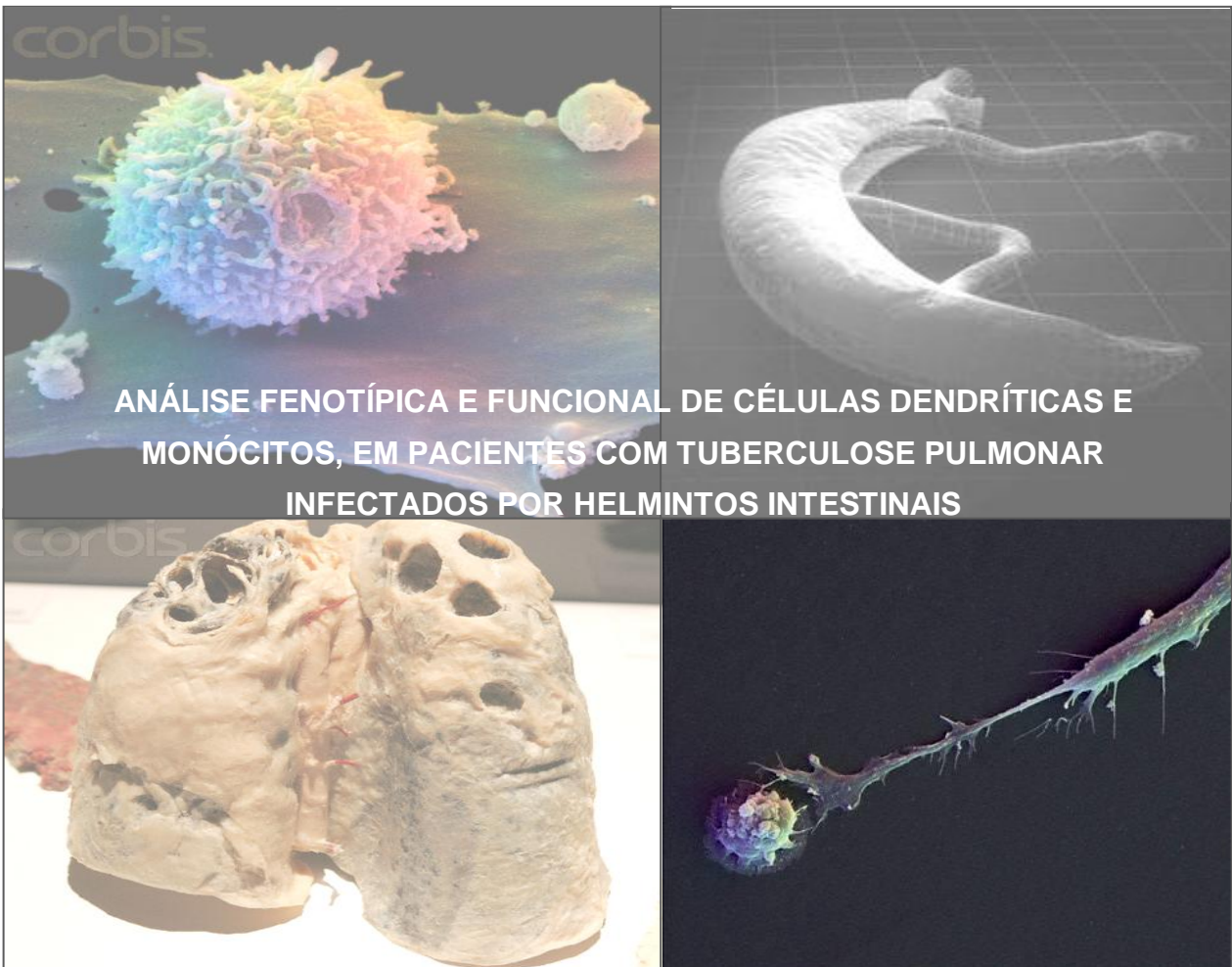




**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
NÚCLEO DE DOENÇAS INFECCIOSAS**



**FLÁVIA DIAS COELHO DA SILVA**



**VITÓRIA  
2009**

FLÁVIA DIAS COELHO DA SILVA

**ANÁLISE FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E  
MONÓCITOS, EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR  
INFECTADOS POR HELMINTOS INTESTINAIS**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências - Patologia Geral das Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues.

VITÓRIA  
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S586a Silva, Flávia Dias Coelho da, 1979-  
Análise fenotípica e funcional de células dendríticas e monócitos, em pacientes com tuberculose pulmonar infectados por helmintos intestinais / Flávia Dias Coelho da Silva. – 2009. 122 f. : il.

Orientador: Rodrigo Ribeiro Rodrigues.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Imunologia. 2. Tuberculose. 3. Helminíase. 4. Monócitos. 5. Macrófagos. 6. Citocinas. 7. Quimiocinas. 8. Células dendríticas. 9. Imunofenotipagem. I. Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS  
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS


PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda FLÁVIA DIAS COELHO DA SILVA, apresentou dissertação intitulada: "ANÁLISE FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS DENTRÍTICAS E MONÓCITOS, EM PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR CO-INFECTADOS POR HELMINTOS INTESTINAIS" em sessão pública, no dia 28 de abril de 2009, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Ciências – Patologia Geral das Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, tendo sido aprovada com restrição, condicionada a apresentar correções no texto.

Considerando as correções apresentadas na dissertação, a Comissão Examinadora decidiu, **aprovar sem restrições**, a dissertação e habilitar a bióloga FLÁVIA DIAS COELHO DA SILVA, a obter o Grau de MESTRE EM CIÊNCIAS – PATOLOGIA GERAL DAS DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 03 de agosto de 2009

  
Prof.ª. Dr.ª. Andréa Teixeira de Carvalho

  
Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

  
Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues  
(Orientador)

Ao meu querido marido que tanto me apóia, e que muitas vezes, priva-se de seus sonhos e metas em favor dos meus; o meu amor, carinho, admiração e agradecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelas bênçãos concedidas, pelos direcionamentos no decorrer deste trabalho e pelas pessoas que colocou em minha vida, para a conclusão do mesmo.

Ao meu amado esposo, Mauro Sérgio, pela AJUDA, apoio, paciência, confiança, companheirismo, dedicação e AMOR, sem os quais eu jamais teria alcançado esta meta.

Aos meus pais, José Fernando e Elinete, e irmãos, Fernando e Flávio, pelo amor e apoio.

À família Silva, pelo carinho e incentivo.

Ao Professor Rodrigo, pela oportunidade, orientação, confiança e dedicação.

Às amigas, Luciana, Lúcia e Janete que foram mais que um ombro amigo. Agradeço pela ajuda, apoio e por serem minhas amigas.

Às amigas, Carol, Valéria, Carlinha pelo apoio, paciência e amizade.

À professora Lúcia Renata, por ter me apresentado a imunologia e estimulado o espírito de pesquisador em mim.

À professora Dra. Andréa Teixeira, por ter aceito meu convite, e também, por ter feito contribuições extremamente pertinentes à dissertação.

Ao professor Dr. Fausto Pereira, por ter feito parte de minha banca. Além disso, agradeço pela ajuda, contribuições e paciência que auxiliaram na conclusão desse trabalho.

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas, pelo suporte ao desenvolvimento de nosso projeto.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa dissertação. Sem vocês, não estaria concluindo mais uma etapa de minha vida. Amo todos vocês.

"De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre a começar, a certeza de que é preciso continuar, e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.

Portanto, devemos: fazer da interrupção um caminho novo, da queda, um passo de dança, do medo, uma escada, do sonho, uma ponte, da procura, um encontro."

(Fernando Sabino)

## RESUMO

A Tuberculose (TB) ainda é uma ameaça global à humanidade, sem vacina eficaz disponível até momento. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e os helmintos são coendêmicos em muitas regiões no mundo, e que as “coinfecções” com esses patógenos são freqüentes. A infecção por helmintos intestinais pode ser um dos fatores de risco para o desenvolvimento da TB pulmonar ativa. Através de marcações fenotípicas e dosagem de citocinas e quimiocinas, pretendemos mostrar que os vermes são capazes de desviar a resposta Th-1 protetora para a Tuberculose para a Th-2 característica nas helmintíases intestinais. Cultura de sangue total para dosagem de citocinas e quimiocinas pela técnica de microesferas marcadas para leitura em citômetro de fluxo, em conjunto com a imunofenotipagem de células dendríticas (DCs) e monócitos/macrófagos através de marcadores extra e intracelulares via citometria, foram utilizadas com o objetivo de se estudar alguns aspectos da imunidade inata em pacientes com TB, com TB e helmintíases intestinais (TB+HELM), com helmintos, e controles saudáveis. Para tal foram avaliados: a) o número e fenótipo de DCs e monócitos/macrófagos do sangue periférico; e b) a produção de citocinas (IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e de algumas quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL-8, CXCL9 e CXCL-10) no sobrenadante de cultura de sangue total após estímulo com antígenos de MTB. A análise de células dendríticas e macrófagos circulantes, e a avaliação de citocinas e quimiocinas em pacientes com TB+HELM, nos permite concluir que: a) A maioria das DCs apresentava fenótipo de células imaturas. Entre as células com fenótipo de células maduras, existiam células mDC DC-SIGN<sup>+</sup> e pDC CD123<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, fenótipos compatíveis com DCs maduras indutoras de resposta Th-2; b) A maior parte dos macrófagos avaliados estava ativada e expressava DC-SIGN (fenótipo é compatível com macrófagos M2); c) A produção de citocinas mostrou-se significativamente maior para IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-6, enquanto IL-1 $\beta$  teve uma tendência ao aumento. No entanto, os níveis de IL-12 permaneceram semelhantes ao grupo controle; d) Redução significativa da produção de CCL-2, tendência à menor produção de CXCL-8 e aumento não significativo de CXCL-10 foram observados, ao passo que quimiocinas CXCL-9 e CCL-5 não foram detectadas. Embora o número de casos estudados não permita uma afirmação conclusiva, as observações admitem a possibilidade de que a infecção com helmintos intestinais em pacientes com tuberculose possa estar interferindo na resposta Th-1 aos antígenos de MTB.



## ABSTRACT

The Tuberculosis (TB) remains a global threat to humanity, which no effective vaccine available until now. Epidemiological studies have shown that *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and helminths are co-endemic in many regions in the world, and that co-infections with these pathogens are frequent. The intestinal helminths infection may be a risk factor to the development of active pulmonary TB. Through phenotypic markings and dosage of cytokines and chemokines, we aimed to show that the worms are capable to deviate the Th-1 response TB protective to the Th-2 response, characteristic in intestinal helminthiasis. Blood culture for cytokines and chemokines dosage was done by the technique of marked microspheres for reading on flow cytometry, in conjunction with immunophenotyping of dendritic cells (DCs) and monocytes / macrophages through extra and intracellular markers by cytometry were used to study some aspects of innate immunity in TB patients, TB and intestinal helminths patients (TB + HELM), patients with helminths, and healthy controls. Were analyzed: a) The number and phenotype of DCs and monocytes/macrophages in peripheral blood, and b) The production of cytokines (IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ ) and of some chemokines (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 and CXCL10) in the culture supernatant of whole blood after stimulation with MTB antigens. The analysis of circulating dendritic cells and macrophages, and evaluation of cytokines and chemokines in patients with TB + HELM, should us conclude that: a) The majority of DCs were immature cell phenotype. Among the cells with mature cell phenotype, there were cells mDC DC-SIGN + and CD40 + CD123 + pDC, phenotypes consistent with mature DCs to induce Th-2 response; b) Most of the activated macrophages was assessed and expressed DC-SIGN (phenotype compatible with M2 macrophages); c) The production of cytokines was significantly greater for IL-10, TNF- $\alpha$  and IL-6, while IL-1 $\beta$  had a tendency to increase. However, the levels of IL-12 remained similar to control group; d) significant reduction of the production of CCL-2, a trend to lower production of CXCL-8 and no significant increase of CXCL-10 were observed, whereas the chemokines CXCL CCL-5 and -9 were not detected. Although the number of cases does not permit a conclusive statement, the observations allow the possibility that infection with intestinal helminths in TB patients may be interfering with the Th-1 response to antigens of *MTB*.

## LISTA DE SIGLAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

APC – Antigen-Presenting Cell (células apresentadoras de antígeno)

BCG – Bacillus Calmette-Guérin (bacilo Calmette-Guerin)

BSA – Bovine Serum Albumin (soro albumina bovina)

CBA – Cytometric beads array (ensaio de microesfera em citômetro)

CD – Cluster of differentiation (grupo de diferenciação)

CD40L – CD40 ligand (CD40 ligante)

CMV – Citomegalovírus

CpG – Cytosine and guanine separated by a phosphate (citosina e guanine separadas pelo grupo fosfato – é um dinucleotídeo)

CR – Complement receptor (receptor de complemento)

CTLA-4 – Cytotoxic T-lymphocyte antigen (antígeno de linfócitoT citotóxico-4)

DAI – DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors (ativação DNA - dependente do fator regulador de interferon).

DAMP – Damage-associated molecular pattern (padrão molecular associado a dano)

DCs – Dendritic cells (células dendríticas)

DC-SIGN – Dendritic cell-specific icam3-grabbing nonintegrin (não-integrina liada a ICAM-3 específica de células dendríticas)

DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxi-ribonucleico)

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ES-62 – Excretory-secretory-62 ( glicoprotéina excretada-secretada-62)

ESAT-6 – 6 kDa early secretory antigenic target of *Mycobacterium tuberculosis* (alvo antigênico de 6kDa secretado precocemente)

Et al – et alii, do latim: e colegas

FACS – Fluorescence-activated cell sorting (separação de células fluorescentes-ativadas)

FCS – Fetal calf serum (soro fetal de bovino)

FITC – Fluorescein isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína)

G-CSF – Granulocyte Colony-Stimulating-Factor (fator estimulador de colônia-granulócito)

GM-CSF – Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor (fator estimulador de colônias- granulócitos e macrófagos)

HCV – Hepatitis C Virus (vírus da hepatite C)

HIV – Human Immunodeficiency virus (Vírus da imunodeficiência humana)

HLA – Human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano)

HSP – Heat shock protein (proteína de choque térmico)

IC – Intervalo de confiança

ICAM – Intercellular adhesion molecular (molécula de adesão intercelular)

ICOSL – Inducible costimulator ligand (coestimulador induzível - ligante)

PD-L – Programmed death ligand 1 (morte celular programada - ligante 1)

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleukin (interleucina)

iNOS – Inducible nitrate oxide sintase (óxido nítrico sintase indusível)

IP-10 – IFN-Inducible Protein 10 (proteína indutora de interferon – 10)

kb – Kilobases

kDa – Kilodalton

LAM – Lipoarabinomannan (lipoarabinomanano)

LPS – Lipopolysaccharide (lipopolissacarídeo)

MCP-1 – Monocyte Chemotactic Protein 1 (proteína quimiotática de monócito-1)

MDA-5 – Melanoma differentiation-associated gene 5 (diferenciação do melanoma associado ao gene 5)

mDC – Dendritic cell myeloid (célula dendrítica mielóide)

MHC – Major histocompatibility complex (complexo de histocompatibilidade principal)

MIF – Macrophage inflammatory factor (fator inflamatória de macrófagos)

MIG – Monokine Induced by IFN- $\gamma$  (monocina induzida por interferon gama)

*Mtb* – *Mycobacterium tuberculosis*

NF- $\kappa$ B – Nuclear factor- kappa B (fator nuclear kappa B)

NK – Natural killer (célula assassina natural)

NLRs – NOD-like receptors (receptores semelhante ao NOD)

NOD – Nucleotide-binding oligomerization domain (domínio de oligomerização ligado a nucleotídeo).

ODN – Oligodeoxynucleotide (oligodeoxinucleotídeo)

PAMP – Pathogenic-associated molecular pattern (padrão molecular associado a patógeno)

PBMC – Peripheral blood mononuclear cells (células mononucleares do sangue periférico)

PBS – Phosphate-buffered saline (tampão fosfato salino)

pDC – Dencritic cell plasmacytoid (célula dendrítica plasmacitóide)

PD-L – Programmed ligand (morte programada-ligante)

PE – Phycoerithrin (ficoeritrina)

PE-Cy5 (antigo Cy-Chrome™) - Sistema conjugado que combina R-ficoeritrina e um corante cianina (de 1.5 kDa; Cy5).

PGN – Peptidoglicano

poly I:C – Inosine:cytosine (inosina:citosina)

PPD – Purified protein derivative (derivado protéico purificado)

PRR – Pattern recognition receptor (receptor de reconhecimento de padrão)

RANTES – Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (ativação na regulação da expressão e secreção de células T normais)

RIG-I – Retinoic-acid-inducible gene I (ácido retinóico induzível pelo gene I)

RNA – Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

SR – Scavenger receptor (receptor de remoção)

TB – Tuberculose

TCR – T cells receptors (receptor de células T)

Tg – Transgênico

TGFβ – Transforming Growth Factor –β (fator de crescimento transformante-beta)

Th – T helper (T auxiliar)

TLR – Toll-like receptors (receptor Toll-like)

TNF – Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)

TNF-α – Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral-alfa)

WHO – World Health Organization (organização mundial de saúde)

μm – micrometro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Parede celular do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	24
Figura 2.	DC-SIGN na Tuberculose.....	31
Figura 3.	Distribuição dos participantes do estudo, portadores ou não de TB associada a helmintos intestinais.....	47
Figura 4.	Gráficos de distribuição pontual dos marcadores que definirão os fenótipos de células dendríticas e monócitos/macrófagos.....	52
Figura 5.	Análise de célula dendrítica marcada com Lin <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos).....	60
Figura 6.	Análise de célula dendrítica marcada com Lin <sup>-</sup> CD123 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos).....	61
Figura 7.	Análise de célula dendrítica marcada com Lin <sup>-</sup> CD86 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos).....	61
Figura 8.	Análise de célula dendrítica marcada com Lin <sup>-</sup> CD40 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos).....	62
Figura 9.	Análise de célula dendrítica marcada com Lin <sup>-</sup> CD209 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos).....	63
Figura 10.	Análise de célula dendrítica marcada com Lin <sup>-</sup> TLR-2 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos).....	63
Figura 11.	Análise de célula dendrítica marcada com Lin <sup>-</sup> TLR-4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos).....	64
Figura 12.	Análise de célula dendrítica marcada com Lin <sup>-</sup> TLR-9 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos).....	65

Figura 13. Análise de monócitos/macrófagos marcados com CD14 <sup>+</sup> CD209 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 (monócitos).....	66
Figura 14. Análise de monócitos/macrófagos marcados com CD14 <sup>+</sup> CD86 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 (monócitos).....	67
Figura 15. Análise de monócitos/macrófagos marcados com CD14 <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 (monócitos).....	67
Figura 16. Análise de monócitos/macrófagos marcados com CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 (monócitos).....	68
Figura 17. Análise de monócitos/macrófagos marcados com CD14 <sup>+</sup> TLR-2 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 (monócitos).....	69
Figura 18. Análise de monócitos/macrófagos marcados com CD14 <sup>+</sup> TLR-4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 (monócitos).....	69
Figura 19. Análise de monócitos/macrófagos marcados com CD14 <sup>+</sup> TLR-9 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> no gate R1 (monócitos).....	70
Figura 20. Representação da produção de IL-12p70 por grupos.....	71
Figura 21. Representação da produção de IL-10 por grupos.....	72
Figura 22. Representação da produção de TNF- $\alpha$ por grupos.....	72
Figura 23. Representação da produção de IL-6 por grupos.....	73
Figura 24. Representação da produção de IL-1 $\beta$ por grupos.....	74
Figura 25. Representação da produção de CXCL-8/IL-8 por grupos.....	74
Figura 26. Representação da produção de CXCL-10/IP-10 por grupos.....	75

Figura 27. Representação da produção de CXCL-9/MIG por grupos .....	76
Figura 28. Representação da produção de CCL-5/RANTES por grupos.....	76
Figura 29. Representação da produção da quimiocina CCL-2/MCP-1 por grupos.....	77

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos monoclonais que caracterizam as DCs e suas subpopulações.....	50
Tabela 2. Idade, sexo, leucócitos totais, monócitos, linfócitos e eosinófilos indivíduos com TB, com TB e com TB+HELM, com HELM e pessoas saudáveis (controles).....	58
Tabela 3. Média do número absoluto de DCs (mielóides e plasmacitóides) e monócitos/macrófagos.....	59
Tabela 4. Classificação dos indivíduos participantes do estudo.....	117
Tabela 5. Imunofenotipagem de células dendríticas – <i>gate</i> em linfócitos.....	118
Tabela 6. Imunofenotipagem de células dendríticas – <i>gate</i> em monócitos.....	119
Tabela 7. Imunofenotipagem de monócitos/macrófagos.....	120
Tabela 8. Dosagem de citocinas pelo kit CBA <i>inflammation</i> .....	121
Tabela 9. Dosagem de quimiocinas pelo kit CBA <i>chemokine</i> .....	122



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos indivíduos participantes do estudo. Anticorpos monoclonais utilizados para células dendríticas e monócitos/macrófagos.....	116
--	-----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....</b>	<b>25</b>
2.1.1. <b><u>RESPOSTA INATA</u></b> .....	<b>25</b>
2.1.1.1. <b>CÉLULAS DENDRÍTICAS</b> .....	<b>26</b>
2.1.1.2. <b>MONÓCITOS/MACRÓFAGOS</b> .....	<b>28</b>
2.1.1.3. <b>MARCADORES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS/MONÓCITOS.</b> .....	<b>29</b>
2.1.1.3.1. <b>TLRs</b> .....	<b>29</b>
2.1.1.3.2. <b>DC-SIGN</b> .....	<b>30</b>
2.1.1.3.3. <b>MOLÉCULAS COESTIMULATÓRIAS EM DCs E MONÓCITOS/MACRÓFAGOS</b> .....	<b>32</b>
2.1.1.4. <b>ALGUMAS CITOCINAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA AO <i>MTB</i></b> .....	<b>33</b>
2.1.1.4.1. <b>IL-12</b> .....	<b>33</b>
2.1.1.4.2. <b>TNF-<math>\alpha</math></b> .....	<b>34</b>
2.1.1.4.3. <b>IL-1</b> .....	<b>34</b>
2.1.1.4.4. <b>IL-6</b> .....	<b>35</b>
2.1.1.4.5. <b>IL-10</b> .....	<b>35</b>
2.1.1.5. <b>ALGUMAS QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA AO <i>MTB</i></b> .....	<b>36</b>
2.1.1.5.1. <b>CXCL-8</b> .....	<b>36</b>
2.1.1.5.2. <b>CCL-2</b> .....	<b>37</b>
2.1.1.5.3. <b>CCL-5</b> .....	<b>37</b>
2.1.1.5.4. <b>CXCL-9 E CXCL-10</b> .....	<b>38</b>
2.1.2. <b><u>RESPOSTA ADAPTATIVA AO <i>MTB</i></u></b> .....	<b>38</b>
<b>2.2. RESPOSTA IMUNITÁRIA NAS HELMINTÍASES INTESTINAIS .....</b>	<b>40</b>
2.2.1. <b>RESPOSTA IMUNE NA ASSOCIAÇÃO TB E HELMINTÍASES INTESTINAIS</b> .....	<b>41</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>45</b>
<b>4. AMOSTRAS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1. PACIENTES E INDIVÍDUOS CONTROLES</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2. EXAMES PARASITOLÓGICOS</b> .....	<b>48</b>
<b>4.3. BACILOSCOPIA E CULTURA</b> .....	<b>48</b>
<b>4.4. COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO</b> .....	<b>48</b>

4.5. QUANTIFICAÇÕES E FENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E MONÓCITOS / MACRÓFAGOS EM SANGUE TOTAL .....	49
4.6. CULTURAS DE SANGUE TOTAL PARA ANÁLISE DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS .....	52
4.6.1. DOSAGENS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E QUIMIOCINAS POR CBA (CYTOMETRIC BEADS ARRAY).....	53
4.7. PREPARO DO ANTÍGENO (AG) SOLÚVEL DE <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	54
4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	56
<b><u>5. RESULTADOS .....</u></b>	<b><u>58</u></b>
5.1. QUANTIFICAÇÃO E FENOTIPAGEM DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E MACRÓFAGOS.....	59
5.1.1. <u>CÉLULAS DENDRÍTICAS</u> .....	59
5.1.2. <u>MONÓCITOS/MACRÓFAGOS</u> .....	65
5.2. ANÁLISE DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NO SANGUE TOTAL .....	70
<b><u>6. DISCUSSÃO .....</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>7. CONCLUSÃO .....</u></b>	<b><u>88</u></b>
<b><u>8. PERSPECTIVAS .....</u></b>	<b><u>90</u></b>
<b><u>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u></b>	<b><u>92</u></b>
<b><u>ANEXOS .....</u></b>	<b><u>105</u></b>

# Introdução

---

## 1. INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) doença causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), é responsável por mais mortes do que qualquer outro agente infeccioso. Estima-se que 1,7 bilhões de pessoas estejam infectadas pelo MTB, e sob risco de desenvolver a doença ativa (DUCATI *et al.*, 2006).

Na TB, tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa estão envolvidas na eliminação/contenção do MTB. Para tanto, é importante que ocorra uma interação eficiente entre células dendríticas, macrófagos ativados, e células efetoras T CD4 e CD8 antígeno-específicas, para o estabelecimento de uma resposta T *helper* (Th)-1 protetora (LICHTNER *et al.*, 2005). Esta interação é dependente da complexa rede de citocinas, quimiocinas e seus receptores, auxiliando de forma efetiva na eliminação do bacilo pelo hospedeiro (LICHTNER *et al.*, 2005).

Na imunidade inata, o recrutamento celular e a comunicação célula-célula são vitais para a sua ativação (PARKER *et al.*, 2007). Diante disso, acredita-se que o reconhecimento do MTB ou de seus produtos por macrófagos através de receptores de reconhecimento de padrão associado a patógenos, tais como os receptores “Toll-like” (TLR), seja uma etapa crucial para o estabelecimento e desenvolvimento de uma resposta imune eficaz contra o bacilo (RAJA, 2004). Por meio desses receptores, antígenos do MTB podem induzir a produção de IL-12, por macrófagos e células dendríticas, para o desencadeamento de uma resposta imune do tipo Th-1, responsável pelo controle da infecção e eliminação do bacilo (RAJA, 2004).

Assim como a TB, as helmintíases intestinais são um grande problema de saúde mundial, sendo que mais de um quarto da população mundial é portadora de infecções crônicas por helmintos intestinais (HALL & CHAN, 1994). Nas regiões tropicais (países em desenvolvimentos, por exemplo), ocorre uma sobreposição significativa de áreas com elevada incidência de TB, baixa resposta após vacinação com o BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) e elevada taxa de infecção por helmintos (ELIAS, AKUFFO & BRITTON, 2006). No Brasil, além da alta incidência de TB, podemos identificar um número alto de indivíduos acometidos por parasitoses intestinais (REY, 2008).

A infecção crônica por helmintos induz a produção excessiva de citocinas tipo Th-2 (BRADLEY & JACKSON, 2004), ativação imune crônica (BORKOW et al., 2000), aumento na atividade regulatória de células T (BORKOW & BENTWICH, 2004; ROOK, DHEDA & ZUMLA, 2005) e anergia antígeno-específica ou inespecífica (STADECKER et al., 1990; SARTONO, et al., 1995). Tais efeitos podem comprometer a capacidade do hospedeiro em responder à infecção com outros patógenos não-relacionados (ELIAS, AKUFFO & BRITTON, 2006), como por exemplo, o *MTB*.

Alguns autores demonstraram a existência de associação entre tuberculose e helmintíases intestinais (TRISTÃO-SÁ et al., 2002; ELIAS et al., 2006). Tal associação resultaria em imunomodulação da resposta imune adaptativa, o que poderia impactar negativamente na resposta Th-1 ao *MTB* (BENTWICH et al., 1996; KALINKOVICH et al., 1998; ELIAS et al., 2001; RESENDE-CÓ et al., 2007). Na literatura, no entanto, pouco se conhece sobre a influência da superinfecção, tuberculose e helmintíases intestinais, na resposta imune inata.

