



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ - CPQGM**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AUSÊNCIA DE EFEITO DA MEMÓRIA IMUNOLÓGICA A ANTÍGENOS
MICOBACTERIANOS SOBRE A PRODUÇÃO DE IgE E CITOCINAS
EM RESPOSTA A *Dermatophagoïdes pteronyssinus***

THAÍS SILVA PELETEIRO

**Salvador, Bahia – Brasil
2012**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ – CPQGM**

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AUSÊNCIA DE EFEITO DA MEMÓRIA IMUNOLÓGICA A ANTÍGENOS
MICOBACTERIANOS SOBRE A PRODUÇÃO DE IgE E CITOCINAS
EM RESPOSTA A *Dermatophagoides pteronyssinus***

THAÍS SILVA PELETEIRO

Orientadora: Prof^a Dr^a Theolis Costa Barbosa Bessa

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) para obtenção do grau de Mestre.

**Salvador, Bahia – Brasil
2012**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

P382i Peleteiro, Thaís Silva
Ausência de efeito da memória imunológica e antígenos micobacterianos sobre a produção de IgE e citocinas em resposta a *Dermatophagoides pteronyssinus* . [manuscrito] / Thaís Silva Peleteiro . - 2012.
86f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2013.

Orientador: Profª Drª. : Theolis Costa Barbosa Bessa.

1. Alergia 2. *Dermatophagoides pteronyssinus*. 3. Micobacterium 4. Tuberculosis 5. Vacina BCG 6. Imunomodulação I. Título.

CDU 616.2:615.371

“AUSÊNCIA DE EFEITO DA MEMÓRIA IMUNOLÓGICA À ANTÍGENOS MICOBACTERIANOS SOBRE
A PRODUÇÃO DE IGE E CITOCINAS EM RESPOSTA A *Dermatophagoides pteronyssinus*”

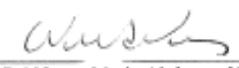
THAÍS SILVA PELETEIRO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Drª Maria Ilma Andrade Santos Araújo
Professor Adjunto I
UFBA



Drª Neuza Maria Alcântara Neves
Professor Colaborador
UFBA



Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho
Pesquisador Titular
CPqGM/ FIOCRUZ

FONTE DE FINANCIAMENTO:

Fapesb

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido o meu guia ao longo de toda a minha trajetória iluminando a minha mente, provendo forças para que eu continuasse de cabeça erguida nos momentos mais difíceis;

Aos meus pais, por todo o apoio, atenção, paciência e compreensão que me foram destinados desejando-me sempre o melhor e confiando meu sucesso;

A minha orientadora Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa, pelo apoio, pela compreensão e confiança no meu potencial, além de ter me concedido a oportunidade de compartilhar conhecimentos que até então, não eram por mim conhecidos;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, que participaram da minha formação acadêmica e profissional;

A equipe do LIMI – em especial ao meu grupo de pesquisa pelo apoio;

Aos meus amigos e colegas, pelas palavras ou gestos de cumplicidade e apoio, além da compreensão da minha ausência ou distância física durante vários momentos, uma vez que precisei dar prioridades aos trabalhos destinados ao mestrado;

A todos os demais que possam ter contribuído indiretamente para elaboração deste trabalho e para minha formação profissional.

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

PELETEIRO, Thaís Silva. Ausência de efeito da memória imunológica a antígenos micobacterianos sobre a produção de IgE e citocinas em resposta a *Dermatophagoides pteronyssinus*. 86 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

Introdução: As doenças respiratórias alérgicas, tais como rinite e asma, afetam elevada proporção da população brasileira. Estima-se que mais de 58 mil pessoas foram afetadas por alguma destas condições no Brasil em 2002-2003. Estudos realizados em humanos e animais sugerem que a exposição ambiental ao *Mycobacterium tuberculosis* ou imunização com o *M. bovis* (vacina BCG), podem estar relacionadas à proteção contra doenças alérgicas. **Objetivo:** Investigar a influência da resposta Th1 a antígenos micobacterianos sobre a modulação da resposta do tipo Th2 ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp). **Métodos:** O estudo compreendeu duas fases. Para avaliar o efeito da resposta à revacinação com o BCG sobre a modulação de uma resposta do tipo Th2 ao Derp, foi realizado um estudo de intervenção randomizado com coorte prospectiva, e os voluntários que participaram compuseram a Amostra 1. Para avaliar o efeito da resposta à infecção latente com *M. tuberculosis* sobre a modulação de uma resposta do tipo Th2 ao Derp, foi feito um estudo de caso-controle e os voluntários que participaram compuseram a Amostra 2. A população foi composta por adultos jovens com idade entre 19 a 33 anos. Todos responderam ao questionário ISAAC, modificado. Foi feita coleta de sangue para quantificação da IgE total, IgE específica ao *D. pteronyssinus* e citocinas das respostas Th1/Th2/inflamatória. **Resultados:** Não houve diferenças, quanto à produção de citocinas, IgE total e específica ao Derp, entre os grupos controle e revacinados ou entre os indivíduos infectados e não infectados. Isso foi verificado pela ausência de diferenças na produção de citocinas ou nos níveis de IgE total e específica ao Derp entre os grupos atópicos e não atópicos das duas amostras avaliadas. **Conclusões:** Não houve influência da resposta Th1 ao *M. bovis* (BCG) ou da resposta Th1 ao *M. tuberculosis* sobre a modulação da resposta do tipo Th2 ao ácaro *D. pteronyssinus*, indicando que o contato com micobactérias não parece afetar a resposta alérgica pré-estabelecida em indivíduos adultos jovens.

Palavras-chave: alergia, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Mycobacterium tuberculosis*, vacina BCG, imunomodulação.

ABSTRACT

PELETEIRO, Thaís Silva. Absence of effect of immunological memory to mycobacterial antigens on the production of cytokines and IgE in response to *Dermatophagoides pteronyssinus*. 86 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

Introduction: Allergic respiratory diseases such as asthma and rhinitis, affecting a high proportion of the Brazilian population. More than 58.000 people have been affected by some of these conditions in Brazil in 2002-2003. Studies in humans and animals suggest that environmental exposure to *Mycobacterium tuberculosis* or immunization with *Mycobacterium bovis* (BCG), may be related to protection against allergic diseases. **Objective:** To investigate the influence of Th1 response to mycobacterial antigens on the modulation of Th2-type response to aeroallergen *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp). **Methods:** The study comprised two phases. To evaluate the effect of the response to revaccination with BCG on the modulation of a Th2-type response to Derp, we conducted a randomized intervention study with prospective cohort, and the volunteers composed the Sample 1. To evaluate the effect of latent response to infection with *M. tuberculosis* on the modulation of a Th2-type response to Derp, a study was made of case-control and the volunteers composed the Sample 2. The population consisted of young adults aged 19 to 33 years. All responded to questionnaire ISAAC modified. Blood sampling was performed for quantification of total IgE, specific IgE to *D. pteronyssinus* and cytokine responses Th1/Th2/inflamatória. **Results:** No significant differences in cytokine production or levels of total and specific IgE to Derp between atopic and non-atopic groups of the two samples. **Conclusions:** There were no differences regarding cytokine production, total and specific IgE to Derp, between the control group and revaccinated or between infected and uninfected individuals indicating that contact with mycobacteria not seem to affect the allergic response in adults young.

Keywords: allergy, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Mycobacterium tuberculosis*, BCG vaccine, immunomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama esquemático mostrando quatro ações importantes do Der p 1 como um alérgeno.	21
Figura 2 – Mecanismos potencialmente envolvidos na hipótese da higiene.	23
Figura 3 – Produção de IL-6 em resposta aos antígenos Derp, PPD e ambos Derp e PPD em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características sócio-demográficas e perfil clínico dos voluntários do estudo.	38
Tabela 2 – Positividade ao teste cutâneo para alergia dos voluntários da Amostra 1.	39
Tabela 3 – Avaliação da produção de IgE específica ao Derp e IgE total em voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1), atópicos e não atópicos, nos tempos zero e dois meses após a intervenção.	41
Tabela 4 – Avaliação da produção de IgE específica ao Derp e IgE total em indivíduos revacinados ou não com BCG (Amostra 1), que apresentaram sintomas de alergias nos últimos 12 meses, nos tempos zero e dois meses após a intervenção.	42
Tabela 5 – Produção de citocinas em resposta ao antígeno Derp em culturas de sangue total dos voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1) positivos para atopia ao antígeno Derp no teste cutâneo ou sorológico.	43
Tabela 6 – Produção de citocinas em resposta ao antígeno Derp em culturas de sangue dos voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1) que foram negativos para atopia ao antígeno de Derp no teste sorológico ou cutâneo.	43
Tabela 7 – Produção de citocinas em resposta ao antígeno Derp em culturas de sangue total dos voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1) que apresentaram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses.	44
Tabela 8 – Produção de citocinas em resposta ao antígeno Derp em culturas de sangue total dos voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1) que não apresentaram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses.	45
Tabela 9 – Avaliação da produção de IgE específica ao Derp, IgE total e TGF- β em voluntários da Amostra 2 portadores de LTBI e controles atópicos e não atópicos.	46
Tabela 10 – Avaliação da produção de IgE específica ao Derp e IgE total em indivíduos da Amostra 2 portadores de LTBI e controles que apresentaram sintomas de alergia nos últimos 12 meses.	46
Tabela 11 – Produção de citocinas em resposta a Derp em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2 positivos para atopia ao antígeno de Derp no teste sorológico.	47
Tabela 12 – Produção de citocinas em resposta a Derp em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2 que foram negativos para atopia ao antígeno de Derp no teste sorológico.	48

Tabela 13 – Produção de citocinas em resposta a Derp em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2 que apresentaram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses. 49

Tabela 14 – Produção de citocinas em resposta a Derp em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2 que não apresentaram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses. 49

Tabela 15 – Produção de citocinas em resposta a Derp, PPD e ambos Derp e PPD em culturas de sangue total dos voluntários da amostra 2. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

CPqGM – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

CBA (*cytometric bead array*) – Método citométrico multi-ensaio

CD (*cluster of differentiation*) – Agrupamento de diferenciação

Derp – extrato do ácaro da poeira doméstica *Dermatophagoides pteronyssinus*.

Der p 1 – Alérgeno do grupo 1 do ácaro *D. pteronyssinus*

EBMSP – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Fc – Fragmento cristalizável

FcεRI – Receptor de alta afinidade para a região constante carboxiterminal das moléculas IgE que é expresso nos mastócitos e basófilos.

IFN-γ – Interferon gama

Ig – Imunoglobulina

IgE – Imunoglobulina E

IL – Interleucina

ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*) – Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância

LTBI (*latent tuberculosis infection*) – Infecção tuberculosa latente

MS – Ministério da Saúde

Mtb (*Mycobacterium tuberculosis antigen*) – antígeno total lisado de *M. tuberculosis*

NK cells (natural killer cells) – Células exterminadoras naturais

OMS – Organização Mundial da Saúde

OVA – Ovalbumina

PPD (*purified protein derivative*) – Derivado protéico purificado

TB - Tuberculose

T CD4⁺ – Células T auxiliares expressando a molécula de superfície CD4

TGF- β (*transforming growth factor beta*) – Fator transformador de crescimento β

Th1 – Linfócito T auxiliar 1 (*helper*)

Th2 – Linfócito T auxiliar 2 (*helper*)

Th17 – Linfócito T auxiliar (*helper*) 17

TNF (tumor necrosis factor) – Fator de necrose tumoral

T_{reg} – células T reguladoras

TST (*tuberculin skin test*) – Teste tuberculínico

UFBA – Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Resposta imune alérgica	17
2.2 Alérgenos da poeira domiciliar	18
2.2.1 Resposta imune ao Der p 1	19
2.3 Modulação da resposta alérgica por agentes infecciosos	21
2.4 Desvio Th1/Th2	23
2.5 Células T reguladoras e seu papel nas alergias	24
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Desenho do estudo	27
4.2 População do estudo	27
4.2.1 Critérios de inclusão e exclusão	28
4.3 Locais de realização	30
4.4 Testes cutâneos	30
4.4.1 Teste tuberculínico (TST)	30
4.4.2 Teste de punctura para sensibilidade a aeroalérgenos	31
4.5 Coleta de sangue	32
4.6 Avaliações sorológicas	32
4.7 Avaliações no sobrenadante de culturas	33
4.8 Imunoensaios	34
4.8.1 Método citométrico multi-ensaio	34
4.9 Análise de dados	35
4.9.1 Variáveis do estudo	35
4.9.2 Análises citofluorométricas	35
4.9.3 Testes estatísticos	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Características da população do estudo	37
5.2 Performance dos testes para atopia	39
5.3 Modificações da resposta de IgE após a revacinação com BCG	40
5.4 Modificação da resposta <i>in vitro</i> ao Derp após a revacinação com BCG	42
5.5 Resposta sorológica em indivíduos com infecção tuberculosa latente	45
5.6 Resposta <i>in vitro</i> ao Derp em indivíduos com infecção tuberculosa latente	47
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	59

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de consentimento da Amostra 1

Apêndice B – Termo de consentimento da Amostra 2

Apêndice C – Questionário geral

Apêndice D – Questionário de doenças respiratórias

Apêndice E – Parecer no 19/2002

Apêndice F – Parecer no 117/2006

Apêndice G – Protocolo

Apêndice H – Manuscrito em preparação para submissão ao *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* (JACI) sob o formato *Letter to the Editor*

1. INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias alérgicas, tais como rinite e asma, afetam elevada proporção da população brasileira. A prevalência de pessoas afetadas por alguma destas condições no Brasil foi maior que 58 mil pessoas em 2002-2003 (SOLÉ et al., 2006). Dentre estas condições, a asma recebe maior atenção, por ser causa de internamentos e óbitos.

A asma é uma das doenças crônicas mais comuns do mundo. Estima-se que aproximadamente 300 milhões de pessoas são acometidas por asma (MASOLI et al., 2004). De acordo com os dados estatísticos mais recentes, em 2011 a asma foi responsável por 178.156 internações (997 em Salvador-BA), sendo a média nacional de permanência em hospitalização de 3,0 dias. Os gastos com internamento por asma em 2011 atingiram R\$ 94.239.782,82 no Brasil e R\$ 587.388,75 em Salvador, o que demonstra o elevado custo social em decorrência desta enfermidade. A frequência de mortalidade por asma em 2011 foi de 0,43% no Brasil e de 0,40% em Salvador-BA (DATASUS, 2011). Por outro lado, vários inquéritos epidemiológicos, estudos de imunopatologia e clínicos demonstram a inter-relação entre a asma e a rinite alérgica, a qual é evidenciada por características imunopatológicas semelhantes. Ambas consistem em manifestações de uma enfermidade sistêmica, e o controle da rinite favorece o controle da asma (IBIAPINA et al., 2006).

A resposta imune associada às alergias respiratórias é caracterizada, basicamente, pela participação das células Th2, as quais produzem citocinas a exemplo da IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Células do tipo Th1 produzem citocinas inflamatórias a exemplo da IL-2, IFN- γ e TNF, que são reconhecidas por inibirem a resposta do tipo Th2 (OKADA et al., 2010). Além do paradigma Th1/Th2, as células T reguladoras também atuam na supressão das células Th2. As citocinas TGF- β e IL-10, produzidas, principalmente, pelas células T reguladoras, podem suprimir a produção de IgE. As células T reguladoras podem também suprimir células efetoras da inflamação alérgica como mastócitos, basófilos e eosinófilos (JUTEL & AKDIS, 2011).

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento da incidência de doenças alérgicas. Algumas razões para explicar este aumento estão sintetizadas na *Hipótese da higiene*, proposta por Strachan D.P (1989), a qual postula que a

melhoria das condições de saúde dos indivíduos na infância, devido a mudança no estilo de vida da população mundial como saneamento, urbanização, dieta, vacinação, e a menor exposição a infecções virais e bacterianas ocorrida nas últimas décadas, estaria diretamente ligada a manutenção da resposta imune Th2 predispondo o desenvolvimento de hipersensibilidade a alérgenos ambientais e a manifestações de alergias. Paralelo ao aumento da incidência das doenças alérgicas também, foi verificado um decréscimo na incidência e prevalência de infecções virais e bacterianas (OKADA et al., 2010).

Os principais alérgenos associados à asma e alergias respiratórias são os componentes dos ácaros presentes na poeira doméstica. Estudos realizados em diferentes países investigaram a exposição aos alérgenos de ácaros e encontraram associação entre a exposição e a ocorrência de alergia e asma (Platts-Mills & de Weck, 1989). O *Dermatophagoides pteronyssinus* é um dos ácaros da poeira doméstica que estão mais relacionados com fenômenos alérgicos e o principal alérgeno do ácaro *D. pteronyssinus* é o alérgeno 1, denominado Der p 1 que consiste numa enzima do trato digestivo do ácaro que é secretada em suas fezes (SHARMA et al, 2003).

O tratamento das doenças alérgicas consiste em medidas ambientais para evitar a exposição aos alérgenos, dessensibilização, administração de agentes anti-inflamatórios, principalmente, corticosteróides (BOYCE et al., 2012). Embora as duas últimas formas de tratamento sejam efetivas para o controle sintomático, são capazes de provocar múltiplos efeitos colaterais como imunossupressão, susceptibilidade a infecções, complicações metabólicas, alterações no crescimento, dentre outros (IBIAPINA et al., 2006).

Estudos indicam que a imunoterapia específica (ITE) com alérgenos identificados e o anticorpo monoclonal anti-IgE apresentam-se como tratamentos promissores para rinite alérgica e asma, com benefícios ao longo prazo, caso sejam administradas doses adequadas de alérgenos padronizados. No entanto, a ITE encontra-se relacionada ao risco de reações anafiláticas e o efeito clínico pode ser incompleto no primeiro ano de tratamento, podendo requerer anos para tornar-se plenamente efetivo (IBAPINA et al., 2006). A imunoterapia contra estas doenças é vista como eficiente em pacientes que apresentam sinais e sintomas resistentes ao tratamento tradicional (BAPTISTELLA et al., 2009).

São poucos os estudos realizados em humanos que tenham como propósito investigar como seria a modulação da resposta alérgica a partir da exposição a antígenos micobacterianos. Além disso, os mecanismos específicos envolvidos na inibição da resposta alérgica após exposição a antígenos micobacterianos não são, no entanto, completamente esclarecidos, pois, grande parte desses estudos realizados em humanos avalia apenas as evidências clínicas e epidemiológicas, associando a exposição aos produtos microbianos e a ocorrência de manifestações alérgicas, não explorando as modificações da resposta imune causada pela exposição a estes antígenos.