Com base no exposto, acreditamos que a participação de células dendríticas e macrófagos no estabelecimento de uma resposta imune inata adequada/eficaz ao *MTB*, pode ser afetada por alterações quantitativas e/ou fenotípicas nessas células, em relação a receptores de reconhecimento, moléculas coestimulatórias e a produção de algumas citocinas e quimiocinas, na vigência de helmintíases intestinais superpostas á infecção com o *MTB*. Por essas que os estudo de quantitativo de macrófagos e células dendríticas, com avaliação dos receptores de reconhecimento, de algumas moléculas coestimulatórias e de algumas citocinas e quimiocinas pode contribui para o conhecimento da patogênese da tuberculose.

# Revisão Bibliográfica

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O *MTB*, agente etiológico da TB, é uma bactéria em forma de bastão, aflagelado, não-capsulado, imóvel, e que não produz esporos e toxinas (NORTH & JUNG, 2004; DUCATI *et al.*, 2006). As dimensões do *MTB* variam de 0.3 a 0.6  $\mu\text{m}$  e de 1 a 4  $\mu\text{m}$ . Este bacilo é um microrganismo intracelular facultativo, aeróbico estrito, com um crescimento consideravelmente lento, e uma homogeneidade genética (DUCATI *et al.*, 2006).

Cerca de 60% da estrutura bacilar é formada por ácidos graxos (Figura 1). Essa estrutura da parede celular micobacteriana, extremamente incomum, é rica em ácidos micólicos e arabinogalactano, que se ligam por sua vez ao peptidoglicano (MCNEIL & BRENNAN, 1991; JARLIER & NIKAIDO, 1994; BRENNAN & NIKAIDO, 1995; DIETZE *et al.*, 2009). Esta composição confere ao bacilo peculiar resistência ao álcool-ácido, observada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen, como também, resistência a álcalis, ácidos, anti-sépticos e a uma variedade de antibióticos (DIETZE *et al.*, 2009; DUCATI *et al.*, 2006). A parede celular também permite que o microorganismo sobreviva dentro do macrófago, que normalmente destrói os patógenos fagocitados. A parede celular micobacteriana contém diversos tipos de lipídeos livres, que não são unidos covalentemente ao complexo micolilarabinogalactano-peptidoglicano (Figura 1), os quais também podem agir como antígenos no hospedeiro (BRENNAN & NIKAIDO, 1995).

A infecção ocorre, comumente, de pessoa a pessoa com a inalação de gotículas infectadas com as micobactérias (PASQUALOTO & FERREIRA, 2001). Estas gotículas apresentam 1 a 5 micrômetros, contendo dois a três bacilos viáveis envoltos por secreção pulmonar (núcleos de Wells). Esses núcleos são produzidos pela tosse, fala ou espirro de indivíduo com TB pulmonar ativo, sendo capazes de atingir os bronquíolos e alvéolos após a inalação dos mesmos (GLICKMAN & JACOBS, 2001; DIETZE *et al.*, 2009).





Duas semanas após a infecção, macrófagos começam a se organizar para sofrer a transformação epitelióide, originando granulomas, com numerosos linfócitos, macrófagos e fibroblastos na periferia (DUCATI *et al.*, 2006; DIETZE *et al.*, 2009). Os granulomas completos são formados a partir da terceira semana, quando começa a necrose caseosa (não obrigatória em todos os granulomas), que se estende de um granuloma para outro (lesão nodular caseificada). Quando as lesões caseificadas atingem os brônquios e são drenadas, originam-se às cavernas (BLOOM & MURRAY, 1992; YOUNG, 1998; DIETZE *et al.*, 2009).

No entanto, na maioria das vezes, os bacilos que chegam aos alvéolos são destruídos totalmente pelas células da imunidade inata (macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas). Nesse caso, não há infecção progressiva ou latente. Quando os bacilos são contidos na proliferação, após a formação do granuloma, fala-se em infecção latente, já que os bacilos permanecem vivos, podendo esta forma latente reativar, desenvolvendo a doença progressiva. As pessoas que abrigam a infecção latente têm um risco de desenvolver a TB ativa de aproximadamente 5% após o primeiro ano, e de 10% durante sua vida (DUCATI *et al.*, 2006).

## **2.1. Resposta Imunológica ao *Mycobacterium tuberculosis***

### **2.1.1. Resposta Inata**

No início da infecção pelo *MTB*, tem-se a exposição do bacilo e/ou dos antígenos micobacterianos aos componentes da resposta imune inata. Nessa resposta, admitem-se para infecções bacterianas nos pulmões, a participação de: a) pneumócitos produtores de surfactantes em resposta a estímulos de receptores TLR; b) macrófagos septais; c) células dendríticas residentes e originadas de precursores do sangue circulante; d) células NK, NKC e NKT; e, e) polimorfonucleares. Quanto à participação de fatores humorais, como o complemento, pouco ou nada se conhece a cerca da participação destes fatores na resposta inata ao *MTB* (MARTINO, 2008; DIETZE *et al.*, 2009).

Como nossa pesquisa baseia-se em alguns componentes da imunidade inata, descreveremos tais componentes para melhor compreensão de nosso estudo.

#### **2.1.1.1. Células dendríticas**

As células dendríticas (*dendritic cells* – DCs) têm papel chave tanto no estabelecimento, quanto no controle da intensidade e qualidade da resposta imune adaptativa (UENO, *et al.*, 2007). São células apresentadoras de antígenos profissionais, que no sítio de entrada do patógeno, comportam-se como células sentinelas imaturas, capazes de capturar antígenos estranhos ao meio (DE JONG, *et al.*, 2002).

Sob a ativação de sinais liberados por microorganismos ou por tecidos infectados, as DCs sentinelas, sofrem maturação, tornando-se DCs efectoras, as quais são potentes estimuladoras de células T. Quando as células dendríticas se tornam efectoras, migram para a área paracortical no linfonodo de drenagem (DE JONG, *et al.*, 2002; PARKER, *et al.*, 2007). Nos linfonodos, as DCs efectoras ativam células Th *naive* (Th0) através de moléculas patógeno-específicas (complexo MHC/peptídeo, sinal 1) e coestimuladoras (moléculas da família B7, sinal 2) (BHATT & SALGAME, 2007; KALINSKI *et al.*, 1999). Além dos sinais 1 e 2, DCs possuem um terceiro sinal mediado por várias moléculas solúveis ou ligadas à membrana celular, quais sejam: citocinas (IL-12, por exemplo) (TRINCHIERI, 1995), OX40L e Poly I:C (DE JONG, *et al.*, 2002), responsáveis pela polarização de células Th *naive* em células Th1 ou Th2 (KALINSKI *et al.*, 1999).

Estudos *in vitro*, demonstram que o nível de expressão de moléculas polarizantes das células Th por DCs efectoras, depende fortemente, das condições durante sua ativação inicial como DC sentinela (DE JONG *et al.*, 2002). Fatores teciduais tais como, IFN- $\gamma$  e prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) presentes durante a ativação de DCs sentinelas (derivadas de monócitos), promovem a geração de DCs efectoras tipo 1 (DC1s) e tipo 2 (DC2s), respectivamente (RAJA, 2004; BOONSTRA *et al.*, 2003). DC1s tem a capacidade de produzir grande quantidade de IL-12 após subsequente

reconhecimento de células Th *naive*, enquanto que DC2s são deficientes da citocina IL-12, além de produzirem IL-4 para o desenvolvimento de células Th-2 (KALINSKI, *et al.*, 1998; VIEIRA, *et al.*, 2000; RAJA, 2004). Deste modo, diferentes componentes microbianos (poly I:C, toxinas de *Bordetella pertussis* e *Vibrio cholerae*, ovos de *Schistosoma mansoni*) podem polarizar a maturação de DCs mielóides – mDCs (DE JONG *et al.*, 2002) em DC1 ou DC2.

Em camundongos transgênicos (TCR específico para ovalbumina), DC1s ativadas por lipopolissacarídeo (LPS) promovem uma resposta Th-1 (aumento da produção de IFN $\gamma$  e redução de IL-4) em células T CD4<sup>+</sup> estimuladas (WHELAN *et al.*, 2000). Já a glicoproteína ES-62, secretada pelo nematódeo filarióide, *Acanthocheilonema viteae*, origina uma resposta do tipo Th-2, induzindo a maturação de DC2s com capacidade de gerar resposta Th-2 (caracterizada pelo aumento de IL-4 e decréscimo de IFN- $\gamma$ ), mesmo em presença de IL-12 (WHELAN *et al.*, 2000).

A expressão de TLR nas subpopulações de DCs em humanos é variável. As DCs plasmacitóides (pDCs) expressam TLR-1, TLR-6, TLR-7, TLR-9 e TLR-10, ao passo que mDCs apresentam TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8 e TLR-10 (revisado por UENO *et al.*, 2007). No sangue encontram-se tanto mDCs quanto pDCs. Estas células são caracterizadas como Lin<sup>-</sup> e *Human Leukocyte Antigen* (HLA)-DR<sup>+</sup> com recíproca expressão de CD11c<sup>+</sup> (mDCs) e de IL-3R $\alpha$  ou CD123<sup>+</sup> (pDCs) (revisado por UENO *et al.*, 2007; LICHTNER *et al.*, 2005). A utilização desses marcadores servirá para distinguir tais subpopulações de DCs (mDCs e pDCs) em nossa pesquisa.

Na infecção por *MTB*, células dendríticas e macrófagos apresentam antígenos micobacterianos aos linfócitos T, produzindo IL-12, a qual direciona a resposta para o lado Th-1 (FLYNN & CHAN, 2001). Estas células têm papel central na defesa do hospedeiro contra o *MTB*, uma vez que o bacilo de Koch infecta especialmente esses fagócitos (FLYNN & CHAN, 2001; MARTINO, 2008). De acordo com as características apresentadas para células dendríticas e para macrófagos, é possível evidenciar que o desenvolvimento da resposta Th-1 ou Th-2 em cada infecção depende, também, do tipo de microorganismo presente.

### 2.1.1.2. *Monócitos/Macrófagos*

Os macrófagos são as primeiras células a entrarem em contato com o *MTB* nos pulmões durante a TB (SHARMA *et al.*, 2003). Estas células são derivadas de monócitos circulantes. Existem três diferentes subgrupos de monócitos em humanos, são eles: a) clássico ou CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD64<sup>+</sup>, b) intermediário ou CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup>, e c) não-clássico ou CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup>CD64<sup>-</sup> (VEGA & CORBÍ, 2006). Funcionalmente, monócitos mostram pouca atividade fagocítica no sangue periférico, onde vários de seus receptores envolvidos com a adesão de patógenos se mantêm inativos (VEGA & CORBÍ, 2006). Para a obtenção dos monócitos/macrófagos em nossa pesquisa, utilizamos as moléculas CD14 e HLA-DR.

A ativação de macrófagos em resposta a estímulos patogênicos, sinais endógenos de dano e/ou citocinas tipo 1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), tem sido denominada ativação clássica, resultando em macrófagos conhecidos como M1. Este tipo de ativação proporciona altos níveis de expressão de IL-12 e IL-23, e baixos níveis de IL-10, o que promove uma forte polarização para uma resposta do tipo Th-1 (VEGA & CORBÍ, 2006). Na ativação alternativa, a designação macrófagos M2 refere-se aos que produzem grande quantidade de IL-10 e TGF- $\beta$ , e níveis de IL-12 extremamente baixos. Estes macrófagos são funcionalmente anti-inflamatórios, além de desempenharem funções imunossupressoras e de inibirem a proliferação de células T (VEGA & CORBÍ, 2006). Macrófagos ativados por linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante uma resposta Th-2 (M2), são células efetoras requeridas para proteção contra metazoários e para eliminação dos mesmos (VEGA & CORBÍ, 2006). Dessa forma, macrófagos M1 são responsáveis pela polarização da resposta Th-1, enquanto que os M2 polarizam para a resposta Th-2.

Estudos *in vitro* da TB demonstraram que os receptores de manose e de complemento CR3 (CD11b/CD18) são os principais receptores para a fagocitose do *MTB* por macrófagos. Além destes, outros receptores de superfície destas células também reconhecem e se ligam ao *MTB*, quais sejam: CR1 (CD35), CR4 (CD11c/CD18), CD14, e os *scavenger receptors* – SRs (SCHLESINGER *et al.*, 1990; ERNST, 1998; BERRINGTON & HAWN, 2007).

### 2.1.1.3. Marcadores de células dendríticas e macrófagos/monócitos

O reconhecimento imune inato está baseado na detecção de estruturas moleculares que são comuns aos microorganismos, e que são discriminadas por receptores de reconhecimento de padrão associado a patógenos – PRRs (MEDZHITOV, 2007). PRRs podem ser receptores transmembranares ou de compartimentos endossomais, tais como os receptores de complemento (CR1 e CR3), *scavenger receptors* (SR), receptores de manose, a dectina 1 (família das lectinas tipo C) e os TLR, ou ainda, receptores citosólicos, por exemplo, *NOD-like receptors* – NLRs (*nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-1 e NOD-2), *retinoic-acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5) e *DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors* (DAI). Estes receptores são agrupados em classes funcionais distintas, sendo a classe dos TLR melhor caracterizada (MEDZHITOV, 2007).

#### 2.1.1.3.1. TLRs

TLR são receptores transmembranares altamente conservados entre as espécies, apresentando semelhanças entre drosófilas e humanos (HORNUNG *et al.*, 2002). Estes reconhecem lipídeos, carboidratos, peptídeos (TRINCHIERI & SHER, 2007) e ácidos nucleicos de vírus e bactérias (MEDZHITOV, 2007). Cerca de 12 proteínas de membrana compõem a família de receptores TLR dos mamíferos, os quais desencadeiam a resposta imune inata através das vias de sinalização dependentes do fator regulador de IFN- $\gamma$  e do fator nuclear NF- $\kappa$ B (TRINCHIERI & SHER, 2007). Alguns de seus membros são expressos na superfície celular, enquanto outros estão presentes nas membranas do retículo (TRINCHIERI & SHER, 2007).

Estes receptores fazem a ligação entre imunidade inata e imunidade adaptativa por ação em: DCs, macrófagos, células T, entre outras células (PARKER *et al.*, 2007; BHATT & SALGAME, 2007). TLR-1 e TLR-6 são expressos em células T e B, células NK, monócitos e células dendríticas plasmacitóides (pDCs). Já TLR-10 é

intensamente expresso em células B, e pouco expresso em pDCs (HORNUNG *et al.*, 2002). A alta expressão de TLR-2 é característica de monócitos. Em células B e pDCs existe um nível de expressão marcante para TLR-7 e TLR-9, além de serem diretamente sensíveis ao CpG ODN (HORNUNG *et al.*, 2002). Em monócitos, células NK e células T, TLR-7 está ausente, enquanto TLR-9 é pouco expresso (HORNUNG *et al.*, 2002).

#### 2.1.1.3.2. DC-SIGN

Embora os TLR possuam papel central, outros receptores igualmente importantes participam do reconhecimento. Por exemplo, as lectinas tipo-C, que se ligam aos resíduos de carboidratos de glicoproteínas presentes em patógenos ou em outras células do indivíduo. Estes receptores são provavelmente importantes não só na absorção de patógenos (UENO, *et al.*, 2007), mas atuam, na adesão e migração celular (UENO *et al.*, 2007; FIGDOR, VAN KOOYK & ADEMA, 2002).

*DC-specific ICAM3-grabbing nonintegrin* (DC-SIGN ou CD209) é uma lectina tipo C expressa por DCs, que foi descrita, inicialmente, como receptor para gp120 do HIV (GEIJTENBEEK *et al.*, 2000a; TAILEUX *et al.*, 2005). Além disso, ela permite, às células dendríticas derivadas de monócitos, o reconhecimento de uma variedade de microorganismos, dentre eles: vírus, parasitos e bactérias (TAILEUX *et al.*, 2005; PULENDRAN, 2005). CD209 age como receptor natural para ICAM-2 e ICAM-3 (GEIJTENBEEK *et al.*, 2000b). As interações entre DC-SIGN e ICAM-2 em células endoteliais induzem a adesão e o rolamento de DCs imaturas, que provoca o extravasamento destas células dos vasos sanguíneos, para os focos inflamatórios (diapedese). Interações entre ICAM-3 em células T e DC-SIGN em DCs maduras iniciam a formação da sinapse imunológica, que promove a ativação de células T (GEIJTENBEEK *et al.*, 2000b; Figura 2).

CD209 está envolvida na captação de diferentes patógenos, sendo expressa por DCs da derme, bem como por DCs circulantes no sangue (FIGDOR, VAN KOOYK & ADEMA, 2002; UENO, *et al.*, 2007). Novas evidências sugerem que diversos vírus (HIV - *human immunodeficiency virus*, citomegalovírus (CMV), vírus da hepatite C

(HCV), e dengue), bactérias (*Helicobacter pylori*, *MTB* e *Klebsiella pneumonia*), e leveduras interagem com DC-SIGN (PULENDRAN, 2005; NICOD, 2007). Uma característica comum a vários destes patógenos é que causam infecções crônicas, nas quais as respostas T regulatórias são um determinante crítico da persistência do patógeno (PULENDRAN, 2005). Conseqüentemente, muitos patógenos podem especificamente agir em DC-SIGN para suprimir a função de DCs, e para modular as respostas imunes induzindo as respostas T regulatória ou Th-2, que beneficiam sua persistência no hospedeiro (BERGMAN *et al.*, 2004; GEIJTENBEEK *et al.*, 2003). DC-SIGN ainda, potencializa a produção da citocina IL-10 (anti-inflamatória) em células dendríticas derivadas de monócitos (GEIJTENBEEK *et al.*, 2003; Figura 2).

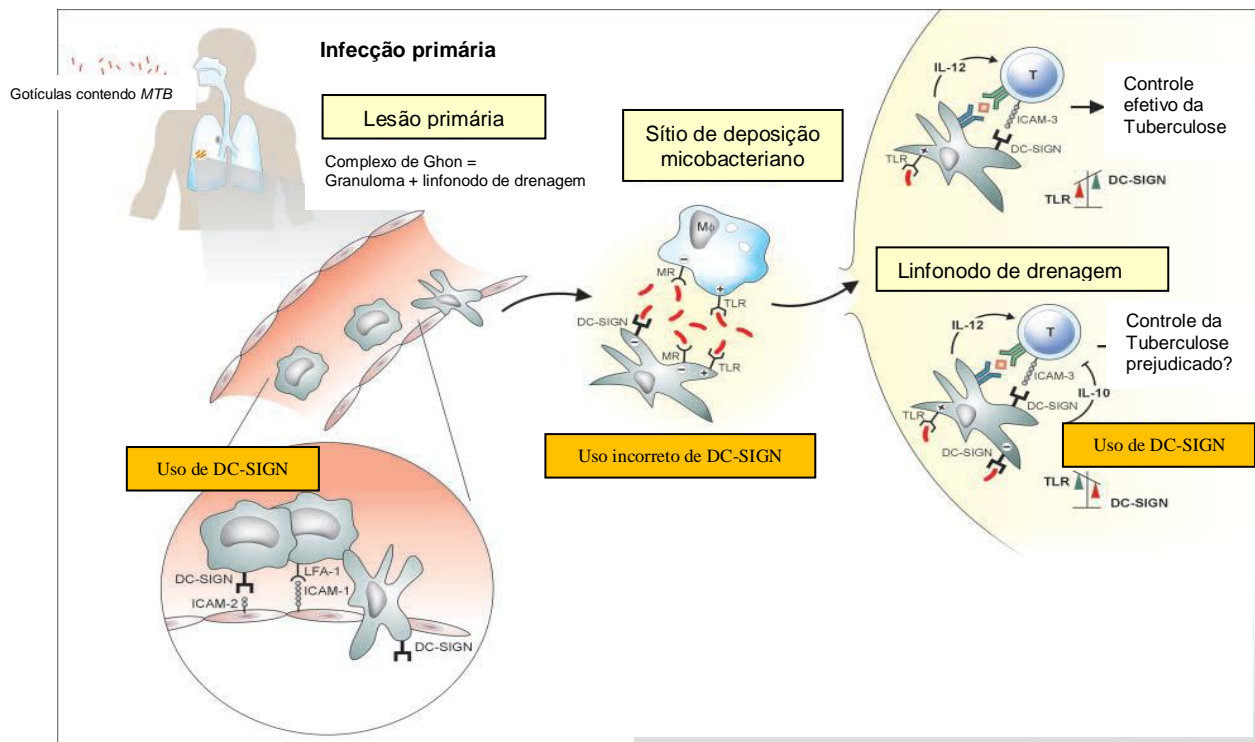


Figura 2 - DC-SIGN na TB. Sob o encontro das micobactérias, DC-SIGN em DCs e macrófagos alveolares acoplam-se em glicolípidos micobacterianos, por exemplo, o LAM, que provoca a secreção de IL-10, que induz a um decréscimo na resposta de células T. O acoplamento de TLRs, pelo contrário, promoverá uma resposta inflamatória protetora caracterizada pela secreção de IL-12 e de IFN- $\gamma$ . Uma estimulação equilibrada de ambas vertentes é de suma importância para as respostas protetoras, acompanhadas de uma imunopatologia mínima. Desequilíbrio pode favorecer o *M. tuberculosis*, e conseqüentemente, o desenvolvimento da doença (KAUFMANN & SCHAIBLE, *et al.*, 2003).

Tailleux e colaboradores (2003), revelam que a cepa virulenta de *MTB* usa DC-SIGN para entrar nas DCs. DC-SIGN permite que células dendríticas derivadas de monócitos reconheçam micobactérias do complexo *MTB* através da molécula



lipoarabinomanano (LAM; *lipoarabinomanan*) presente no patógeno (TAILEUX *et al.*, 2005; NICOD, 2007). A interação de CD209 com a micobactéria ou com os produtos micobacterianos, pode ser benéfica para o patógeno quando as funções das células dendríticas são submoduladas. Tal interação poderá favorecer o hospedeiro na medida em que a inflamação tecidual e a imunopatologia forem limitadas (GEIJTENBEEK *et al.*, 2003), proporcionando com isso, menor dano ao indivíduo.

A sinalização através de DC-SIGN pode resultar em inibição de sinais por TLRs (Figura 2). Deste modo, os resíduos de manose no LAM de BCG e de *MTB*, inibem a produção IL-12 induzida por LPS em DCs (NIGOU *et al.*, 2001). O estímulo de LPS ocorre por meio de TLR, e a inibição a este estímulo, é proporcionada pelos resíduos de carboidratos no LAM, através de DC-SIGN. Os resíduos de manose mono, di, ou triméricos da molécula LAM compreendem a estrutura de ligação de DC-SIGN (Figura 1). O LAM é reconhecido não somente por DC-SIGN, mas também, por uma variedade de outros receptores expressos por DCs, incluindo: o SR, o CD11b, e o CD11c (KAUFMANN & SCHAIBLE, *et al.*, 2003).

DC-SIGN, assim como em DCs, é encontrado em macrófagos alveolares. Fatores solúveis do hospedeiro (IL-15, por exemplo) e/ou micobacterianos podem induzir a expressão deste receptor, resultando em células propensas à infecção pelo bacilo (TAILEUX *et al.*, 2005).

#### 2.1.1.3.3. Moléculas coestimulatórias em DCs e monócitos/macrófagos

Receptores da família B7 são essenciais para a regulação da tolerância e imunidade mediadas por células T (UENO *et al.*, 2007). Esta família é formada por sete receptores: CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), ICOSL (*inducible costimulator ligand*), PD-L (*programmed death ligand*) 1 (B7-H1), PD-L2 (B7-DC), B7-H3 e B7-H4, podendo todas ser expressas em DCs e macrófagos (GRENWALD, FREEMAN & SHARPE, 2005 citado por UENO *et al.*, 2007). Tanto CD80 como CD86 ligam-se a CD28 e CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4*). CD28 transmite sinais para células T tornarem-se efetoras funcionais, enquanto que CTLA-4 produz sinais inibitórios/supressores da função destas células (UENO *et al.*, 2007). CD80 e CD86

são comumente usados como marcadores de maturação de DCs (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

As células apresentadoras de antígenos possuem moléculas coestimulatórias (CD40, CD80 e CD86) e apresentadoras (HLA-DR), assim como moléculas de reconhecimento de antígenos CD11b, CD11c (cadeia  $\alpha$  de CR4), CD16 (Fc $\gamma$ RIII), receptores TLR (TLR2, TLR4 e TLR9) (TAILLEUX *et al.*, 2005). Além das moléculas coestimulatórias, apresentadoras de antígeno e de reconhecimento, TNF e CD40L atuam como ativadores precoces de DCs. Quando estimuladas por CD40, pDCs induzem o desenvolvimento de células T reguladoras (Treg) CD4<sup>+</sup> secretoras de IL-10, bem como células T CD8<sup>+</sup> (UENO *et al.*, 2007). A interação CD40/CD40L em DCs promove ainda, a superregulação de CD80 e CD86, além da secreção de IL-12 (UENO *et al.*, 2007).

Moléculas de ativação endógenas conhecidas como *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), das quais fazem parte as *heat shock proteins* (HSPs), são igualmente capazes de induzir a maturação de DCs (UENO, *et al.*, 2007) e macrófagos. A indução por HSPs é dependente de receptores para LPS, como por exemplo, TLR-4, CD14, entre outros (OHASHI *et al.*, 2000), que auxiliam no reconhecimento, estimulação, e conseqüentemente, na maturação celular.

#### 2.1.1.4. Algumas citocinas envolvidas na resposta ao *MTB*

Apenas as citocinas IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 serão abordadas neste tópico, pois foram as avaliadas em nossa pesquisa.

##### 2.1.1.4.1. IL-12

A IL-12 (IL-12p70), pertence ao grupo de citocinas heterodiméricas que fazem ligação entre imunidade inata e adaptativa (TRINCHIERI, 2003). É produzida após ativação por TLRs, principalmente, em DCs (UENO *et al.*, 2007) e macrófagos, por meio da ativação das vias dependentes de IFN- $\gamma$  e NF- $\kappa$ B, que têm como alvos os

genes IL-12/23p40 e IL-12p35 (REINHARDT, *et al.*, 2006; TRINCHIERI, 2003). A dimerização das subunidades formadas a partir dos genes IL-12p35 e IL-12p40 formam a proteína IL-12p70 ativa, responsável pela polarização da resposta Th-1 (UENO *et al.*, 2007; GATELY, *et al.*, 1998; BERRINGTON & HAWN, 2007). Além de IL-12p70, outras duas citocinas utilizam a subunidade IL-12p40: IL-23 e a IL-12(p40)<sub>2</sub> (GATELY, *et al.*, 1998; KHADER, *et al.*, 2006).

Em modelo murino de TB, a deficiência de IL-12p35 é menos prejudicial à resposta do hospedeiro do que a deficiência de IL-12p40 (HOLSCHER *et al.*, 2001; COOPER, *et al.*, 2002a), sugerindo uma bioatividade de IL-12p40 independente de IL-12p35. Nesses animais, DCs ativadas por *MTB* necessitam produzir IL-12p40 para migrar dos pulmões para os linfonodos de drenagem (o mesmo não é observado para as citocinas IL-12p70 e IL-23), e para reduzir a resposta de IL-10 ao *MTB* nestas células (KHADER, *et al.*, 2006). Estes dados são indícios de uma resposta Th-1, que é considerada protetora para a TB.

#### 2.1.1.4.2. TNF- $\alpha$

Na resposta inflamatória, os TLR ativam macrófagos teciduais-residentes a produzirem citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, que são responsáveis por coordenar as respostas inflamatórias local e sistêmica (MEDZHITOV, 2007). TNF- $\alpha$  apresenta múltiplos papéis nas respostas imune e patológica durante a TB, por isso sua secreção é induzida em macrófagos, DCs e células T (RAJA, 2004). Esta citocina retém a infecção e previne a disseminação do patógeno, além de influenciar na expressão de moléculas de adesão, bem como de quimiocinas e seus receptores (RAJA, 2004), o que afeta a formação de granuloma no tecido infectado.

#### 2.1.1.4.3. IL-1

IL-1, em conjunto com TNF- $\alpha$ , têm papel importante na resposta de fase aguda (febre e caquexia) proeminente na TB. A IL-1 $\beta$  é uma citocina produzida por várias

condições infecciosas e inflamatórias, sendo secretada na forma inativa (pró-IL1 $\beta$ ), a qual é clivada pela caspase-1 para obtenção de sua forma ativa (BERRINGTON & HAWN, 2007). A conversão da forma inativa em forma ativa ocorre por inúmeros estímulos bacterianos, inclusive pelo *MTB* (BERRINGTON & HAWN, 2007). Esta citocina também proporciona a expressão de IL-2R e a secreção de IL-2 por linfócitos T, além de participar de mecanismos imunossupressores (RAJA, 2004). Cabe salientar, que a IL-1 $\beta$  liberada por células apresentadoras de antígeno infectadas por *MTB* inibe a maturação de DCs (MAKINO *et al.*, 2006), mostrando o papel pró e anti-inflamatório (ou supressor).

#### 2.1.1.4.4. IL-6

Como IL-1 e TNF- $\alpha$ , a IL-6, do mesmo modo, está associada à resposta do hospedeiro ao *MTB*. Estudo com camundongos IL-6<sup>-/-</sup> e TB sugere que IL-6 seja importante para a resposta inata inicial contra a micobactéria, pois na ausência desta citocina ocorre um aumento precoce da carga bacteriana e um retardo na produção de IFN- $\gamma$  (SAUNDERS *et al.*, 2000). Além disso, IL-6 apresenta vários papéis na resposta imune, os quais compreendem a inflamação, a hematopoiese e a diferenciação de células T (RAJA, 2004).

#### 2.1.1.4.5. IL-10

A IL-10, assim como as citocinas comentadas anteriormente, assume papel relevante na resposta imune ao *MTB*, haja vista que é uma citocina anti-inflamatória produzida por macrófagos, células dendríticas (BHATT & SALGAME, 2007) e células T, durante a infecção por este patógeno (RAJA, 2004; BERRINGTON & HAWN, 2007). A IL-10 possui a propriedade de desativar macrófagos, resultando na diminuição da produção de IL-12, e, conseqüentemente, no decréscimo da produção de IFN- $\gamma$  por células T (RAJA, 2004). Inclusive, esta citocina anti-inflamatória inibe diretamente a resposta de células T CD4<sup>+</sup>, assim como de *antigen presentation cells*

(APCs – células apresentadoras de antígenos) infectadas com a micobactéria (ROJAS *et al.*, 1999; BHATT & SALGAME, 2007).

A produção de IL-10 pode ser induzida pelo *MTB*, suprimindo a geração da imunidade anti-*MTB*. Frequentemente, citocinas Th-1 são encontradas juntamente com a IL-10, no entanto, a quantidade relativa de IL-10 é que determinará se a imunidade Th-1 será suprimida ou não (BHATT & SALGAME, 2007).

#### 2.1.1.5. Algumas quimiocinas envolvidas na resposta ao *MTB*

Quimiocinas são citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular, que medeiam: o recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios; o tráfego de células através dos órgãos linfóides secundários; e a modulação da proliferação de células T e da produção de citocinas (revisado por PETERS *et al.*, 2001). As quimiocinas CXCL-8/IL-8, *monocyte chemoattractant protein 1* (CCL-2/MCP-1), *Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted* (CCL-5/RANTES), *Monokine Induced by IFN- $\gamma$*  (CXCL-9/MIG) e *IFN-Inducible Protein 10* (CXCL-10/IP-10), comentadas a seguir, foram as avaliadas em nosso estudo.

##### 2.1.1.5.1. CXCL-8/IL-8

A CXCL-8/IL-8 proporciona o recrutamento de neutrófilos, linfócitos T e basófilos em resposta a uma variedade de estímulos (RAJA, 2004). É liberada, principalmente, por monócitos/macrófagos, entretanto, os fibroblastos, os queratinócitos e os linfócitos também a produzem (MUNK & EMOTO, 1995 citado por RAJA, 2004). Esta quimiocina é importante no início da resposta do hospedeiro ao bacilo, sendo a fagocitose do *MTB* por células monocíticas, um importante estímulo para sua secreção. Além da quimiotaxia de células inflamatórias, CXCL-8 é considerada um importante fator ativador de neutrófilos (RAJA, 2004).

#### 2.1.1.5.2. CCL-2/MCP-1

A CCL-2/MCP-1 é produzida por monócitos e macrófagos, atuando nos mesmos e em células T e NK (VAN CREVEL, OTTENHOFF & VAN DER MEER, 2002; LU *et al.*, 1998). Esta quimiocina induz a expressão de integrinas (CD11b/CD18 e CD11c/CD18) necessárias à quimiotaxia de monócitos (ROLLINS, 1997) durante a infecção. Na TB, o bacilo induz a produção dessa quimiocina por monócitos (KASAHARA *et al.*, 1994 citado por VAN CREVEL, OTTENHOFF & VAN DER MEER, 2002).

A deficiência de CCL-2/MCP-1, em modelo murino, inibe a formação de granuloma, assim como a deficiência de seu receptor (CCR-2) proporciona: redução na formação do granuloma, supressão da produção de citocina do tipo Th-1 e morte precoce após infecção por *MTB* (PETERS *et al.*, 2001; LU *et al.*, 1998; BORING *et al.*, 1997). CCL-2 induz a liberação de grânulos por células NK e T CD8<sup>+</sup>, atua como potente fator liberador de histamina por basófilos, e ativa células NK (ROLLINS, 1997). Podemos ressaltar ainda, que elevadas concentrações dessa quimiocina foram encontradas no lavado broncoalveolar, soro e fluido pleural de pacientes com TB (VAN CREVEL, OTTENHOFF & VAN DER MEER, 2002), evidenciando o favorecimento da quimiotaxia e, conseqüentemente, a formação do granuloma.

#### 2.1.1.5.3. CCL-5/RANTES

CCL-5/RANTES é liberada por macrófagos alveolares humanos na infecção por *MTB*, sendo esta quimiocina uma das principais quimiocinas C-C produzidas em resposta à infecção micobacteriana (MENDÉZ-SAMPERIO, 2008). CCL-5 atua na quimiotaxia de monócitos, células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, bem como de eosinófilos e basófilos. Em basófilos, assim como MCP-1, RANTES também induz a liberação de histamina (revisado por ROLLINS, 1997). Esta quimiocina é produzida por uma ampla variedade de células, mostrando promiscuidade de ligação, ao se ligar a múltiplos receptores, quais sejam: CCR1, CCR3, CCR4 e CCR5 (ROLLINS, 1997; VAN CREVEL, OTTENHOFF & VAN DER MEER, 2002). Em humanos, CCL-5 como CCL-2, também tem sido detectada no lavado broncoalveolar (KURASHIMA *et al.*, 1997).

Sua expressão em murinos foi associada com o desenvolvimento de granuloma pulmonar induzido por *M. bovis*. Em camundongos, CCL-5 é mais expressa em granulomas tipo 1 (por *M. bovis*), apresentando aumento na área das lesões, enquanto que em granuloma tipo 2 (por ovos de *S. mansoni*), sua expressão é reduzida, assim como, a área das lesões (CHENSUE et al., 1999). Seu bloqueio com anticorpos monoclonais, diminuem a área das lesões nos granulomas tipo 1, ao passo que aumentam as do tipo 2 (CHENSUE et al., 1999). Este bloqueio promove ainda, o aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 nos linfonodos de murinos com granuloma tipo 2. Esta quimiocina é uma molécula reguladora endógena, que participa de forma diferente tanto da resposta imune tipo 1, quanto da resposta tipo 2 (CHENSUE et al., 1999).

#### 2.1.1.5.4. CXCL-9/MIG e CXCL-10/IP-10

CXCL-9/MIG é uma quimiocina induzida por IFN- $\gamma$  e isolada de macrófagos (ROLLINS, 1997). Já CXCL10/IP-10 é expressa por células mononucleares, neutrófilos, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos T, predominantemente, pós-estímulo com IFN- $\gamma$  (ROLLINS, 1997; SAUTY et al., 1999). Estas quimiocinas (CXCL-9 e CXCL-10) são responsáveis pela quimiotaxia de células T ativadas e células NK (SAUTY et al., 1999).

No lavado broncoalveolar de indivíduos positivos para o teste tuberculínico, foram encontradas grandes quantidades de CXCL-9 e CXCL-10, 48 horas após estímulo com PPD (WALRATH et al., 2005). Estes achados demonstram o estabelecimento de uma resposta imune contra os antígenos micobacterianos, devido ao recrutamento de células efectoras ao local do estímulo, após instilação broncoscópica com o PPD.

#### 2.1.2. Resposta Adaptativa ao MTB

O sistema imunológico dos mamíferos age por resposta celular e/ou humoral (DUCATI et al., 2006). Ambas as respostas envolvem linfócitos T *helper* (Th). O

resultado de cada resposta imune (humoral ou celular) depende do tipo de subclasse de linfócitos envolvida (DUCATI *et al.*, 2006; LABIDI *et al.*, 2001). Os linfócitos Th são produzidos, principalmente, por duas vias de maturação (Th-1 e Th-2), e agrupados de acordo com a diferenciação do conjunto (CD4 e CD8), bem como, a secreção de diferentes citocinas (DUCATI *et al.*, 2006; LABIDI *et al.*, 2001).

A resposta imune do tipo Th-1 (de natureza celular), envolve linfócitos T CD8+ e T CD4+, que promovem a ativação de macrófagos e a detecção/lise de células afetadas. Esta resposta é importante em doenças crônicas tais como o parasitismo intracelular e o câncer (LABIDI *et al.*, 2001). Estas células secretam citocinas como *Interleukin* (IL)-2, IL-12, IL-15, *interferon gamma* (IFN- $\gamma$ ), linfotoxinas e o *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), responsáveis pela ativação de macrófagos (LABIDI *et al.*, 2001).

A resposta imune tipo Th-2, de natureza humoral, envolve diferentes subgrupos de linfócitos T CD4+, que estão associados à produção de anticorpos. Estes podem ser requeridos na eliminação de antígenos e parasitas extracelulares (LABIDI *et al.*, 2001). Células tipo Th-2 secretam citocinas tais como IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, e TNF- $\alpha$ ; estas citocinas inativam a proliferação de macrófagos (YEW & LEUNG, 2006), enquanto TNF- $\alpha$  contribui com a inflamação e necrose de tecidos, quando liberada em níveis elevados (LABIDI *et al.*, 2001).

Depois da exposição ao *MTB*, via gotículas de aerossóis, os macrófagos alveolares e as células T CD4+ e T CD8+ são responsáveis pela contenção/eliminação do bacilo e pela imunopatogênese da TB (YEW & LEUNG, 2006). Sabe-se que as células T CD4+ são importantes na imunidade protetora contra o *MTB*. Entretanto, células T CD8+ também desempenham um papel importante na TB, pois estas células são assassinas de células-alvo infectadas, atuantes na lise de macrófagos infectados pelo bacilo, através da exocitose de grânulos (YEW & LEUNG, 2006). A interação de Fas-FasL resulta na morte apoptótica das células-alvo infectadas com *MTB*, por linfócitos T CD8+. Podemos ainda destacar que células humanas T CD8+ periféricas possuem especificidade contra o *MTB*, reconhecendo antígenos micobacterianos, tais como o ESAT-6 (*early secretory antigenic target*; 6-KDa), e



contribuindo para a produção de IFN- $\gamma$  e de TNF- $\alpha$  por estas células (YEW & LEUNG, 2006).

A sobrevivência intracelular micobacteriana depende de sua capacidade para suportar a acidificação do fagossomo em macrófagos infectados e impedir a fusão fagossomo-lisossomo (DUCATI *et al.*, 2006). Na maioria dos pacientes imunocompetentes infectados, o recrutamento de células T e de macrófagos ocorre de forma eficaz levando ao estabelecimento da resposta imune secundária e, por conseguinte, ao controle da infecção. Quando o sistema imune falha ou é deprimido/suprimido, a tuberculose latente pode tornar-se ativa, mesmo que a infecção tenha ocorrido há décadas (DUCATI *et al.*, 2006).

## 2.2. Resposta Imunitária nas Helmintíases Intestinais

Os helmintos intestinais são responsáveis por significativa morbidade em humanos. Estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas no mundo estão infectadas por alguma espécie de helminto (BETHONY, 2006). A prevalência real das infecções helmínticas no Brasil e no Espírito Santo é desconhecida, visto que estas parasitoses não são de notificação obrigatória. Deste modo, os dados aqui apresentados sobre a prevalência de infecção por helmintos, são oriundos de estudos realizados isoladamente.

Segundo Rey (2008), *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermiculares*, Ancilostomídeos, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia sp* infectam mais crianças, enquanto adultos (após a terceira década) são frequentemente infectados por Ancilostomídeos e *S. stercoralis*. No estado do Espírito Santo, levantamento de 942 exames de fezes realizados pelo Laboratório de Parasitologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) em pacientes internados nesta unidade, entre 1996 e 1998, mostrou uma prevalência de 24% para os nematóides intestinais (TRISTÃO-SÁ *et al.*, 2002). Estas informações corroboram com o fato de que a helmintíase intestinal é responsável por morbidade em alguns brasileiros.

As infecções por helmintos são potentes indutoras da resposta Th-2, caracterizada por: eosinofilia; altos títulos de IgE circulantes; favorecimento da secreção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-10; e redução das citocinas Th-1 (BUNDY, SHER, & MICHAEL, 2000).

A infecção com *S. stercoralis* tem sido associada com uma forte resposta imune tipo Th-2 (citado por RESENDE-CÓ et al., 2007), comum a muitos vermes intestinais. No entanto, infecções por *Hymenolepis nana* podem ser tanto Th-2 quanto Th-1, conforme a fase do desenvolvimento o parasita está apresentando no hospedeiro naquele momento, isto é, fase luminal ou fase tecidual, respectivamente (CONCHEDDA et al., 1997). Existem parasitas intestinais que também apresentam resposta imune tanto Th-1 quanto Th-2, como o *H. nana*, outros entretanto, são capazes de desenvolver uma resposta somente Th-2, porém esta resposta pode ser pouco intensa.

As infecções helmínticas induzem uma imunomodulação que pode afetar o desenvolvimento de outras doenças infecciosas (BENTWICH et al., 1999). Baseado em achados de estudos relacionados ao estado imunológico dos seres humanos com vermes intestinais, Bentwich e colaboradores (1999), acreditam que a erradicação destes vermes poderia mudar o impacto de algumas doenças infecciosas, tais como a AIDS e a TB.

### **2.2.1. Resposta Imune na Associação TB e Helmintíases Intestinais**

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o *MTB* e os helmintos são coendêmicos em muitas regiões no mundo, e que as superinfecções desses patógenos são freqüentes (revisado por TALAAT et al., 2006). A infecção por helmintos intestinais pode ser um dos fatores de risco para o desenvolvimento da TB pulmonar ativa, da mesma forma que a infecção pelo HIV (ELIAS et al., 2006).

A existência de associação entre infecções helmínticas intestinais e doenças micobacterianas, tais como a TB pulmonar e a hanseníase multibacilar, foi demonstrada por diversos autores, dentre eles, pesquisadores do nosso grupo (TRISTÃO-SÁ et al., 2002; DINIZ et al., 2001; ELIAS, et al., 2006). Tristão-Sá e

colaboradores (2002), realizaram um estudo com pacientes do HUCAM, Vitória, ES, Brasil, no período de setembro 1997 a agosto 1999, que investigou a frequência de nematódeos intestinais em indivíduos com ou sem TB pulmonar, demonstrando maior prevalência de infecção por helmintos em pacientes com TB.

A eosinofilia e os níveis elevados de IgE presentes na helmintíase intestinal são conseqüências da ativação Th-2, uma resposta especialmente induzida por este tipo de infecção (COOPER et al., 2000b). Assim sendo, os resultados apresentados por Tristão-Sá e colaboradores (2002), indicam que uma possível causa de eosinofilia (e provavelmente dos níveis elevados de IgE) nos pacientes com TB pulmonar, poderia ser a presença de infecções intestinais por helmintos. Estes dados se baseiam nas contagens de eosinófilos superior a 600 células/mm<sup>3</sup> encontradas em 26 dos 57 (45.6%) pacientes com TB. Destes 26 pacientes com TB, 69.8% apresentavam eosinofilia e infecção por um ou mais helmintos intestinais (TRISTÃO-SÁ et al., 2002).

De acordo com Tristão-Sá e colaboradores (2002), os nematódeos intestinais mais comumente encontrados na população de pacientes adultos controles eram *A. lumbricoides*, *S. stercoralis*, *T. trichiura*, Ancylostomidae (*Necator americanus* ou *Ancylostoma duodenale*), respectivamente. A frequência das infecções com algum tipo de nematódeo foi mais elevada nos pacientes com TB pulmonar, do que entre o grupo controle. Quando considerados separadamente, *S. stercoralis* era o mais prevalente em relação aos demais nematódeos, entre os pacientes com TB Pulmonar.

Dados epidemiológicos demonstram que a observação da resposta ao PPD, *in vivo* e *in vitro*, é menor nas crianças com parasitas intestinais, melhorando após eliminação dos vermes (ELIAS et al., 2001). Desta forma, pode-se inferir que a resposta imune celular ao PPD é reduzida em pessoas com infecção por helmintos, o que possivelmente, resulta em baixa eficácia da vacina BCG em áreas endêmicas para helmintíases no mundo (ELIAS et al., 2001). Além disso, Elias e colaboradores (2008), investigaram a associação TB e helmintíases, demonstrando que a infecção crônica por helmintos pode reduzir a imunogenicidade do BCG em humanos, o que pode estar associada a maior produção de TGF- $\beta$ , porém, sem aumento da resposta Th-2.

Resende-Có e colaboradores (2007), avaliaram o número de linfócitos e o perfil de citocinas de pacientes com TB ou com TB e helmintos intestinais (TB+HELM); dados destes autores indicam que a infecção intestinal por helmintos, em pacientes com TB, pode induzir ao desvio no perfil de citocinas para uma resposta do tipo Th-2. A produção de um fator homólogo ao fator humano de inibição da migração de macrófagos (MIF) por nematódeos, poderia interferir sistematicamente na imunidade do hospedeiro, deslocando a resposta imune para o tipo Th-2 (RESENDE CÓ et al.,2007).

Embora os dados aqui apresentados sugiram que a presença de helmintos intestinais favoreça/aumente outras doenças infecciosas (RESENDE CÓ et al.,2007), estes argumentos ainda não são conclusivos (BUNDY et al., 2000 citado por TRISTÃO-SÁ *et al.*, 2002). Brown e colaboradores (2006) relataram que a infecção por nematódeos e a progressão da TB ativa entre pacientes infectados pelo HIV-1 não estão correlacionadas.

Na literatura pouco ou praticamente nada se conhece sobre a influência das helmintíases intestinais na resposta imune inata ao *MTB*. Até mesmo as informações a cerca do impacto negativo dos helmintos intestinais na resposta imune adaptativa ao *MTB* ainda não são irrefutáveis. Tendo em vista que esta resposta é dependente da imunidade inata, acreditamos que esta pesquisa poderá contribuir para elucidação do impacto dos helmintos intestinais na resposta imune inata e, por conseguinte, na resposta adaptativa ao *MTB*.

Objetivo

### 3. OBJETIVO

Estudar alguns aspectos da imunidade inata em pacientes com tuberculose, com e sem helmintíases intestinais, em pacientes com helmintos intestinais e em indivíduos saudáveis (controles), avaliando:

- O número e fenótipo de células dendríticas e macrófagos do sangue periférico;
- A produção de citocinas (IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e de quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL-8, CXCL9 e CXCL-10) no sobrenadante de cultura de sangue total após estímulo com antígenos de *MTB*.

**Amostras e Métodos**

---

## 4. AMOSTRAS E MÉTODOS

### 4.1. Pacientes e indivíduos controles

Este projeto é um estudo descritivo transeccional de indivíduos portadores de tuberculose pulmonar e/ou helmintíase intestinal. Tal projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (Anexo 1). Termos de consentimento esclarecidos e assinados foram obtidos de todos os participantes do estudo. Os critérios de inclusão foram não apresentar: infecção pelo HIV, gravidez, doenças de base, e ter idade entre 13 e 65 anos. A figura 3 resume as amostras estudadas, indicando o número de casos em cada grupo. Pacientes com TB e helmintíase intestinal associadas, e indivíduos infectados por helmintos intestinais apenas, foram denominados TB+HELM e HELM, respectivamente. Tanto TB+HELM quanto HELM receberam tratamento padrão para suas verminoses. Pacientes com TB receberam tratamento padrão para TB de acordo com o consenso brasileiro para tratamento da TB. Voluntários saudáveis PPD positivos e negativos formaram os grupos controles.

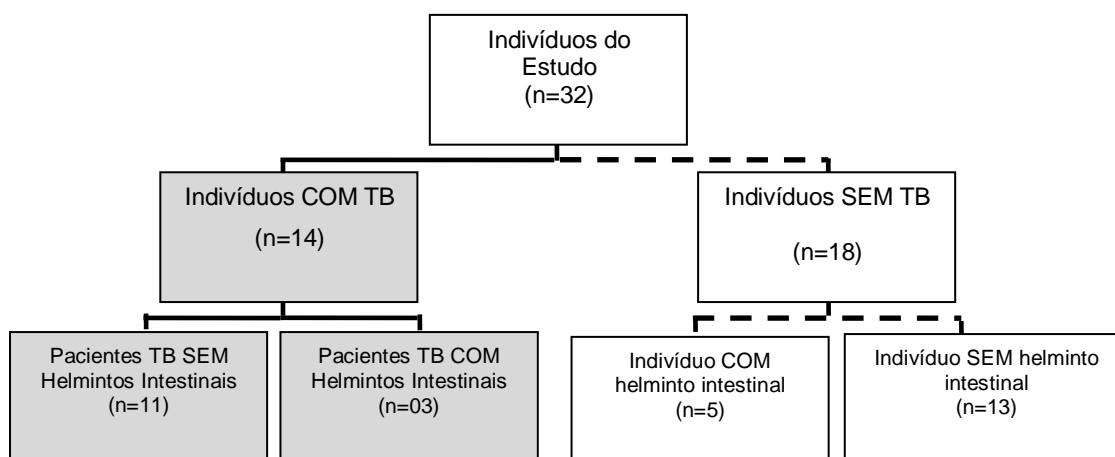


Figura 3 - Distribuição dos participantes do estudo, portadores ou não de TB associada a helmintíases intestinais.

Os pacientes com tuberculose pulmonar foram recrutados no período de julho de 2008 a dezembro de 2008. Foram atendidos no ambulatório de tuberculose do HUCAM da Universidade Federal do Espírito Santo, e encaminhados pelas Unidades de Saúde da Grande Vitória (Cariacica, Serra, Vitória e Viana), sendo



arrolados antes de iniciar a terapia para TB. Todos os pacientes fizeram raio-X de tórax e coletaram amostras de escarro para baciloscopia e cultura, para pesquisa do *MTB*. Foi realizado o teste rápido para HIV em todos os participantes do estudo. Os participantes eram informados sobre o estudo, e após consentimento e preenchimento do questionário/ficha (Anexos 2 e 3), eram entregues os potes de coleta de fezes, além de serem coletadas amostras de escarro (exceto indivíduos controles).

#### **4.2. Exames parasitológicos**

Exames parasitológicos de fezes foram realizados tanto em pacientes quanto nos controles. O diagnóstico parasitológico foi realizado em 3 amostras consecutivas de fezes, visando cobrir o maior número possível de helmintos intestinais. A avaliação parasitológica foi feita pelas técnicas: Lutz-Hoffman, Kato-Katz, e Baerman-Moraes, realizadas no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Espírito Santo e no Laboratório Deomar Bittencourt.

#### **4.3. Baciloscopia e cultura**

As amostras de escarro dos pacientes TB e TB+HELM foram obtidas antes do tratamento anti-TB (2 amostras consecutivas). Estas amostras foram processadas no Laboratório de Tuberculose do Núcleo de Doenças Infecciosas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Os escarros eram utilizados no preparo do esfregaço, de onde se obtém os resultados de baciloscopia, assim como, na inoculação em meio Ogawa (LJ – Löwenstein-Jensen) para obtenção das culturas.

#### **4.4. Coleta de sangue periférico**

Amostras de sangue periférico (7mL de sangue) foram coletadas por punção venosa em todos os participantes do estudo. A coleta de sangue foi realizada após a

entrega das amostras de fezes. As amostras de sangue foram utilizadas para avaliação quantitativa e fenotípica das populações celulares, para o desenvolvimento de culturas de sangue total estimuladas com antígenos solúveis de *MTB*, e para avaliação do perfil de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de cultura. Além disso, alíquota da amostra de sangue foi utilizada para obtenção de hemograma com contagem global e diferencial de leucócitos (Coulter STKS) pelo Laboratório Tommasi, Vitória, ES.

#### **4.5. Quantificações e fenotipagem de células dendríticas e monócitos/macrófagos em sangue total**

Para a realização deste procedimento, 3mL de sangue periférico foram coletados em tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*). 100 $\mu$ L desse sangue foram adicionados a cada tubo de citometria. Acrescentou-se por tubo, ainda, 50 $\mu$ L de PBS (*phosphate-buffered saline* – Invitrogen) 10% FCS (*fetal calf serum* - Sigma). PBS com FCS e o sangue foram incubados por vinte minutos, à 4<sup>o</sup> C, com o intuito de diminuir as ligações inespecíficas. Decorrido este tempo, cada tubo recebeu seu conjunto de anticorpos monoclonais conjugados (5 $\mu$ L de cada anticorpo – Anexo 4).

Os anticorpos utilizados estão listados no anexo 4, no qual informamos os clones, concentrações, fluorocromos, marca e funções/ação dos mesmos. Para a identificação de células dendríticas utilizamos os anticorpos monoclonais: coquetel de anticorpo – Lin1 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56), CD123, CD11c e HLA-DR. Na identificação de monócitos/macrófagos utilizamos CD14 e HLA-DR. Na análise de moléculas coestimuladoras e receptores de reconhecimento em DCs e monócitos/macrófagos usamos anticorpos monoclonais para: CD40, CD86, CD209 (DC-SIGN), CD16, TLR2, TLR4 e TLR9. Os controles isotípicos utilizados em todos os procedimentos foram: IgG1-FITC, IgG2a-PE e IgG2b-PECy5.

Para a marcação de células dendríticas utilizamos os anticorpos HLA-DR (característico de células apresentadoras de antígenos) e o coquetel de anticorpos Lin1 para a obtenção desta população celular. Para distinguir as subpopulações de células dendríticas (tabela 1), acrescentamos ao HLA-DR e Lin1, os anticorpos

CD11c (mDC) e CD123 (pDC). Células dendríticas mielóides apresentam fenótipo  $\text{Lin1}^- \text{CD11c}^+ \text{HLA-DR}^+$ , enquanto as plasmacitóides são  $\text{Lin1}^- \text{CD123}^+ \text{HLA-DR}^+$ .

Para análise das moléculas coestimulatórias e de reconhecimento, em cada tubo de análise, junto aos anticorpos monoclonais HLA-DR e Lin1, foram colocados os marcadores de coestimulação e reconhecimento: CD86, CD40, CD209, CD16, TLR-2, TLR-4 e TLR-9.

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais que caracterizam as DCs e suas subpopulações.

Anticorpo monoclonal	Finalidade
HLA-DR	Molécula MHC classe II utilizada na obtenção de células apresentadoras de antígenos.
Lin1 (coquetel de anticorpos formado por: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56).	Obtenção da população de células dendríticas por exclusão das células marcadas por Lin1. Por isso, as DCs são denominadas $\text{Lin1}^-$ .
CD11c	Obtenção da subpopulação mielóide.
CD123	Obtenção da subpopulação plasmacitóide.

Para análise de monócitos/macrófagos utilizamos os anticorpos monoclonais HLA-DR e CD14 para definir tal população. Na análise das moléculas coestimulatórias e de reconhecimento, em cada tubo de análise, junto aos anticorpos monoclonais HLA-DR e CD14, foram colocados os marcadores para tais finalidades, quais sejam: CD86, CD40, CD209, CD16, TLR-2, TLR-4 e TLR-9.

Após adição dos anticorpos monoclonais aos seus respectivos tubos, o sangue marcado foi incubado à 4°C, por vinte minutos. Passado este tempo, foi adicionado 1mL de solução de lise (*fluorescence-activated cell sorting (FACS) lysing solution*)

(BD Biosciences) em cada tubo. Após adição desta solução, o sangue marcado passou por uma incubação de quinze minutos à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo, os tubos passaram por centrifugação a 300 x g por sete minutos. O sobrenadante foi descartado, e ao *pellet* ressuspensionado foram acrescentados 2mL de PBS 1% BSA (Sigma) em cada tubo. Os tubos foram submetidos à nova centrifugação e o *pellet* foi ressuspensionado em 400 $\mu$ L de solução de fixação (MAC'S FACS *fix solution*)<sup>1</sup> por tubo com marcação extracelular, exclusivamente.