Conhecer como a resposta a alérgenos pode ser modificada no contexto da exposição a agentes microbianos fortes indutores da resposta Th1, como as micobactérias, poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas para doenças alérgicas. Diante do exposto, no presente estudo, propomos verificar se a resposta imune contra antígenos micobacterianos têm a capacidade de influenciar as respostas imunes elicítadas por alérgenos comuns em nosso meio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O termo alergia foi definido por Clemens Von Pirquet em 1906, como “uma capacidade alterada do corpo de reagir a uma substância estranha”, sendo tal definição bastante ampla, incluindo todas as reações imunológicas. A alergia refere-se a certas doenças nas quais ocorrem respostas imunológicas a antígenos ambientais, os alérgenos, causando inflamação tecidual e disfunção orgânica (GALLI et al., 2008). O desencadeamento da resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e da predisposição genética do hospedeiro. A atopia refere-se a uma predisposição hereditária a responder imunologicamente a alérgenos comuns de ocorrência natural, havendo contínua produção de IgE (EIFAN et al., 2009)

As doenças alérgicas estão associadas à produção de IgE específica ao alérgeno e à expansão de populações de células T específicas ao alérgeno. Tais doenças apresentam prevalência elevada no mundo desenvolvido e incluem rinite alérgica, dermatite atópica (também conhecida como eczema), asma alérgica (ou atópica) e algumas alergias alimentares (GALLI et al., 2008).

2.1 RESPOSTA IMUNE ALÉRGICA

Os indivíduos que são expostos, repetidamente, aos alérgenos não apresentam estimulação das respostas imunes inatas que poderiam promover a ativação de macrófagos, e a secreção de citocinas indutoras da resposta Th1. Nesse caso, as células dendríticas capturam os antígenos (alérgenos) no epitélio, transportam para os linfonodos drenais, onde há o processamento antigênico, e apresentam às células T CD4+ naive. Tais células T diferenciam-se no subtipo de células efetoras TCD4+ tipo 2 (células Th2). As células Th2 induzem a produção de IgE, pelas células B, principalmente através da ação das citocinas IL-4 e IL-13 (JUTEL & AKIDS, 2011).

A IgE produzida, liga-se a alérgenos e a receptores de alta afinidade (FcεRI) localizados na superfície de mastócitos e basófilos, levando a degranulação destas

células. Os grânulos liberados são ricos em leucotrienos, histamina e citocinas pro-inflamatórias, os quais acarretam espasmos da musculatura lisa e iniciam a resposta inflamatória das vias aéreas, ocasionando coriza, espirros e broncoespasmo. Esta resposta é também responsável pela reação de hipersensibilidade imediata dos testes cutâneos aos aeroalérgenos. A IgE específica para estes antígenos liga-se ainda a receptores de baixa afinidade de (FCεRII) de eosinófilos, linfócitos, plaquetas e macrófagos, intensificando e modulando a resposta inflamatória através da produção de IL-4, que estimula a produção de IL-5, IL-13 e demais citocinas e moléculas envolvidas na resposta Th2 (NANDAKUMAR et al., 2009).

Com relação às funções das citocinas envolvidas nas respostas Th2, a IL-13 parece ser importante para o desenvolvimento da hiperreatividade das vias aéreas e a produção de muco. A IL-4 e a IL-13 promovem o *switch* de classe da imunoglobulina, induzindo a produção da IgE, enquanto a IL-5 estimula a diferenciação de eosinófilos na medula óssea, além de aumentar a capacidade dos eosinófilos de liberar o conteúdo dos grânulos. A IL-9 atua na proliferação e diferenciação de mastócitos, estimula a proliferação das células T ativadas e aumenta a produção de imunoglobulinas pelas células B (GREGORY et al., 2009). Na fase tardia da resposta alérgica, após 6 a 12h do contato com o alérgeno, há também a participação das células Th1. Verificou-se que na asma, por exemplo, tais células induzem apoptose do epitélio do músculo liso dos brônquios (JUTEL & AKDIS, 2011).

2.2 ALÉRGENOS DA POEIRA DOMICILIAR

Os ácaros da poeira são animais minúsculos (100 a 400 µm), pertencentes ao Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Subclasse Acari e Ordem Acariformes. Esta última se divide em Subordens definidas principalmente por características do trato respiratório, como a presença ou ausência de estigmas ou espiráculos, e as disposições dos mesmos em seus corpos (FLECHTMAN, 1975). Entre os ácaros da poeira, aqueles que estão mais relacionados com fenômenos alérgicos são: *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus* em

países temperados e *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* em países tropicais (VOORHOST et al., 1967).

Investigações sobre o impacto do ambiente doméstico em crianças e adultos mostrou que há realmente esta ligação entre alérgenos potentes de ácaros da poeira doméstica (HDM) *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp) ou *Dermatophagoides farinae* (Derf) e a ocorrência da asma alérgica em pacientes (SHARMA et al., 2003). Mais que 50% das crianças e adolescentes portadores de asma são sensibilizados aos ácaros da poeira doméstica. Além disso, independentemente da asma, o desenvolvimento da sensibilidade aos ácaros predispõe tais indivíduos a deficiências na função pulmonar em comparação aos não sensibilizados (GAFFIN & PHIPATANAKUL, 2009).

Grande parte dos alérgenos de *D. pteronyssinus* são elementos presentes no corpo ou na matéria fecal dos ácaros. Os alérgenos relacionados às fezes são originados do trato gastrointestinal do ácaro e alguns desses também se encontram presentes em sua saliva. Outra provável fonte de alérgenos dessa espécie inclui enzimas associadas aos processos de mudanças de estágios. Der p 1 é o maior alérgeno do ácaro da poeira doméstica e nove antígenos diferentes Derp têm sido identificados (Der p 1-9). O Der p 1 é uma cisteína protease, uma proteína de 30-kDa que é produzida no intestino do ácaro, onde seu papel é participar da digestão de substratos alimentares incluindo a queratina humana (ARLIAN & PLATTS-MILLS, 2001).

2.2.1 Resposta imune ao Der p 1

Há poucos relatos na literatura que buscam explicar como o Der p 1 participa no desenvolvimento da inflamação brônquica alérgica. Alguns utilizam modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (SHARMA et al., 2003). O Der p 1 pode apresentar efeitos imunomodulatórios diretos através da clivagem ou modulação negativa do CD23 nos linfócitos B, CD 25 nos linfócitos T e CD40 nas células dendríticas, bem como através de rupturas das junções intercelulares no epitélio brônquico, ocasionando o aumento da permeabilidade celular (BISCHOF et al., 2008). CD 23 é um receptor de superfície celular encontrado em linfócitos B, eosinófilos e células

dendríticas. Embora o papel preciso de CD23 em eosinófilos e células dendríticas permaneça desconhecido, evidências consideráveis sugerem que a ligação de IgE a CD23 na superfície das células B promove um *feedback* negativo para a síntese de IgE. Uma vez que a molécula humana CD23 tem sido vista como sensível a clivagem por cisteinil-proteases, tais como o Der p 1, infere-se que o alérgeno contribui para o aumento da síntese de IgE através da inibição do mecanismo de *feedback* negativo da produção de IgE por linfócitos B. Neste cenário, a síntese da IgE específica ao Der p 1 ou contra outros alérgenos será elevada, resultando no realce das respostas alérgicas não específicas (SHARMA et al., 2003).

Outros estudos evidenciaram que o Der p 1 também cliva a subunidade α do receptor IL-2 (CD 25) dos linfócitos T do sangue periférico. Tem sido visto que em consequência desta clivagem a proliferação de células T produtoras de IFN- γ é marcadamente reduzida, o que sugere que a clivagem por Der p 1 pode desviar a resposta imune para o tipo Th2. A importância da atividade da cisteína protease do Der p 1 tem sido demonstrada ainda pela sua capacidade de aumentar tanto a síntese da IgE total quanto a síntese da IgE específica ao Der p 1 *in vivo*, ações inibidas pelo inibidor irreversível da protease E-64 (GHAEMMAGHAMI & SHAKIB, 2002).

O Der p 1 pode ainda induzir diretamente danos no epitélio através da atividade da cisteína protease. Um estudo demonstrou que o Der p 1 provocou rupturas nas junções epiteliais através da clivagem, ocasionando liberação de produtos solúveis, o que facilitou o movimento do alérgeno através do epitélio. Der p 1 também é capaz de inibir a atividade da α_1 -antitripsina, uma antiprotease que se encontra envolvida na regulação homeostática do ambiente das vias aéreas, sendo vista como inibidora de outras proteases tais que poderiam ocasionar danos celulares, como exemplo, elastase neutrófila e proteases bacterianas. Dessa forma, o Der p 1 pode fazer modulação negativa da α_1 -antitripsina, resultando na queda da defesa contra outras proteases, conduzindo aos danos provocados nos epitélio (BISCHOF et al., 2008).

O Der p 1 induz a resposta imune do tipo Th2, tendo como consequência uma resposta alérgica inflamatória. Estudos realizados em humanos mostram que o Der p 1 e outros alérgenos do ácaro da poeira doméstica induzem mudanças no sistema imunológico de indivíduos sensibilizados. O desafio brônquico com estes alérgenos resulta no recrutamento de linfócitos T auxiliares, neutrófilos, eosinófilos e

mastócitos. A ativação dos mastócitos e eosinófilos resulta na liberação de mediadores pró-inflamatórios tais como histamina, prostaglandinas e leucotrienos, ocasionando as manifestações clínicas alérgicas (SHARMA et al., 2003). A figura 1 mostra algumas ações do alérgeno Der p 1:

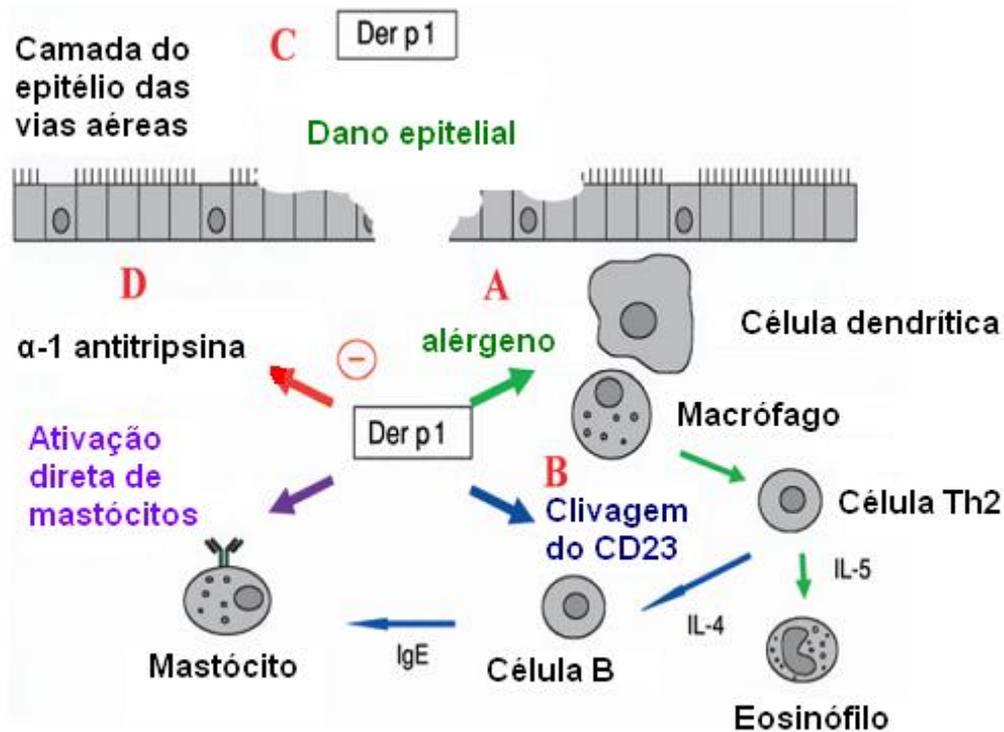


Figura 1 – Diagrama esquemático mostrando quatro ações importantes do Der p 1 como um alérgeno (adaptada de Sharma et al., 2003); (a), através da clivagem do DC23 (b), ocasionando danos diretamente no epitélio (c) e inibição da α_1 -antitripsina (d).

2.3 MODULAÇÃO DA RESPOSTA ALÉRGICA POR AGENTES INFECCIOSOS

Especula-se que uma interação entre fatores genéticos e ambientais poderia contribuir para o surgimento e manutenção de doenças alérgicas tais como asma brônquica e dermatite atópica (ROMAGNANI, 2007). Ao longo dos últimos 30-40 anos, foi observado nos países ocidentais um aumento na incidência e prevalência de desordens atópicas, sem explicações específicas o que estimulou investigações

para identificação das prováveis causas e tomada de medidas preventivas (BLOOMFIELD et al., 2006).

Algumas razões para explicar este aumento da incidência de doenças alérgicas estão sintetizadas na hipótese da higiene, proposta por Strachan D.P (1989), a qual postula que a melhoria das condições de saúde dos indivíduos na infância (devido à mudança no estilo de vida da população mundial como saneamento, urbanização, dieta, vacinação, menor exposição a infecções) ocorrida nas últimas décadas, pudesse estar diretamente relacionada à menor exposição a infecções virais e bacterianas, predispondo os indivíduos ao desenvolvimento de hipersensibilidade a alérgenos ambientais e a manifestações de alergia (OKADA et al., 2010). Estudos mostram que infecções por helmintos como o *Shistosoma mansoni*, por exemplo, podem modular o sistema imune através da ação da citocina IL-10, o que contribui para uma diminuição da resposta Th2 (PRIOULT & NAGLER-ANDERSON, 2005).

Inicialmente, dois subtipos de linfócitos foram descritos: Th1 e Th2, representando dessa forma um paradigma binário Th1/Th2. Depois, novos subtipos de células T auxiliares foram caracterizados como importantes reguladores da resposta imune, a exemplo das células T reguladoras (JUTEL & AKDIS, 2011). Um resumo dos mecanismos potencialmente envolvidos na teoria da higiene encontra-se esquematizado na figura 2:

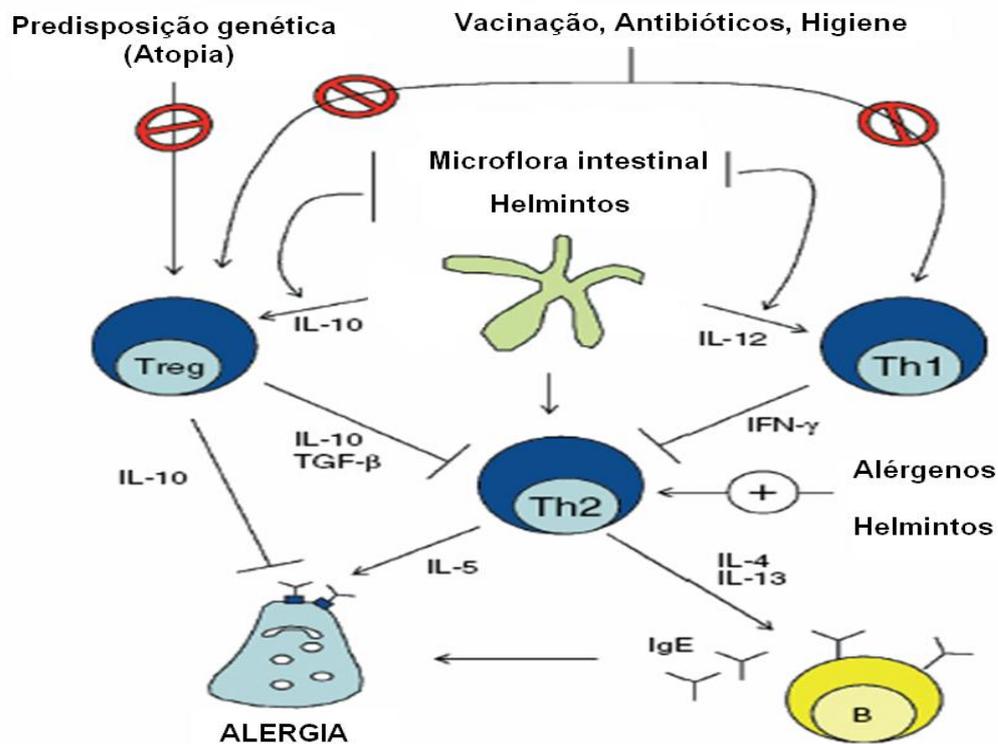


Figura 2 - Mecanismos potencialmente envolvidos na hipótese da higiene (adaptada de PRIOULT & NAGLER-ANDERSON, 2005). Células Th2 específicas ao alérgeno são moduladas negativamente tanto pelas células Th1 quanto pelas células T reguladoras (T_{regs}). Células Th1 atuam através da produção de $IFN-\gamma$, enquanto a supressão pelas T_{regs} é mediada principalmente através da IL-10 e do TGF- β . A redução da ocorrência das doenças infecciosas decorrente de programas de vacinação, do uso de antibióticos, e elevados padrões de higiene resultou no decréscimo da ativação das células Th1 e na indução insuficiente da rede imunorregulatória. Além disso, T_{regs} não são estimuladas adequadamente em indivíduos atópicos com predisposição genética à alergia. Juntas, estas observações podem ajudar a explicar por que a prevalência de doenças mediadas pela resposta Th2 como as alergias têm aumentado ao longo dos últimos 20 anos. A manipulação da microflora intestinal e o tratamento com bactérias da microflora normal são promissores para a modulação das células Th1 e T_{regs} . As infecções por helmintos e os alérgenos induzem a resposta Th2 polarizada. No entanto, infecções por helmintos também induzem IL-10 secretada por T_{regs} , a qual previne o desenvolvimento da atopia.

2.4. DESVIO TH1/TH2

O desvio Th1/Th2 foi o primeiro mecanismo para explicar a influência protetora dos agentes infecciosos sobre as doenças imunológicas. Os subtipos de células TCD4+ são categorizados baseando-se em suas funções celulares distintas e capacidade de secreção de citocinas (AKIDS & JUTEL, 2011). Células do tipo Th1

produzem citocinas inflamatórias como IL-2, IFN- γ e TNF, que são reconhecidas por inibirem a resposta do tipo Th2. Do contrário, células Th2 que produzem IL-4, IL-5 e IL-13 contribuem para produção de IgE e respostas alérgicas. Devido à recíproca modulação negativa de células Th1 e Th2, alguns autores sugeriram, inicialmente, que nos países desenvolvidos a falta do contato microbiano nos primeiros anos de vida, que normalmente favorece um forte desvio para imunidade do tipo Th1, redireciona a resposta imune para o fenótipo Th2, predispondo o indivíduo a doenças alérgicas (OKADA et al., 2010).

2.5 CÉLULAS T REGULADORAS E SEU PAPEL NAS ALERGIAS

As células T reguladoras consistem num subtipo de células T CD4 positivas que apresentam capacidade de manutenção da tolerância imune e prevenção das doenças inflamatórias (CAMPBELL & KOCH, 2011). Subtipos de células T CD8+, células T $\gamma\delta$, células dendríticas (DCs), células B produtoras de IL-10, células natural killer (NK) e células residentes do tecido que podem promover a geração de células T reguladoras, também podem participar dos eventos supressores e regulatórios (JUTEL & AKIDS, 2011).