Nos tubos que havia a necessidade de identificação de molécula intracelular (TLR-9), foram adicionados 100 $\mu$ L de solução de fixação, que compõe o kit de fixação e permeabilização celular (eBioscience). Segundo instruções do fabricante, após adição da solução de fixação, faz-se necessário a incubação de vinte minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, adicionou-se 1mL de solução de permeabilização (diluição conforme indicado no manual – 1:10), seguida de centrifugação a 300 x g por cinco minutos e posterior descarte do sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais uma vez antes da marcação com o anticorpo monoclonal TLR9-PE. 5 $\mu$ L desse anticorpo e 100 $\mu$ L de solução de permeabilização foram acrescentados a cada tubo, os quais passaram por um período de incubação de vinte minutos. Ao fim desse período, mais 1mL de solução de permeabilização foi colocada em cada tubo, que foi submetido a mais um processo de centrifugação de 300 x g por cinco minutos. Após descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado em 400 $\mu$ L de solução MAC'S FACS.

As amostras com marcação (extra e intracelular) foram analisadas em citômetro de fluxo FACSort (BD Biosciences) e os dados foram obtidos e analisados através do software CellQuest (BD Biosciences). Adquiriram-se cinquenta mil eventos totais por tubo, visto que as regiões (*Gates*) R1 e R1+R2 delimitavam as populações de monócitos e células dendríticas, respectivamente, sendo definidos a partir do *gráfico de distribuição pontual SSC (side scatter) versus HLA-DR<sup>+</sup>* (Figura 4 A). Baseado nestas regiões do gráfico de distribuição montou-se gráficos de distribuição pontual, com Lin1 versus algum marcador conjugado com PE (x PE), para células dendríticas, e CD14 versus qualquer marcador conjugado com PE (x PE), para monócitos/macrófagos (Figura 4 B e C). Nestes gráficos, os marcadores (x)

---

<sup>1</sup> MAC'S FACS *fix solution* – contém paraformaldeído, cacodilato de sódio e cloreto de sódio

conjugados com PE (ficoeritrina) foram os seguintes: CD209<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, TLR-2<sup>+</sup>, TLR-4<sup>+</sup> e TLR-9<sup>+</sup>, além de CD123<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup> (somente para Lin1<sup>-</sup> células dendríticas). A análise de células dendríticas foi baseada na região R1+ R2, para a obtenção de células com fenótipo Lin1<sup>-</sup> x<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>, enquanto que a análise de monócitos/macrófagos feita em R1 obteve o fenótipo CD14<sup>+</sup> x<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>.

A análise de intensidade de fluorescência média também foi realizada, porém os resultados obtidos não foram significativos, por isso optamos pela análise utilizada neste trabalho, já que alguns de nossos achados foram estatisticamente significantes.

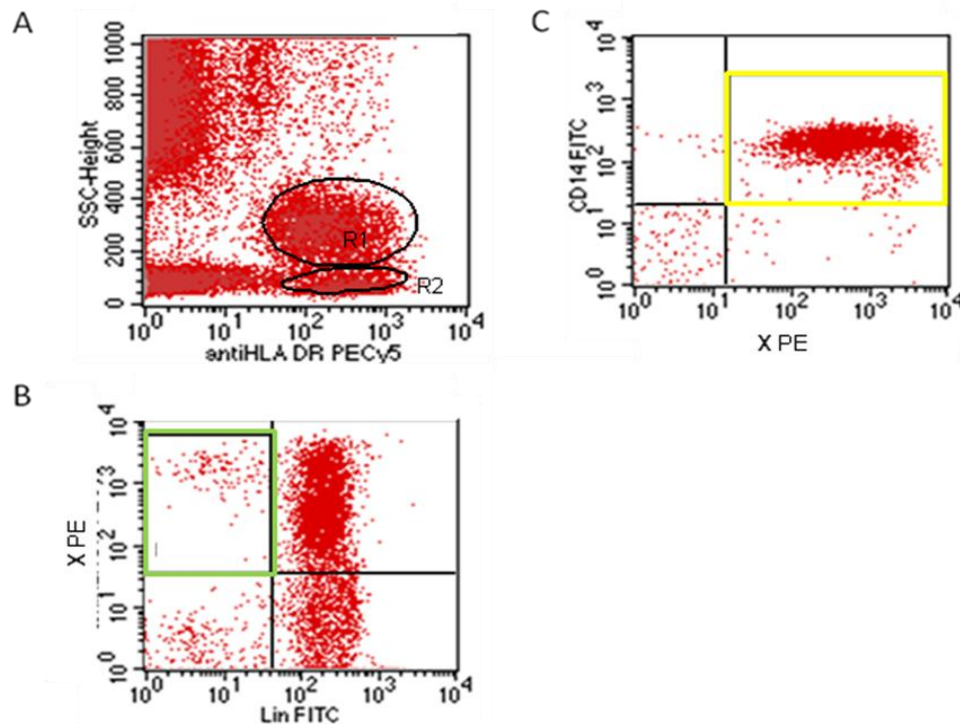


Figura 4 – Gráficos de distribuição pontual dos marcadores que definirão os fenótipos de células dendríticas e monócitos/macrófagos. A) Gráfico de distribuição pontual SSC (*side scatter*) versus HLA-DR PE Cy5 para definição das regiões de análise de células dendríticas (gate R1+R2) e monócitos/macrófagos (gate R1). B) Gráfico de distribuição pontual entre os marcadores x PE e Lin FITC, para obtenção da subpopulação Lin<sup>-</sup>x<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (retângulo verde). C) Gráfico de distribuição pontual entre os marcadores CD14 FITC e x PE, para obtenção da subpopulação CD14<sup>+</sup>x<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> (retângulo amarelo).

#### 4.6. Culturas de sangue total para análise de citocinas e quimiocinas

Para a realização da cultura de sangue total, obteve-se 1mL de sangue heparinizado. As amostras de sangue foram diluídas 10x em meio RPMI 1640 (Gibco) completo (HEPES 25mM, L-glutamina 200mM (Gibco), penicilina e

estreptomicina (Sigma) e bicarbonato de sódio), ou seja, 700 $\mu$ L de sangue foi adicionado a 6,3mL de meio RPMI completo. Esta diluição foi dispensada em placas de cultura de 24-poços estéreis (1mL por poço). A placa foi identificada com a data de início da cultura e com as iniciais e código do paciente, enquanto nos poços anotou-se o dia de estudo (24 horas ou 3 dias) e o estímulo (sem estímulo ( $\emptyset$ ) ou estímulo com antígenos (Ags) solúveis de *MTB*).

Amostras foram incubadas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. Nos poços identificados com estímulo, eram acrescentados 100 $\mu$ L de Ags solúveis (concentração final de 5  $\mu$ g/mL) de cultura de *MTB* (cepa H37Ra). Conforme identificação na placa, 24 horas ou 3 dias de cultivo, os sobrenadantes de cultura eram coletados (duas alíquotas de 400 $\mu$ L/cada) e congelados a -70°C até sua utilização para dosagem de citocinas e quimiocinas.

#### **4.6.1. Dosagens de citocinas inflamatórias e quimiocinas por CBA (Cytometric Beads Array)**

A presença de citocinas proinflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 e de quimiocinas CXCL9/MIG (*Monokine Induced by IFN- $\gamma$* ), CXCL10/IP-10 (*IFN-Inducible Protein 10*), CCL5/RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*), CCL2/MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*) e CXCL-8/IL-8 nas amostras de sobrenadante de cultura de sangue total, foi avaliada através da utilização dos kits CBA *inflammation* e CBA *chemokine* (BD Biosciences). Uma alíquota de sobrenadante de cultura de cada condição do estudo (24h $\emptyset$ , 24h Ag *MTB*, 3d $\emptyset$  e 3d Ag *MTB*), foi descongelada à temperatura ambiente. Tubos de citometria foram identificados para as amostras e para os padrões. As amostras estimuladas com Ag de *MTB* foram utilizadas sem diluir e diluindo 1:30 (diluição definida após padronização). Os procedimentos de preparo da mistura de *beads* e dos padrões foram seguidos conforme instruções do fabricante, para cada kit. Nos tubos identificados para as amostras, colocou-se 15 $\mu$ L de mistura de *beads*/tubo e 25 $\mu$ L de amostra por tubo. Nos tubos dos

padrões, também foram acrescentados 15 $\mu$ L de mistura de *beads* por tubo e 25 $\mu$ L dos padrões nos seus respectivos tubos.

Depois que todos os tubos identificados estavam com a mistura de *beads* e suas respectivas amostras ou padrões, 18 $\mu$ L/tubo de reagente de detecção PE foi adicionado a todos os tubos. Estes foram mantidos no escuro por 3 horas. Decorrido este tempo, 500 $\mu$ L de reagente F em cada tubo foi acrescentado antes da centrifugação de 300 x g por sete minutos. Após a centrifugação, o conteúdo do tubo foi aspirado através de uma bomba a vácuo, de modo que, aproximadamente, 100 $\mu$ L do preparo permanecesse para a análise.

Depois deste passo, os tubos foram analisados em citômetro de fluxo FACSort (BD Biosciences), após calibração conforme manual do kit. Na aquisição utilizou-se um *threshold* para SSC de 650 e uma resolução de 1024. O número de eventos na região R1 (definida no arquivo de aquisição, montado durante a calibração e compensação do citômetro para utilização dos kits) foi de 1800 eventos. As amostras foram lidas numa taxa de fluxo HIGH. Os dados obtidos foram analisados no programa BD CBA Software (BD Biosciences), seguindo as informações contidas no manual dos kits, visto que os resultados foram expressos em pg/mL.

#### **4.7. Preparo do Antígeno (Ag) solúvel de *Mycobacterium tuberculosis***

Para o preparo do Ag de *MTB* utilizou-se a cepa H37Ra ATTC (*American Type Culture Collection*) 25177 cedida pelo laboratório de Tuberculose do Núcleo de Doenças Infecciosas, da Universidade Federal do Espírito Santo. Para tanto, preparou-se uma suspensão bacteriana com turvação comparável a escala número 1 de McFarland em solução salina/0,25% tween ou em água destilada estéril. Inoculamos 500 $\mu$ L de suspensão bacteriana em meio Middlebrook 7H9 (BD Difco) com 0,05% Tween (Merck-Schuchardt), totalizando 150mL de cultura (30 tubos com 5mL de cultura cada). A Incubação foi realizada em estufa à 37°C por aproximadamente 10 dias (fase log).

No dia anterior ao preparo do antígeno, alíquotas das culturas foram inoculadas em ágar sangue para pesquisa de contaminantes. Após a constatação de ausência de contaminantes, as culturas foram transferidas para quatro tubos cônicos de 50mL (37,5mL em cada tubo) e centrifugadas por 15 minutos, 2000 x g, à temperatura ambiente e sem freio. Os sobrenadantes foram desprezados e o sedimento ressuspendido em PBS (1ª lavagem). O procedimento de centrifugação repetiu-se mais duas vezes, sendo que na última vez, o sedimento foi ressuspendido num volume 10x menor que o inicial (3,75mL/tubo). Após vigorosa homogeneização, o conteúdo de cada tubo foi transferido para um tubo de centrífuga de 15mL. Estes tubos foram submetidos à agitação em vórtex por cerca de vinte minutos (múltiplas repetições durante vinte minutos). Depois da agitação, os tubos foram selados com parafilme e colocados em banho-maria à 65°C por 1 hora. Passado este tempo, estes foram congelados à -70°C (*overnight*).

O ciclo de congelamento à -70°C e descongelamento à 37°C foi repetido quinze vezes, agitando em vórtex entre o congelamento e descongelamento. Concluídos os ciclos, o conteúdo dos tubos foram divididos em eppendorfs para serem submetidos a 4 ciclos (sem intervalos) no sonicador LCX Lysor (Abbott Probe System). Terminado o procedimento de sonicação, a suspensão contida nos eppendorfs foi transferida para um tubo cônico, e mantida em repouso por cinco minutos. Após este tempo, coletou-se o sobrenadante, sendo este, alíquotado em eppendorfs (400µL cada) e mantidos à -70°C até sua utilização. Para confirmação de que não haveria crescimento micobacteriano após todo o processo de obtenção dos antígenos, uma alíquota destes antígenos (retirada do tubo cônico) foi inoculada em LJ, o qual foi acompanhado por trinta dias para verificação de ausência ou não de crescimento. Com a confirmação de que não houve crescimento micobacteriano, as proteínas foram dosadas pelo método de Lowry no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo. Cabe lembrar, que durante todo o processo, inóculos em ágar sangue foram utilizados para constatação de possíveis contaminações.



#### **4.8. Análises estatísticas**

Dados com distribuição normal foram analisados através do Teste-t de Student (não-pareado), teste Qui-Quadrado para a análise de variáveis discretas, e Mann-Whitney, para dados com distribuição desconhecida e N reduzido. Nas correlações, o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) foi utilizado. Foram utilizados os programas SPSS 17.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e STATA version 7 (STATA Corporation, College Station, TX, USA). Valores de  $p \leq 0.05$  foram considerados significativos.

**Resultados**

---

## 5. RESULTADOS

Participaram dessa pesquisa 32 indivíduos, todos HIV - negativos, dos quais 14 participantes apresentavam diagnóstico recente de TB (9 homens e 5 mulheres, com idade entre 18-56 anos), sendo 11 pacientes com TB e três pacientes com TB e helmintos intestinais (TB+HELM). Dos 18 indivíduos sem TB, cinco apresentaram helmintíase intestinal (com helmintos e sem TB, denominado grupo HELM), enquanto os demais eram PPD-positivos (PPD > 10mm) clinicamente saudáveis (8 homens e 5 mulheres, com idade entre 14-60 anos), que foram arrolados como controles saudáveis (Controles). A mediana da idade dos indivíduos arrolados foi de 32 anos, com IQ de 11. Informações sobre a idade, sexo, leucócitos totais, monócitos, linfócitos e eosinófilos nos grupos estudados estão representados na tabela 2 (os dados brutos estão contidos na tabela 4, no anexo 5).

Tabela 2 – Idade, sexo, leucócitos totais, monócitos, linfócitos e eosinófilos indivíduos com TB, com TB e helmintíases intestinais (TB+HELM), com helmintos intestinais (HELM) e pessoas saudáveis (controles).

	<b>TB+ HELM</b>	<b>TB</b>	<b>p</b>	<b>HELM</b>	<b>Controle</b>	<b>p</b>
<b>Idade</b>	24; IQ=9,5	32; IQ=9	0,35***	31; IQ=21	35,5; IQ=29,2	0,28***
<b>Sexo M/F</b>	3/0	6/5	0,14**	4/1	9/9	0,23**
<b>Leucócitos*</b>	6600 ± 600	8912,7 ± 800,8	0,17*	7600 ± 698,5	7585 ± 500,3	0,98 *
<b>Monócitos*</b>	696,6 ± 176,28	692,6 ± 82,1	0,98*	566 ± 47,9	531,1 ± 44,2	0,69*
<b>Linfócitos*</b>	2146,6 ± 411,5	1780 ± 158,2	0,33*	2382 ± 216,7	2480,5 ± 133,4	0,72*
<b>Eosinófilos*</b>	446,6 ± 123,4	327,2 ± 130,9	0,66*	666 ± 159,1	331,6 ± 98,9	0,12 *

\* Médias (expressas em células/mm<sup>3</sup>) e os respectivos erros-padrão. Mediana e intervalos interquartis (IQ) foram usadas na análise da idade. Valores de *p* não foram estatisticamente significantes. \* Teste t de student; \*\*\* Teste Qui-quadrado; \*\* Teste Mann-Whitney.

Dos indivíduos analisados nessa pesquisa, 21,63% (8 indivíduos) apresentavam algum tipo de verme, sendo que os helmintos encontrados e suas respectivas freqüências relativas foram as seguintes: *Strongyloides stercoralis* (3; 8,10%), *Schistosoma mansoni* (1; 2,70%), *Enterobius vermicularis* (2; 5,40%), *Hymenolepis nana* (1; 2,70%) e *S. stercoralis* + *S. mansoni* (1; 2,70%). Um indivíduo estava

infectado simultaneamente por dois tipos de helmintos intestinais, *S. stercoralis* e *S. mansoni*.

## 5.1. Quantificação e fenotipagem de células dendríticas e macrófagos

### 5.1.1. Células Dendríticas

As análises fenotípicas e quantitativas das células dendríticas foram realizadas nos *gates* R1+R2 (monócitos + linfócitos). Foram analisados dados de sete indivíduos do grupo TB, sete do grupo PPD+, dois do grupo HELM e dois do grupo TB+HELM. Indivíduos PPD negativo foram incluídos posteriormente a esta análise. A média do número absoluto de células dendríticas mielóides, plasmacitóides e de monócitos/macrófagos estão representadas na tabela 3, bem como os erros-padrão. Os resultados da análise de DCs estão contidos nas figuras 5 a 12, com gráficos em que as médias e seus respectivos erros-padrão estão representados. Os dados para obtenção desses gráficos foram tirados das tabelas 5 e 6, no anexo 5. As marcações  $\text{Lin}^- \text{CD11c}^+ \text{HLA-DR}^+$  e  $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{HLA-DR}^+$  foram utilizadas para a aquisição das subpopulações de células dendríticas mielóides (mDC) e células dendríticas plasmacitóides (pDC), respectivamente.

Tabela 3 – Média do número absoluto de DCs (mielóides e plasmacitóides) e monócitos/macrófagos.

Células	mDC				pDC				Mo/MΦ				
	Grupos	TB+HEL.	TB	HEL.	CTRL	TB+HEL.	TB	HEL.	CTRL	TB+HEL.	TB	HEL.	CTRL
Gate	Monócitos	5 ± 3	3 ± 0,7	3 ± 0,1	2 ± 0,4	10 ± 3,5	8 ± 2,3	12 ± 3	4 ± 0,5	670 ± 174	644 ± 87	477 ± 48	484 ± 44
	Linfócitos	7 ± 6	3 ± 1,1	1 ± 0,5	8 ± 1,6	84 ± 26	26 ± 5	25 ± 17	32 ± 5,1	—	—	—	—
	<b>TOTAL</b>	12 ± 3	6 ± 1,4	4 ± 0,4	8 ± 1,8	94 ± 22,5	34 ± 5,9	37 ± 20	36 ± 5,6	670 ± 174	644 ± 87	477 ± 48	484 ± 44

Média ± erro-padrão.\*Teste t Student. mDC: células dendríticas mielóides. pDC: células dendríticas plasmacitóides. Mo/MΦ: monócitos/macrófagos. TB+HEL.: grupo com tuberculose e helmintos intestinais. TB: grupo com tuberculose. HEL.: grupo com helmintíases intestinais. CTRL: grupo controle. Valores de p\* não foram estatisticamente significantes.

No que se refere a estas subpopulações, uma redução na expressão dos marcadores de mDC ( $\text{Lin}^- \text{CD11c}^+ \text{HLA-DR}^+$ ;  $p > 0,05$ ) foi observada para os grupos TB e HELM, em relação ao controle PPD+. Apesar de não estatisticamente significativo, um discreto aumento na expressão dos marcadores de mDC no grupo TB+HELM foi observado ao se comparar com os demais grupos (Figura 5). Já a expressão dos marcadores de pDC ( $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{HLA-DR}^+$ ,  $p > 0,05$ ) também foi maior no grupo TB+HELM quando comparado aos outros grupos, inclusive o grupo controle (Figura 6).

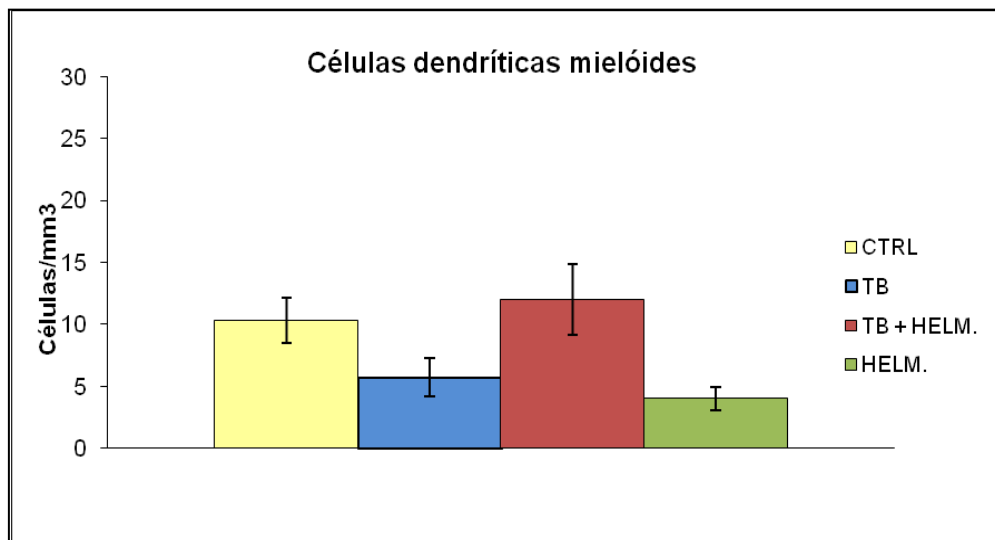


Figura 5 – Análise de célula dendrítica marcada com  $\text{Lin}1^- \text{CD11c}^+ \text{HLA-DR}^+$  no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos). Células dendríticas mielóides ( $\text{CD11c}^+$ ) do sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=07), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=02), helmintíases intestinais – HELM (n=02) e controle – CTRL (n=07). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.

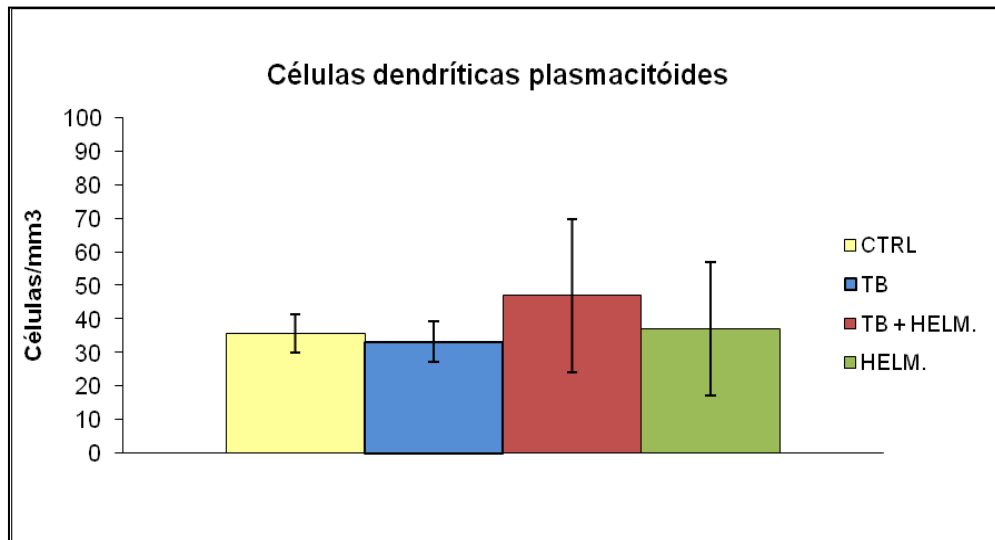


Figura 6 – Análise de célula dendrítica marcada com  $\text{Lin1}^- \text{CD123}^+ \text{HLA-DR}^+$  no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos). Células dendríticas mielóides ( $\text{CD123}^+$ ) do sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=07), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=02), helmintíases intestinais – HELM (n=02) e controle – CTRL (n=07). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.

A expressão de moléculas coestimulatórias CD86 e CD40 está representada nas figuras 7 e 8, respectivamente. Na figura 7, evidencia-se uma tendência ao aumento na expressão de CD86 nos grupos infectados por helmintos e/ou *MTB* (TB, HELM e TB+HELM) em relação ao grupo controle. No entanto, em pacientes com infecções associadas (TB +HELM) a expressão de CD86 foi intermediária entre as observadas para os grupos TB (menor expressão) e HELM (maior expressão).

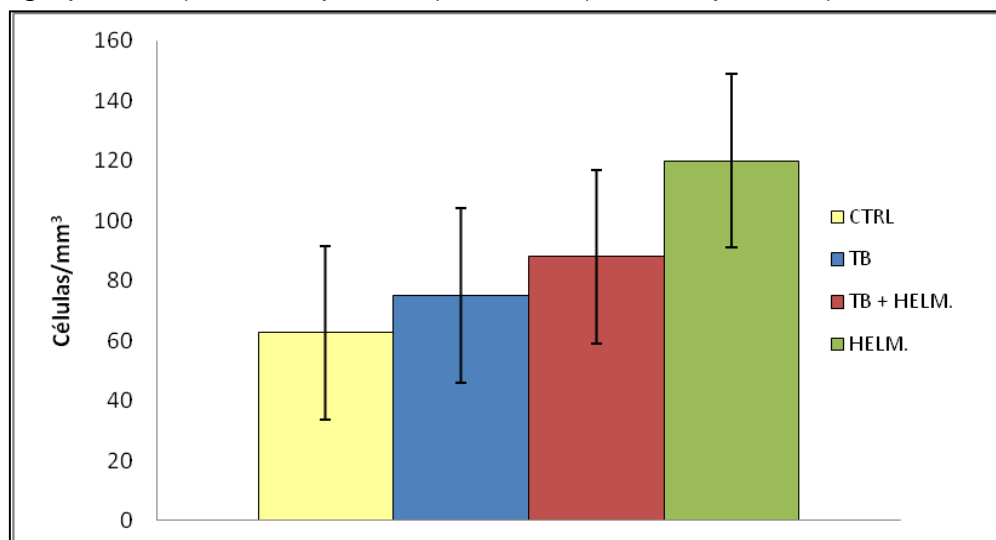


Figura 7 – Análise de célula dendrítica marcada com  $\text{Lin1}^- \text{CD86}^+ \text{HLA-DR}^+$  no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos). Células dendríticas  $\text{CD11c}^+$  ou  $\text{CD123}^+$  expressando CD86 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=07), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=02), helmintíases intestinais – HELM (n=02) e controle – CTRL (n=07). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.

Quando a expressão de CD40 foi avaliada, observamos que a mesma foi reduzida no grupo TB e no grupo HELM, quando comparados ao grupo PPD+ ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, em pacientes do grupo TB+HELM a expressão foi maior tanto em relação ao grupo TB ( $p = 0,02$ ), quanto aos demais ( $p > 0,05$ ; Figuras 8). Células dendríticas mielóides e plasmacitóides tendem a maior expressão no grupo TB+HELM. A expressão de CD86 e CD40, neste grupo, mostra que estas células podem estar ativadas e maduras. Além disso, a expressão de DC-SIGN e TLR9 por mDC e pDC, respectivamente, sugere um desvio de resposta Th-1 para Th-2.

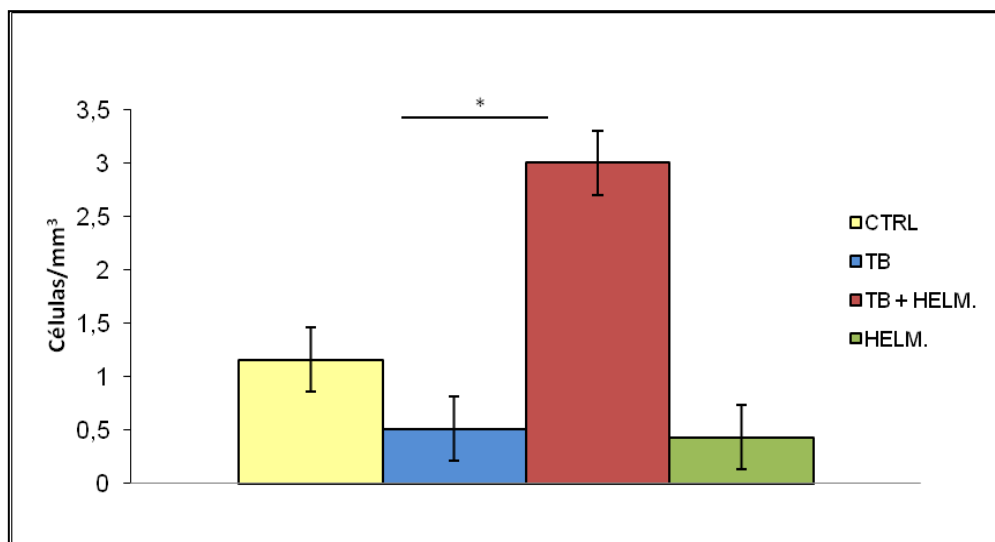


Figura 8 – Análise de célula dendrítica marcada com Lin1<sup>-</sup> CD40<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos). Células dendríticas CD11c<sup>+</sup> ou CD123<sup>+</sup> expressando CD40 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=07), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=02), helmintíases intestinais – HELM (n=02) e controle – CTRL (n=07). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Valor de  $p$  significante: (\*)  $p < 0,05$ .

Nas figuras de 9 a 12 estão representadas a expressão dos marcadores CD209, TLR2, TLR4 e TLR9. A expressão de CD209 (Figura 9) estava reduzida (grupo TB) ou apresentou discreto aumento nos grupos infectados por helmintos (TB+HELM e HELM;  $p > 0,05$ ) em relação ao controle. Para o receptor TLR2, observamos uma tendência à maior expressão nos indivíduos infectados, seja por *MTB* ou por vermes, quando comparados ao grupo PPD+ (Figura 10).

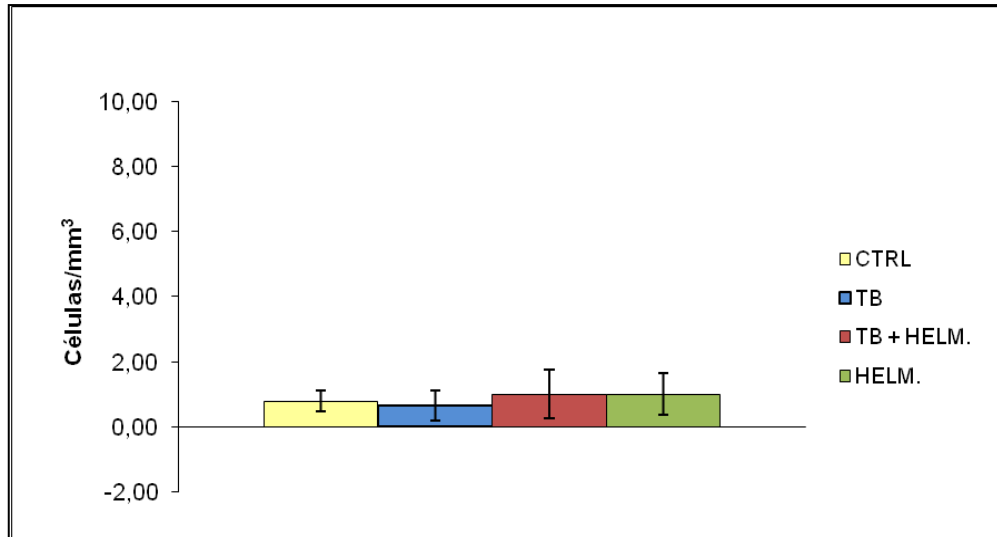


Figura 9 – Análise de célula dendrítica marcada com  $\text{Lin1}^- \text{CD209}^+ \text{HLA-DR}^+$  no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos). Células dendríticas  $\text{CD11c}^+$  ou  $\text{CD123}^+$  expressando DC-SIGN/CD209 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=07), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=02), helmintíases intestinais – HELM (n=02) e controle – CTRL (n=07). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.

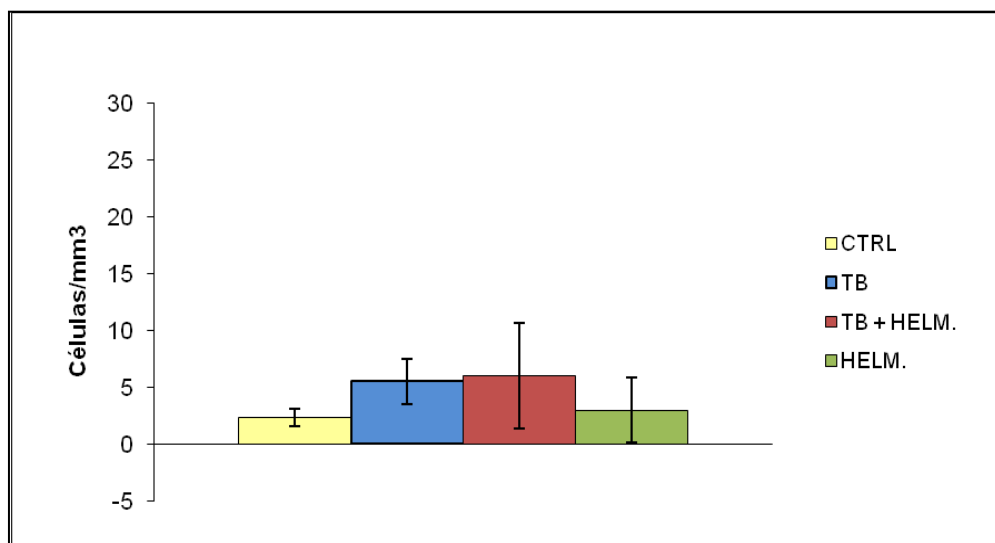


Figura 10 – Análise de célula dendrítica marcada com  $\text{Lin1}^- \text{TLR2}^+ \text{HLA-DR}^+$  no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos). Células dendríticas  $\text{CD11c}^+$  ou  $\text{CD123}^+$  expressando TLR-2 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=07), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=02), helmintíases intestinais – HELM (n=02) e controle – CTRL (n=07). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.



Para o receptor TLR4 (Figura 11), observamos uma tendência para o aumento na expressão deste receptor nos grupos TB e HELM e uma redução no grupo TB+HELM, quando comparados ao grupo controle. A expressão do receptor TLR-9 (Figura 12) pelo grupo HELM apesar de ser mais elevado que os demais grupos, não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Já os pacientes com tuberculose, tanto do grupo TB, quanto do TB+HELM, observamos redução na expressão deste receptor ( $p > 0,05$ ), quando comparados aos demais grupos participantes do estudo.

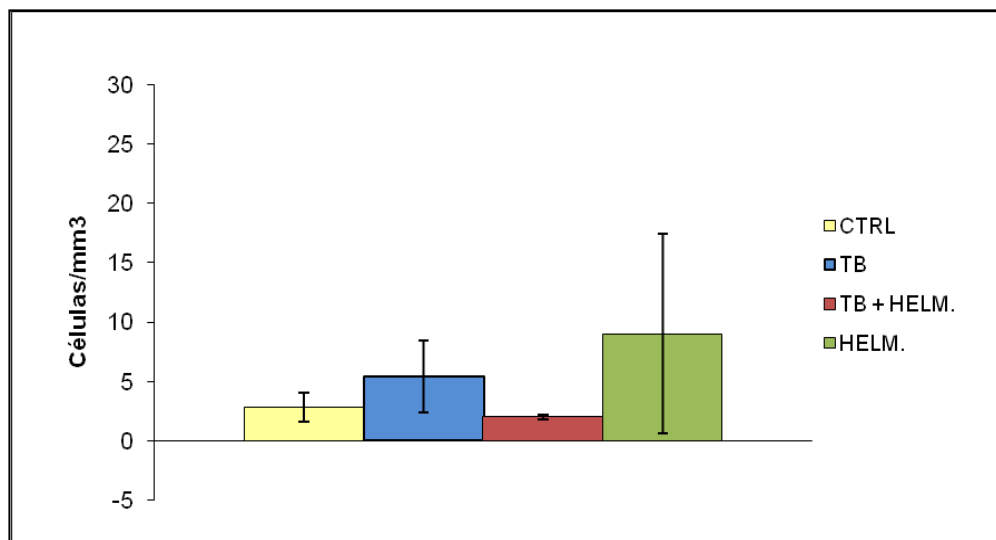


Figura 11 – Análise de célula dendrítica marcada com Lin1<sup>-</sup> TLR4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos). Células dendríticas CD11c<sup>+</sup> ou CD123<sup>+</sup> expressando TLR-4 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=07), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=02), helmintíases intestinais – HELM (n=02) e controle – CTRL (n=07). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.

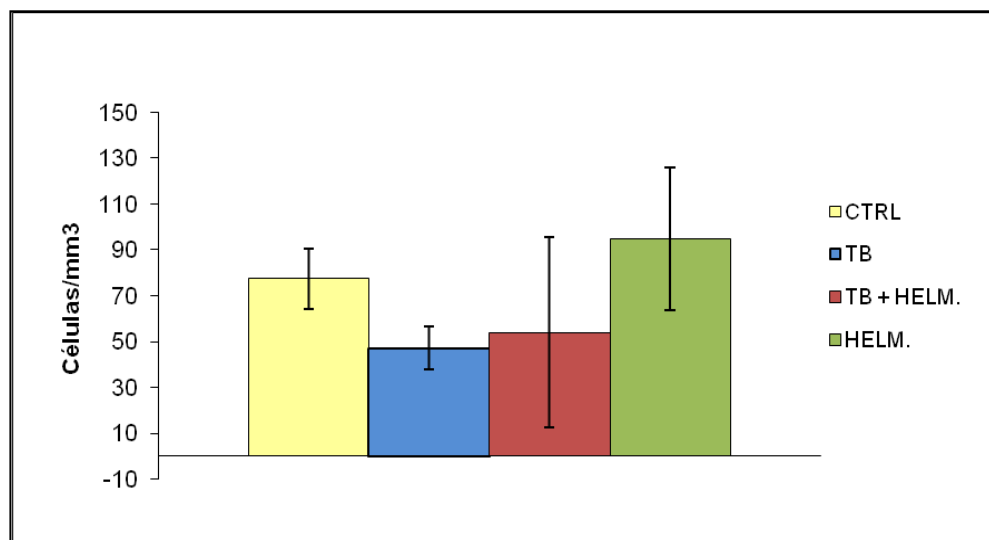


Figura 12 – Análise de célula dendrítica marcada com Lin1<sup>-</sup> TLR9<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no gate R1 + R2 (monócitos+linfócitos). Células dendríticas CD11c<sup>+</sup> ou CD123<sup>+</sup> expressando TLR-9 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=07), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=02), helmintíases intestinais – HELM (n=02) e controle – CTRL (n=07). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.

### 5.1.2. Monócitos/Macrófagos

As análises fenotípicas e quantitativas de macrófagos foram realizadas com base nos dados obtidos no gate R1 (monócitos). Estes grupos estão distribuídos da seguinte forma: 10 indivíduos no grupo TB, 13 no grupo PPD-positivo, três no grupo TB+HELM e cinco no grupo HELM. As figuras 13 a 19 representam a comparação das médias de cada marcador entre os grupos estudados, cujos dados foram tabelados para a obtenção das médias e erros-padrão (tabela 7, no anexo 5).

A expressão do receptor DC-SIGN (CD209; Figura 13) em macrófagos não foi significativa entre os grupos, no entanto podemos sugerir que os grupos infectados por vermes (TB+HELM e HELM) apresentam maior expressão deste marcador em relação aos demais grupos. A possível diferença entre os grupos TB e TB+HELM, na qual a expressão de CD209 pelo grupo TB+HELM foi mais expressiva ( $p > 0,05$ ), leva-nos a ponderar que este grupo apresenta um maior número de macrófagos tipo M2

(polarização Th-2), mostrando assim, uma tendência ao desvio da resposta Th1 para Th2.

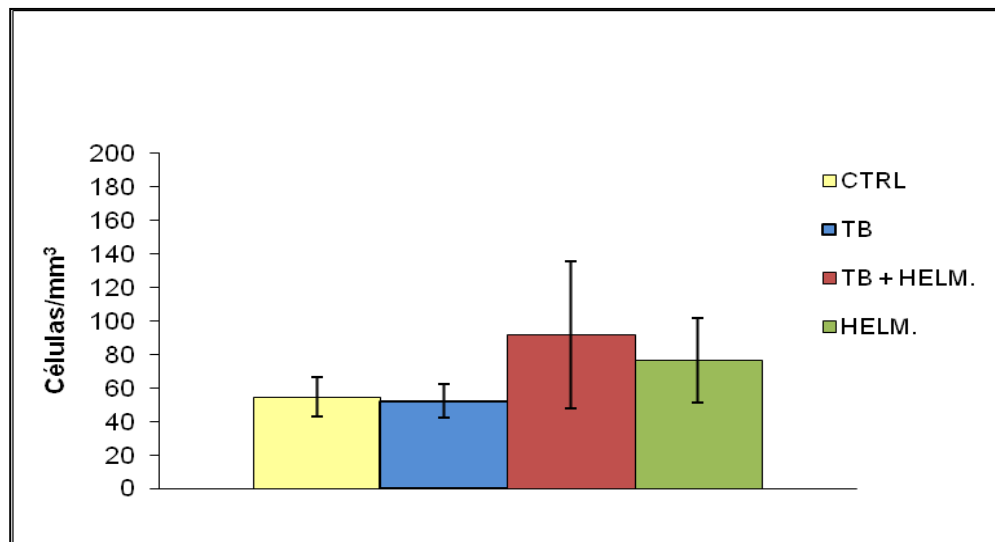


Figura 13 – Análise de monócitos/macrófagos marcados com CD14<sup>+</sup> CD209<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no gate R1 (monócitos). Monócitos/macrófagos expressando CD209 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=10), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=03), helmintíases intestinais – HELM (n=05) e controle – CTRL (n=13). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de *p* não foram estatisticamente significantes.

Moléculas coestimulatórias (CD86 e CD40) apresentaram maior expressão, ou uma tendência ao aumento, nos grupos compostos por indivíduos infectados por *MTB* e/ou helmintos (TB e TB+HELM) (Figuras 14 e 15, respectivamente). Apesar de não ser relevante, estatisticamente, a expressão do marcador CD14<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> foi maior nos grupos TB e TB+HELM do que nos demais (Figura 14).

A expressão de CD14<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> da mesma forma que CD86, não foi significativa, mas demonstra um aumento nos grupo TB e TB+HELM (Figura 15). Estes dados apontam para um aumento na expressão de moléculas coestimulatórias durante a infecção por *MTB*, o que sugere uma ativação de macrófagos nestes grupos.

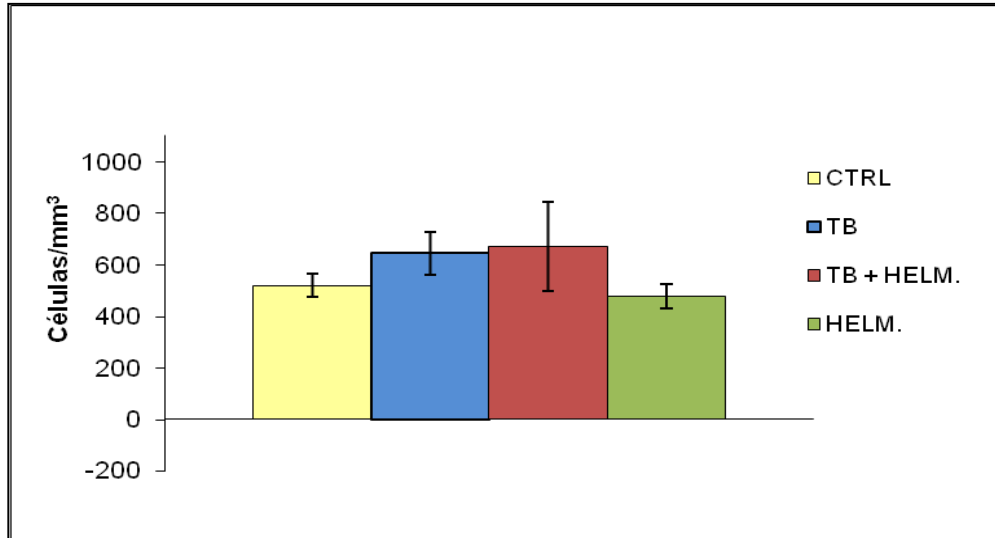


Figura 14 – Análise de macrófagos marcados com CD14<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no gate R1 (monócitos). Monócitos/macrófagos expressando CD86 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=10), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=03), helmintíases intestinais – HELM (n=05) e controle – CTRL (n=13). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.

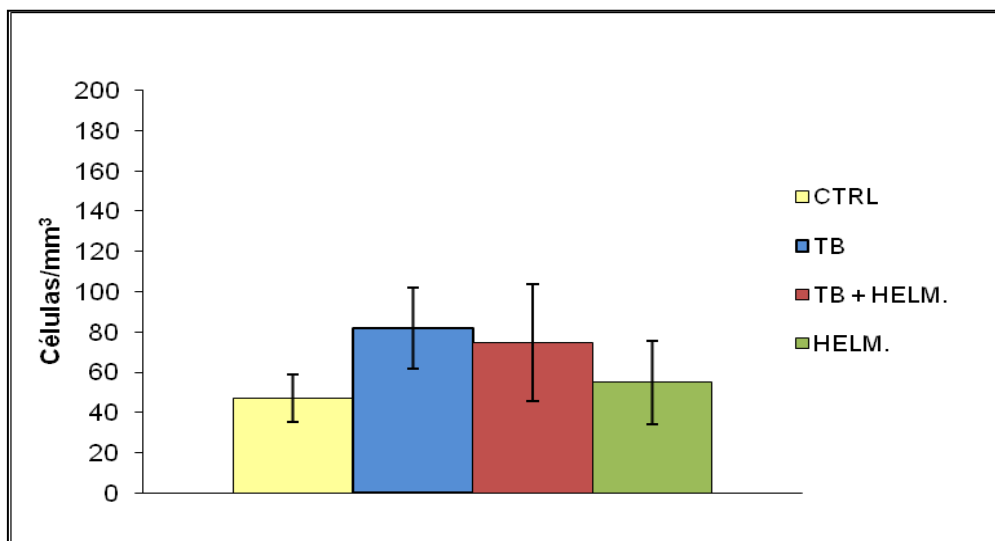


Figura 15 – Análise de macrófagos marcados com CD14<sup>+</sup> CD40<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no gate R1 (monócitos). Monócitos/macrófagos expressando CD40 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=10), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=03), helmintíases intestinais – HELM (n=05) e controle – CTRL (n=13). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Valor de  $p$  significativo: (\*)  $p < 0,05$ .

A expressão dos marcadores  $CD14^+CD16^+HLA-DR^+$  esteve elevada em todos os grupos apesar das diferenças não serem significativas.

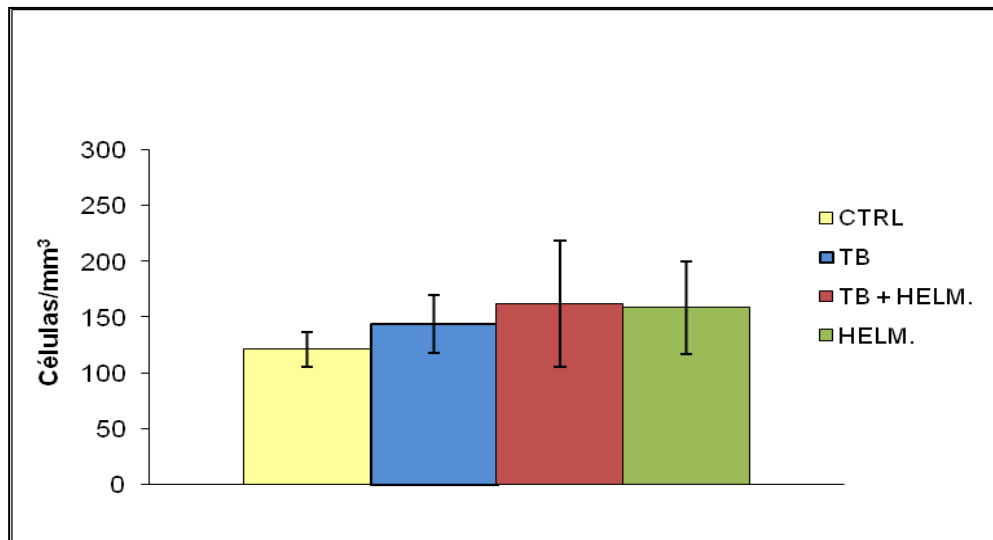


Figura 16 – Análise de macrófagos marcados com  $CD14^+ CD16^+ HLA-DR^+$  no gate R1 (monócitos). Monócitos/macrófagos expressando CD16 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=10), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=03), helmintíases intestinais – HELM (n=05) e controle – CTRL (n=13). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Valor de p: \* p<0,05.

Na análise dos receptores TLRs, também não houve diferença significativa entre os grupos, no entanto, observamos um aumento dos TLRs nos grupos com TB e TB+HELM (Figuras 17-19). Não obstante, observamos uma tendência à redução na expressão de moléculas de reconhecimento (TLR2 e TLR4) no grupo TB+HELM, em relação ao grupo TB, o que poderia culminar em anergia nas células desse grupo (Figuras 17 e 18).

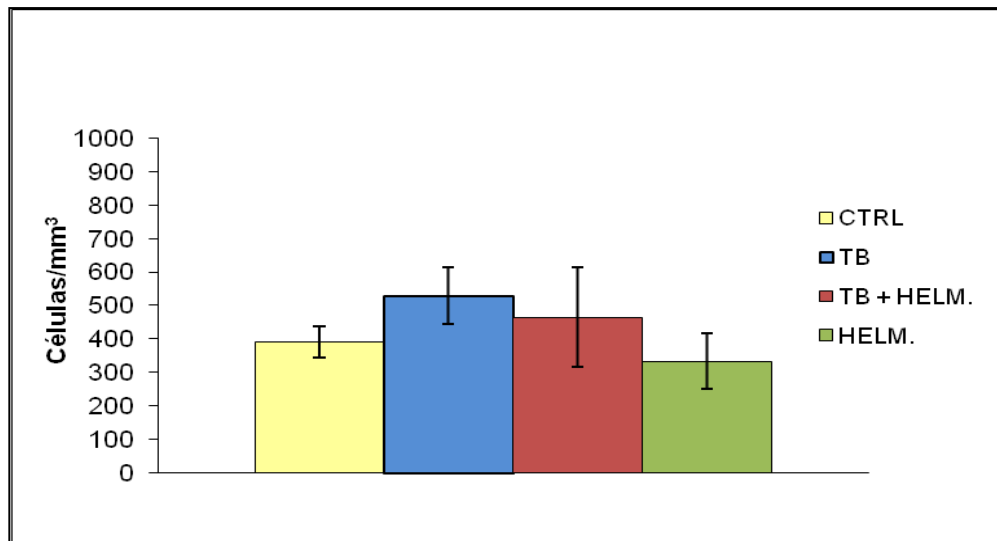


Figura 17 – Análise de macrófagos marcados com CD14<sup>+</sup> TLR2<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no gate R1 (monócitos). Gráfico representativo das médias (células/mm<sup>3</sup>) *versus* grupos Monócitos/macrófagos expressando TLR-2 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=10), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=03), helmintíases intestinais – HELM (n=05) e controle – CTRL (n=13). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Valores de p: (\*) p<0,05, (\*\*) p<0,01, estatisticamente significativos.

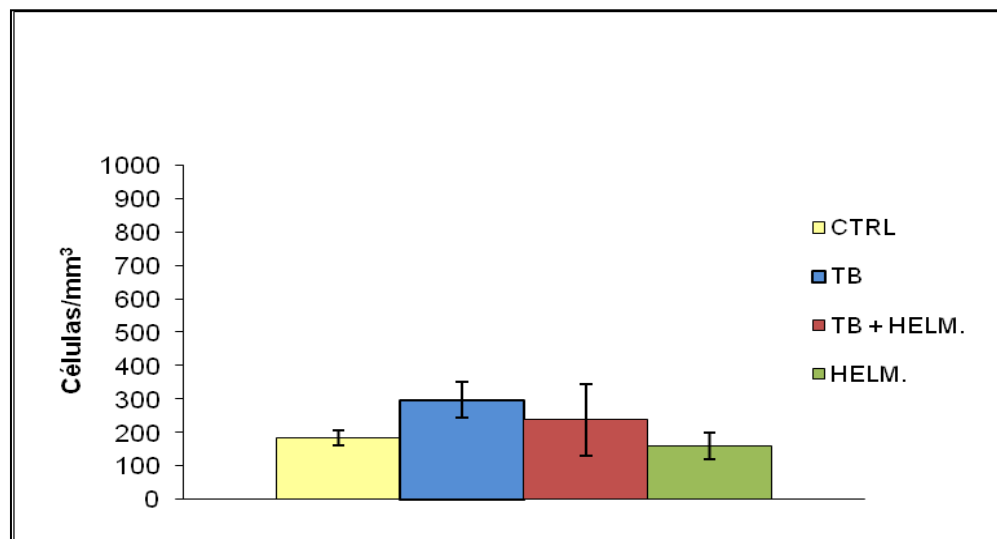


Figura 18 – Análise de macrófagos marcados com CD14<sup>+</sup> TLR4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no gate R1 (monócitos). Gráfico representativo das médias (células/mm<sup>3</sup>) *versus* grupos Monócitos/macrófagos expressando TLR-4 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=10), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=03), helmintíases intestinais – HELM (n=05) e controle – CTRL (n=13). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Valores de p: (\*) p<0,05, (\*\*) p<0,01, estatisticamente significativos.

Em se tratando de TLR9 (Figura 19), foi constatada uma tendência ao aumento deste receptor no grupo TB+HELM em relação aos demais grupos.

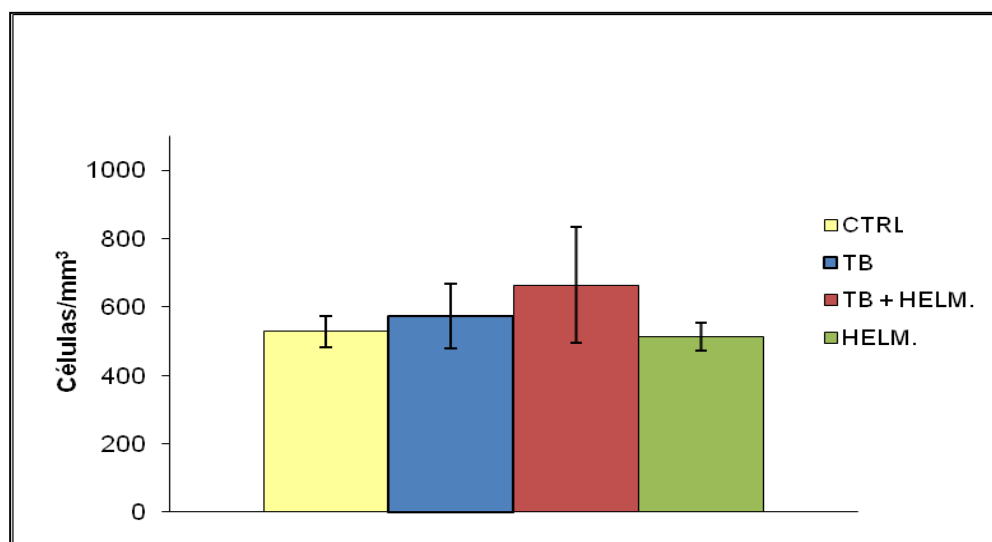


Figura 19 – Análise de macrófagos marcados com CD14<sup>+</sup> TLR9<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> no gate R1 (monócitos). Monócitos/macrófagos expressando TLR-9 no sangue periférico de indivíduos com tuberculose pulmonar – TB (n=10), tuberculose e helmintos intestinais – TB+HELM (n=03), helmintíases intestinais – HELM (n=05) e controle – CTRL (n=13). As barras indicam as médias e os respectivos erros-padrão de cada grupo. Os valores de *p* não foram estatisticamente significantes.

## 5.2. Análise de citocinas e quimiocinas no sangue total

Amostras de sangue periférico de vinte e cinco indivíduos foram utilizadas para a realização de culturas de sangue total. A escolha pela cultura de sangue total foi baseada no fato de acharmos que este procedimento melhor mimetiza a resposta *in vivo*. Os grupos foram compostos por: nove pacientes no grupo TB, três no grupo HELM, três no grupo TB+HELM e, dez indivíduos no grupo PPD positivo (controle). No experimento de dosagem de citocinas e quimiocinas, o grupo PPD negativo não está presente, por ter sido incluído após o término das culturas. Finalizadas as culturas, não havia antígenos para realizar tal procedimento com estes novos participantes.