Entre as células T, várias subpopulações apresentam propriedades reguladoras, como as células Tr1, produtoras de IL-10, que suprimem algumas respostas de células T *in vivo*, as células Tr3, capazes de suprimir mediante a produção de TGF- β , além dos linfócitos T duplo-negativos (CD4-CD8-) e linfócitos T CD8+Qa1+. Além das células T, outros tipos celulares foram descritos com tais propriedade, entre elas as células B CD1+, produtoras de IL-10. Para exercerem sua função, as células imunorreguladoras apresentam, como propriedades básicas, a capacidade de produção de citocinas imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β , além da capacidade de indução de supressão mediada por contato célula-célula. Atuam numa complexa rede de mecanismos regulatórios destinados a assegurar a modulação das respostas imunológicas diante dos diversos antígenos provenientes de agentes infecciosos, tumores, aloantígenos, auto-antígenos e alérgenos (CRUVINEL et al., 2008).

Estudos mostram que as células T reguladoras atuam na supressão das células Th2, mostrando múltiplos efeitos no controle da resposta imune específica ao alérgeno e inflamação alérgica (ROBINSON et al., 2009). Como exemplo, células T reguladoras contra alérgenos da mucosa, tais como ácaro da poeira doméstica, grãos de pólen, alérgenos alimentares, produzem IL-10 e TGF- β , que estão relacionadas à supressão da produção de IgE específica ao alérgeno, supressão de células Th2 que ativam mastócitos e basófilos inibindo a resposta alérgica (JUTEL & AKIDS, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência da resposta Th1 a antígenos micobacterianos sobre a modulação da resposta do tipo Th2 ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da resposta à revacinação com *M. bovis* BCG sobre a capacidade de resposta de indivíduos atópicos e não atópicos a antígenos de *D. pteronyssinus* *in vivo*, medida pela produção de IgE total e específica para Derp no soro.
- Avaliar o efeito da resposta à revacinação com *M. bovis* BCG sobre a capacidade da resposta de indivíduos atópicos e não atópicos a antígenos de *D. pteronyssinus* *in vitro* (medida pela produção de citocinas Th1/Th2/ inflamatórias em culturas de sangue total ao antígeno Derp).
- Avaliar o efeito da resposta à infecção latente com *M. tuberculosis*, medida a partir da positividade ao teste tuberculínico, sobre a capacidade de produção no soro de IgE sérica total e específica para Derp.
- Avaliar o efeito da resposta à infecção latente com *M. tuberculosis*, medida a partir da positividade ao teste tuberculínico, sobre a capacidade de produção de citocinas Th1/Th2/ inflamatórias em culturas de sangue total estimuladas com Derp.
- Avaliar, em indivíduos infectados com *M. tuberculosis*, a capacidade da resposta *in vitro* ao derivado protéico purificado (PPD) interferir sobre a resposta *in vitro* ao Derp, medido pela produção de citocinas Th1/Th2/inflamatórias em culturas de sangue total.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

O estudo compreendeu duas fases. Para avaliar o efeito da resposta à revacinação com o *M. bovis* BCG sobre a modulação da resposta do tipo Th2 ao Derp, foi realizado um estudo de intervenção randomizado com coorte prospectiva, e os voluntários que participaram deste estudo compuseram a AMOSTRA 1. Para avaliar o efeito da resposta à infecção latente com *M. tuberculosis* sobre a modulação da resposta do tipo Th2 ao Derp, foi feito um estudo transversal, e os voluntários que participaram deste estudo compuseram a AMOSTRA 2. O poder estimado para a determinação de um efeito moderado ($h=0.5$) em testes inferenciais de proporções para uma amostra de 30 indivíduos, considerando nível de significância de 0.05, é de 78%. Infelizmente não foi possível obter este número de indivíduos na Amostra 2 devido ao tempo reduzido para a coleta de amostras e variabilidade na frequência dos voluntários no local de captação (Hospital Especializado Octávio Mangabeira).

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A Amostra 1 foi composta por indivíduos negativos ao teste tuberculínico (TST), com cicatriz vacinal sugestiva de vacinação prévia com BCG avaliados em um inquérito para detecção de infecção tuberculosa latente em duas universidades de Salvador, Bahia, Brasil (ROCHA et al., 2012), que foram randomizados para receber ou não uma segunda dose da vacina *M. bovis* BCG. Setenta e cinco voluntários TST negativos foram divididos nos grupos controle e revacinado sendo compostos por 29 e 46 indivíduos respectivamente. Os voluntários alocados para o grupo revacinado receberam 0,1 mL de vacina *M. bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guérin, cepa Moreau, gentilmente, cedida pela Fundação Atauilpho de Paiva e pela Divisão Epidemiológica do SUS – Bahia, administrada na região deltoide do braço

direito por injeção subcutânea, por técnico treinado e segundo a técnica padrão recomendada pelo Ministério da Saúde.

A Amostra 2 foi composta por 8 voluntários sem infecção tuberculosa (TST negativos) comparados com 12 indivíduos infectados (TST positivos).

Os voluntários recrutados para este estudo tiveram a oportunidade de esclarecimento, verbalmente e por escrito, de todas as dúvidas a respeito do teste tuberculínico e revacinação com BCG (aos que foram revacinados) e a possibilidade de apresentarem reações adversas aos procedimentos realizados no âmbito do estudo, não apenas com a equipe envolvida na coleta, como com os coordenadores do estudo e com médico pneumologista da equipe.

Dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foram adotados, respeitando as peculiaridades do estudo para a Amostra 1 (Apêndice A) e para a Amostra 2 (Apêndice B). Os voluntários que concordaram participar de cada uma destas fases do estudo assinaram o respectivo TCLE, estando cientes de todos os procedimentos adotados. Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CEP- CPqGM/FIOCRUZ, Parecer nº 19/2002, Extensão 3).

Todos os voluntários responderam a questionários padronizados com o propósito de avaliar as condições gerais de saúde, doenças crônicas, fatores demográficos, fatores de risco para a tuberculose e a ocorrência de alergias respiratórias. Esta última foi avaliada através do questionário ISAAC *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (1998). Os questionários aplicados estão reproduzidos nos Apêndices C e D. Foram considerados alérgicos, os voluntários que relataram no questionário sintomas de alergias nos últimos 12 meses.

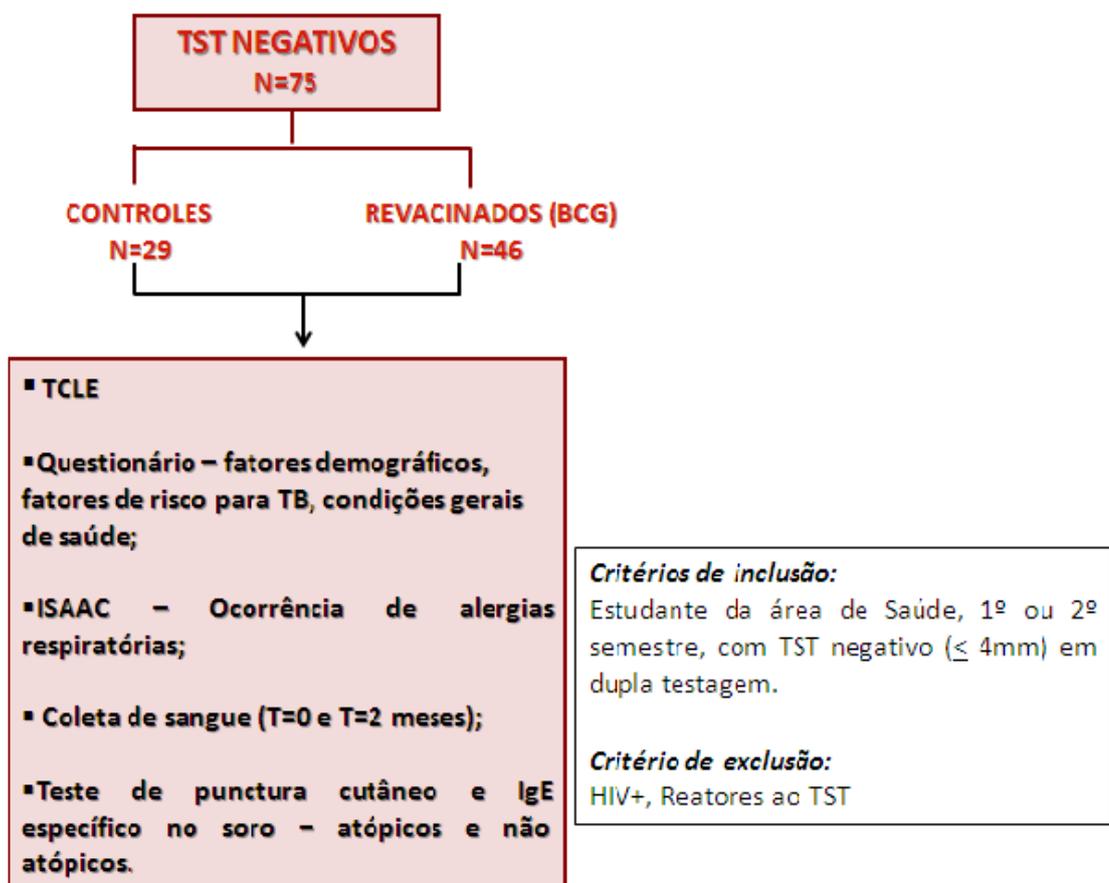
4.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Para a Amostra 1, os critérios de inclusão foram os seguintes: estudantes da área de saúde, cursando 1º ou 2º semestres de medicina, enfermagem,

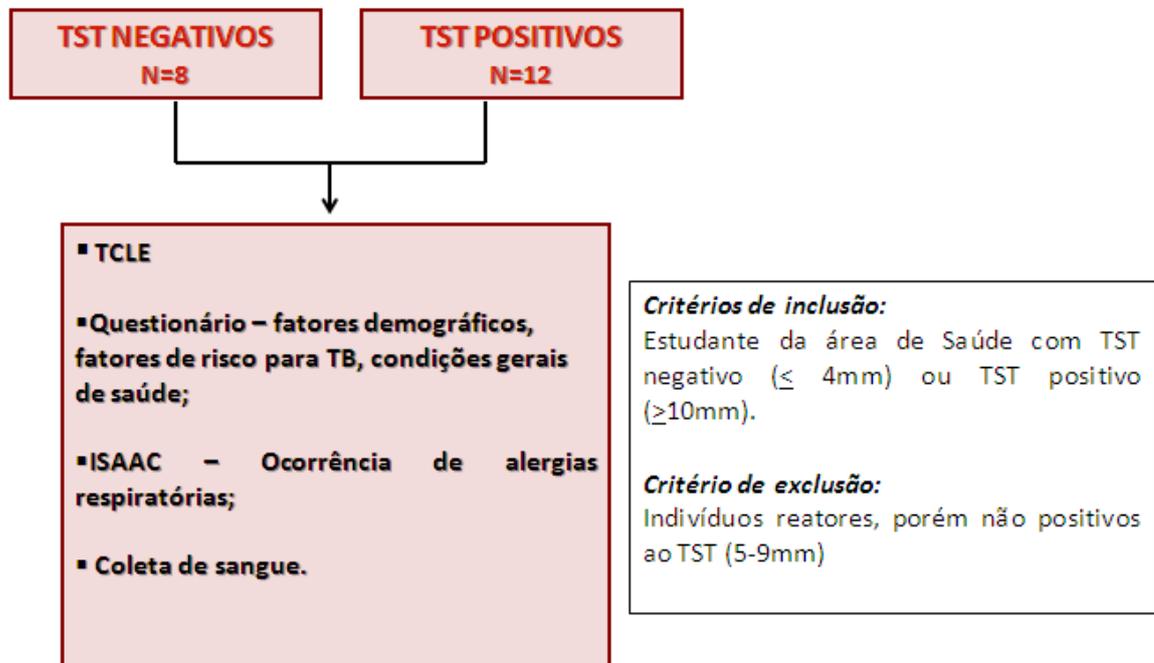
fonoaudiologia, fisioterapia, farmácia, nutrição, odontologia, apresentando teste cutâneo padrão com antígenos micobacterianos (derivado protéico purificado, TST) negativo (valores menores ou iguais a 4 mm), em dupla testagem. Como critérios de exclusão, definimos indivíduos HIV positivo e indivíduos reatores ao TST.

Para a Amostra 2, os critérios de inclusão foram os seguintes: estudantes da área de saúde, apresentando teste cutâneo padrão com antígenos micobacterianos (derivado protéico purificado, TST) negativo ou apresentando o referido teste positivo (valores maiores ou iguais a 10 mm), em uma única testagem, conforme o costume da rotina do laboratório do hospital. Como critérios de exclusão, definimos indivíduos reatores, porém não positivos ao TST (valores entre 5 e 9 mm).

Desenho experimental: AMOSTRA 1



Desenho experimental: AMOSTRA 2



4.3 LOCAIS DE REALIZAÇÃO

O recrutamento dos voluntários da amostra 1 foi realizado na Universidade Federal do Estado da Bahia (UFBA) e na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). O recrutamento dos voluntários da amostra 2, foi realizado no Setor de Medicina Ocupacional do Hospital Especializado Octávio Mangabeira (HEOM). Os experimentos e análises dos resultados foram feitos no CPqGM/Fiocruz.

4.4 TESTES CUTÂNEOS

4.4.1 Teste tuberculínico (TST)

O teste tuberculínico é atualmente empregado no Brasil como padrão para o reconhecimento de portadores de infecção tuberculosa (MS, 2012). A administração e leitura do resultado do teste foram realizadas de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde por técnicas treinadas. Os voluntários foram submetidos à injeção subcutânea de 0,1ml de Derivado Protéico Purificado do lisado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD, RT23, Staatens Serum Institut, Dinamarca, gentilmente cedido pela Diretoria de Vigilância Epidemiológica do Sistema Único de Saúde do Estado da Bahia – DIVEP – SUS/BA), correspondente a 2 unidades tuberculínicas (TU), na porção anterior do antebraço direito. A leitura foi realizada entre 48 e 72 horas após a administração do PPD. Foram considerados negativos os voluntários que apresentaram endureção inferior a 5 mm. Foram considerados reatores os indivíduos que apresentaram endureção igual ou superior a 5 mm, e positivos aqueles indivíduos com endureção igual ou superior a 10mm (MS, 2012).

Na Amostra 1, a aplicação foi repetida para os voluntários negativos transcorridos 7 a 10 dias da primeira aplicação, no antebraço contralateral, de acordo com o estudo de (OLIVEIRA et al., 2013). Foram considerados aptos a participar do estudo apenas os voluntários que apresentaram endureção com diâmetro inferior a 5mm em ambas as aplicações.

4.4.2 Teste de punctura para sensibilidade a aeroalérgenos

O teste de punctura cutâneo (TPC) foi realizado utilizando kit comercialmente disponível para diagnóstico da reatividade a aeroalérgenos (ALK-Abelló, São Paulo, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante. Vinte e cinco microlitros de solução de extrato de *D. pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *B. germânica*, *Periplaneta americana*, epitélio de cão, epitélio de gato, mistura de polens IV (*Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense* e *Poa pratenses*) e fungos V (*Aspergillus amstelodami*, *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. terreus*, *Penicillium brevicompactum*, *P. expansum*, *P. notatum* e *P. roqueforti*, *Cladosporium fulvum* e *C. herbarum*) foram colocados individualmente sobre punções superficiais realizadas no antebraço direito do voluntário, sendo utilizada uma lanceta de aço inoxidável, calibrada, estéril, com precisão de 0,016mL (ALK-Lancet®, ALK-Abelló,

São Paulo, Brasil). Também foram utilizadas salina e histamina a 10,0 mg/mL como controles negativo e positivo, respectivamente. O diâmetro da reação foi medido após 15 minutos e o resultado foi considerado positivo quando o diâmetro da reação foi maior ou igual a 3 mm, e negativo quando o diâmetro foi igual ou menor a 3 mm.

4.5 COLETA DE SANGUE

O sangue foi coletado em seringa ou tubo a vácuo heparinizados (20 mL) e em tubo a vácuo sem anticoagulante (5 mL). Para os voluntários da Amostra 1, foram realizadas duas coletas, uma na ocasião do recrutamento para o estudo (tempo zero, T0) e outra dois meses após este momento (tempo de dois meses, T2), de acordo com o estudo realizado anteriormente pelo grupo (BARBOSA et al, 2003). Os voluntários randomizados para o grupo revacinado tiveram a coleta de sangue do T0 realizada antes da administração da vacina e do teste cutâneo para aeroalérgenos. Para os voluntários da Amostra 2, foi realizada uma única coleta de sangue no momento do recrutamento.

4.6 AVALIAÇÕES SOROLÓGICAS

O sangue sem anticoagulante foi centrifugado para obtenção do soro à temperatura ambiente por 10 minutos a 500+g. O soro obtido foi aliquoteado em duas amostras e estocado no freezer a -20°C até o momento da realização de imunoensaios. As avaliações sorológicas realizadas foram: teste rápido para infecção por HIV 1/2 (Determine TM HIV 1/2; Abbott Laboratories), na Amostra 1; dosagem da IgE total (Human IgE Flex Set CBA, Becton Dickinson, Palo Alto, CA) e do TGF- β (Human TGF- β Flex Set, Becton Dickinson, Palo Alto, CA) através do método citométrico multiensaio, na Amostra 2 e dosagem de IgE específica a Derp, através do teste *in vitro* Pharmacia CAP System FEIA, baseado na tecnologia ImmunoCAP (Immunocap Isac Phadia AB, Uppsala, Suécia).

A IgE específica a Derp foi quantificada através do UniCAP 100 *system* (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Sweden), de acordo com as instruções de manufatura. Os resultados expressos em kU/L, foram obtidos através de uma curva padrão produzida por diluições seriadas da IgE humana contra um padrão de IgE sérica obtido pela Organização Mundial de Saúde (padrão OMS 75/502). Os valores acima de 0.35 kU/L, foram considerados positivos para IgE específica a Derp.

4.7 AVALIAÇÕES NO SOBRENADANTE DE CULTURAS

O sangue heparinizado foi diluído 1:10 em meio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen) suplementado com 2mM L-glutamina (Gibco Invitrogen) e 40µg/ml de gentamicina (Schering Plough). O RPMI é um meio composto de sais enriquecidos que age como uma solução nutritiva sendo acrescido de glutamina, importante para enriquecimento do meio, permitindo rápida proliferação na cultura celular, enquanto que a gentamicina foi o antibiótico utilizado para evitar contaminação de bactérias ou fungos. O sangue diluído foi distribuído em placas de 96 poços com fundo chato (200µl por poço). Foram cultivados três poços por condição: meio, sem estímulos; Mtb, estimulado com antígeno total lisado de *M. tuberculosis* H37Rv (10µg/ml, gentilmente cedido pela Universidade do Colorado – UCLA, EUA); Derp, estimulado com o extrato bruto para cultivo *in vitro* de *D. pteronyssinus*- (25µg/ml, Cosmo Bio Co., LTD., Japão); PPD, derivado protéico purificado (10µg/ml, Staatens Serum Institut, Dinamarca) e PPD + Derp (combinados às mesmas concentrações utilizadas já descritas). Nas culturas da Amostra 2, foi acrescentado a todos os poços polimixina a 10µg/ml, para quelar possível combinação com lipopolissacarídeo.

As culturas foram incubadas a 37°C em incubadora de CO₂ a 5% com umidade relativa de 98%, por 72h. Após esse período, retirou-se o sobrenadante livre de células para um único tubo, homogeneizou-se e aliquotou-se em dois tubos de microcentrífuga de 0,5 mL devidamente identificados. O material foi estocado no freezer a -20°C até a dosagem das citocinas pelo método citométrico multiensaio (CBA Th1/Th2, Becton Dickinson).

4.8 IMUNOENSAIOS

4.8.1 Método citométrico multi-ensaio

Os ensaios foram realizados seguindo-se as instruções do fabricante. Em resumo, as amostras foram diluídas no diluente apropriado fornecido para as amostras de soro (*Serum enhancement buffer*), e para as amostras de sobrenadante de cultura (*Assay diluent*). As amostras de sobrenadante estimuladas com os antígenos Derp, PPD, PPD + Derp, foram diluídas à concentração de 1:5 e as amostras sem estímulo não foram diluídas. As amostras de soro para dosagem de TGF- β foram acidificadas com 10 μ l de 1 NaHCl e neutralizadas com 10 μ l de 1,2N NaOH/0,5M Hepes.

Padrões fornecidos com o kit, contendo os analitos liofilizados, foram diluídos na mesma solução de diluição que as amostras (exceto para IgE total, cujo padrão foi fornecido diluído). As soluções repousaram por 15 min à temperatura ambiente e foram transferidas para o freezer a -80°C em alíquotas de 20 μ l até o uso. A curva-padrão para análise dos dados foi realizada por diluição desta solução 1/10 no tubo de maior concentração (TS) e 8 diluições seriadas de 1/2, com um último padrão contendo apenas a solução de diluição (branco).

Vinte e cinco microlitros de cada amostra e dos padrões foram incubados com um mix contendo anticorpo secundário marcado com ficoeritina (PE) e 3 μ l de mistura de esferas de látex recobertas com anticorpo primário para cada analito (distintas pela intensidade de fluorescência no espectro vermelho, para leitura em citômetro de fluxo no canal FL3). IgE total e TGF- β foram dosados isoladamente, e as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF, foram dosadas simultaneamente. As amostras foram incubadas por 3h à temperatura ambiente e abrigadas da luz. Após este período, acrescentou-se 200 μ l de solução de lavagem por tubo e centrifugou-se os tubos a 14.000 rpm, 4°C e por 5 min. As amostras foram então ressuspensas em solução salina para aquisição em citômetro de fluxo (FACSort ou FACS Aria II, Becton Dickinson, Palo Alto, CA).

4.9 ANÁLISE DE DADOS

4.9.1 Variáveis do estudo

Foram comparadas entre os grupos as seguintes variáveis: sócio-demográficas – gênero, idade, renda; clínicas – peso, altura, contato com indivíduos com tuberculose, doenças, uso de medicamentos, fumo, relatos de alergias, positividade ao HIV; epidemiológicas – grau de contato com o bacilo causador da tuberculose, vacinação contra a tuberculose na infância; laboratoriais – hemograma e exame parasitológico.

Foram considerados atópicos, os voluntários que apresentaram positividade ao teste sorológico para IgE específica a Derp (valores $\geq 0,35$ kU/L) ou teste alérgico cutâneo quando o diâmetro da reação foi maior ou igual a 3 mm. Foram considerados alérgicos, os voluntários que relataram no questionário a ocorrência de sintomas de alergias nos últimos 12 meses. Foram considerados voluntários portadores de infecção tuberculosa latente, aqueles que apresentaram o valor do diâmetro da reação ao teste tuberculínico, maior ou igual a 10 mm.

4.9.2 Análises citofluorométricas

A análise dos dados foi realizada pelo software Facs Array (BD), sendo as seis análises das citocinas realizadas para cada amostra. Os tubos de compensação são os primeiros a serem lidos pelo citômetro, sendo possível localizar a região onde serão analisadas as citocinas (gate-R1). Depois, foi feito o ajuste pelos detectores FL2 e FL3 e a partir daí, são analisadas as amostras dos padrões para geração da curva-padrão correspondente a cada citocina e depois foi feita a aquisição das amostras.

As amostras foram analisadas no FlowJo versão 7.6.3 para obtenção da intensidade média de fluorescência correspondente a cada uma das citocinas avaliadas, bem como dos padrões. Estes dados foram comparados aos obtidos para uma amostra padrão, como exposto. As concentrações de citocinas nas amostras-

teste foram obtidas por interpolação dos resultados de intensidade média de fluorescência, utilizando a curva-padrão. Os valores das concentrações encontradas são calculadas pela diluição. Os controles negativo (sem estímulo) e positivo (Mtb, Derp, PPD, PPD + Derp) foram importantes para comparar a produção das citocinas.

4.9.3 Testes estatísticos

Para avaliar as variáveis categóricas, utilizamos o teste exato de Fisher através do programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 13 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 13.0, 2006). Para comparar os grupos quanto às variáveis quantitativas, utilizamos o teste Mann-Whitney para análises não pareadas e para as avaliações entre os dois tempos, no mesmo grupo, utilizamos o teste Wilcoxon pareado. O teste de Spearman foi calculado para avaliar o grau de correlação entre variáveis estudadas e o Anova de Friedman para comparação de dois grupos para duas condições, estes últimos utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA, 5.01). Os valores de P iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

A Amostra 1 foi composta por voluntários com mediana de idade de 19 anos, a maioria mulheres, sem diferença entre os grupos controle e revacinado ($P>0,05$; Tabela 1). Também na Amostra 2, a maioria dos indivíduos eram mulheres, com idade semelhante à dos voluntários na Amostra 1, e sem diferença entre os grupos TST positivo e TST negativo ($P>0,05$, Tabela 1).

Não foram verificadas diferenças entre os grupos de comparação quanto ao relato de alergias ou sintomas alérgicos, considerando ocorrências passadas em toda a história do indivíduo ou ocorrências nos últimos doze meses. Também não houve diferença na proporção de indivíduos positivos aos testes alérgicos com sintomas nos últimos doze meses. Entre os indivíduos que referiram sintomas de alergia nos últimos doze meses, 2,1% relataram uso de anti-histamínicos.

Mais de um terço dos indivíduos em cada grupo apresentou reatividade a Dep, no teste sorológico, e entre os antígenos testados no teste cutâneo a maior frequência de positividade foi em relação a Derp. Não houve diferença entre revacinados e controles na distribuição de reatividade aos alérgenos testados ($P>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 1 – Características sócio-demográficas e perfil clínico dos voluntários do estudo.

População do estudo	Amostra 1 n=75		Amostra 2 n=20	
	Revacinados n=46	Controles n=29	TST positivos n=12	TST negativos n=8
Gênero				
Masculino	12 (26)	9 (31)	3 (25)	3 (37)
Feminino	34 (74)	20 (69)	9 (75)	5 (62)
Idade (anos)¹	19 [18 – 21]	19 [18 – 21]	28 [23 – 33]	24 [22 – 28]
Alergia²				
Asma ou sintomas de asma	11 (23)	7 (24)	4 (33)	5 (62)
Rinite ou sintomas de rinite	24 (52)	21 (72)	8 (17)	5 (62)
Dermatite ou sintomas de dermatite	12 (26)	7 (15)	1 (8)	0
Não alérgicos	9 (19)	9 (19)	1 (8)	2 (25)
Desconhecido ou sem resposta	10 (21)	4 (13)	0	0
Sintomas de alergia nos últimos 12 meses				
Sim	17 (37)	16 (55)	9 (75)	7 (87)
Não	8 (17)	6(13)	3 (25)	1 (12)
Desconhecido ou sem resposta	21 (45)	7(15)	0	0
Atopia				
Sim				
A qualquer alérgeno no teste cutâneo ³	26 (56)	15 (51)		
Sim				
A Derp no teste sorológico	24 (52)	14 (48)	5 (41)	3 (37)
Não	21 (45)	15 (51)	7 (58)	5 (62)
Não realizado	1 (2)	0	0	0
Uso atual de medicamentos⁴				
Anti-histamínicos	1 (2)	0	2 (16)	
Corticóides	0	1 (3)	1 (8)	
Outros não relacionados	8 (17)	6 (20)	2 (16)	
Nenhum ou sem resposta	37 (80)	22 (76)	7 (58)	

¹ Mediana [intervalo interquartil]. ² Dados colhidos da aplicação do questionário ISAAC. ³ O teste cutâneo foi realizado apenas na primeira amostra. ⁴ O uso de medicamentos foi avaliado apenas na primeira amostra e nos TST positivos. O teste de Fisher foi utilizado para comparação entre os grupos (P>0.05).

Tabela 2 – Positividade ao teste cutâneo para alergia dos voluntários da Amostra 1.

Alérgenos	Revacinados n=46 (%)	Controles n=29 (%)
Derp	24 (52)	16 (55)
<i>Blomia tropicalis</i>	8 (17)	5 (17)
<i>Blatella germanica</i>	9 (19)	2 (7)
<i>Periplaneta americana</i>	5 (10)	1 (3)
Epitélio de cão	8 (17)	4 (13)
Epitélio de gato	5 (10)	3 (10)
Pólens IV	3 (6)	1 (3)
Fungos	5 (10)	1 (3)
Apenas um alérgeno	10 (21)	7 (24)
Dois ou mais alérgenos	16 (34)	8(27)
Derp + <i>Blomia tropicalis</i>	7 (15)	4 (13)
Derp + outro alérgeno	8 (17)	3 (10)
Derp+ 2 alérgenos	4 (8)	2 (7)
Derp + 3 alérgenos	4 (8)	0
Derp + 4alérgenos	2 (4)	0
Todos os alérgenos	1 (2)	1 (3)
Outros alérgenos que não Derp	1 (2)	1(3)
Não reativos	19 (41)	11 (38)

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparação entre os grupos ($P>0,05$).

5.2 PERFORMANCE DOS TESTES PARA ATOPIA

O teste cutâneo para alergia foi aplicado apenas aos indivíduos da Amostra 1. A sensibilidade deste teste foi de 67% para a ocorrência de sintomas alérgicos nos últimos 12 meses, com especificidade de 59%, valor preditivo positivo (VPP) de 58% e valor preditivo negativo (VPN) de 69%. Não houve associação entre a positividade ao teste cutâneo e a ocorrência de sintomas alérgicos nos últimos 12 meses ($P>0,05$).

A IgE específica a Derp foi dosada em indivíduos da Amostra 1 e da Amostra 2. A sensibilidade deste teste foi de 69% para a ocorrência de sintomas alérgicos nos últimos 12 meses, com especificidade de 68%, VPP de 68% e VPN de 90%.

Não houve associação entre a positividade ao teste sorológico e a ocorrência de sintomas alérgicos nos últimos 12 meses ($P>0,05$).

Os testes cutâneo e teste sorológico para IgE específica a Derp, foram concordantes e positivos em 36% dos indivíduos alérgicos e concordantes negativos em 50% dos não alérgicos. O grau de concordância entre os testes foi de 55%.

Foi verificada correlação entre IgE total e IgE específica ($P<0,0001$; Spearman $r=0,54$), também sendo verificada correlação entre IgE específica em T0 e T2 ($P<0,0001$; Spearman $r=0,88$). Não foi verificada correlações entre IgE total e TGF- β ou entre IgE específica e TGF- β .

5.3 MODIFICAÇÕES DA RESPOSTA DE IgE APÓS A REVACINAÇÃO COM BCG

Os indivíduos com resultado positivo ou ao teste cutâneo para atopia ou ao teste sorológico para IgE específica, foram considerados atópicos e aqueles com resultado negativo em ambos os testes foram considerados não atópicos. A revacinação com o BCG não levou à diminuição dos níveis de IgE específica ao Derp nem entre os indivíduos atópicos nem entre os não atópicos, dois meses após a intervenção. Como esperado, não foram verificadas diferenças entre os níveis de IgE específico ao Derp entre T0 e T2 nos controles, nem entre os atópicos revacinados e os atópicos controles em T0. A produção de IgE específica foi maior nos atópicos do que nos não atópicos em ambos os grupos (Tabela 3). A revacinação com o BCG também não levou à diminuição dos níveis de IgE específica ao Derp entre os indivíduos revacinados que apresentaram ou não sintomas de atopia nos últimos 12 meses, ocorrendo o mesmo para o grupo controle ($P>0,05$, teste Wilcoxon).

A revacinação com o BCG também não levou à diminuição dos níveis de IgE total entre os voluntários atópicos ou entre os não atópicos. Como esperado, não foram verificadas diferenças nos níveis de IgE total entre T0 e T2 nos controles, nem nos atópicos revacinados e os atópicos controles em T0. A produção de IgE total foi maior nos atópicos do que nos não atópicos apenas nos voluntários revacinados (Tabela 3). A revacinação com o BCG também não levou à diminuição dos níveis de IgE total entre os indivíduos revacinados que apresentaram ou não sintomas de

alergia nos últimos 12 meses, ocorrendo o mesmo para o grupo controle (Tabela 4; $P > 0.05$, teste Wilcoxon).

Tabela 3 – Avaliação da produção de IgE específica ao Derp (kU/L) e IgE total (pg/ml) em voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1), atópicos e não atópicos, nos tempos zero (T=0) e dois meses (T=2) após a intervenção.

Amostra 1	Atópicos			Não Atópicos		
	T=0	T=2	P	T=0	T=2	P
IgE total (pg/ml)						
Revacinado	54,5[24,5 – 103,2]	52,4[32,1 – 86,2]	0,42	17,7[5,5 – 30,9]	21,3[19,0 – 33,3]	0,56
Controle	19,8[11,3 – 36,9]	26,9[15,0 – 52,3]	0,25	10,3[2,5 – 44,3]	22,4[2,8 – 50,3]	0,56
IgE específica ao Derp (kU/L)						
Revacinado	11,2[1,2 – 37,2]	8,5[0,7 – 43,1]	0,31	0[0 – 0]	0[0 – 0,2]	1,00
Controle	7,1[1,7 – 37,2]	3,2[0 – 11,2]	0,31	0[0 – 0]	0[0 – 0,8]	1,00

Os valores representam a mediana [intervalo interquartil]. O teste Wilcoxon pareado foi utilizado para comparação entre os dois tempos.

Tabela 4 – Avaliação da produção de IgE específica ao Derp (kU/L) e IgE total (pg/ml) em voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1), que apresentaram sintomas de alergia nos últimos 12 meses, nos tempos zero (T=0) e dois meses (T=2) após a intervenção.

Amostra 1	Alérgicos nos últimos 12 meses			Não Alérgicos nos últimos 12 meses		
	T=0	T=2	P	T=0	T=2	P
IgE total (pg/ml)						
Revacinado	43,7[15,5 – 142,6]	74,3[11,4 – 185,3]	0,63	34,3[18,0 – 69,8]	33,9[22,5 – 64,2]	0,49
Controle	22,2[9,8 – 45,4]	26,4[15,0 – 53,5]	0,94	9,5[1,2 – 24,5]	21,4[1,6 – 45,1]	0,38
IgE específica ao Derp (kU/L)						
Revacinado	5,3[0 – 18,7]	20,8[3,9 – 60,6]	0,47	0[0 – 23,2]	0[0,46 – 10,7]	0,22
Controle	4,7[0 – 35,4]	3,1[0 – 11,2]	0,06	0[0 – 1,3]	0[0 – 2,8]	0,50

Os valores representam a mediana [intervalo interquartil]. O teste Wilcoxon pareado foi utilizado para a comparação entre os dois tempos.

5.4 MODIFICAÇÃO DA RESPOSTA *IN VITRO* AO DERP APÓS A REVACINAÇÃO COM BCG

A revacinação com o BCG não interferiu no perfil de produção de citocinas entre controles e revacinados atópicos e não atópicos nos tempos T0 e T2. Os voluntários atópicos, pertencentes tanto ao grupo controle quanto ao grupo revacinado, apresentaram aumento discreto na produção das citocina IL-10 (Tabela 5), os indivíduos do grupo controle apresentaram discreto aumento na produção da citocina TNF. Os indivíduos não atópicos do grupo controle e revacinado não apresentaram diferenças no perfil de produção das citocinas após a revacinação (Tabela 6).

Tabela 5 – Produção de citocinas em resposta ao antígeno Derp em culturas de sangue total dos voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1) positivos para atopia ao antígeno de Derp no teste cutâneo ou sorológico.

Citocinas	Controles N=16			Revacinados N=24		
	T=0	T=2	P	T=0	T=2	P
IFN-γ	169,7[83,1 – 511,3]	128,2[105,1 – 414,1]	1,00	215,5[104,2 – 441,4]	295,4[119,4 – 1148,2]	0,14
TNF	7,5[0 – 10,2]	21,4[19,8 – 61,8]	0,02	9,2[0 – 13,8]	15,1[7,1 – 31,8]	0,14
IL-2	4,7[0 – 6,2]	4,7[4,7 – 5,6]	0,28	5,3[3,3 – 5,9]	5,3[3,0 – 7,3]	0,78
IL-4	2,3[0 – 17,7]	16,7[16,7 – 18,5]	0,81	17,2[6,5 – 19,3]	18,7[14,2 – 21,4]	0,37
IL-6	1434,6[328,9 – 2436,3]	3494,6[2071,6 – 6143,5]	0,055	2455,3[393,2 – 4164,6]	4628,1[3422,1 – 7473,4]	0,04
IL-10	0,2[0 – 3]	23,3[12,3 – 34,8]	0,004	6,5[0 – 17,5]	21,1[10,5 – 43,8]	0,002

Os valores representam a mediana [intervalo interquartil] em pg/ml. O teste Wilcoxon pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os dois tempos.

Tabela 6 – Produção de citocinas em resposta ao antígeno Derp em culturas de sangue total dos voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1) que foram negativos para atopia ao antígeno de Derp no teste sorológico ou cutâneo.