Neste procedimento, foram avaliadas as citocinas e quimiocinas que se seguem: IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL-10/IP-10, CCL-2/MCP-1, CXCL-9/MIG, CCL-5/RANTES e CXCL-8/IL-8 (tabelas 8 e 9, no anexo 5). Não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos nos dias zero (*baseline*) e três dias (3d) de cultura, tanto nos poços estimulados (Ag MTB) quanto nos sem estímulo ( $\emptyset$ ) antigênico. Portanto, os resultados apresentados baseiam-se nas culturas com 24 horas de estimulação (Figuras 20-29). Os gráficos apresentam as médias e erros-padrão de cada citocina e quimiocina, em seus devidos grupos.

A IL-12, citocina do tipo Th-1, obtida na ausência de estímulo, foi produzida em baixas concentrações, quase indetectáveis, mesmo quando estimulada por antígenos solúveis de MTB (Figura 20). Quando estimulada, essa citocina mostrou uma tendência à menor concentração entre os indivíduos dos grupos infectados por vermes (TB+HELM e HELM) quando comparados ao grupo TB.

A citocina IL-10, no entanto, apresentou um aumento mais expressivo em sua concentração nos sobrenadantes de cultura, visto que, foram encontradas diferenças estatisticamente, significativas entre os grupos PPD+ e TB ( $p=0,02$ ) e, PPD+ e TB+HELM ( $p=0,02$ ) quando na presença de estímulo antigênico (Figura 21). A existência de correlação negativa ( $r=-0,47$ ) entre IL-10 e IL-12 no grupo TB+HELM, não foi observada nos demais grupos. Esta correlação sugere que o aumento de IL-10 induza a redução de IL-12, possivelmente, porque IL-10 é uma citocina inibitória de células produtoras de IL-12.

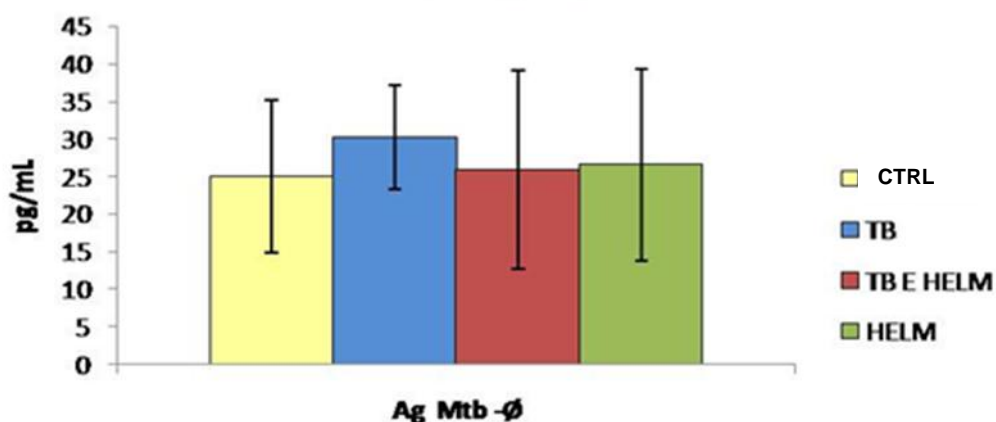


Figura 20 - Representação da produção de IL-12p70, em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da diferença entre estímulo com antígenos de MTB e não estímulo ( $\emptyset$ ). Valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.



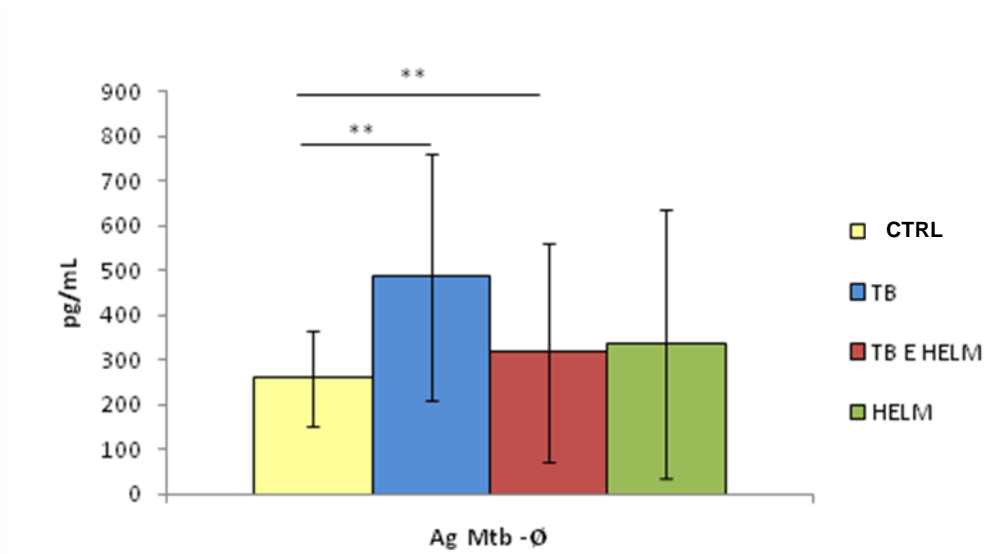


Figura 21 - Representação da produção de IL-10, em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da diferença entre estímulo com antígenos de MTB e não estímulo (Ø). Valor significativo de p: \* p<0,05.

A produção de TNF- $\alpha$  (Figura 22) esteve aumentada nos grupos TB (**p=0,03**) e TB+HELM (**p=0,01**) quando comparados ao grupo PPD+. O grupo TB também apresentou maior produção de TNF- $\alpha$  que o grupo TB+HELM (**p=0,02**).

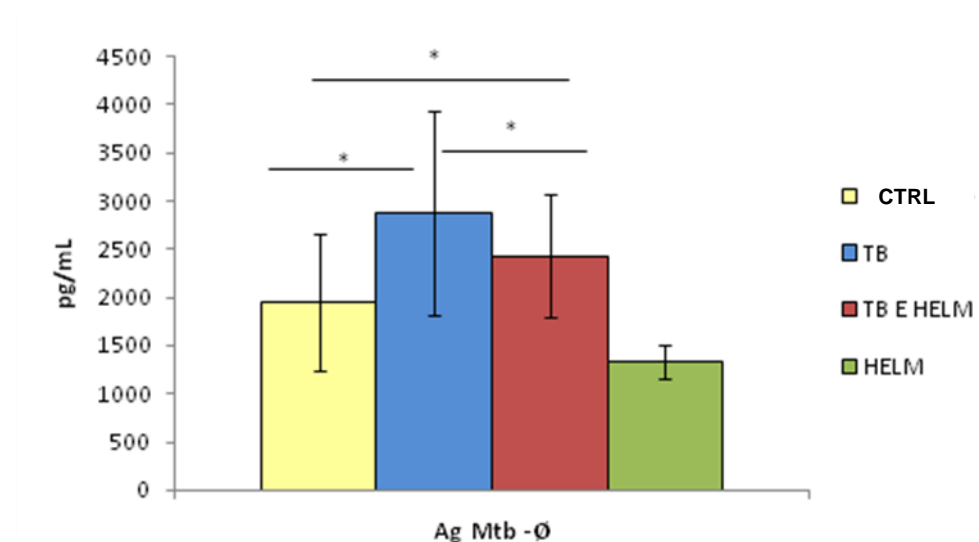


Figura 22 - Representação da produção de TNF- $\alpha$ , em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da diferença entre estímulo com antígenos de MTB e não estímulo (Ø). Valor significativo de p: \* p<0,05.

Quando as culturas foram estimuladas com antígenos de *MTB*, as citocinas IL-6 e IL-1 $\beta$ , tiveram aumento de concentração no sobrenadante, porém, este aumento só foi estatisticamente significativo para a citocina IL-6 (Figura 23). A concentração de IL-6, quando comparados ao controle, foi significativamente maior nos grupos TB ( $p=0,04$ ) e TB+HELM ( $p=0,02$ ). Dentre os grupos analisados, o grupo HELM foi o que apresentou maior concentração de IL-6, a qual proporcionou significância estatística em relação ao grupo TB ( $p= 0,005$ ). Como observado na figura 24, a citocina IL-1 $\beta$  tende a um comportamento semelhante à citocina TNF- $\alpha$ .

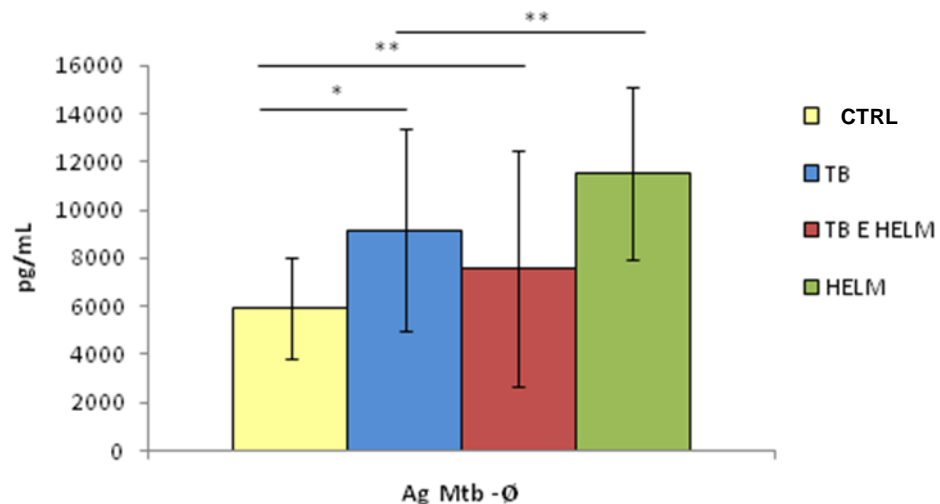


Figura 23 - Representação da produção de IL-6, em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da diferença entre estímulo com antígenos de *MTB* e não estímulo ( $\emptyset$ ). Valor significativo de p: \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$ .

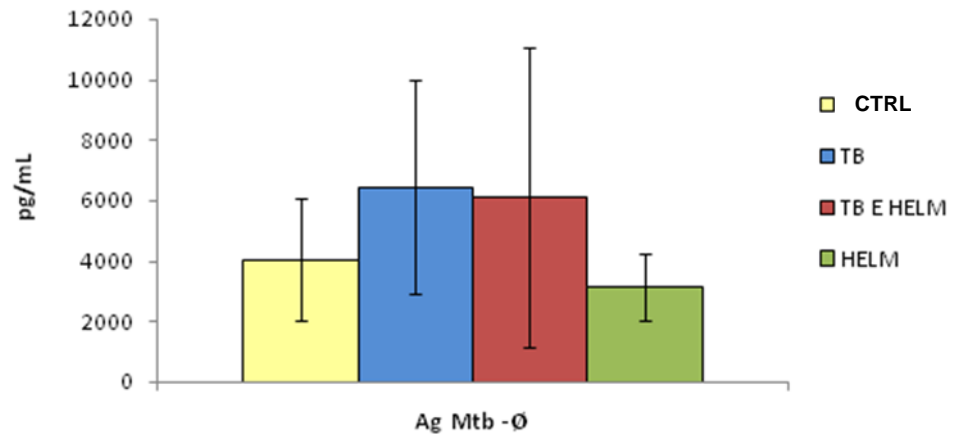


Figura 24 - Representação da produção de IL-1 $\beta$ , em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da diferença entre estímulo com antígenos de MTB e não estímulo ( $\emptyset$ ). Valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes.

Quanto às quimiocinas, os resultados obtidos para CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10 e CCL-5 não foram estatisticamente significantes, em relação a qualquer grupo analisado, porém, algumas tendências foram observadas e, portanto, serão comentadas neste texto.

CXCL-8/IL-8 apresentou maior produção tanto no grupo TB, quanto no grupo HELM, ao passo que, no grupo TB+HELM, observamos redução em sua concentração quando comparados ao controle PPD+ (Figura 25).

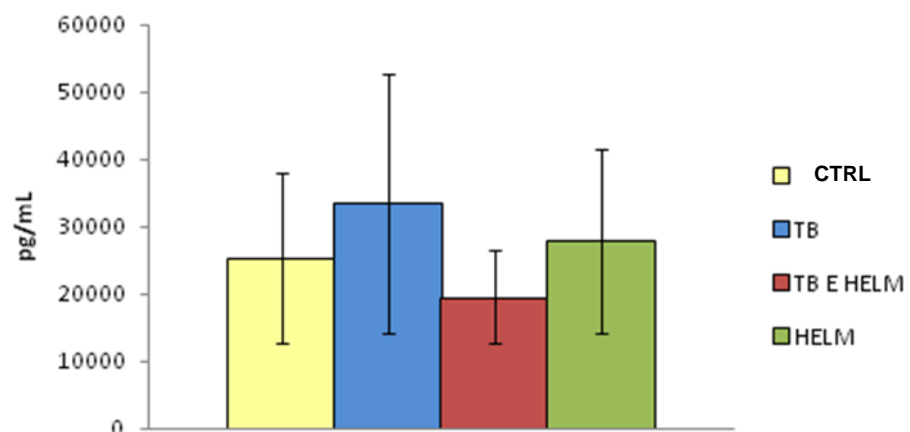


Figura 25 - Representação da produção da quimiocina CXCL-8/IL-8, em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da razão entre estímulo com antígenos de MTB e não estímulo ( $\emptyset$ ). Valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes. Quimiocina dosada pelo kit CBA inflammation. Quimiocina dosada através do kit CBA inflammation.

A análise da quimiocina CXCL-10/IP-10 (Figura 26) revelou que, após o estímulo com antígenos de *MTB*, os indivíduos portadores de infecções helmínticas e/ou TB (TB, TB+HELM e HELM) apresentaram aumento na produção desta molécula em relação ao grupo PPD+.

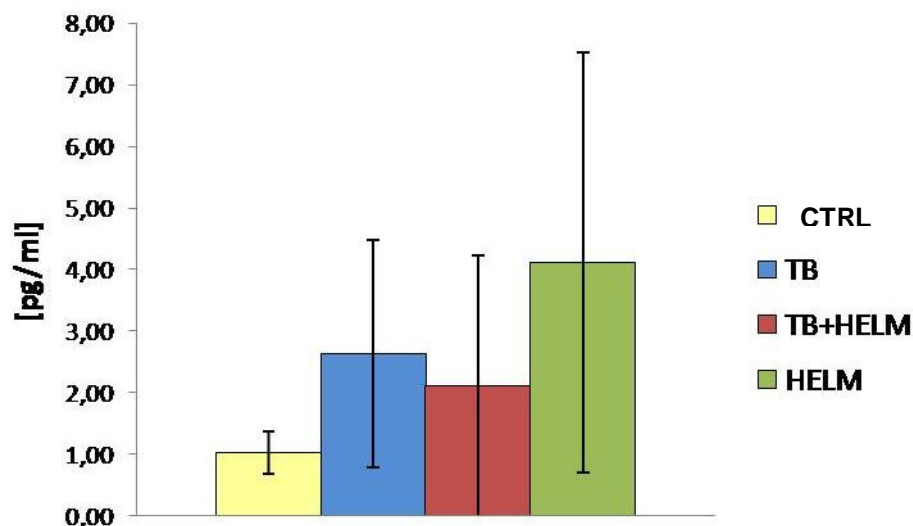


Figura 26 - Representação da produção da quimiocina CXCL-10/IP-10, em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da razão entre estímulo com antígenos de *MTB* e não estímulo ( $\emptyset$ ). Valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes. Quimiocina dosada através do kit CBA chemokine.

Curiosamente, após estimulação antigênica, a quimiocina CXCL-9/MIG (Figura 27) não foi detectada nos sobrenadantes de cultura dos grupos infectados por helmintos (TB+HELM e HELM) e no grupo controle, sendo apenas detectada em baixa concentração no grupo TB. Mesmo não sendo significativa, a pequena produção de CXCL-9/MIG no grupo TB, mostra a influência da citocina IFN- $\gamma$  neste grupo, o que não é possível de ser observada nos demais grupos. A mesma influência pode ser sugerida para CXCL-10 nos grupos infectados por *MTB* (principalmente o grupo TB), visto que ambas quimiocinas são induzidas por IFN- $\gamma$  (ROLLINS, 1997; SAUTY et al., 1999).

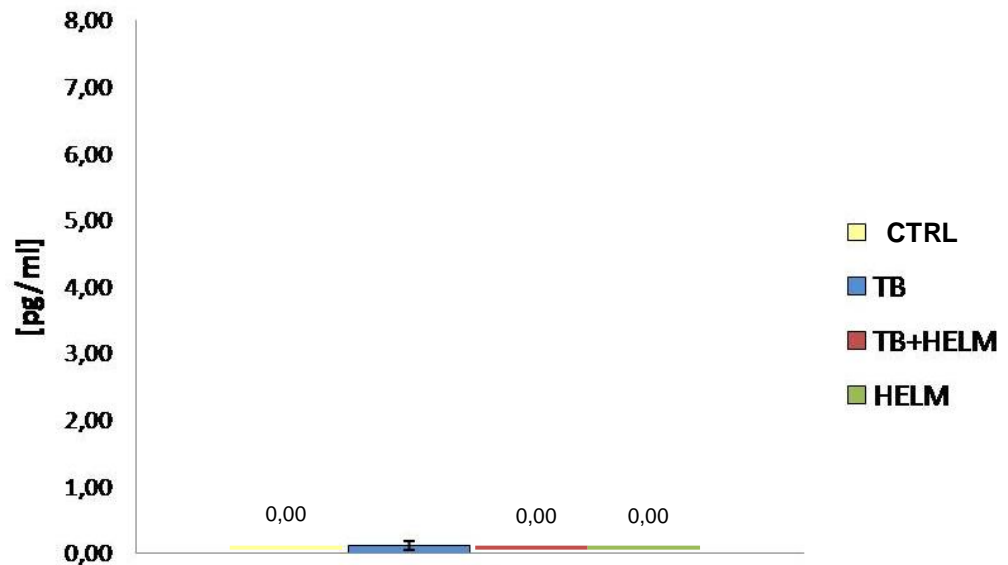


Figura 27- Representação da produção da quimiocina CXCL-9/MIG, em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da razão entre estímulo com antígenos de *MTB* e não estímulo ( $\emptyset$ ). Valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes. Quimiocina dosada através do kit CBA chemokine.

A produção da quimiocina CCL5/RANTES, após estimulação com antígenos de *MTB*, foi reduzida ou inexistiu nos grupos TB ( $p=0,46$ ) e TB+HELM ( $p=0,65$ ), respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Figura 28). O grupo HELM ( $p=0,24$ , em relação ao grupo TB) apresentou uma expressão praticamente semelhante à observada para o grupo PPD+.

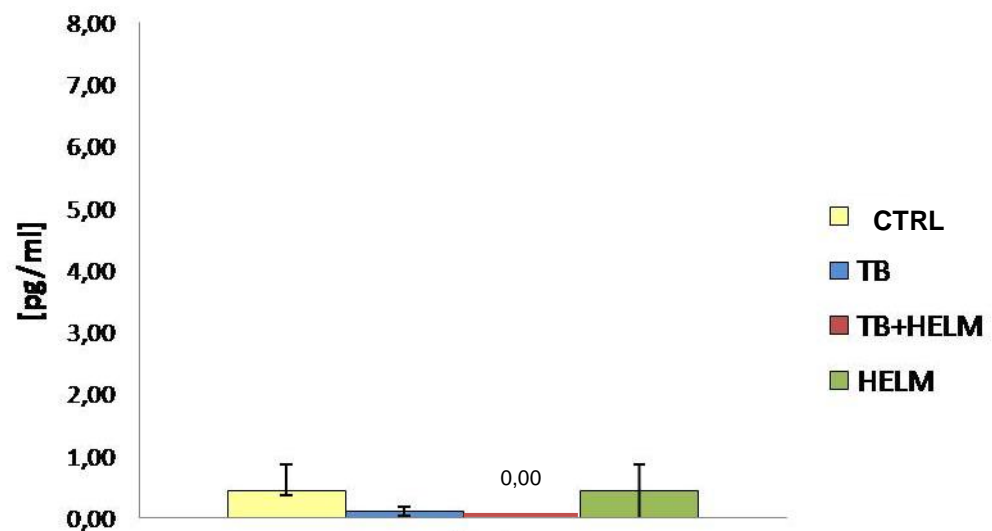


Figura 28 - Representação da produção da quimiocina CCL-5/RANTES, em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da razão entre estímulo com antígenos de *MTB* e não estímulo ( $\emptyset$ ). Valores de  $p$  não foram estatisticamente significantes. Quimiocina dosada através do kit CBA chemokine.

A quimiocina CCL2/MCP-1 (Figura 29), apresentou redução em sua produção no grupo TB ( $p=0,01$ ), quando comparada ao grupo controle. No que se refere ao grupo TB+HELM, não houve alteração relevante em relação ao grupo PPD+ ou aos demais, podendo apenas observar uma tendência a redução, que foi menos expressiva que a observada no grupo TB. No entanto, a produção de CCL2/MCP-1 pelo grupo HELM ( $p=0,02$ ) revelou-se aumentada quando relacionada ao grupo TB.

Cabe salientar, que a maioria dos resultados apresentados não foi estatisticamente significativa, contudo, mostram tendências em virtude da estimulação com antígenos de *MTB*. Esta ausência de resultados significativos pode ser explicada pelo pequeno número de indivíduos que compõe cada grupo.

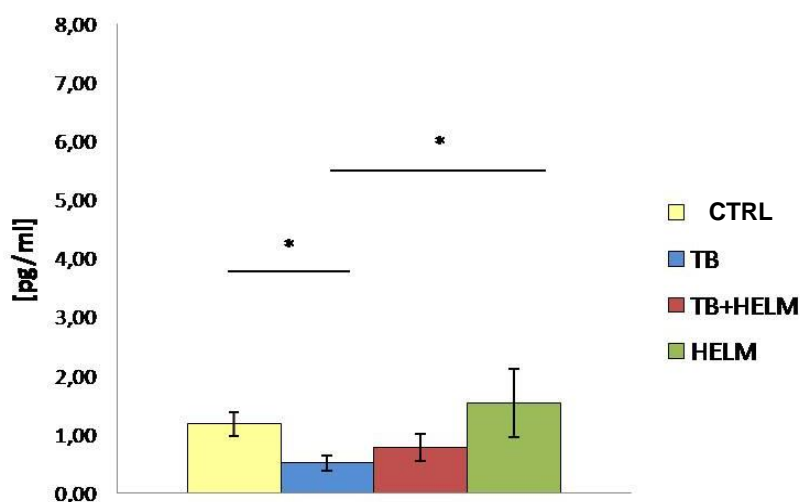


Figura 29- Representação da produção da quimiocina CCL-2/MCP-1, em pg/mL, nos indivíduos do grupo controle – CTRL (n= 10), grupo TB (n= 9), grupo TB+HELM (n= 3) e grupo HELM (n= 3). As barras representam as médias e erros-padrão da razão entre estímulo com antígenos de *MTB* e não estímulo ( $\emptyset$ ). Quimiocina dosada através do kit CBA chemokine. Valores de  $p < 0,05$  (\*) foram estatisticamente significantes.

**Discussão**

---

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo o pequeno número de indivíduos que compõem cada grupo, especialmente, o grupo TB+HELM (apenas 3 pacientes), tornam reduzida a força estatística de nossos dados. A dificuldade de conseguir voluntários para participar do estudo que apresentassem helmintos intestinais foi muito grande. Muitos voluntários não aceitavam participar quando eram informados da necessidade de coleta de amostras de fezes e sangue. No entanto, pretendemos aumentar nossa amostra para confirmar ou não nossos resultados, vislumbrando a publicação dos mesmos.

Optamos por utilizar cultura de sangue total ao invés da cultura com PBMC, não só pela facilidade da técnica, mas por acreditarmos que esta metodologia melhor representaria a resposta periférica, uma vez que emprega todas as células sanguíneas, bem como os componentes do plasma.

Nosso modelo de estudo investiga o impacto das helmintíases intestinais em algumas células da resposta inata à tuberculose, utilizando sangue periférico para este fim. No entanto, esse não seria o modelo mais apropriado para obter tal resultado na tuberculose pulmonar, já que as células do sistema imunitário nos pulmões podem apresentar modulação diferente das células periféricas.

A análise dos hemogramas dos diferentes grupos (tabela 2) não mostram, em relação ao número de leucócitos totais, monócitos e eosinófilos, diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Já a comparação do número de linfócitos, mostra diferença significativa entre os grupos TB e controle ( $p= 0,003$ ). Cabe ressaltar que alteração no hemograma de pacientes com TB é pouco freqüente, podendo ocorrer discreta anemia e leucocitose, com linfocitose (LOPES & GROTTTO, 2009).

Sabe-se que as DCs, monócitos e macrófagos são identificados no grupo monocítico no hemograma. No entanto, o número de DCs, em todos os grupos, foi maior na leitura no *gate* (região) de linfócitos (tabela 3), especialmente, para as DCs plasmacitóides. Esses dados demonstram que grande parte das células dendríticas estão contidas no grupo de células contadas como linfócitos.



Entre todos os grupos avaliados, células dendríticas marcadas com CD11c e CD123 variaram de 0 a 82 células (tabelas 5 e 6 no anexo 5). Resultados das análises imunofenotípicas, demonstram que DCs mielóides ( $\text{Lin}^{-1}\text{CD}11\text{c}^{+}\text{HLA-DR}^{+}$ ) apresentaram redução numérica, mesmo que não significativa nos grupos TB e HELM, ao passo que as células DCs plasmacitóides ( $\text{Lin}^{-1}\text{CD}123^{+}\text{HLA-DR}^{+}$ ) apresentaram maior concentração nos grupos TB+HELM e HELM. O número total de células dendríticas, embora não estatisticamente significativo, foi maior no grupo TB+HELM (tabela 3), o que ocorreu para as subpopulações (mDCs e pDCs) analisadas separadamente.

Nossos resultados, embora não apresentem significância estatística desejada, tendem a concordar com os dados da literatura. Estudos mostram que pacientes com TB ativa exibem uma diminuição específica e significativa do número absoluto de DCs circulantes quando comparados a doadores saudáveis (LICHTNER et al., 2005). A redução desse número para subpopulação plasmacitóide nas formas pulmonar e extrapulmonar da TB tem sido observada, ao passo que, para DCs mielóides uma redução acentuada ocorre na doença extrapulmonar (LICHTNER et al., 2005). Na TB ativa estas células são provavelmente mais susceptíveis à apoptose e à destruição periférica (LICHTNER et al., 2005).

Apesar da pequena amostra (apenas dois pacientes), o maior número de DCs e a maior expressão de DC-SIGN, CD40 e TLR-9 podem resultar num perfil diferente do grupo TB+HELM. O que nos leva a acreditar na possível participação das células dendríticas mielóides, expressando DC-SIGN, e de células dendríticas plasmacitóides, expressando  $\text{CD}123^{+}$  e  $\text{CD}40^{+}$ , no favorecimento de uma resposta Th-2 ou na restrição de uma resposta Th-1.

A participação de DCs nesse favorecimento ou restrição da diferenciação dos linfócitos Th, pode ser explicada, em primeiro lugar, pela existência de DCs DC-SIGN<sup>+</sup> (mDCs), que se ligam ao ManLam (mannosylated LAM) micobacteriano através do DC-SIGN, bloqueando a maturação de DCs induzida por LPS e provocando aumento da liberação da citocina IL-10. Então, mDCs, através de DC-SIGN, podem favorecer a evasão imune micobacteriana, como também, limitar a lesão durante a tuberculose crônica (GEIJTENBEEK et al., 2003).

Em segundo lugar, DCs que expressam CD40 e CD123 (pDCs), induzem células T reguladoras (Tregs) produtoras de IL-10, citocina inibidora da resposta Th-1. Células dendríticas também contribuem para o controle funcional de células Tregs, ao dar suporte à expansão de Tregs funcionais de maneira antígeno-específica ou pelo fato de DCs imaturas, seletivamente, induzirem essas células (YAMAZAKI et al., 2003; MAHNKE et al., 2003). As células Tregs atuam diretamente nas células Th-1 ativadas, inibindo sua proliferação antígeno-específica, assim como na produção de citocinas dependente de contato celular (MAHNKE et al., 2003).

Na análise da expressão de marcadores de coestimulação e de reconhecimento em DCs, observamos grande quantidade de células com baixa a moderada expressão de moléculas de reconhecimento e coestimulatórias, indicando que as mesmas podem não apresentar perfil de células ativadas/maduras (tabelas 5 e 6 no anexo 5). Estas células seriam capazes de apresentar modulação cruzada, visto que em sua maioria são células imaturas. Esses resultados foram observados na maioria das DCs presentes nos grupos infectados.