Citocinas	Controles N=12			Revacinados N=21		
	T=0	T=2	P	T=0	T=2	P
IFN-γ	226,8[0 – 237,8]	188,3[86,2 – 501,2]	0,81	555,6[0 – 1079,5]	89,2[111,5 – 2194,8]	0,38
TNF	0[0 – 8,8]	38,3[27,4 – 48,8]	0,31	5,1[0 – 14,6]	20,4[9,4 – 34,5]	0,10
IL-2	3,4[0 – 4,7]	5,7[3,4 – 10,8]	0,81	1,5[0 – 6,0]	5,3[5,3 – 6,2]	0,61
IL-4	16,8[0 – 13,5]	19,9[18,6 – 33,6]	0,19	5,2[0 – 16,7]	0 [12,9 – 19,5]	0,43
IL-6	209,6[0 – 667,8]	3667,0[3128,6 – 4269,0]	0,19	1754,0[9,2 – 3755,4]	1737,78[1528,9 – 3575,6]	0,85
IL-10	0[0 – 0,5]	5,4[3,5 – 16,2]	0,13	0,7[0 – 3,8]	4,5[1,2 – 10,8]	0,77

Os valores representam a mediana [intervalo interquartil] em pg/ml. O teste Wilcoxon pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os dois tempos.

A revacinação com o BCG também não interferiu no perfil de produção de citocinas entre controles e revacinados com ou sem sintomas alérgicos nos últimos 12 meses, em T0 e T2. Voluntários pertencentes tanto ao grupo controle quanto revacinado, apresentaram aumento discreto na produção das citocinas IL-10 e TNF,

bem como aumento pronunciado na produção de IL-6. Voluntários do grupo controle apresentaram aumento discreto na produção de IL-4 (Tabela 7). Voluntários que não relataram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses, pertencentes tanto ao grupo controle quanto ao grupo revacinado, apresentaram aumento discreto na produção de IL-10. Ao passo que os do grupo controle, apresentaram aumento na produção das citocinas TNF, IL-4 e IL-6 (Tabela 8).

Tabela 7 – Produção de citocinas em resposta ao antígeno Derp em culturas de sangue total dos voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1) que apresentaram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses.

Citocinas	Controles N=13			Revacinados N=25		
	T=0	T=2	P	T=0	T=2	P
IFN-γ	150,3[41,2 – 221,7]	116,6[86,1 – 231,1]	0,90	270[124,7 – 2697,3]	1011,0[255,0 – 2194,8]	0,34
TNF	1,0[0 – 8,6]	21,0[10,5 – 36,5]	0,0004	0[0 – 9,9]	15,7[8,0 – 22,5]	0,02
IL-2	3,7[0 – 5,7]	4,7[4,4 – 6,7]	0,14	4,0[1,5 – 5,3]	3,1[0 – 5,3]	0,70
IL-4	1,2[0 – 16,7]	17,7[15,8 – 18,6]	0,01	0[0 – 18,6]	12,9[12,5 – 14,2]	0,29
IL-6	1017,3[209,6 – 2243,1]	3.684[1762,0 – 5716,3]	0,01	613,5[0 – 3755,4]	5280,1[2963,0 – 15264,9]	0,04
IL-10	0[0 - 3]	19,7[5,2 – 34,8]	0,0002	0[0 – 11,6]	29,9[10,7 – 79,8]	0,007

Os valores representam a mediana [intervalo interquartil] em pg/ml. O teste Wilcoxon pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os dois tempos.

Tabela 8 – Produção de citocinas em resposta ao antígeno Derp em culturas de sangue total dos voluntários revacinados ou não com BCG (Amostra 1) que não apresentaram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses.

Citocinas	Controles N=13			Revacinados N=25		
	T=0	T=2	P	T=0	T=2	P
IFN-γ	229,5[76,9 – 1588,6]	279,5[105,1 – 452,1]	0,76	265,5[23,9 – 569,6]	211[11,20 – 588,6]	0,73
TNF	7,8[0 – 51,1]	39,5[31,0 – 48,8]	0,05	12,2[2,2 – 18,4]	18,5[8,4 – 35,1]	0,09
IL-2	4,7[0 – 6,4]	5,7[5,6 – 5,6]	0,08	5,2[1,7 – 6,4]	5,6[5,1 – 6,5]	0,24
IL-4	0[0 – 16,7]	16,7[16,7 – 21,3]	0,01	15,8[6,4 – 20,2]	19,5[14,8 – 19,8]	0,06
IL-6	462,5[0 – 3321,9]	3.293,9[2727,3 – 5716,0]	0,02	2.568,4[1194,7 – 4056,2]	3.574,1[1582,4 – 5111,3]	0,14
IL-10	0,3[0 – 2,8]	5,4[3,8 – 22,6]	0,01	5,0[0,6 – 9,6]	10,6[4,7 – 22,3]	0,01

Os valores representam a mediana [intervalo interquartil] em pg/ml. O teste Wilcoxon pareado foi utilizado para avaliar a diferença entre os dois tempos.

5.5 RESPOSTA SOROLÓGICA EM INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO TUBERCULOSA LATENTE

A infecção tuberculosa não influenciou nos níveis de IgE específica para Derp em indivíduos atópicos. Indivíduos não atópicos com LTBI apresentaram menor produção de IgE específica do que controles TST negativos, porém a diferença média entre eles foi de 0,05 kU/L (Tabela 9). No entanto, a produção de IgE total e a produção de TGF- β foi semelhante entre indivíduos positivos e negativos ao TST. Como esperado, os voluntários atópicos apresentaram produção aumentada de IgE específica em comparação com os indivíduos não atópicos, tanto entre indivíduos com LTBI ($P=0,003$, teste Mann-Whitney), como entre controles TST negativos ($P=0,004$; teste Mann-Whitney). Níveis aumentados de IgE total foram observados apenas entre indivíduos infectados ($P=0,05$; teste Mann-Whitney). Não foram verificadas diferenças na produção de TGF- β entre atópicos e não atópicos ($P>0,05$; teste Mann-Whitney).

Tabela 9 – Avaliação da produção de IgE específica ao Derp (kU/mL), IgE total (ng/mL) e TGF- β (pg/ml) em voluntários da Amostra 2 portadores de LTBI e controles, atópicos e não atópicos.

Amostra 2	TST negativos	LTBI (TST positivos)	P
IgE total (pg/ml)			
Atópicos	636,2 [0 – 648,2]	284,4 [135,7 – 632,6]	1,00
Não atópicos	43,0 [14,8 – 188,4]	26,7 [0 – 59,6]	0,33
IgE específica ao Derp (kU/L)			
Atópicos	30,2[1,7 – 33,80]	7,6 [0,3 – 26,1]	0,25
Não atópicos	0,1[0,05 – 0,2]	0,04 [0,03 – 0,07]	0,03
TGF-β (pg/ml)			
Atópicos	41,0 [6,4 – 557,8]	51,3 [0 – 1715]	1,00
Não atópicos	124,0 [5,8 – 2089]	652,9 [5,8– 3075]	0,68

Os valores representam mediana [mínimo – máximo]. O teste Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos.

A infecção tuberculosa não influenciou nos níveis de IgE específica para Derp, IgE total e TGF- β em voluntários que apresentaram ou não sintomas de alergias nos últimos 12 meses (Tabela 10).

Tabela 10 – Avaliação da produção de IgE específica ao Derp (kU/L) e IgE total (pg/ml) e TGF- β (pg/ml) em indivíduos da Amostra 2 portadores de LTBI e controles, que apresentaram sintomas de alergia nos últimos 12 meses.

Amostra 2	TST negativos	LTBI (TST positivos)	P
IgE total (pg/ml)			
Com sintomas	178,2[0 – 648,2]	85,6[21,0 – 670,0]	0,75
Sem sintomas	0[0 – 0]	26,6[12,3 – 594,4]	1,00
IgE específica ao Derp (kU/L)			
Com sintomas	0,07[0,03 – 10,5]	0,05[0,03 – 26,1]	0,93
Sem sintomas	0,05[0,05 – 0,05]	0,05[0,2 – 33,8]	1,00
TGF-β- (pg/ml)			
Com sintomas	78,9[30,8 – 157,2]	652,9[0 – 3075]	0,58
Sem sintomas	2089[2089 – 2089]	41,0[5,8 – 702,3]	1,00

Os valores representam mediana [mínimo – máximo]. O teste Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos.

5.6 RESPOSTA *IN VITRO* AO DERP EM INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO TUBERCULOSA LATENTE

Indivíduos atópicos apresentaram o mesmo perfil de produção de citocinas nas culturas estimuladas com o Derp, independentemente da ocorrência de infecção (Tabela 11). Na ausência de atopia, os indivíduos infectados apresentaram níveis de produção das citocinas TNF, IL-2, IL-4 e IL-10 mais elevados quando comparados aos controles não infectados (Tabela 12).

Tabela 11 – Produção de citocinas em resposta a Derp em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2 positivos para atopia ao antígeno de Derp no teste sorológico.

Citocinas	TST positivos N= 5	TST negativos N= 3	P
IFN- γ	0 [0 – 0]	0 [0 – 4592,2]	0,2
TNF	70,8 [0 – 77,6]	0 [0 – 73,7]	0,36
IL-2	199,7 [60,6 – 200,3]	65,4 [56,9 – 201,1]	0,65
IL-4	79,8 [0 – 95,0]	0 [0 – 89,7]	0,45
IL-13	22,3 [14,2 – 22,6]	14,4 [13,3 – 23,1]	0,65
IL-6	1021,6 [657,4 – 5325,6]	1573,5 [1315,9 – 4902,0]	0,46
IL-10	59,2 [9,2 – 63,1]	15,4 [5,5 – 63,3]	0,65

Os valores representam a mediana [mínimo-máximo] em pg/ml. O teste Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos.

Tabela 12 – Produção de citocinas em resposta a Derp em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2 que foram negativos para atopia ao antígeno de Derp no teste sorológico.

Citocinas	TST positivos N= 7	TST negativos N= 5	P
IFN-γ	0 [0 – 1473,1]	0 [0 – 1412,7]	0,85
TNF	70,4 [0 – 75,2]	0 [0 – 0]	0,02
IL-2	199,8 [61,7 – 201,1]	60,8 [57,2 – 64,0]	0,01
IL-4	94,1 [0 – 101,9]	0 [0 – 0]	0,02
IL-13	22,4 [14 – 22,6]	14,4 [13,3 – 37,6]	0,29
IL-6	1501,1 [420,3 – 3152,8]	635,9 [0 – 5280,8]	0,46
IL-10	60,5 [3,6 – 61,8]	6,9 [1,9 – 18,4]	0,04

Os valores representam a mediana [mínimo-máximo] em pg/ml. O teste Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos.

Entre os indivíduos que apresentaram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses, verificou-se maior produção das citocinas TNF, IL-2, IL-4 e IL-10 entre os indivíduos infectados (Tabela 13). Não houve diferenças nos perfil de produção das citocinas em voluntários sem sintomas alérgicos (Tabela 14).

Tabela 13 – Produção de citocinas em resposta a Derp em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2 que apresentaram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses.

Citocinas	TST positivos N= 5	TST negativos N= 3	P
IFN- γ	776,4[0 – 7.380,8]	1.003,1[0 – 2.483,0]	0,87
TNF	75,5[65,7 – 79,5]	0[0 – 73,8]	0,005
IL-2	201,9[197,3 – 209,2]	64,2[50,8 – 201,6]	0,02
IL-4	92,8[74,7 – 105,1]	0[0 – 101,4]	0,01
IL-13	22,5[22,2 – 23,2]	15,5[13,1 – 22,4]	0,17
IL-6	687,9[420,3 – 1.824,7]	1.514,7[381,5 – 9.063,8]	0,37
IL-10	63,5[56,8 – 66,5]	8,4[0 – 66,4]	0,02

Os valores representam a mediana [mínimo-máximo] em pg/ml. Utilizou-se o teste Mann-Whitney para avaliar a diferença entre os grupos.

Tabela 14 – Produção de citocinas em resposta a Derp em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2 que não apresentaram sintomas alérgicos nos últimos 12 meses.

Citocinas	TST positivos N= 5	TST negativos N= 3	P
IFN- γ	0[0 – 4.449,5]	0 [0 – 0]	0,56
TNF	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	1,00
IL-2	58,5 [55,1 – 61,7]	56,3[56,3 – 56,3]	0,65
IL-4	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	1,00
IL-13	15,5 [0 – 22,5]	15,2 [15,2 – 15,2]	0,65
IL-6	2903,6[2506,9 – 2993,3]	473,9[473,9 – 473,9]	0,18
IL-10	4,9[0 – 5,3]	0 [0 – 0]	0,35

Os valores representam a mediana [mínimo-máximo] em pg/ml. O teste Mann-Whitney foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos.

Para avaliar a capacidade da resposta *in vitro* ao derivado protéico purificado (PPD) interferir sobre a resposta *in vitro* ao Derp, medido pela produção de citocinas Th1/Th2/inflamatórias em culturas de sangue total, verificou-se a produção de citocinas em resposta ao estímulo com os antígenos Derp, PPD e ambos Derp e PPD em culturas de sangue total dos grupos de voluntários atópicos e não atópicos da Amostra 2 (Tabela 15).

Tabela 15 – Produção de citocinas em resposta a Derp, PPD e ambos Derp e PPD em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2.

Produção de citocinas	Atópicos		Não atópicos	
	TST positivos N= 5	TST negativos N= 3	TST positivos N= 7	TST negativos N= 5
IFN-γ				
Sem estímulo	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]	0 [0 – 0]
Derp	0 [0 – 0]	0 [0 – 4592,2]	0 [0 – 1473,1]	0 [0 – 1412,7]
PPD	590,9 [0 – 2514,7]	0 [0 – 0]	820,4 [0 – 5522,6]	0 [0 – 1213,7]
Derp + PPD	0 [0 – 2322]	1846,6 [0 – 2483,0]	1781,6 [0 – 7380,8]	0 [0 – 2496,1]
TNF				
Sem estímulo	63,9 [0 – 70,4]	0 [0 – 75,4]	70,2 [0 – 77,4]	0 [0 – 0]
Derp	70,8 [0 – 77,6]	0 [0 – 73,7]	70,4 [0 – 75,2]	0 [0 – 0]
PPD	71,4 [0 – 72,5]	0 [0 – 71,1]	73,0 [0 – 75,1]	0 [0 – 0]
Derp + PPD	73,7 [0 – 77,1]	0 [0 – 73,8]	72,7 [0 – 79,5]	0 [0 – 0]
IL-2				
Sem estímulo	192,4 [63,8 – 200,6]	66,5 [61,6 – 200,1]	199,0 [61,9 – 202,4]	57,4 [52,5 – 63,1]
Derp	199,7 [60,6 – 200,3]	65,4 [56,9 – 201,1]	199,8 [61,7 – 201,1]	60,8 [57,2 – 64,0]
PPD	200,6 [61,0 – 203,4]	58,8 [55 – 201,9]	99,2 [56,1 – 202,1]	63,3 [61,2 – 67,1]
Derp + PPD	201,9 [61,7 – 205,8]	56,6 [56,1 – 201,6]	199,7 [55,1 – 209,2]	64,2 [50,8 – 64,8]
IL-4				
Sem estímulo	43,2 [0 – 80,2]	0 [0 – 87,8]	88,1 [0 – 92,3]	0 [0 – 0]
Derp	79,8 [0 – 95,0]	0 [0 – 89,7]	94,1 [0 – 101,9]	0 [0 – 0]
PPD	92,8 [0 – 110,4]	0 [0 – 96,1]	87,3 [0 – 105,1]	0 [0 – 0]
Derp+ PPD	92,8 [0 – 105,1]	0 [0 – 101,4]	87,3 [0 – 100,0]	0 [0 – 0]
IL-13				
Sem estímulo	22,3 [13,2 – 22,5]	14,1 [13,5 – 22,4]	22,4 [14,5 – 22,5]	13,6 [13,1 – 15,3]
Derp	22,3 [14,2 – 22,6]	14,4 [13,3 – 23,1]	22,4 [14 – 22,6]	14,4 [13,3 – 37,6]
PPD	22,6 [13,1 – 23,4]	14,1 [13,6 – 22,4]	22,4 [15,8 – 22,5]	13,6 [13,5 – 14,5]
Derp + PPD	22,5 [22,2 – 23,0]	15,9 [14,3 – 22,3]	22,4 [0 – 23,2]	15,2 [13,1 – 15,8]
IL-6				
Sem estímulo	64,1 [0 – 380,8]	0 [0 – 64,8]	71,5 [0 – 263,3]	0 [0 – 12,8]
Derp	1021,6 [657,4 – 5325,6]	1573,5 [1316,0 – 4902,0]	1501,1 [420,3 – 3152,8]	635,9 [0 – 5280,8]
PPD	208,8 [130,5 – 269,5]	155,6 [85,3 – 379,6]	209,8 [8,5 – 732,0]	12,2 [0 – 5769,9]
Derp + PPD	1102,4 [420,3 – 2993,3]	1514,7 [446,8 – 3076,4]	851,7 [593,4 – 2903,6]	825,6 [381,5 – 9063,8]
IL-10				
Sem estímulo	51,3 [0 – 58,6]	8,9 [1,6 – 59,3]	59,9 [9,8 – 64,5]	4,7 [1,2 – 11,1]
Derp	59,2 [9,2 – 63,1]	15,4 [5,5 – 63,3]	60,5 [3,6 – 61,8]	6,9 [1,9 – 18,4]
PPD	60,5 [11,4 – 61,0]	3,8 [0,2 – 64,5]	60,1 [0 – 67,3]	9,4 [3,1 – 11,1]
Derp + PPD	63,4 [5,3 – 66,5]	8,4 [3,4 – 62,2]	61,8 [0 – 65,0]	7,5 [0 – 66,4]

. Os valores representam a mediana [mínimo-máximo] em pg/ml. O teste ANOVA de Friedman foi utilizado para avaliar a diferença entre as condições de estímulo.

O antígeno Derp induziu a produção de IL-6 em culturas de indivíduos atópicos, independentemente do estado de infecção (Figura 3 A e C). Entre os indivíduos não atópicos, a estimulação com Derp e PPD, simultaneamente, induziu a produção de IL-6 (Figura 3 B e D), sendo que em culturas dos indivíduos infectados também houve produção com o estímulo de Derp isoladamente (Figura 3 A e B). Não foi detectada indução da produção de outras citocinas com os estímulos avaliados.

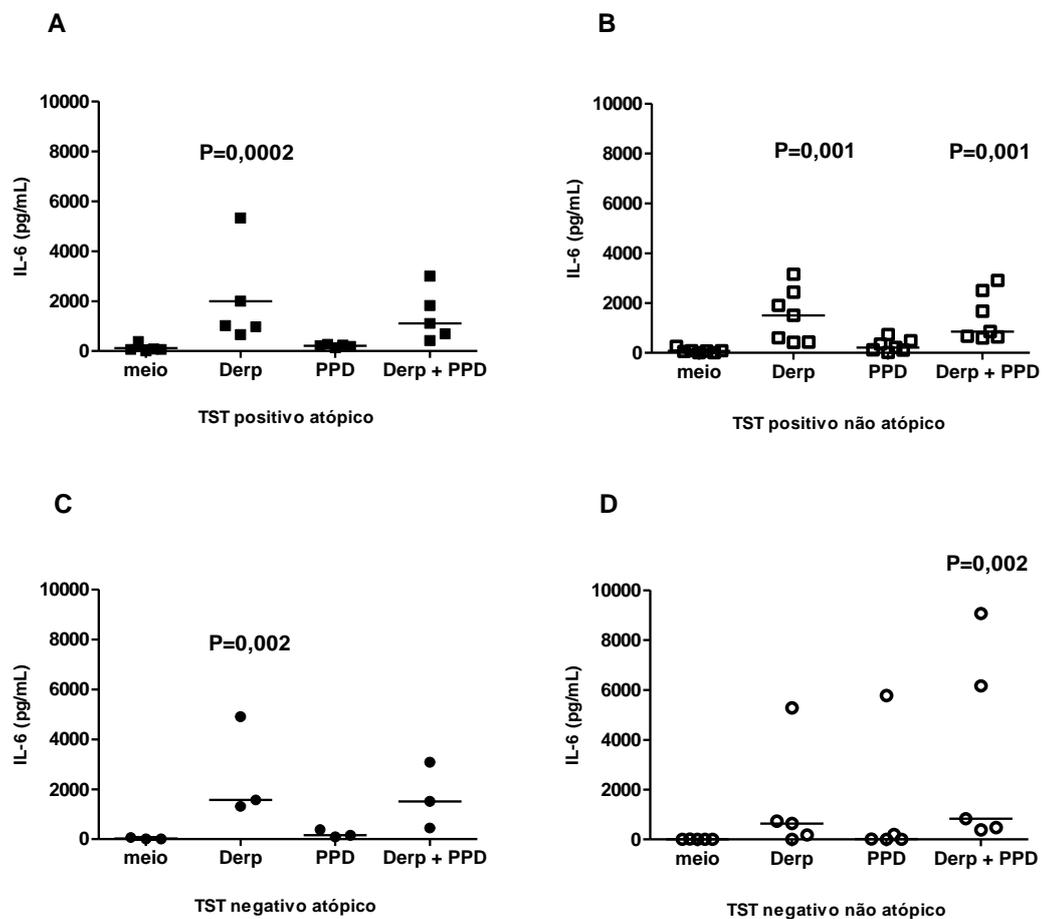


Figura 3. Produção de IL-6 em resposta aos antígenos Derp, PPD e ambos Derp e PPD em culturas de sangue total dos voluntários da Amostra 2. Utilizou-se o teste ANOVA de Friedman para avaliar a diferença entre os grupos.

Para verificar o balanço da resposta Th1/Th2 e Th1/Treg, avaliou-se a razão entre a produção de IFN- γ /IL-4 e entre a produção de IFN- γ /IL-10 nos voluntários da amostra 2. Entre os indivíduos não atópicos com LTBI, a estimulação com Derp e PPD simultaneamente induziu o aumento da razão IFN- γ /IL-4: 21,3 [0 – 4450] (P=0,01; teste ANOVA de Friedman), e da razão IFN- γ /IL-10: 27,5 [0 – 4450] (P=0,01; teste ANOVA de Friedman).

6. DISCUSSÃO

Neste estudo verificou-se que não houve influência da resposta a micobactéria sobre a modulação da resposta do tipo Th2 ao alérgeno Derp do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*. Não foram verificadas diferenças entre os grupos controle e revacinados ou entre os indivíduos infectados e não infectados nem quanto ao relato de alergias ou sintomas alérgicos nem quanto ao resultado de testes imunológicos. Isso que indica que o contato com micobactérias não parece afetar a resposta alérgica pré-estabelecida em indivíduos adultos jovens.

Os testes para atopia, aplicados neste estudo, apresentaram sensibilidade e especificidade dentro do padrão observado em outros estudos (DORTAS JR et al., 2010). Conforme publicação do Jornal de Pneumologia (1998), os testes cutâneos apresentam sensibilidade e especificidade suficientes para confirmar o diagnóstico na grande maioria dos casos de alergia a inalantes. Para alérgenos inaláveis, os testes *in vitro* apresentam sensibilidade de 60 – 80% e especificidade maior do que a dos teste cutâneos, chegando a 90% em alguns casos. A proporção de indivíduos atópicos para o teste cutâneo foi compatível com o que já foi verificado em outros estudos (Pastorino et al., 2006). O teste de punctura cutâneo mostrou maior positividade para aeroalérgenos de ácaros de poeira doméstica (*D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*). A prevalência de sensibilização para *B. germânica* e *P. americana* foi menor em relação aos ácaros e maior frente aos animais domésticos. Nossos dados também mostram que houve uma baixa prevalência de sensibilização para os alérgenos de epitélio de cão e de gato. Este padrão de sensibilização vem sendo observado em alguns trabalhos (Santos et al., 1999; Moreira et al., 2001; Nazpits et al., 2004; Pastorino et al., 2006).

A reatividade ao *D. pteronyssinus* foi superior à reatividade ao *B. tropicalis*. Estes dados são concordantes com outro estudo realizado aqui em Salvador, BA, pelo grupo de MEDEIROS-JR e colaboradores (2002), assim como com estudos desenvolvidos em outras regiões do Brasil (Moreira et al.,(2001); Marques et al., (2001) e Soares et al., (2007). Porém, outro estudo que foi realizado também na cidade de Salvador-BA mostrou maior prevalência de reatividade ao teste de punctura cutâneo para *B. tropicalis*, em comparação ao *D. pteronyssinus* (JESUS, 2006). Estes resultados discordantes podem ser atribuídos às diferenças entre os preparo do extrato do alérgeno utilizado no teste, uma vez que a proteína utilizada pode ser

imunogênica para uma população, mas não para outra. No entanto, para o nosso trabalho, não é importante verificar qual o ácaro seria a maior fonte de aeroalérgeno sensibilizante na população de estudo, pois o teste de punctura cutâneo foi aplicado apenas para obtermos a população de indivíduos atópicos e não atópicos.

A proporção de indivíduos atópicos para o teste sorológico foi compatível com o que já foi verificado em outros estudos (SPALDING et al., 2000). A IgE é reconhecida por desempenhar papel importante na inflamação alérgica. A produção da IgE é regulada, principalmente, por células T CD4+. O desenvolvimento da atopia é controlado, predominantemente, por células T do subtipo Th2, que secretam IL-4, levando ao aumento da produção de IgE por linfócitos B (BARLAN et al., 2002). Verificamos uma produção de IgE total e IgE específica maior, nas duas amostras do estudos, nos atópicos do que nos não atópicos, corroborando os dados da literatura (SPALDING et al., 2000). Entretanto, nem a revacinação com BCG nem a infecção tuberculosa latente foram capazes de interferir nos níveis de produção de IgE total. Na amostra 2, os voluntários não atópicos com infecção tuberculosa latente, apresentaram níveis um pouco menores de produção de IgE específica, em comparação aos controles não infectados. Nesse caso, infere-se que a infecção tuberculosa latente pudesse talvez interferir, reduzindo a produção da IgE específica. Embora a diferença média entre nesse caso tenha sido de apenas 0,05 kU/L. Há estudos que mostram que o tratamento com o BCG foi capaz de reduzir os níveis de IgE em adolescentes (Shirakawa et al., 1997; Barlan et al., 2002). Em um estudo com camundongos, verificou-se redução da IgE quando a BCG foi administrada antes, durante ou após sensibilização com o alérgeno ovoalbumina – OVA (MAJOR et al., 2002; ERB et al., 1998 e GOUVEIA et al., 2012).

Zuany-Amorim e colaboradores (2002) demonstraram que o efeito protetor exercido pelo BCG na infamação alérgica pulmonar seria independente de IFN- γ , mas correlacionado à proliferação de células T reguladoras, que seriam mediadas por IL-10 e TGF- β . No entanto, não houve diferença no perfil de produção de IL-4, IL-13 e IFN- γ em resposta ao estímulo com o Derp em indivíduos revacinados com BCG ou infectados, mesmo em presença de restimulação *in vitro* com antígeno micobacteriano (PPD).

O benefício da vacina BCG nas doenças atópicas foi constatado pela primeira vez, em um estudo clínico realizado no Japão, com crianças na idade escolar, no qual foi observada associação entre a vacina BCG e uma menor incidência de

doenças alérgicas. No referido estudo, os indivíduos foram vacinados ao nascer e aos 6 e 12 anos de idade. Diferente do que foi visto no nosso estudo, foi verificado que reatores ao teste tuberculínico apresentaram redução significativa nos níveis de citocinas envolvidas na resposta Th2 (IL-4 e IL-13) e níveis elevados de citocinas da resposta Th1 (IFN- γ) (Shirakawa et al., 1997). Em nosso estudo, esperava-se que o contato com micobactérias pudesse ocasionar a imunomodulação reduzindo a resposta Th2. No entanto, não foi observada uma resposta Th2 importante a Derp em nosso estudo. Esperava-se que a produção de IFN- γ estivesse aumentada tanto após a revacinação quanto nos indivíduos com infecção tuberculosa latente e que isso estivesse relacionado com a diminuição da produção de IgE e com a menor frequência de episódios de manifestações alérgicas. Em concordância com nosso trabalho, um estudo realizado por Yasumi e colaboradores (2005) em modelo murino, com o objetivo de investigar se uma resposta pré-existente específica a um antígeno indutor de respostas do tipo Th1 poderia afetar o desenvolvimento das células Th2, mostrou que a resposta Th1 pré-existente não inibiu o desenvolvimento de uma resposta Th2, tampouco a adição exógena de IFN- γ foi capaz de realizar esta inibição. Por outro lado, uma resposta Th2 pré-existente e a adição exógena de IL-4 foram capazes de inibir o desenvolvimento de uma resposta Th1. Vale ressaltar que o modelo utilizado neste trabalho, o BALB/c, é conhecido por ser mais propenso ao desenvolvimento da resposta Th2, indicando a possível importância da influência do *background* genético do organismo sobre a capacidade de modificação dessas respostas (YASUMI et al., 2005).

Na Amostra 1 foi verificado aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 dois meses após a intervenção independentemente dos indivíduos terem recebido ou não a revacinação, levando à suspeita de que houve contaminação das amostras por lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias que poderiam estar contaminando o antígeno. Diante disso, utilizamos polimixina nos experimentos da Amostra 2, que age como quelante de LPS, em concentração capaz de diminuir a produção de IL-6 em culturas de células mononucleares de sangue periférico em resposta a LPS à concentração de 10 ng/ml (MENDES & BURDMANN, 2009). A produção de IL-6 em resposta ao Derp na Amostra 2 foi semelhante à produção observada na Amostra 1 para o tempo zero.

Na amostra 2, foi verificado que entre os indivíduos não atópicos com infecção latente, houve uma maior produção de TNF, assim como de IL-4 e IL-10.

Entre os indivíduos com infecção tuberculosa latente e que apresentaram alergias nos últimos 12 meses, também foi verificada maior produção de TNF, IL-2, além de IL-4 e IL-10. Tais achados são condizentes com fato desses indivíduos estarem apresentando infecção tuberculosa latente, conforme já foi verificado em outros trabalhos (COUTO, 2008; ROOK et al., 2007).

Por outro lado, não houve correlação entre os resultados de produção de citocinas e manifestações alérgicas, como também foi verificado em outros estudos realizados em humanos (VARGAS et al., 2004; HADLEY et al., 2005). É interessante observar que a população do nosso estudo foi composta por indivíduos que apresentavam casos brandos de alergias, uma vez que a maioria deles não faziam nem mesmo o uso de medicamentos anti-alérgicos. Por não ser uma população que apresentasse uma resposta alérgica exacerbada, com níveis elevados de IL-4, infere-se que isso pode ter influenciado também nos resultados não sendo notória modulação da resposta imune a partir do contato com micobactérias.

A ausência de modulação da resposta atópica pela revacinação e pela infecção tuberculosa latente poderia ser explicada por alguns fatores: a idade da exposição ao antígeno, o *background* do organismo envolvido no estudo e o momento da sensibilização alérgica (anterior ou após o encontro com antígenos micobacterianos), como pode ser verificado em alguns estudos anteriores (BARLAN et al., 2002; SHIRAKAWA et al., 1997).

Nos estudos realizados em modelos animais, por exemplo, é importante ressaltar que os efeitos protetores que possibilitam o desvio imune da resposta Th2 para Th1, levando à melhoria das condições alérgicas, foram observados quando o encontro com o antígeno microbiano ocorreu previamente à sensibilização com o alérgeno (MAJOR et al., 2002; ERB et al., 1998; OZDEMIR et al., 2002; TÜKENMEZ et al., 1999), como pode ser verificado a partir da Tabela 12. Nestes mesmos trabalhos, quando o encontro com o antígeno microbiano ocorreu após a sensibilização, houve melhora apenas parcial, ou até mesmo não foram observadas modificações na resposta imune associada à condição alérgica (WANG & ROOK, 1998; SMIT et al., 2003). Em nosso trabalho, os voluntários eram adultos jovens com idades variando de 19 a 33 anos. Supõe-se que estes indivíduos entraram em contato com os antígenos micobacterianos, a partir da revacinação ou da infecção tuberculosa latente, depois de terem sensibilizados com o alérgeno e isso poderia

influenciar nos resultados do estudo, não sendo verificadas modificações na resposta imune que levasse a um efeito protetor da condição alérgica.

7. CONCLUSÃO

Não houve modulação da resposta ao alérgeno Derp do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* pela revacinação de adultos jovens com a vacina BCG ou pela infecção tuberculosa latente. Nossos resultados sugerem que o contato com micobacterias não afeta a resposta alérgica de indivíduos adultos jovens.

REFERÊNCIAS

BARBOSA, T. et al. BCG (Bacille of Calmette–Guérin) revaccination leads to improved in vitro IFN- γ response to mycobacterial antigen independent of tuberculin sensitization in Brazilian school-age children. **Vaccine**, v. 21, p. 2152 – 2160, mai. 2003.

BAPTISTELLA, E. et al. Literature review and retrospective study of 670 patients with allergic rhinitis. **ACTA ORL/ Técnicas em Otorrinolaringologia**, v. 27, p. 85-88, 2009.

BARLAN, I. B. et al. The impact of in vivo Calmette-Guérin bacillus administration on in vitro IgE secretion in atopic children. **Journal of Asthma**, Istanbul, v. 39, n. 3, p. 239-246, 2002.

BISCHOF, R. J. et al. Immune response to allergens in sheep sensitized to house dust mite. **Journal of Inflammation**, v. 5, n. 16, p. 1-11. 2008.

BLOOMFIELD, S. F. et al. Too clean, or not too clean: the Hygiene Hypothesis and home hygiene. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 402–425, 2006.

BOYCE, J. A, et al. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2011. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 129, n. 2, p. 335-341, 2012.

CAMPBELL, D. J.; KOCH, M. A. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. **Nature Reviews – Immunology**, v. 11, p. 119-128, fev. 2011.

CAMPOROTA, L. et al. The effects of *Mycobacterium vaccae* on allergen-induced airway responses in atopic asthma. **European Respiratory Journal**, v. 21, p. 287–293, 2003.

COUTO, J. Estudo dos mecanismos de virulência de cepas resistentes e sensíveis de *Mycobacterium tuberculosis*. Dissertação (Mestrado) –Universidade de São Paulo – Programa de pós graduação em Farmácia, área de análises clínicas, São Paulo, 2008.

CRUVINEL, W. M. et al. Células T Regulatórias Naturais (T_{REGS}) em Doenças Reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 6, p. 342-355, nov./dez. 2008.

CUNHA, S. S. et al. Lower prevalence of reported asthma in adolescents with symptoms of rhinitis that received neonatal BCG. **Allergy**, v. 49, p. 857 – 862, 26 jan. 2004.

DORTAS JÚNIOR, S. D. et al. Teste de contato atópico (TCA) com ácaros em crianças com eczema atópico (EA). **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 33, n. 4, 2010.

EIFAN, A. O. et al. No association between tuberculin skin test and atopy in a bacillus Calmette-Guérin vaccinated birth cohort. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 20, p. 545–550, 2009.

ERB, K. J. et al. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*–Bacillus Calmette-Guérin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 4, p. 561–569, 16 fev. 1998.

GAFFIN, J. M.; PHIPATANAKUL, W. The Role Of Indoor Allergens In The Development Of Asthma. **Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology**, v. 9, n. 2, p. 128–135, abr. 2009.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, p. 445-454, 24 jul. 2008.

GOUVEIA, A. C. C. et al. Th2 Responses in OVA-Sensitized BALB/c Mice Are Down-Modulated By *Mycobacterium bovis* BCG Treatment. **Journal of Clinical Immunology**, ago. 2012.

GREGORY, L. G. et al. Inhaled house dust mite induces pulmonary T helper 2 cytokine production. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 1597–1610, 2009.

HADLEY, E. A. et al. Effect of *mycobacterium vaccae* on cytokine responses in children with atopic dermatitis. **Clinical and experimental immunology**, v. 140, p. 101-108, dez. 2005.

IBIAPINA, C. C. et al. Rinite, sinusite e asma: indissociáveis? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 4, p. 357-366, 2006.

JESUS, J. R. Investigação sobre associação entre ácaros de poeira, atopia, manifestações alérgicas e infecções intestinais helmínticas. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

JUTEL, M.; AKDIS, C. A. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Allergy**, v. 66, p. 725-732, 10 mar. 2011.

JUTEL, M.; AKDIS, C. A. T-cell Subset Regulation in Atopy. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 11, p. 139-145, 2011.

MAJOR JUNIOR, T. et al. Application of heat killed *Mycobacterium bovis*-BCG into the lung inhibits the development of allergen-induced Th2 responses. **Vaccine**, Würzburg, v. 20, p. 1532-1540, 2002.

MARQUES, M. C.; PINTO, J. A.; GRECO, D. B. Sensibilização a aeroalérgenos em crianças e adolescentes atópicos em Belo Horizonte, MG: comparação da estimativa de IgE específica “in vivo” versus “in vitro”. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 1, p. 22-32, 2001.

MASOLI, M. et al. The global burden of asthma: executives summary of the GINA Dissemination Committee Report. **Allergy**, v. 59, p. 469-478, 2004.

MEDEIROS JÚNIOR, M. et al. Association between mite allergen (Der p 1, Der f 1, Blo t 5) levels and microscopic identification of mites or skin prick test results in asthmatic subjects. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 129, p. 237-241, 2002.

MENDES, C.A.C.; BURDMANN, E.A. Polimixina – Revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, n. 6, p. 752 – 759, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Tratamento Diretamente Observado (TDO) da Tuberculose na Atenção Básica: Protocolo de Enfermagem**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/original_tdo_enfermagem_junho_2010.pdf>. Acesso em: 15 abril 2012.