No entanto, um fenótipo imaturo ou de maturação intermediária, pode ser também reflexo do tipo de estímulo micobacteriano. Produtos micobacterianos, como o ManLAM, podem induzir tais fenótipos que comprometem a resposta protetora contra o *MTB*, pois DCs perdem a capacidade fagocítica, tornam-se sensíveis a lise por células NK, reduzem a expressão de receptores de quimiocinas para migração aos linfonodos, e conseqüentemente, prejudicam a resposta T *MTB*-específica (DULPHY et al., 2007).

Apesar de não estatisticamente significantes, foi possível observar pequena maturação ou diferenciação em alguns representantes desse grupo celular, conforme observação da expressão de CD86 e CD40 no grupo TB+HELM (Figuras 7 e 8). Além do mais, receptores indutores da resposta Th-1 (TLR-2, TLR-4; Figuras 10 e 11) estão reduzidos em células dendríticas do grupo TB+HELM, o que resulta em DCs fracas na indução de Th-1, capazes de induzir resposta Th-2 ou mesmo restringir a resposta Th-1.

DCs efectoras (expressando quantidade maior de moléculas de coestimulação) foram pouco observadas no estudo (apenas grupo TB+HELM). Estas células são

resistentes à mudança na diferenciação por estímulos variados e quando estimuladas por outros antígenos, estas não estão sujeitas a subsequente modulação cruzada com outro antígeno que tenha capacidade de estimulá-las (DE JONG, et al., 2002). Nossa observação leva-nos a hipotetizar, que células dendríticas que se tornam efectoras na presença de helmintos não podem sofrer modulação cruzada num contato com outros tipos de antígenos, inclusive antígenos do *MTB*, o que induziria uma resposta do tipo Th-2 no grupo TB+HELM. A presença de DCs efectoras vai de encontro aos achados de outros pesquisadores no qual, na infecção por *MTB*, DCs do sangue periférico expressam altos níveis de moléculas coestimulatórias e de adesão (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; GIACOMINI et al., 2001).

A análise quantitativa de monócitos/macrófagos foi obtida em citômetro de fluxo utilizando apenas o *gate* para monócitos. Na citometria, embora não significativa, o número de monócitos/macrófagos esteve aumentado nos grupos só com TB, e principalmente, no grupo TB+HELM (tabela 3).

A expressão de TLR-2, TLR-4 e DC-SIGN, pode definir dois tipos de macrófagos: M1 (TLR-2 e TLR-4) indutor da resposta Th-1 e M2 (DC-SIGN), que induz a resposta Th-2 (VEGA & CORBÍ, 2006). Mesmo não sendo estatisticamente significativo, no grupo TB, o número aumentado de macrófagos e a maior expressão de TLR-2 e TLR-4 indicam predomínio de M1. No grupo TB+HELM, a maior expressão de DC-SIGN (CD209) em macrófagos, indica que eles tendem para M2. Tais macrófagos estariam relacionados com a resposta Th-2 ou com o desvio de resposta Th-1 no grupo TB+HELM.

DC-SIGN é um receptor presente em DCs e macrófagos, capaz de suprimir a resposta de DCs, levando a ativação de células T reguladoras ou Th-2 (GEIJTENBEEK et al., 2003; BERGMAN et al., 2004), como também, a indução da produção de IL-10 (GEIJTENBEEK et al., 2003). Este receptor de reconhecimento expresso em DCs (tipo 2) e macrófagos M2 (TAILLEUX et al., 2003) pode indicar um desvio de resposta Th-2 (VEGA & CORBÍ, 2006). O menor número de macrófagos M1 no grupo TB+HELM pode ter ocorrido devido à presença de DC2s, diferenciadas e ativadas por antígenos de vermes presentes nos indivíduos desse grupo. Estas

células promovem à polarização da resposta para o lado Th-2, e conseqüentemente, a redução de macrófagos do tipo M1 nestes pacientes, diminuindo a possibilidade de estabelecimento de uma resposta Th-1 (WHELAN et al., 2000).

Para macrófagos, a quantificação e características fenotípicas não foram representativas. Embora a expressão não tenha sido estatisticamente significativa para os marcadores CD40, CD86, CD209, CD16, TLR-2, TLR-4 e TLR-9, houve uma tendência de aumento no grupo TB+HELM, o que pode indicar maturação dessas células neste grupo.

Nossos resultados mostram que os níveis de IL-10 em cultura de sangue total, estimulada com antígenos de *MTB* nos grupos TB+HELM ( $p=0,02$ ) e TB ( $p=0,02$ ) apresentaram-se elevados quando comparados ao grupo controle. Já a citocina IL-12 não apresentou variação importante entre os grupos. Os níveis mais elevados de IL-10 no grupo TB+HELM podem estar relacionados a baixa produção de IL-12. Isso se sustenta pelo fato do coeficiente de correlação entre IL-10 e IL-12 nesse grupo ter sido negativo.

Em nossos experimentos, o aumento na produção de IL-10 foi provavelmente específico para os antígenos solúveis totais do *MTB*, visto que macrófagos em cultura não estimulados ou estimulados com PPD produzem IL-10 em baixas concentrações (BONECINI-ALMEIDA et al., 1998). Além do mais, na infecção experimental de células THP1, por H37Ra (fonte do antígeno utilizado) e H37Rv, há produção de níveis elevados de IL-10 no sobrenadante de cultura (SHARMA et al., 2003). Adicionalmente, níveis aumentados de IL-10, bem como TNF- $\alpha$ , foram detectados em pacientes com TB pulmonar (revisado por SHARMA et al., 2003).

A baixa produção de IL-12 após estímulo com antígenos solúveis de *MTB* em nosso estudo, vai ao encontro dos níveis de IL-12 produzidos em cultura de células THP1 infectada com *MTB* (FLESCH et al., 1995). Possíveis explicações para a pequena produção de IL-12 após estímulo com *MTB* ou seus produtos, são: a) o *MTB* sozinho, pode não induzir quantidade suficiente de IL-12, como registrado em células THP1; b) a possível presença de fatores antagônicos a IL-12, tais como IL-10 ou IL-4, os quais contrapõem a ação de IL-12; c) ou ainda, que a produção de IL-12

seja dose dependente, portanto, necessitaria de uma maior concentração de antígenos (FLESCH et al., 1995; SHARMA et al., 2003).

Noutro sentido, alguns pesquisadores, relataram níveis elevados de IL-10 e IL-12p40 em sobrenadantes tanto de cultura de macrófagos infectados com *MTB* da cepa H37Ra, quanto de coculturas de macrófagos e linfócitos do sangue periférico estimulados com lisado de *MTB*/IFN- $\gamma$ . Já IL-12p70 foi obtida em nível extremamente baixo quando testada nas mesmas condições (BONECINI-ALMEIDA et al., 1998). Nossos dados estão de acordo com o observado por Bonecini-Almeida e colaboradores (1998), que acreditam que o homodímero IL-12p40 atue como antagonista de IL-12p70, por bloquear o receptor IL-12R. Wong e colaboradores (2007) sugerem os níveis de IL-10 e IL-12 observados in vitro estão ligados ao tipo de cepa que estimula a cultura e, nos nossos experimentos, o antígeno foi originado de uma cepa avirulenta.

Observamos maior produção de TNF- $\alpha$  nos grupos TB e TB+HELM ( $p < 0,05$ ) nas culturas estimuladas com antígenos da cepa avirulenta H37Ra. É sabido TNF- $\alpha$  apresenta papel importante na infecção pelo *MTB*. O efeito bacteriostático mediado por TNF- $\alpha$ , em macrófagos murinos infectados com H37Ra, está associado ao aumento de expressão de citocinas tipo Th-1 e quimiocinas (FREEMAN et al., 2006). É lícito admitir que a menor produção de TNF- $\alpha$  no grupo TB+HELM, pode advir da presença de helmintos, resultando em menor efeito bacteriostático nesse grupo.

Quanto à IL-1 $\beta$ , observamos um aumento nos grupos TB e TB+HELM, mesmo que não significativo. Esta citocina tem sua produção estimulada por componentes da parede celular e proteínas do *MTB* (SHARMA et al., 2003), cujo aumento está associado a maior produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ , que estão significativamente aumentados nos grupos TB e TB+HELM (Figuras 22-23). Por outro lado, IL-1 $\beta$  pode estar relacionada com a inibição da maturação de células dendríticas (MAKINO et al., 2006), observada no grupo TB+HELM.

Houve aumento significativo de IL-6 nos grupos TB, TB+HELM e HELM. No entanto, o grupo TB+HELM foi o que apresentou menor aumento em relação ao grupo controle. Uma possível explicação para o menor aumento de IL-6 nesse grupo é o

fato da resposta Th-2 originada pela presença do helminto poder modular a resposta Th-1 induzida pelo *MTB*. Em um modelo de infecção com *S. mansoni* em camundongos CBA/J, observa-se grande produção de IL-17, IFN- $\gamma$  e IL-6, que é fortemente reduzida em animais previamente infectados com *Heligmosomoides polygyrus*, sendo uma forte evidência de resposta Th-2 (BAZZONE et al., 2008). Esses autores admitem que no modelo estudado, o aumento de células Tregs (FoxP3<sup>+</sup>) e macrófagos M2 observados, podem ser responsáveis pela redução de citocinas Th-1, e também, IL-6.

Embora não significativa, a produção da quimiocina CXCL-8 mostrou-se aumentada no grupo TB e no grupo HELM, e reduzida no grupo TB+HELM. A presença de helmintos intestinais com resposta Th-2 no grupo TB+HELM, pode justificar a menor produção de CXCL-8 nesse grupo, já que citocinas Th-2 podem modular a produção de quimiocinas CXC, como demonstrado em células epiteliais humanas infectadas com BCG. Nesse experimento foi demonstrado que a expressão do gene e a secreção de CXCL-8 foram reduzidas na presença de IL-4 (Méndez-Samperio, Miranda & Vázquez, 2006).

Nossos resultados demonstram que CCL-2 após estímulo micobacteriano, apresentou concentração significativamente reduzida nos grupos TB ( $p=0,01$ ) e TB+HELM, quando comparados com o grupo controle. Houve maior produção de CCL-2, com diferença significativa em relação ao grupo TB ( $p=0,02$ ). Como mencionado, houve redução de CCL-2 no grupo TB+HELM, no entanto, os níveis de CCL-2 nesse grupo foram maiores (embora não significativos) do que no grupo TB. Isso pode indicar que a resposta Th-2 induzida por helmintos esteja atuando, ainda que em menor intensidade, sobre a resposta Th-1 induzida pelo *MTB*. Em ambiente com participação Th-2, pode haver maior facilidade de atuação de macrófagos M2, menos capazes de matar/conter o *MTB* (MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008).

Os resultados da avaliação de CCL-5 são de difícil interpretação. No grupo TB a redução observada não é significativa. Entretanto, trabalhos nos quais CCL-5 foi dosada no lavado broncoalveolar ou em sangue periférico de pacientes com TB, relatam aumento dessa quimiocina (KURASHIMA et al., 1997; POKKALI & DAS, 2009). Quanto ao grupo TB+HELM (apenas três pacientes), a quimiocina CCL-5 não

foi detectada. Tornando difícil pelo pequeno número de indivíduos, e também, pelo resultado da dosagem, especular se a helmintíase tem ou não impacto na produção de CCL-5.

De forma semelhante ao observado para CCL-5, a avaliação de CXCL-9 e de CXCL-10 tem difícil interpretação, uma vez que não houve diferença entre os grupos, sendo que CXCL-9 não foi detectada nos grupos estudados. Não há explicação plausível para nossos resultados, já que na literatura relata-se aumento dessas quimiocinas em pacientes com TB (SAUTY et al., 1999; WALRATH et al., 2005).

Nossos resultados para CXCL-10/IP-10 mostram níveis aumentados em todos os grupos, especialmente, o grupo HELM. Isso impossibilita qualquer especulação a cerca da influência dessa quimiocina na associação TB e helmintíases intestinais.

Em resumo, as observações aqui relatadas, ainda que em número pequeno de casos, podem sugerir que no paciente com TB+HELM haja uma redução da capacidade de células dendríticas e de macrófagos em apresentarem antígenos que promovam uma resposta Th-1. De fato as células dendríticas no grupo TB+HELM tem uma tendência ao fenótipo de células imaturas, enquanto macrófagos apresentam fenótipo mais próximo de macrófagos M2. Pode-se inferir também, que a capacidade microbicida de macrófagos está reduzida, já que há uma tendência ao predomínio de macrófagos M2. Quanto à produção de citocinas e quimiocinas, como já discutido, é difícil interpretar/comparar uma vez que o grupo TB+HELM é bastante reduzido.

Conclusão



## 7. CONCLUSÃO

A análise de células dendríticas e macrófagos circulantes, e a avaliação de citocinas (IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) e quimiocinas (CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10, CCL-2 e CCL-5) após estímulo com antígenos solúveis de *MTB* em pacientes com TB+HELM, nos permite concluir que:

- a) A maioria das células dendríticas apresentava fenótipo de células imaturas. Entre as células com fenótipo de células maduras, existiam células mDC DC-SIGN<sup>+</sup> e pDC CD123<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>, fenótipos compatíveis com DCs maduras indutoras de resposta Th-2.
- b) A maior parte dos macrófagos avaliados estava ativada e expressava DC-SIGN, fenótipo compatível com macrófagos M2.
- c) A produção de citocinas mostrou-se significativamente maior para IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-6. Para IL-1 $\beta$  houve uma tendência ao aumento e os níveis de IL-12 permaneceram semelhantes ao grupo controle.
- d) Redução significativa da produção de CCL-2, tendência à menor produção de CXCL-8 e aumento não significativo de CXCL-10 foram observados. As quimiocinas CXCL-9 e CCL-5 não foram detectadas.
- e) Embora o número de casos estudados não permita uma afirmação conclusiva, as observações admitem a possibilidade de que a infecção com helmintos intestinais em pacientes com tuberculose possa estar interferindo na resposta Th-1 aos antígenos de *MTB*.

Perspectivas

## 8. PERSPECTIVAS

Na finalização deste trabalho foi possível visualizar o quão importante é continuá-lo e incrementá-lo. Por isso, temos como perspectivas prosseguir com este projeto para:

- Aumentar a amostragem, principalmente, do grupo TB+HELM.
- Acrescentar o estímulo com antígenos de *Ascaris lumbricoides* nas culturas de sangue total com e sem antígenos de *MTB*.
- Utilizar antígenos de *MTB* de cepa avirulenta (H37Ra) e de cepa virulenta (H37Rv), separadamente.
- Realizar além das culturas de sangue total, culturas de células dendríticas e de macrófagos para dosagem de citocinas e quimiocinas (em todos os tipos de culturas).
- Realizar infecção de culturas de sangue total com as cepas H37Ra e H37Rv em indivíduos TB, TB+HELM, HELM (PPD+ e PPD-) e controles (PPD+ e PPD-).
- Fazer as marcações celulares antes e depois dos cultivos, realizando marcações intracelulares para IL-12 e IL-10, especialmente, para identificar quais células estão produzindo.

Acreditamos que estes apontamentos sejam necessários para um melhor entendimento do impacto da presença de helmintos intestinais, na resposta imune inata, em pacientes com tuberculose pulmonar.

## Referências Bibliográficas

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673):245-52.
2. BAZZONE, L. E., SMITH, P. M., RUTITZKY, L. I., SHAINHEIT, M. G., URBAN, J. F., SETIAWAN, T., BLUM, A. M., WEINSTOCK, J. V., STADECKER, M. J. (2008). Coinfection with the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* markedly reduces hepatic egg-induced immunopathology and proinflammatory cytokines in mouse models of severe schistosomiasis. *Infect Immun.*, 76(11):5164-72.
3. BENTWICH, Z., WEISMAN, Z., MOROZ, C., BAR-YEHUDA, S., & KALINKOVICH, A. (1996). Immune dysregulation in Ethiopian immigrants in Israel: relevance to helminth infections? *Clin Exp Immunol.*, 103(2):239-43.
4. BENTWICH, Z., KALINKOVICH, A., WEISMAN, Z., BORKOV, G., & BEYERS, N. (1999). Can eradication of helminthic infections change the face of AIDS and tuberculosis? *Immunology Today*, 20(11):485-7.
5. BERGMAN, M. P., ENGERING, A., SMITS, H. H., VAN VLIET, S. J., VAN BODEGRAVEN, A. A., WIRTH, H. P., et al. (2004). Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *Journal of Experimental Medicine*, 200(8):979-90.
6. BERRINGTON, W. R. & HAWN, T. R. (2007). Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunological Reviews*, 219:167-186.
7. BETHONY, J., BROOKER, S., ALBONICO, M., GEIGER, S., LOUKAS, A., DIEMERT, D., et al. (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*, 367(9521):1521-32.
8. BHATT, K. & SALGAME, P. (2007). Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Immunology*, 27(4):347-62.

9. BLOOM, .BR. & MURRAY, C.J. (1992). Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*, 257(5073):1055-64.
10. BONECINI-ALMEIDA, M. G., CHITALE, S., BOUTSIKAKIS, I., GENG, J., DOO, H., HE, S., et al. (1998). Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: Requirement for IFN- $\gamma$  and primed lymphocytes. *Journal of Immunology*, 160:4490-4499.
11. BOONSTRA, A., ASSELIN-PATUREL, C., GILLIET, M., CRAIN, C., TRINCHIERI, G., LIU, Y., et al. (2003). Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *The Journal of experimental Medicine*, 197(1): 101-109.
12. BORING, L., GOSLING, J., CHENSUE, S. W., KUNKEL, S. L., FARESE, R. V., et al. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Investig.* 100:2552–2561.
13. BORKOW, G., LENG, Q., WEISMAN, Z., STEIN, M., GALAI, N., KALINKOVICH, A., et al. (2000). Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. *J Clin Invest.*, 106(8):1053-60.
14. BORKOW, G. & BENTWICH, Z. (2004). Chronic immune activation associated with chronic helminthic and human immunodeficiency virus infections: role of hyporesponsiveness and anergy. *Clin Microbiol Rev.*, 17(4):1012-30.
15. BRADLEY, J.E & JACKSON, J.A. (2004). Immunity, immunoregulation and the ecology of trichuriasis and ascariasis. *Parasite Immunol.*, 26(11-12):429-41.
16. BRENNAN P. J, NIKAIDO H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.*, 64:29-63.
17. BROWN, M., MIIRO, G., NKURUNZIZA, P., WATERA, C., & QUIGLEY, M. A. (2006). *Schistosoma mansoni*, nematode infections, and progression to active

- tuberculosis among HIV-1-infected Ugandans. *Am J Trop Med Hyg* , 74(5):819-25.
18. BUNDY, D., SHER, A., & MICHAEL, E. (2000). Good Worms or Bad Worms? Do worm Infections Affect the Epidemiological Patterns of Other Diseases? *Parasitology Today*, 16:273-274.
  19. CHENSUE, S. W., WARMINGTON, K. S., ALLENSPACH, E. J., LU, B., GERARD, C., KUNKEL, S. L., & LUKACS, N. W. (1999). Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J. Immunol.* 163:165–173.
  20. CONCHEDDA, M., BORTOLETTI, G., GABRIELE, F., WAKELIN, D., & PALMAS, C. (1997). Immune response to the cestode *Hymenolepis nana*: cytokine production during infection with eggs or cysts. *Int Journal Parasitol.*, 27(3):321-7.
  21. COOPER, A., KIPNIS, A., TURNER, J., MAGRAM, J., & FERRANTE, J. A. (2002a). Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12p40 subunit is present. *Journal of Immunology*, 168(3):1322-7.
  22. COOPER, P., CHICO, M., SANDOVAL, C., ESPINEL, I., & GUEVARA, A. (2000b). Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. *Journal Infect Dis*, 182(4):1207-13.
  23. DE JONG, E. C., VIEIRA, P. L., KALINSKI, P., SCHUITEMAKER, J. H., TANAKA, Y., WIERENGA, E. A., et al. (2002). Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals. *Journal of Immunology*, 168 (4):1704-1709.
  24. DIETZE, R., HADAD, D. J., PEREIRA, F. E. L. & RIBEIRO-RODRIGUES, R. (2009). In ROCHA, M. O. C., PEDROSO, E. R. P. Fundamentos em Infectologia. Ed. RuBio.

25. DINIZ, L., ZANDONADE, E., DIETZE, R., PEREIRA, F. E. L. & RIBEIRO-RODRIGUES, R. (2001). Short report: do intestinal nematodes increase the risk for multibacillary leprosy? *Am J Trop Med Hyg*, 65(6):852-4.
26. DUCATI, G. G., RUFFINO-NETTO, A., & BASSO, L. A. (2006). The resumption of consumption - A review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101(7): 697-714.
27. DULPHY N, HERRMANN JL, NIGOU J, RÉA D, BOISSEL N, PUZO G, CHARRON D, LAGRANGE PH, TOUBERT A. (2007). Intermediate maturation of *Mycobacterium tuberculosis* LAM-activated human dendritic cells. *Cell Microbiol.*, 9(6):1412-25.
28. ELIAS, D., WOLDAY, D., AKUFFO, H., PETROS, B., BRONNER, U., & BRITTON, S. (2001). Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacilli Calmette-Guérin (BCG) vaccination. *Clin Exp Immunol*, 123(2):219-25.
29. ELIAS, D; AKUFFO, H & BRITTON, S. (2006). Helminthes could influence the outcome of vaccines against TB in the tropics. *Parasite Immunology*, 28:507-513.
30. ELIAS, D., MENGISTU, G., AKUFFO, H., & BRITTON, S. (2006). Are intestinal helminths risk factors for developing active tuberculosis? *Trop Med Int Health*, 11(4):551-8.
31. ELIAS D, BRITTON S, ASEFFA A, ENGERS H, AKUFFO H. (2008). Poor immunogenicity of BCG in helminth infected population is associated with increased in vitro TGF-beta production. *Vaccine*, 26(31):3897-902.
32. ERNST, J. D. (1998). Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 66(4):1277-81.
33. FIGDOR, C., VAN KOOYK, Y., & ADEMA, G. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Review Immunology*, 2(2):77-84.
34. FLESCHE, I. E., HESS, J. H., HUANG, S., AGUET, M., ROTHE, J., BLUETHMANN, H., et al. (1995). Early interleukin 12 production by macrophages



- in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *Journal Experimental Medicine*, 181:1615-1621.
35. FLYNN, J. L. & CHAN, J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*, 19:93-129.
36. FREEMAN, S., POST, F. A., BEKKER, L., HARBACHEUSKI, R., STEYN, L. M., RYFFEL, B., et al. (2006). Mycobacterium tuberculosis H37Ra and H37Rv Differential Growth and Cytokine/Chemokine Induction in Murine Macrophages In Vitro. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 26(1): 27-33. doi:10.1089/jir.2006.26.
37. GATELY, M. K., RENZETTI, L. M., MAGRAM, J., STERN, A. S., ADORINI, L., GUBLER, U., et al. (1998). The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.*, 16:495-521.
38. GEIJTENBEEK, T., KWON, D. S., TORENSMA, R., & VAN VLIET, S. J. (2000a). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 100(5):587-97.
39. GEIJTENBEEK, T., TORENSMA, R., VAN VLIET, S., VAN DUIJNHOFEN, G., ADEMA, G., VAN KOOYK, Y., et al. (2000b). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100(5):575-85.
40. GEIJTENBEEK, T., VAN VLIET, S., KOPPEL, E., SANCHEZ-HERNANDEZ, M., VANDENBROUCKE-GRAULS, C., APPELMELK, B., et al. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1):7-17.
41. GIACOMINI, E., IONA, E., FERRONI, L., MIETTINEN, M., FATTORINI, L., OREFICI, G., et al. (2001). Infection of human macrophages and dendritic cells with Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *The Journal of Immunology*, 166:7033-7041.
42. GLICKMAN, M.S & JACOBS, Jr W.R. (2001). Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. *Cell*, 104:477-485.

43. HALL, A. & CHAN, M.S. (1994). Intestinal worms: strategies to control disease. *Afr Health*, 17(1):23-6.
44. HISAEDA, H., TETSUTANI, K., IMAI, T., MORIYA, C., TU, L., HAMANO, S., et al. (2008). Malaria Parasites Require TLR9 Signaling for Immune Evasion by Activating Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 180: 2496–2503.
45. HOLSCHER, C., ATKINSON, R., ARENDSE, B., BROWN, N., MYBURGH, E., ALBER, G., et al. (2001). A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. *The Journal of Immunology*, 167(12):6957-66.
46. HORNING, V., ROTHENFUSSER, S., BRITSCH, S., KRUG, A., JAHRSDÖRFER, B., GIESE, T., et al. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 168(9):4531-7.
47. JARLIER, V. & NIKAIDO, H. (1994). Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett.*, 123(1-2):11-8.
48. KALINKOVICH, A., WEISMAN, Z., GREENBERG, Z., NAHMIAS, J., & EITAN, S. (1998). Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. *Clin Exp Immunol*, 114(3):414-21.
49. KALINSKI, P., SCHUITEMAKER, J., HILKENS, C., & KAPSENBERG, M. (1998). Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *The Journal of Immunology*, 161(6):2804-9.
50. KALINSKI, P., HILKENS, C., WIERENGA, E., & KAPSENBERG, M. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*, 20(12):561-7.
51. KAUFMANN, S. H.E. & SCHAIBLE, U. E. (2003). A Dangerous Liaison between Two Major Killers: Mycobacterium tuberculosis and HIV Target Dendritic Cells through DC-SIGN. *J Exp Med*, 197(1):1-5.

52. KHADER, S. A., PARTIDA-SANCHEZ, S., BELL, G., JELLEY-GIBBS, D. M., SWAIN, S., PEARL, J. E., et al. (2006). Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell- priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 203 (7): 1805-1815.
53. KURASHIMA, K., MUKAIDA, N., FUJIMARA, M., YASUI, M., NAKAZUMI, Y., MATSUDA, T. & MATSUSHIMA, K. (1997). Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:1474–1477.
54. LABIDI, i. A., ESTES, R., DAVID, H., & BOLLON, A. (2001). Mycobacterium recombinant vaccines. *Tunis Med.*, 79(2):65-81.
55. LICHTNER, M., ROSSI, R., MENGONI, F., VIGNOLI, S., COLACCHIA, B., MASSETTI, A. P., et al. (2005). Circulating dendritic cells and interferon- $\alpha$  production in patients with tuberculosis: correlation with clinical outcome and treatment response. *Clinical and Experimental Immunology*, 143:329-337.
56. LOPES, A. C. & GROTTTO, H. Z. W. (2009). Série Clínica Médica Ciência e Arte: Interpretação clínica do hemograma. São Paulo: Editora Atheneu; 160 p, 3:63-78.
57. LU, B., RUTLEDGE, B. J., GU, L., FIORILLO, J., LUKACS, N. W., KUNKEL, S. L. et al. (1998). Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 187:601–608.
58. MAHNKE, K., QIAN, Y., KNOP, J. & A. H. ENK, A. H. (2003). Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 101:4862–4869.
59. MAKINO, M., MAEDA, Y., MUKAI, & KAUFMANN, S. H. (2006). Impaired maturation and function of dendritic cells by mycobacteria through IL-1beta. *Eur J. Immunol.*, 36(6):1443-52.
60. MARTINO, A. (2008). Mycobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity. *J. Biosci.* , 33:137-144.

61. McNEIL, M.R. & BRENNAN, P.J. (1991). Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res Microbiol.*, 142(4):451-63.
62. MEDZHITOV, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449:819-826.
63. MÉNDEZ-SAMPERIO, P. MIRANDA, E. & VÁZQUEZ, A. (2006). Expression and Secretion of CXCL-8 and CXCL-10 From *Mycobacterium bovis* BCG-Infected Human Epithelial Cells: Role of IL-4. *Mediators Inflamm.*, 2006(1):67451.
64. MÉNDEZ-SAMPERIO, P. (2008). Expression and regulation of chemokines in mycobacterial infection. *Journal of Infection*, 57: 374-384.
65. NICOD, L. P. (2007). Immunology of tuberculosis. *Swiss Medicine Wkly*, 137:357-362.
66. NIGOU, J., ZELLE-RIESER, C., GILLERON, M., THURNHER, M., & PUZO, G. (2001). Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *The Journal of Immunology*, 166(12):7477-85.
67. NORTH, R. J. & JUNG, Y. (2004). Immunity to tuberculosis. *Annual Review Immunology*, 22:599-623.
68. OHASHI, K., BURKART, V., FLOHE, S., & KOLB, H. (2000). Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *The Journal of Immunology*, 164(2):558-61.
69. PARK, S. H. & BENDELAC, A. (2000). CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature* 406, 788-792.
70. PARKER, L. C., PRINCE, L. R., & SABROE, I. (2007). Translational mini-review series on toll-like receptors: networks regulated by toll-like receptors mediate innate and adaptative immunity. *Clinical and experimental Immunology*, 147:199-207.

71. PASQUALOTO, K. F. & FERREIRA, E. I. (2001). An approach for the rational design of new antituberculosis agents. *Curr Drug Targets.*, 2(4):427-37.
72. PETERS, W., SCOTT, H. M., CHAMBERS, H. F., FLYNN, J. L., CHARO, I. F. & ERNST, J. D. (2001). Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7958–7963; 128.
73. POKKALI, S., DAS, S. D. (2009). Augmented chemokine levels and chemokine receptor expression on immune cells during pulmonary tuberculosis. *Hum Immunol.*, 70(2):110-5.
74. PULENDRAN, B. (2005). Variagation of the Immune Response with Dendritic Cells and Pathogen Recognition Receptors. *Journal of Immunology*, 173:2457-2465.
75. RAJA, A. (2004). Immunology of tuberculosis. *Indian Journal Medicine Research*, 120:213-232.
76. REINHARDT, R. L., HONG, S., KANG, S., WANG, Z., & LOCKSLEY, R. M. (2006). Visualization of IL-12/23p40 in vivo reveals immunostimulatory dendritic cell migrants that promote Th1 differentiation. *Journal of Immunology*, 177:1618-1627.
77. RESENDE CÓ, T., HIRSCH, C. S., TOOSI, Z., DIETZE, R., & RIBEIRO-RODRIGUES, R. (2007). Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-Mycobacterium tuberculosis immunity and clinical response to tuberculosis therapy. *Clin Exp Immunol.*, 147(1):45-52.
78. REY, L. (2008). Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos. Editora: Guanabara Koogan 4ªed.
79. ROJAS, M., OLIVIER, M., GROS, P., BARRERA, L. F., & GARCÍA, L. F. (1999). TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. *The Journal of Immunology*, 162(10):6122-31.

80. ROLLINS, B. J. (1997). Chemokines. *Blood*, 90: 909-928.
81. ROMANI, L.; PUCETTI, P. & BISTONI, F. (1997). Interleukin-12 in infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*, 10:611-636.
82. ROOK, G.A.; DHEDA, K.; ZUMLA, A. (2005). Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine*, 23(17-18):2115-20.
83. SARTONO, E., KRUIZE, Y., PARTONO, F., KURNIAWAN, A., MAIZELS, R., & YAZDANBAKHSI, M. (1995). Specific T cell unresponsiveness in human filariasis: diversity in underlying mechanisms. *Parasite Immunol*, 17(11):587-94.
84. SAUNDERS, B., FRANK, A., ORME, I., & COOPER, A. M. (2000). Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*, 68(6):3322-6.
85. SAUTY, A., DZIEJMAN, M., TAHA, R. A., IAROSI, A. S., NEOTE, K., GARCIA-ZEPEDA, E. A., HAMID, Q. & LUSTER, A. D. (1999). The T Cell-Specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are Expressed by Activated Human Bronchial Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 162: 3549–3558
86. SCHLESINGER, L., BELLINGER-KAWAHARA, C., PAYNE, N., & HORWITZ, M. (1990). Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *The Journal of Immunology*, 144(7):2771-80.
87. SHARMA, M. K., AL-AZEM, A., WOLFE, J., HERSHFIELD, E., & KABANI, A. (2003). Identification of a predominant isolate of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Infectious Diseases*, 3:1-10.
88. TAILLEUX, L., SCHWARTZ, O., HERRMANN, J., PIVERT, E., JACKSON, M., AMARA, A., et al. (2003). DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 197(1):121-7.


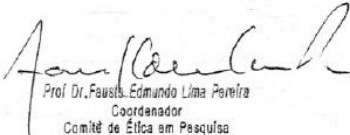
89. TAILLEUX, L., PHAM-THI, N., BERGERON-LAFAURIE, A., HERRMANN, J., CHARLES, P., SCHWARTZ, O., et al. (2005). DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for Mycobacterium in patients with Tuberculosis. *PLOS Medicine*, 2(12): 1269-1279.
90. TALAAT, K., BONAWITZ, R., DOMENECH, P., & NUTMAN, T. (2006). Preexposure to Live *Brugia malayi* Microfilariae Alters the Innate Response of Human Dendritic Cells to Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*, 193:196-204.
91. TRINCHIERI, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol*, 13:251-76.
92. TRINCHIERI, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Review Immunology*, 3(2):133-46.
93. TRINCHIERI, G. & SHER, A. (2007). Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defense. *Nature Reviews*, 7:179-190.
94. TRISTÃO-SÁ, R., RIBEIRO-RODRIGUES, R., JOHNSON, L. T., PEREIRA, F. E. L., & DIETZE, R. (2002). Intestinal nematodes and pulmonary tuberculosis. *Rev Soc Bras Med Trop*, 35(5): 533-535.
95. UENO, H., KLECHEVSKY, E., MORITA, R., ASPORD, C., CAO, T., MATSUI, T., et al. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews*, 219:118-142.
96. VAN CREVEL, R., OTTENHOFF, T. H. M. & VAN DER MEER, J. W. M. (2002). Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microb. Rev* p. 294–309.
97. VEGA, M. A. & CORBÍ, A. L. (2006). Human macrophage activation: too many functions and phenotypes for a single cell type. *Immunol.*, 25(4): 248-272.
98. VIEIRA, P., DE JONG, E., WIERENGA, E., KAPSENBERG, M., & KALIŃSKI, P. (2000). Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *The Journal of Immunology*, 164(9):4507-12.

99. WALRATH, J., ZUKOWSKI, L., KRYWIAK, A. & SILVER, R. F. (2005). Resident Th1-Like Effector Memory Cells in Pulmonary Recall Responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol 33:48–55.
100. WHELAN, M., HARNETT, M., HOUSTON, K., PATEL, V., HARNETT, W., & RIGLEY, K. (2000). A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol*, 164(12):6453-60.
101. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2008). WHO Report 2008: Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing.
102. YAMAZAKI, S., IYODA, T., TARBELL, K., OLSON, K., VELINZON, K., INABA, K. & STEINMAN, R. M. (2003). Direct expansion of functional CD25+CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198: 135–147.
103. YEW, W.W. & LEUNG, C.C. (2006). Update in tuberculosis 2005. *Am J Respir Crit Care Med.*, 173(5):491-8.
104. YOUNG, D. (1998). Blueprint for the white plague. *Nature*, 393: 515-516.




Anexos

## ANEXO 1

	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO</b> <b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO</b> <b>CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE</b>
Vitória-ES, 28 de março de 2007	
Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde	
Para: Prof. Rodrigo Ribeiro Rodrigues Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: <b>"Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar"</b>	
Senhor Pesquisador,	
<p>Informamos à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Protocolo de Pesquisa, No. de Registro no <b>CEP-012/07</b>, intitulado: <b>"Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar"</b> e o <b>Termo de Consentimento Livre e Esclarecido</b>, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, <b>APROVOU</b> o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 28 de março de 2007.</p> <p>Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".</p>	
Atenciosamente,	
 Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa Centro Biomédico / UFES	
<hr/> <p>Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29 040-091. Telefax: (27) 3335 7504</p>	

## ANEXO 2

		<b>Ficha de Coleta de Dados</b> <b>Projeto de Pesquisa:</b> Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar.			Pesquisadora Responsável: <b>Rodrigo Ribeiro Rodrigues</b> (rodrigrr@ndi.ufes.br)							
<b>IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE</b>												
Nº Registro		Foco N°	Unidade	Procedência		Transferência						
Nome					Sexo							
Data Nascimento		Estado Civil		Peso		Altura						
Mãe			Profissão									
Endereço												
Referência					Telefone							
<b>DADOS RELATIVOS À DOENÇA</b>												
<b>Localização</b>		<b>Se Extra-pulmonar</b>										
<input type="checkbox"/> 1 – Pulmonar <input type="checkbox"/> 2 – Extra-Pulmonar <input type="checkbox"/> 3 – Pulmonar e Extra		<input type="checkbox"/> 1 – Pleural <input type="checkbox"/> 2 – Gang Periférica <input type="checkbox"/> 3 – Genito Urinária <input type="checkbox"/> 4 – Óssea <input type="checkbox"/> 5 – Ocular <input type="checkbox"/> 6 – Miliar <input type="checkbox"/> 7 – Meningite <input type="checkbox"/> 8 – Outras <input type="checkbox"/> 9 – Não se aplica										
<b>EXAMES / INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA</b>												
<input type="checkbox"/> 1 – Baciloscopia de Escarro (inicial) <input type="checkbox"/> + <input type="checkbox"/> ++ <input type="checkbox"/> +++ <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não Realizado		<input type="checkbox"/> 2 – Baciloscopia de Outro Material <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não Realizado	<input type="checkbox"/> 3 – Cultura de Escarro <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não Realizado	<input type="checkbox"/> 4 – Cultura de Outro Material <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não Realizado	<input type="checkbox"/> 5 – Rx de Tórax <input type="checkbox"/> C/ Cavidade <input type="checkbox"/> S/ Cavidade <input type="checkbox"/> Pleural <input type="checkbox"/> Complexo 1* <input type="checkbox"/> Não Realizado <input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> 6 – Histopatologia (biopsias) <input type="checkbox"/> Baar + <input type="checkbox"/> Granuloma Caseoso <input type="checkbox"/> Não Sugestiva <input type="checkbox"/> Não Realizada						
<b>Teste Tuberculínico</b>		<b>Comunicante de Tuberculose</b>		<b>HIV</b>								
<input type="checkbox"/> 1 – Não Reator <input type="checkbox"/> 2 – Reator Fraco <input type="checkbox"/> 3 – Reator Forte <input type="checkbox"/> 4 – Não Realizado		<input type="checkbox"/> 1 – Sim <input type="checkbox"/> 2 – Não		<input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Não Realizado								
<b>Agravos Associados</b>												
<input type="checkbox"/> 1 – Diabetes <input type="checkbox"/> 6 – Doenças do Colágeno*		<input type="checkbox"/> 2 – Alcoolismo <input type="checkbox"/> 7 – Outras	<input type="checkbox"/> 3 – Tabagismo	<input type="checkbox"/> 4 – Doença Renal		<input type="checkbox"/> 5 – Doença Mental <input type="checkbox"/> 9 – Ignorado						
* Artrite reumatóide, lúpus, Esclerodermia, Síndrome de Jorgens												
<b>Possui histórico de tratamento para TB?</b>		<b>Fazia uso de corticóides?</b>		<b>Qual exame definidor do diagnóstico?</b>								
<input type="checkbox"/> 1 – Sim <input type="checkbox"/> 2 – Não		<input type="checkbox"/> 1 – Sim <input type="checkbox"/> 2 – Não		<input type="checkbox"/> Clínico <input type="checkbox"/> Laboratório <input type="checkbox"/> histopatológico								
<b>Hemograma</b>			<b>Leucograma</b>									
Hemácias	Hemoglobina	Leucócitos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Neutrófilos						
<b>TRATAMENTO</b>												
Data de Início		Local do Início										
/ /												
Primo tratamento: Esquema												
Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	C
												+++
												++
												+
												-
<b>Mudança de Esquema</b>												
<input type="checkbox"/> Intolerância <input type="checkbox"/> Resistência <input type="checkbox"/> Cura <input type="checkbox"/> Abandono <input type="checkbox"/> Transferência <input type="checkbox"/> Óbito												
<b>Tratamento Supervisionado</b>												
<input type="checkbox"/> 1 – Sim <input type="checkbox"/> 2 – Não <input type="checkbox"/> 9 – Ignorado												

## **ANEXO 3**

### **Termo de Consentimento Pós-informação**

**Título do estudo:** Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com TB pulmonar.

#### **Investigadores:**

Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues

Professor de Imunologia

Departamento de Patologia & Núcleo de Doenças Infecciosas - NDI

Universidade Federal do Espírito Santo

Telefone: 27-3335-7207

Prof. Dr. Reynaldo Dietze

Professor de Medicina

Núcleo de Doenças Infecciosas - NDI

Universidade Federal do Espírito Santo

Telefone: 27-3335-7204

Profa. Dra. Lúcia Renata Meirelles

Professor de Imunologia

Departamento de Patologia & Núcleo de Doenças Infecciosas - NDI

Universidade Federal do Espírito Santo

Telefone: 27-3335-7290

---

## Seus Direitos:

Este termo de consentimento irá informá-lo sobre a pesquisa. Estas informações também serão discutidas com você. Esta pesquisa pretende avaliar se a presença de helmintos (vermes) intestinais é capaz de afetar a resposta do sistema imune contra a TB (TB), doença que você tem. Após suas perguntas e dúvidas em relação ao estudo terem sido respondidas e se você (ou seu representante legal) concordar em participar do estudo, você (seu representante legal) será solicitado a assinar este termo de consentimento. Você (seu representante legal) também receberá uma cópia deste para guardar.

Sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá deixar o estudo em qualquer momento. A sua decisão em não participar ou de se retirar do estudo depois do mesmo já ter iniciado não ocasionará nenhum problema no tratamento médico de sua doença ou de seus familiares em nosso hospital, hoje ou no futuro. Você deve tirar todas as dúvidas que possam surgir após você ler e ouvir as explicações deste termo de consentimento.

## **Descrição do Estudo**

### Justificativa do estudo

A TB é uma doença séria que afeta os pulmões e também pode afetar outras partes do seu corpo. A TB é uma doença muito comum no Brasil. Pessoas com TB pulmonar geralmente tem tosse persistente. As pessoas contraem a doença respirando o ar contendo os micróbios (bacilos) da TB que foram eliminados por outra pessoa com TB durante a tosse.

Acredita-se que a susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis*, seja resultante da presença de uma resposta imune ineficaz contra o bacilo. Apenas 10% das pessoas infectadas pelo bacilo irão apresentar alguma forma da doença ao longo da vida, enquanto os 90% restantes dos indivíduos desenvolvem uma resposta imune suficiente para eliminar o bacilo ou pelo menos conter a infecção.

Outro mecanismo capaz de mediar a supressão da resposta imune observada na TB, seria a pré-existência de infecção por helmintos intestinais (vermes). Sabe-se que mais de 1 bilhão de pessoas no mundo estão infectadas por pelo menos uma espécie de helminto (verme) intestinal e de acordo com autores, em países em desenvolvimento, é mais comum estar infectado do que não estar infectado. Estes achados sugerem que uma infecção helmíntica crônica tem efeito importante e prolongado no sistema imune tornando o indivíduo mais susceptível a outras infecções (doenças).

### A Proposta do Estudo

Participarão deste estudo, 50 pacientes HIV - negativos, com baciloscopia em amostra de escarro positiva, e diagnóstico recente de TB (TB), sendo 25 pacientes com TB e 25 pacientes com TB co-infectados por helmintos intestinais (TB+Helmintos). O diagnóstico de TB será confirmado através de cultura positiva para micobactérias. Trinta indivíduos PPD-positivos (PPD > 10mm) clinicamente saudáveis serão também convidados para participar. Este estudo terá duração de aproximadamente 2 anos. Se você aceitar participar do estudo e completar todas as visitas, sua participação será de 6 meses.

Como foi dito anteriormente este estudo está tentando verificar se a presença de vermes intestinais afeta a resposta imune contra o bacilo da TB, tornando a pessoa menos resistente à infecção.

### O diagnóstico

Seu escarro, após ser colhido, irá para o laboratório onde será feito os exames de baciloscopia e de cultura de escarro para procurar os bacilos da TB. O resultado dessa cultura bem como todos os resultados das amostras coletadas serão encaminhadas ao seu médico. Se o diagnóstico da TB for confirmado você será acompanhado mensalmente durante 6 meses. Se o resultado da sua cultura de escarro for negativo você também será acompanhado por 6 meses para que se possa ter certeza que você não tem TB. Serão colhidas também 3 amostras de fezes para diagnosticar a presença de vermes intestinais. Caso você tenha vermes intestinais, será oferecido tratamento adequado.

### As Rotinas do Estudo

Como parte desta pesquisa, você será examinado regularmente através de consulta médica e de enfermagem e exames de laboratório para termos certeza que o seu tratamento está dando certo e que sua doença está sendo curada.

Se você (seu representante legal) concordar inicialmente em participar do estudo, você deverá:

1. Informar aos médicos sobre problemas de saúde no passado, ou remédios que esteja tomando no momento.

2. Fazer uma consulta geral que irá incluir entre outras coisas exame físico, peso, pressão arterial e frequência cardíaca.
3. Fazer exame de sangue para HIV, mesmo que você já tenha feito em outro lugar.
4. Fazer Raio-X dos pulmões para avaliar a extensão da sua TB. Se você já fez um Raio-X de pulmão há menos de duas semanas não será necessário repetir.
5. Fazer exame do escarro para confirmar se você está mesmo com TB e se o bacilo não é resistente ao tratamento.
6. Fazer exame de sangue (mais ou menos 45mL) para avaliar o seu estado de saúde e se você tem outras doenças.
7. Fazer exame de fezes para saber se tem ou não vermes intestinais.

Se após esses exames não houver nada que impeça você de entrar no estudo e se você (seu representante legal) ainda quiser participar como voluntário da pesquisa você deverá:

1. Colher sangue do braço (mais ou menos 10 mL).

Durante os primeiros 6 meses você deverá comparecer ao hospital algumas vezes. Nestas visitas você será reexaminado pelos médicos e pelos investigadores do estudo para saber se está tudo indo bem com o seu tratamento. Em algumas destas visitas (semanas 2, 4, 16 e 24 após o início do tratamento) os investigadores do estudo irão novamente coletar sangue, escarro e fezes para novas análises no laboratório.



Durante as visitas de revisão você deve sempre informar ao investigador sobre qualquer problema de saúde que você tem ou teve ou qualquer medicação que esteja tomando. Se os sintomas da TB voltarem os médicos precisarão reexaminá-lo (exame físico, sangue, escarro e raio-X de pulmão), para saber se houve cura ou não da doença.

### Riscos

Possíveis riscos e desconfortos decorrentes da sua participação no estudo são: a retirada de sangue que pode causar pequena dor ou hematoma no local da punção.

### Benefícios

Você pode não ter benefícios diretos de estar participando deste estudo. Você fará revisões regulares que incluem o resultado do teste de HIV. Participando deste estudo você estará ajudando a descobrir se a presença de vermes intestinais torna a pessoa mais susceptível a infecção pelo bacilo da TB. Se esta hipótese se confirmar, você estará ajudando a melhorar o tratamento e prevenção da TB no Brasil e no resto do mundo.

### Alternativas de Tratamento

Sua participação neste estudo é voluntária. Se você decidir não participar ou se você decidir deixar este estudo, você receberá o tratamento convencional de 6 meses.

### Confidencialidade

Suas informações pessoais, os resultados dos seus exames e o seu número de registro de participação no estudo que será usado em lugar do seu nome são confidenciais. Somente você e as pessoas envolvidas no estudo (médicos, enfermeiras, a Comissão de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo) terão acesso a elas.

Algumas de suas amostras laboratoriais (sangue e escarro) poderão ser usadas em outros estudos de TB. Neste caso sua privacidade também será mantida, conforme prevê a lei brasileira.

### Custos

Você não terá despesas decorrentes de sua participação no estudo. Todos os medicamentos e os exames realizados serão gratuitos.

### Interrupção de sua participação no estudo

Sua participação no estudo poderá ser interrompida por qualquer uma das razões a seguir: **a)** se os médicos acharem que sua permanência no estudo é prejudicial para você; **b)** se você não comparecer as visitas de seguimento.

### Dúvidas ou Problemas

Caso você tenha alguma dúvida sobre sua participação no estudo você deverá entrar em contato com o Prof. Rodrigo Ribeiro Rodrigues ou com a Profa. Lúcia Renata Meirelles no Departamento de Patologia ou no Núcleo de Doenças Infecciosas ou pelo telefone (27) 3335-7207 / 3335-7210/ 3335-7290. Se você tiver alguma dúvida sobre seus direitos como voluntário desta pesquisa, você pode entrar

em contato com o Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico no telefone (27) 3335-7243.

### Retenção das Amostras

Com a sua permissão, os médicos gostariam de guardar uma amostra de sangue colhida após o término de sua participação no estudo. Este material poderá ser usado em estudos futuros. Se você concordar, essas amostras serão guardadas com algumas informações sobre você, como por exemplo número do estudo, iniciais do seu nome, idade, sexo e data do diagnóstico de TB. Se no futuro você decidir que suas amostras devem ser destruídas isso deve ser solicitado e será feito.

Você pode também autorizar que sua amostra de sangue seja guardada somente se a mesma não contiver qualquer identificação. Mesmo neste casos a amostra de sangue poderá ser usada em estudos futuros porém não poderá ser destruída caso você mude de idéia por não termos como identificá-la.

Você pode dizer que não quer que suas amostras sejam guardadas, ou você pode optar por autorizar guardar suas amostras com ou sem identificação, e mesmo assim você poderá participar do estudo.

### Consentimento

Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento e sei que uma cópia ficará guardada no arquivo do estudo. Eu entendo posso deixar o estudo a qualquer momento que eu quiser.

Eu também entendo que os pesquisadores estarão me perguntando se eles podem guardar amostras de sangue ou outras amostras para pesquisas futuras. Eu entendo que eu posso dizer "não", que eu não quero ter minhas amostras armazenadas e mesmo continuar no estudo.

Eu entendo que se eu assinar ou colocar minha impressão digital no espaço abaixo, eu concordo em participar do estudo e seguir os procedimentos do estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura  
Data \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome Legível (impresso)

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha  
Data \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha (impresso)

Eu expliquei a proposta deste estudo para o voluntário (seu representante legal). Tenho plena convicção que ele/ela entendeu o objetivo, os procedimentos, os riscos e os benefícios da participação no estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Investigador  
Data \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Nome do Investigador (impresso)

## ANEXO 4

**Quadro 1 – Anticorpos monoclonais utilizados para células dendríticas e monócitos/macrófagos**

Anticorpo Monoclonal	Isotipo	Clone	Concentração	Expressão/Função
Lin 1 (lineage Cocktail 1) FITC: coquetel de anticorpos (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 e CD56).  <i>BD</i>	Mouse IgG <sub>1</sub> , k	CD3, clone SK7; CD16, clone 3G8; CD19, clone SJ25C1; CD20, clone L27; CD14, clone MΦP9; CD56, clone NCAM16.2	_____	Distinguir células dendríticas (DC) e basófilos do sangue periférico pela perda de marcação com Lin 1 (Lin <sup>-</sup> 1). CD3 é expresso por todos os linfócitos T. CD14 é expresso em monócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. CD16 é expresso por células NK, macrófagos, cultura de monócitos e neutrófilos. CD19 e CD20 são expressos em linfócitos B. CD56 expresso em células NK ativadas e em repouso.
CD14 FITC <i>eBioscience</i>	Mouse IgG <sub>1</sub> , k	61D3	50 µg/ml	Glicoproteína expressa em monócitos, macrófagos interfoliculares e algumas células dendríticas. Liga-se com alta afinidade a LPS e LBP em monócitos.
CD16 (FcγRIII) PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG <sub>1</sub>	eBIOCB16(CB16)	0,3 µg/ml	Receptor de baixa afinidade para IgG, ligando-se na forma de imunocomplexo. Macrófagos, células NK e neutrófilos expressam este receptor.
CD11c PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG <sub>1</sub> , k	3.9	50 µg/ml	Está associada a β2 integrina para formar o heterodímero CD11c/CD18. Este complexo é expresso em monócitos, granulócitos, macrófagos, células NK, células dendríticas e subgrupos de células T e B. CD11c/CD18 liga-se a CD54, iC3b e fibrinogênio, mostrando um papel na adesão de leucócitos.
TLR2 PE <i>ebioscience</i>	Mouse IgG2a, κ	TL2.1	50 µg/ml	Receptor de reconhecimento padrão que sinaliza em resposta a lipoproteínas bacterianas. Atua na imunidade inata e na inflamação. É expresso por monócitos do sangue periférico.
TLR4 PE <i>ebioscience</i>	Mouse IgG2a, κ	HTA125	50 µg/ml	Como TLR2, TLR4 também responde a lipoproteínas bacterianas. Este receptor de reconhecimento padrão associa-se com a molécula MD-2, e junto com CD14, reconhecem LPS e sinalizam. Também é expresso por monócitos do sangue periférico.
TLR9 PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG2a, κ	eB72-1665	0,2mg/ml	Molécula intracelular, que medeia resposta a dinucleotídeos CpG não-metilados do DNA bacteriano. É expresso por células dendríticas plasmacitoides e linhagem de células epiteliais humana.
HLA-DR PE Cy5 <i>ebioscience</i>	Mouse IgG2b, κ	LN3	0,75 µg/ml	Proteína transmembrana heterodimérica importante na apresentação de peptídeos a linfócitos T CD4 <sup>+</sup> . É expressa na superfície de células apresentadoras de antígenos incluindo células B, monócitos, macrófagos e DC.
CD123 PE <i>eBioscience</i>	Mouse IgG <sub>1</sub> , k	6H6	6,25 µg/ml	CD123 é a cadeia α do receptor de IL-3. Esta cadeia liga-se com baixa afinidade a IL-3, mas quando associada à cadeia β (CD131), a ligação do receptor (cadeias α e β) a IL-3 é de alta afinidade. CD123 é expresso por precursores mielóides, macrófagos, DC, mastócitos, basófilos e megacariócitos.
CD209 PE <i>BD Pharmingen</i>	Mouse IgG2b, κ	DCN46	_____	DC-SIGN ou CD209 é expressa por células dendríticas. Sua interação com ICAM-3 e/ou ICAM-2 promove a migração destas células.
CD40 PE <i>BD Pharmingen</i>	Mouse IgG <sub>1</sub> , κ	5C3	_____	Molécula coestimulatória presente no sangue periférico e tonsilas B. Também está presente em algumas células epiteliais, carcinomas e células dendríticas linfóides.
CD86 (B70/B7-2) PE <i>BD Pharmingen</i>	Mouse IgG <sub>1</sub> , κ	2331 (FUN-1)	_____	CD86 é o ligante secundário de CD28 e CTLA-4, mostrando papel importante na coestimulação de linfócitos T na resposta imune primária. É expresso por monócitos e células B ativadas.
Mouse IgG <sub>1</sub> , κ FITC isotype control <i>eBioscience</i>	Mouse IgG <sub>1</sub> , κ	_____	50 µg/ml	Controle isotípico
Mouse IgG2b PECy5 isotype control <i>eBioscience</i>	Mouse IgG2b, κ	_____	1,5 µg/ml	Controle isotípico
Mouse IgG2a PE isotype control <i>eBioscience</i>	Mouse IgG2a, κ	_____	12,5 µg/ml	Controle isotípico

Fluorescein isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE) e PE-Cy5 (antigo Cy-Chrome™) é um sistema conjugado que combina R-phycoerythrin e um corante cianina (de 1.5 kDa; Cy5).

## ANEXO 5

Tabela 4 – Classificação dos indivíduos participantes do estudo

Código	Idade	Sexo	PPD	TB	Helminto	Leucócitos	Monócitos	Linfócitos	Eosinófilos
CA-06	19	M	NR	Mtb	<i>S. stercoralis</i>	7200	1010	2220	680
VT-03	24	M	Pos	Mtb	<i>E. vermicularis</i>	5400	680	2820	400
VT-18	38	M	NR	Mtb	<i>H. nana</i>	7200	400	1400	260
CA-01	43	M	NR	Mtb	N	7800	470	1830	230
CA-05	32	M	NR	Mtb	N	9320	470	1120	90
VT-01	29	M	NR	Mtb	N	10020	990	1530	130
VT-04	20	M	NR	Mtb	N	9900	750	2560	130
VT-05	36	F	Pos	Mtb	N	7500	500	2550	1460
VT-06	36	F	NR	Mtb	N	11000	1010	1300	110
VT-07	32	M	Pos	Mtb	N	14300	1009	2140	830
VT-08	22	F	NR	Mtb	N	9800	970	1730	210
VT-15	43	F	Pos	Mtb	N	4200	250	1090	40
VT-28	32	F	