MOREIRA, M. R. et al. Sensibilização a alérgenos inaláveis domiciliares em pacientes asmáticos em Uberlândia, MG. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n. 1, p. 11-21, 2001.

NANDAKUMAR, S.; MILLER, C. WT; KUMARAGURU, U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome. **Clinical and Molecular Allergy**, p. 1-8, 12 mar. 2009.

NAZPITS, C. K. et al. Sensitization to inhalant and food allergens in brazilian atopic children by *in vitro* total and specific IgE assay. Allergy Project – PROAL. **Journal of Pediatrics**, v. 80, n. 3, p. 203-210, 2004.

OKADA, H. et al. The “hygiene hypothesis” for autoimmune and allergic diseases an update. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, p. 1-9, 21 jan. 2010.

OLIEVEIRA, E. S; MARINHO, J. M; BARBOSA, T. Interferon-gamma production by mononuclear cells in Bacille Calmette-Guérin-revaccinated healthy volunteers predicted long-term antimycobacterial responses in a randomized controlled trial. 2013.

OZDEMIR, C. *et al.* Impact of *Mycobacterium vaccae* immunization on lung histopathology in a murine model of chronic asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 266-270, 2003.

PASTORINO, A. C. et al. Sensitization to aeroallergens in brazilian adolescents living at large urban centers. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 117, n. 2, p. 294, 2006.

PRIOULT, G.; NAGLER-ANDERSON, C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? **Immunological Reviews**, Singapore, v. 206, p. 204–218, 2005.

ROMAGNANI, S. Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 1511-1513, 2007.

ROOK, G. A.W; HAMELMANN, E., BRUNET, L. R. Mycobacteria and allergies. **Immunobiology**, v. 212, p 461 – 473, 2007.

SAMARY, C. S.; SILVA, J. R. L; ROCCO, P. R. M. BCG como modulador do processo inflamatório na asma. **Pulmão RJ**, v. 18, n. 2, p. 89-95, 2009.

SANTOS, A. B. et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: identification of tropomyosin as a major allergen with potential crossreactivity with mite and shrimp allergens. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, p. 329-337, 1999.

SHARMA, S.; LACKIE, P. M.; HOLGATE, S. T. Uneasy breather: the implications of dust mite allergens. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, p. 163-165, 2003.

SHIRAKAWA, T. et al. The Inverse Association Between Tuberculin Responses And Atopic Disorder. **Science**, v. 275, p. 77-79, 3 jan. 1997.

SMIT, J. *et al.* Therapeutic treatment with heat-killed *Mycobacterium vaccae* (SRL172) in a mild and severe mouse model for allergic asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 470, p. 193-199, abr. 2003.

SOARES, F. A. A. et al. Perfil de sensibilização a alérgenos domiciliares em pacientes ambulatoriais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 1, p. 25-28, 2007.

SOCIEDADES BRASILEIRAS DE ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA, PEDIATRIA E PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. II consenso brasileiro no manejo da asma. **Jornal de Pneumologia**, v. 24, n. 4, jul-ago 1998.

SOLÉ, D. *et al.* Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) – Phase 3. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 341-346, 2006.

SPALDING, S.M.; WALD, V.; BERND, L.A.G. IgE sérica total em atópicos e não atópicos na cidade de Porto Alegre. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 93 – 97, 2000.

TÜKENMEZ, F. Effect of pre-immunization by killed *Mycobacterium bovis* and *vaccae* on immunoglobulin E response in ovalbuminsensitized newborn mice. **Pediatric Allergy and Immunology**, United Kingdom, v. 10, p. 107-111, 1999.

VARGAS, M. H. *et al.* Effect of BCG vaccination in asthmatic schoolchildren. **Pediatric allergy and immunology**. v. 15, p. 415-420, 2004.

WANG, C. C.; ROOK, G. A. W. Inhibition of an established allergic response to ovalbumin in BALB/c mice by killed *Mycobacterium vaccae*. **Immunology**, v. 93, p. 307-313, 1998.

YASUMI, T. et al. Limited ability of antigen-specific Th1 responses to inhibit Th2 cell development in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 1325–1331, 2005.

ZUANY-AMORIM C. et al. Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae* induced allergen-specific regulatory T cells. **Nature Medicine**, v. 8, p. 625-629, 2002.

APÊNDICE A- Termo de consentimento da Amostra 1

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

TERMO DE CONSENTIMENTO

1. Eu, _____, fui informado de que este estudo é uma pesquisa e que seu objetivo é avaliar a evolução da resposta imune ~~in vitro~~ e ~~in vivo~~ contra antígenos do bacilo causador da tuberculose e de alérgenos, em indivíduos revacinados com BCG, para identificar parâmetros que possam ser considerados como potenciais marcadores de proteção contra estas doenças.
2. A participação neste estudo envolve o preenchimento de um questionário confidencial, a aplicação do teste tuberculínico antes da revacinação e 1 (um) ano após a revacinação, e a aplicação de um teste cutâneo para alérgenos, bem como a doação de 20 ml de sangue, conforme detalhado abaixo.
3. A duração prevista da minha participação na pesquisa é de um ano até no máximo dois anos. Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão ajudar, no futuro, para a avaliação de novas estratégias vacinais de controle da tuberculose e das alergias. Poderei me beneficiar do conhecimento da minha reatividade a alérgenos comuns associados a alergias respiratórias.
4. Serão realizados os seguintes procedimentos: primeiramente, será submetido à aplicação de teste tuberculínico (PPD) intradérmico no antebraço. Se o resultado do meu teste for negativo, será submetido à nova aplicação no intervalo de uma semana. Em caso de reação negativa em ambos os testes, será revacinado ou não com BCG. Durante o estudo doarei 20 ml de sangue em cada uma das seguintes etapas: antes da revacinação, 2 (dois) meses, 6 (seis) meses e 1 (um) ano após a revacinação. Após 1 ano de revacinação, farei um novo teste tuberculínico, por duas vezes em intervalos de 1 semana se for negativo.
5. Desde já consinto a realização de todos os tipos de análises hematológicas e sorológicas, dentre estas a realização do teste de HIV. Consinto também na realização de análises sobre o conteúdo de RNA em culturas do meu sangue. Consinto também que seja armazenado material biológico, inclusive DNA, para análises posteriores, com finalidade exclusiva de pesquisa, ainda que não previstas neste estudo. Estou ciente que para estas utilizações um comitê de ética em pesquisas avaliará o estudo a ser proposto.
6. Os possíveis desconfortos e riscos inerentes aos procedimentos do estudo são aqueles relacionados com a retirada de sangue venoso, aplicação de teste tuberculínico e revacinação com BCG (ver folder). Estas reações adversas foram explicadas pessoalmente e constam do folder que recebi, juntamente com a autorização do serviço de referência para o meu atendimento a qualquer momento durante a minha participação no estudo. Dor local, reações à vacina, e, mais raramente, infecção, podem ocorrer. Os procedimentos referidos são condutas médicas de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.
7. Os voluntários serão randomizados no início do estudo para o recebimento ou não da vacina BCG, e, portanto, não posso escolher a que grupo será designado (revacinado ou não revacinado). A revacinação com BCG em profissionais de saúde é recomendada pelo Ministério da Saúde, e, portanto, ao final do estudo será oferecida a oportunidade de revacinação para mim, caso eu seja selecionado para o grupo não revacinado.
8. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes, e quaisquer esclarecimentos sobre os mesmos estarão disponíveis para mim caso eu manifeste o desejo de obtê-los.
9. Dr. _____ discutiu comigo esta informação e se colocou à disposição para responder minhas perguntas. Se eu tiver novas perguntas eu poderei ~~contatá-lo~~, pelo telefone _____, ou entrar em contato com os responsáveis pelo estudo, através do Dr. Sérgio Arruda, pelo telefone 3356-4320 (ramal 232).
10. Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária e não remunerada, e eu sou livre para recusar participar no estudo, ou me retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que possa necessitar em decorrência dos procedimentos realizados no âmbito do estudo.
11. Recebi uma cópia deste formulário e tive a oportunidade de lê-lo cuidadosamente, bem como de tirar todas as minhas dúvidas.
12. Pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

Assinatura:	RG nº _____	Data _____ / _____ / _____	
Testemunha	RG nº _____	Função no estudo: _____	

APÊNDICE B – Termo de consentimento da Amostra 2

RELAÇÃO ENTRE REATIVIDADE AO TESTE TUBERCULÍNICO E RESPOSTA ALÉRGICA EM ESTUDANTES DA ÁREA DE SAÚDE EM SALVADOR (BAHIA)

TERMO DE CONSENTIMENTO

- Eu, _____, fui informado de que este estudo é uma pesquisa e que seu principal objetivo é avaliar a quantidade de pessoas infectadas com o bacilo da tuberculose em estudantes universitários da área de saúde em Salvador, bem como estimar o risco de infecção anual entre estes estudantes, fornecendo dados para o planejamento de medidas de controle e prevenção contra a tuberculose no desenvolvimento das atividades clínicas por estes profissionais. Além disso, será estudada a possível associação entre a capacidade de responder ao bacilo e a existência de resposta contra agentes causadores de alergias respiratórias.
- A participação neste estudo envolve o preenchimento de questionário confidencial, a aplicação de testes cutâneos (de injeção na pele) e a doação de 10 ml de sangue, conforme detalhado abaixo.
- A duração prevista da minha participação na pesquisa é de até dez anos. Os resultados deste estudo podem me beneficiar diretamente, pois:
 - Permitirão avaliar se estou infectado com o bacilo da tuberculose, e caso eu seja negativo ao teste tuberculínico poderei estar sendo monitorado durante o meu curso quanto à possibilidade de contrair a infecção tuberculosa.
 - Permitirão avaliar se sou alérgico contra agentes causadores de alergias respiratórias.
- Serão realizados os seguintes procedimentos:
 - Serei submetido à aplicação de teste tuberculínico (com o PPD, derivado protéico purificado), por técnico devidamente capacitado. Se o resultado do meu teste for negativo, serei submetido a nova aplicação no intervalo de uma semana para confirmação do resultado.
 - Serei submetido à aplicação de testes para detectar possível(s) alergia(s) contra agentes causadores de alergias respiratórias. Esses testes administrados por punção, com a leve penetração da superfície da pele, e gotejamento de soluções contendo um dos dito alérgenos a serem testados (contra espécies de ácaros, fungos, pólen, baratas e animais domésticos), controle positivo (histamina) e controle negativo (diluente).
 - 10 ml de sangue serão coletados para avaliação imunológica da resposta de minhas células sanguíneas contra componentes do bacilo da tuberculose e dos agentes causadores de alergias respiratórias.
- Desde já permito a realização de todos os tipos de análises hematológicas e sorológicas, dentre estas a realização do teste de HIV. Consinto também na realização de análises sobre o conteúdo de RNA em culturas do meu sangue. Consinto também que seja armazenado material biológico, inclusive DNA, para análises posteriores, com finalidade exclusiva de pesquisa, ainda que não previstas neste estudo. Estou ciente que para estas utilizações um comitê de ética em pesquisas avaliará o estudo a ser proposto. Todos os resultados relativos aos testes realizados em amostras de sangue ou testes cutâneos serão disponibilizados para mim pelos responsáveis pelo estudo, em caráter absolutamente sigiloso.
- Os possíveis desconfortos e riscos inerentes aos procedimentos do estudo são relacionados à aplicação dos testes cutâneos, como coceira no local da aplicação e reação forte ao PPD. Os testes serão realizados por pessoal treinado e experiente, e todos os cuidados apropriados serão tomados. O teste tuberculínico é uma conduta médica de rotina, recomendada pelo Ministério da Saúde. Reação alérgica forte à administração dos testes alérgicos ocorre raramente; este teste será realizado sempre sob supervisão médica, por técnico treinado na aplicação de medidas para conter possíveis reações exacerbadas. Estas reações adversas foram explicadas pessoalmente e constam do folder que recebi, juntamente com a autorização do serviço de referência para o meu atendimento a qualquer momento durante a minha participação no estudo.
- Os resultados deste estudo serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes, e quaisquer esclarecimentos sobre os mesmos estarão disponíveis para mim caso eu manifeste o desejo de obtê-los.
- Dr. _____ discutiu comigo esta informação e se colocou à disposição para responder minhas perguntas. Se eu tiver novas perguntas eu poderei contactá-lo pelo telefone _____, ou entrar em contato com os responsáveis pelo estudo, Dra. Thelma Barbosa ou Dr. Sérgio Arruda, pelos telefones 3176-2264 ou 3176-2232.
- Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária e não remunerada, e eu sou livre para recusar participar no estudo, ou me retirar em qualquer época após o seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que possa necessitar em decorrência dos procedimentos realizados no âmbito do estudo.
- Recebi uma cópia deste formulário e tive a oportunidade de lê-lo cuidadosamente, bem como de tirar todas as minhas dúvidas.
- Pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

Assinatura: _____ RG n° _____ Data _____/_____/_____
 Testemunha _____ RG n° _____ Função no estudo: _____

APÊNDICE C – Questionário geral

1 ESTUDO DA REVACINAÇÃO COM BCG

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO Voluntário n°: 001

Data: ____/____/____

Nome _____

Data do Nascimento: _____

Curso _____ Instituição _____ Semestre: _____

Endereço _____ residencial: _____

Endereço eletrônico (e-mail): _____

Telefone: _____ Celular: _____

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são estritamente confidenciais. A resposta a qualquer

das perguntas do questionário é facultativa. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável.

ESTUDO DA REVACINAÇÃO COM BCG

Voluntário n°: 001

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

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

() Masculino () Feminino

2- Qual a sua idade? _____

3- Qual o total de rendimentos da sua família?

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

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

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

4- Tem ou teve contato com pessoas com tuberculose?

() Não () Sim

5- Qual o grau de contato?

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

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

6- Esse contato com paciente com tuberculose foi:

() diário () diário intermitente () semanal

() quinzenal () eventual () não sabe informar

7- Foi vacinado com BCG?

() Não () Sim () Não sabe

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

() Não () Sim () Não sabe

9- Já foi internado para realização de alguma cirurgia?

() Não () Sim

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

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

() Não () Sim

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são estritamente confidenciais. A resposta a qualquer das perguntas do questionário é facultativa. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável.

II- Avaliação nutricional (questionário 2):

- 1- Qual o seu peso? _____
- 2- Altura? _____
- 3- O que costuma comer nas refeições?
 arroz feijão carne de boi peixe
 carne de frango verduras legumes
- 4- Perdeu mais de 10% de peso nos últimos 12 meses?
 Não Sim
- 5- Nos últimos seis meses chegou a ter diarreia por mais de 30 dias?
 Não Sim

III- ESTADO GERAL DE SAÚDE (questionário 3)

1. Já teve ou tem tuberculose?
 Não Sim
 2. Algum médico já lhe disse que você tinha asma ou bronquite ou bronquite alérgica?
 Não Sim
 Se a resposta foi sim, especificar o ano: _____
 3. Já teve algum problema nos pulmões?
 Não Sim
 Se a resposta foi sim:
 Em que ano? _____
 Qual o problema? _____
 Qual o diagnóstico? _____
 Que tratamento foi feito? _____
 Que remédios tomou? _____
 Que especialista o atendeu? _____
- Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são estritamente confidenciais. A resposta a qualquer das perguntas do questionário é facultativa. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável.

4. Nas últimas semanas teve ou vem tendo tosse?
 Não Sim
 se a resposta foi não passe para a questão 6.
5. Há quanto tempo vem tendo tosse? _____
6. Teve febre nas últimas semanas?
 Não Sim
7. Tem sudorese excessiva durante a noite
 Não Sim
8. Tem Diabetes?
 Não Sim
9. Usa insulina?
 Não Sim
10. Tem ou teve algum tipo de câncer?
 Não Sim
11. Tem ou teve algum tipo de alergia?
 Não Sim

12. Faz uso de algum medicamento?

Não Sim

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

13. Faz uso de corticóides?

Não Sim

Se a resposta foi sim, Qual?

14. Faz uso de medicações controladas?

Não Sim

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

15. Faz exame de fezes regularmente?

Não Sim

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são estritamente confidenciais. A resposta a qualquer

das perguntas do questionário é facultativa. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável.

5

16. Quando foi realizado o último exame? _____

17. Já apresentou resultado positivo?

Não Sim

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

18. Você é hemofílico?

Não Sim

19. É doador de sangue?

Não Sim

20. Tem tatuagem no corpo?

Não Sim

21. Já fez algum tratamento de hemodiálise?

Não Sim

22. Recebeu alguma transfusão de sangue?

Não Sim

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

1. Fuma?

Não Sim

2. Qual a quantidade diária?

1-5 cigarros 5-10 cigarros 10 a 15 cigarros

15 a 20 cigarros mais de 20 cigarros

3. Qual o tipo de fumo?

cigarro charuto outros. Qual? _____

4. Faz uso de bebidas alcoólicas?

Não Sim

Se a resposta foi sim, Quais? _____

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são estritamente confidenciais. A resposta a qualquer

das perguntas do questionário é facultativa. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável.

6

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

1 vez/mês 1 vez por semana mais de 1 vez/semana

diariamente

6. Faz uso de drogas injetáveis?

Não Sim

Se a resposta foi sim, qual? _____

V- Atividade sexual (questionário 5):

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

0-1 2 3-5 6-10

11-20 mais de 20

2. Já teve alguma doença sexualmente transmissível?

Não Sim

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

3. Já fez teste de HIV ou HTLV?

Não Sim

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

APÊNDICE D – Questionário de doenças respiratórias

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO Voluntário n°:

Data: ___/___/___

Nome _____

Data do Nascimento: _____

Curso _____ Instituição _____ Semestre: _____

Endereço _____ residencial: _____

Endereço eletrônico (e-mail): _____

Telefone: _____ Celular: _____

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são estritamente confidenciais. A resposta a qualquer das perguntas do questionário é facultativa. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável.

Questionário de doenças respiratórias (questionário 1)

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

Sim Não Não sabe

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

Sim Não Não sabe

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

nenhuma crise 1 a 3 crises 4 a 12 crises

mais de 12 crises Não sabe

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

nunca acordou com chiado menos de 1 noite por semana

uma ou mais noites por semana Não sabe

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

Sim Não Não sabe

6- Alguma vez na vida você teve asma?

Sim Não Não sabe

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

Sim Não Não sabe

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

infecção respiratória?

Sim Não Não sabe

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são estritamente confidenciais. A resposta a qualquer

das perguntas do questionário é facultativa. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável.

Questionário de doenças respiratórias (questionário 2)

1- Alguma vez na vida você teve problema com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou

obstrução nasal, quando não estava gripado?

Sim Não Não sabe

Se a resposta foi não, passe para a questão 6

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

Sim Não Não sabe

Se a resposta foi não, passe para a questão 6

3- Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento

ou coceira nos olhos?

Sim Não Não sabe

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

em qual ou quais meses isto ocorreu)

Janeiro Fevereiro Março Abril

Maio Junho Julho Agosto

Setembro Outubro Novembro Dezembro

Não sabe

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

Nada Um pouco Moderado Muito

Não sabe

6- Alguma vez na vida você teve rinite?

Sim Não Não sabe

Seu questionário não será identificado. Os dados constantes são estritamente confidenciais. A resposta a qualquer

das perguntas do questionário é facultativa. Em caso de dúvidas consulte o pesquisador responsável.

Questionário de doenças respiratórias (questionário 3)

1- Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam

e desapareciam por pelo menos 6 meses?

Sim Não Não sabe

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

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

Sim Não Não sabe

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

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

Sim Não Não sabe

4- Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) desapareceram completamente nos

últimos 12 meses?

Sim Não Não sabe

5- Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à

noite por causa dessa coceira na pele?

- Nunca nos últimos 12 meses Menos de 1 noite por semana
 Uma ou mais noites por semana Não sabe
- 6- Alguma vez você teve manchas com coceira (eczema)?
 Sim Não Não sabe



Ministério da Saúde

FIUCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 19/2002

Protocolo: 106

Projeto de Pesquisa: "Estabelecimento de potenciais marcadores de proteção para a avaliação de estratégias vacinais contra infecções micobacterianas"

Pesquisador Responsável: Dr. Sergio Marcos Arruda

Instituição ou Departamento: Unidade de Histopatologia/CPqGM/Fiocruz

Considerações:

Após a análise ética do projeto, tendo sido feitos pelo responsável os esclarecimentos solicitados e pelo mesmo adequadas às pendências apontadas, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIUCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovado** o projeto supracitado.

Salvador, 12 de novembro de 2002

Dr. Italo A. Sherlock
Coordenador do
CEP-CPqGM/Fiocruz

ITALO A. SHERLOCK
Coordenador do CEP-CPqGM
Mat. 454853-3 CPqGM-Fiocruz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PARECER Nº 117/2006

Protocolo: 106

Emenda do Projeto de Pesquisa: Emenda nº3 “Estabelecimento de Potenciais Marcadores de Proteção para a Avaliação de Estratégias Vacinais Contra Infecções Micobacterianas”.

Pesquisador Responsável: Dr. Sérgio M. Arruda

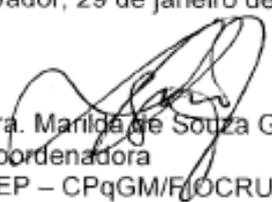
Instituição ou Departamento: LIM1

Considerações:

Após a análise ética da emenda do projeto, o CEP considera que a emenda atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32/04/97), com base na Resolução 196/96, julga **aprovada** a emenda supracitada.

Salvador, 29 de janeiro de 2007.


Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Coordenadora
CEP – CPqGM/FIOCRUZ



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

PROTOCOLO

Atesto que nesta data foram recebidos os documentos referente a proposta de **Emenda nº 03** intitulada "Relação entre reatividade ao teste tuberculínico e responsividade alérgica em estudantes da área de saúde em Salvador (Bahia) ao Projeto N° 106, **protocolo 106**, intitulado "Estabelecimentos de potenciais marcadores de proteção para a avaliação de estratégias vacinais contra infecções micobacterianas" de responsabilidade da Dra. Theolis Costa Barbosa para análise e apreciação do Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz.

Salvador, 31 de agosto de 2006.


Tatiane Valasques
Secretaria do CEP/CPqGM

Bacille Calmette-Guérin revaccination modulates the total serum IgE levels in a randomized controlled trial

Thaís Silva Peleteiro, MSci¹, Evelin Santos Oliveira, MSci¹, Francisco Soares Nascimento Sampaio, MD, MSci², Neuza Maria Alcântara-Neves, MD, PhD², Carlos Mauricio Cardeal Mendes, MD, PhD², Theolis Barbosa, DSci^{1,*}

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM, FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil.

²Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador, Bahia, Brazil.

*Correspondence to: Dr. Theolis Barbosa. Contact information: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Rua Waldemar Falcão 121, Candeal, 40296-710 Salvador, Bahia, Brazil. Phone: +55 71 3176-2215; Fax: +55 71 3176-2279, e-mail: theolis@bahia.fiocruz.br.

Financial Disclosure: this work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB [www.fapesb.ba.gov.br, Convênio 160/03] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq [www.cnpq.br, Proc. Nr. 476860/2007-5]. TSP received a scholarship from FAPESB, and ESO received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [www.capes.gov.br]. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Capsule summary:

BCG revaccination modulated the total serum IgE levels (but not the allergen-specific IgE levels) in vaccine-responsive individuals. This result is in agreement with lack of protection conferred by BCG against allergic diseases.

Key words:

Mycobacterium bovis BCG; Allergy; Atopy; Immune modulation; *Dermatophagoides pteronyssinus*; Derp; Whole blood assay; IFN- γ ; Vaccine take.

To the Editor:

Studies performed in humans are not conclusive regarding the possible protection conferred by *Mycobacterium bovis* Bacille of Calmette-Guérin (BCG) immunization against allergic diseases¹. Nevertheless, evidences of BCG capacity of modulating several aspects of the allergic response accumulate in experimental models of asthma. Mice immunized with BCG and sensitized with OVA by intranasal route have shown decreased percentages of eosinophils in the bronchoalveolar lavage fluid, reduced total and allergen-specific serum IgE, diminished production of Th2 cytokines and less lung inflammation paralleled by increased production of IFN- γ , TGF- β and IL-10². Similarly, in spite of the fact that BCG shows consistent protection against experimental tuberculosis in the mouse model, vaccine efficacy against this disease in humans is highly variable among distinct populations, and is likely to depend on the individual capacity of mounting an appropriate immune response to vaccination³. We evaluated the atopic response in young adults revaccinated with BCG in a randomized controlled trial performed in Salvador, Bahia, Brazil, where vaccine take was studied³. In this city atopic individuals are frequently sensitized against the respiratory allergen *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp)⁴ and the estimated efficacy of a second dose of BCG against tuberculosis is 19% (3-33% 95% confidence interval, P=0.022)⁵. Neonatal BCG scar was associated with a reduction in the risk of asthma only in individuals with a past history suggestive of allergic rhinitis⁶.

The volunteers were recruited among tuberculin skin test (TST) and human immunodeficiency virus (HIV) negative individuals (Table). The study was approved by the Ethics Committee of the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CAAE-0010.0.225.069-09). 46% of the BCG-revaccinated individuals have shown

consistently increased IFN- γ production up to 12 months after intervention in whole blood cultures (blood diluted 1:10 in RPMI 1640) stimulated with *M. tuberculosis* H37Rv whole antigen (10 μ g/ml *M. tuberculosis* H37Rv culture lysate). Ratios of IFN- γ production two months after vaccination over baseline (IFN- γ T2/T0 ratio) above 3.3 predicted higher 12-month follow-up IFN- γ response. These individuals with IFN- γ T2/T0 ratio above 3.3 were considered to show a positive vaccine take, even though the relationship with the possible protection against tuberculosis could not be established³.

The modulation of the atopic response was assessed by correlating the serum allergen-specific (Derp IgE) and the total IgE levels at T0 with those obtained at T2. To address the possible influence of vaccine take we applied multivariate analysis. Derp and total IgE were considered clinically relevant parameters as the ratio between them was associated with the prognosis of immunotherapy in patients with rhinitis⁵.

Socio-demographic and clinic characteristics were obtained using a standard questionnaire and additionally the ISAAC questionnaire⁷. The reactivity against respiratory allergens (*D. pteronyssinus*; *Blomia tropicalis*; *Blatella germanica*; *Periplaneta americana*; dog epithelium; cat epithelium; polens mixture IV - *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, *Lolium perene*, *Phleum pratense* e *Poa pratenses*; and fungi mixture V - *Aspergillus amstelodami*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium brevicompactum*, *P. expansum*, *P. notatum*, *P. roqueforti*, *Cladosporium fluvum*, *C. herbarum*) was assessed using a skin prick test (SPT) (ALK-Abelló, São Paulo, Brazil). Total IgE was measured using a cytometric bead assay (Human IgE Flex Set CBA, Becton Dickinson, Palo Alto, CA) and the FACS Array flow cytometer (Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Derp IgE was measured using ImmunoCAP (ImmunoCAP ISAC Phadia AB, Uppsala, Sweden). The multivariate linear model⁸ was adjusted for gender, age, body mass index (BMI), income, size of revaccination scar, allergy on the past 12 months, atopy (defined as a positive SPT and/or Derp IgE above 0.35 kU/L) and vaccine take.

The proportion of atopic and non-atopic individuals did not differ between revaccinated and control individuals. No differences were found for total IgE or Derp IgE levels at T2 compared with T0 in both groups. The total IgE levels at T2 in BCG revaccinated individuals correlated positively with both total IgE (P<0.0001; Spearman r=0.88, Figure) and Derp IgE (P<0.0001; Spearman r=0.54) at T0,

suggesting the lack of IgE modulation upon BCG revaccination, which is in agreement with previous work⁹. No association was found in bivariate analyses between the IgE levels and the parameters used in the multivariate linear model. The inclusion of the above mentioned variables in the model took into account the fact that they correlated with the IFN- γ production after BCG revaccination in previous work³.

In the model, control and BCG-revaccinated subjects with negative and with positive vaccine take were compared (Figure). The correlation between total IgE levels at T2 and T0 was observed for controls and BCG-revaccinated individuals with negative vaccine take, but was not maintained for the BCG-revaccinated volunteers with positive vaccine take. Therefore, only BCG-responsive subjects underwent modulation of total IgE levels. Derp IgE levels at T2 correlated with its levels at T0 regardless of the group. The BCG-induced IgE modulation did not affect the atopic response to the specific allergen.

The individuals in our study population referred mild symptoms of respiratory allergies. Most of them had not used medication to treat allergic symptoms in the past 12 months (Table). A minority (15%) referred dry cough in the absence of respiratory infection in the past 12 months, and only one individual referred symptoms after physical exercises as well as symptoms sufficient to impair daily life activities and speech in the same time interval. Clinical evaluations were not performed to verify a possible regression of allergic symptoms after revaccination.

The incapacity of BCG revaccination to modulate the atopic response may be related to the age of antigen exposure and/or genetic background of the enrolled subjects as previously suggested⁵. In animal models the protective effects of the modulation of the Th2 responses leading to improvement of allergic condition parameters were observed when the encounter with the microbial antigen occurred before allergen sensitization². BCG revaccination effect on total IgE may reflect the modulation of anti-parasitic responses. Some individuals referred recent parasitic infection (Table).

In conclusion, in spite of the fact that BCG revaccination is capable of modulating the total IgE levels in individuals that are responsive to the vaccine, this modulation does not affect the atopic response in our population.

Acknowledgements:

We wish to thank Jorge Lessa Tolentino, Silvana Sousa da Paz and Cleriston Farias Queiroz for technical help. We also thank Universidade Federal da Bahia and Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública for the logistic support. The Ataulpho de Paiva Foundation kindly provided the *M. bovis* BCG Moreau-RJ vaccine. *M. tuberculosis* H37Rv culture lysate was kindly provided as part of NIH, NIAID Contract No. HHSN266200400091C, entitled “Tuberculosis Vaccine Testing and Research Materials”, which was awarded to Colorado State University.

Funding: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia–FAPESB [Convênio 160/03] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [Proc. Nr. 476860/2007-5]. TSP received a scholarship from FAPESB, and ESO received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References:

1. Arnoldussen DL, Linehan M, Sheikh A. BCG vaccination and allergy: a systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:246–253, 253.e1–21.
2. Gouveia ACC, Brugiolo ASS, Alves CCS, Silva FMC, Mesquita FP, Gameiro J, et al. Th2 responses in OVA-sensitized BALB/c mice are down-modulated by *Mycobacterium bovis* BCG treatment. *J Clin Immunol* 2013;33:235–45.
3. Oliveira ES, Marinho JM, Barbosa T, for the study group. Interferon-gamma production by mononuclear cells in Bacille Calmette-Guérin-revaccinated healthy volunteers predicted long-term antimycobacterial responses in a randomized controlled trial. *Vaccine* 2013;
4. Ponte JC, Junqueira SB, Veiga RV, Barreto ML, Pontes-de-Carvalho LC, Alcântara-Neves NM. A study on the immunological basis of the dissociation between type I-hypersensitivity skin reactions to *Blomia tropicalis* antigens and serum anti-*B. tropicalis* IgE antibodies. *BMC Immunol* 2011;12:34.
5. Barreto ML, Pereira SM, Pilger D, Cruz AA, Cunha SS, Sant'Anna C, et al. Evidence of an effect of BCG revaccination on incidence of tuberculosis in school-aged children in Brazil: second report of the BCG-REVAC cluster-randomised trial. *Vaccine* 2011;29:4875–7.
6. da Cunha SS, Cruz AA, Dourado I, Barreto ML, Ferreira LD, Rodrigues LC. Lower prevalence of reported asthma in adolescents with symptoms of rhinitis that received neonatal BCG. *Allergy* 2004; 59:857-62.
7. Flohr C, Nagel G, Weinmayr G, Kleiner A, Williams HC, Ait-Khaled N, et al. Tuberculosis, bacillus Calmette-Guérin vaccination, and allergic disease: findings from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase Two. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:324–31.
8. Massad E, Menezes RX, Silveira PSP, Ortega NRS. *Métodos Quantitativos em Medicina*. 1st ed. Sao Paulo: Manole; 2004.
9. Marks GB, Ng K, Zhou J, Toelle BG, Xuan W, Belousova EG, et al. The effect of neonatal BCG vaccination on atopy and asthma at age 7 to 14 years: an historical cohort study in a community with a very low prevalence of tuberculosis infection and a high prevalence of atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:541–9.

Table and Figure legend:

Table. Socio-demographic and clinical characteristics of the study subjects.

Figure. Serum IgE levels in revaccinated (A, B) and control (C, D) volunteers and multivariate linear models explaining the relationship between Derp IgE levels two months after intervention and at baseline (E) and between total IgE levels at the same time points (F).

	Revaccinated (N=46) ¹				Control (N=30) ²		P-value of revaccinated x control	
	Atopic (N= 29)		Not atopic (N= 16)		(Atopic N= 17) Not atopic (N= 11)		Atopic	Not atopic
	20 (19-21)	20 (19-21)	20 (17-23)	20 (18-22)	20 (17-23)	20 (18-22)		
Age in years (95% CI) ³	9 (31)	2 (12)	5 (29)	4 (36)	0.5909	1.0000		
Male (%)	20 (69)	14 (88)	12 (71)	7 (64)				
Female (%)	22 (76)	11 (69)	13 (76)	8 (73)	1.0000	1.0000		
Family income > 5 MW ⁴ (%)	1 (3)	0	1 (6)	0				
Not informed	2 (7)	0	0	0				
Smoking (%)	0	0	0	0				
Not informed	0	0	0	0				
Drug use (%)								
Alcohol ⁵	8 (28)	6 (38)	1 (6)	3 (27)	0.0650	0.6924		
Other ⁶	1 (3)	0	0	0				
Not informed	3 (10)	0	0	0				
Parasitic diseases								
Yes	3 (10)	1 (6)	2 (12)	0	1.0000	1.0000		
No	13 (45)	8 (50)	8 (47)	5 (45)				
Unknown or not informed	13 (45)	7 (44)	7 (41)	6 (55)				
BMI ⁷ (95% CI) ³	21.0 (20.1-22.0)	20.3 (19.2-21.3)	21.3 (19.6-23)	20.4 (18.8-22.0)	0.2600	0.6403		
BCG ⁸ scar size from revaccination in mm (95% CI) ³	8.3 (6.3-10.2)	7.4 (4.1-10.8)	-	-				
Current medicine intake (%)								
Anti-histaminic	0	1 (6)	0	0				
Corticoids	0	0	1 (6)	0				
Other non-related	6 (21)	3 (19)	3 (18)	2 (18)				
None	23 (79)	12 (75)	13 (76)	9 (82)	1.0000	1.0000		
Allergy (%) ⁹								
Asthma/wheezing	6 (21)	2 (12)	4 (24)	2 (18)	1.0000	1.0000		
Rhinitis/sneezing	16 (55)	4 (25)	16 (94)	2 (18)	0.0073	0.6404		

Dermatitis/eczema	5 (17)	2 (12)	1 (6)	0	0.3859	0.5077
Not allergic	8 (28)	11 (69)	1 (6)	8 (73)	0.1242	1.0000
Unknown or not informed	1 (3)	0	0	0		
Allergy symptoms in the past 12 months (%) ⁹	13 (45)	5 (31)	13 (76)	3 (27)	0.0636	1.0000
Unknown or not informed	0	0	0	0		
Atopy (%)						
To any allergen in the SPT ¹⁰	17 (59)	-	8 (47)	-	0.5452	-
To Derp ¹¹ in the serologic test	24 (83)	-	14 (82)	-	1.0000	-
Serologic test conversion 2 months after intervention ¹²	-	1 (6)	-	1 (9)		
Total IgE in ng/ml (95% CI)						
Baseline (T0)	90.0 (45.4-134.5)	19.4 (3.2-35.7)	23.6 (10.8-36.5)	21.4 (2.2-40.6)	0.0058	0.8738
2 months after intervention (T2)	66.7 (36.0-97.4)	21.9 (7.9-36.0)	34.4 (8.9-60.0)	25.5 (1.8-49.2)	0.0756	0.9307
Derp IgE in kU/ml (95% CI)						
Baseline (T0)	29.40 (13.18-45.63)	0.00 (0.00-0.00)	23.70 (6.54-40.85)	0.00 (0.00-0.00)	0.6157	-
2 months after intervention (T2)	29.3 (10.5-48.0)	0.12 (-0.10-0.33)	8.09 (-2.69-18.87)	0.22 (-0.47-0.90)	0.3103	0.9112

¹One revaccinated individual not tested. ²Two control individuals not tested. ³Results expressed as mean (CI, confidence interval at 95%). ⁴MW, minimum wage (above 5 MW is considered to signify class "A" consumer) [16]. ⁵Alcohol use was defined as alcohol consumption at least once a week. ⁶Marihuana. ⁷BMI, body mass index: weight in kilograms divided by the square of the height in meters [17]. ⁸BCG, Bacille Calmette-Guérin. ⁹Data obtained from ISAAC questionnaire application [ref.]. ¹⁰CPT, cutaneous prick test. ¹¹Derp, *Dermatophagoides pteronyssinus* whole extract. ¹²Frequency of individuals with IgE specific to Derp equal or inferior to 0.35 at baseline that increased these levels to more than 0.35 two months after the intervention.

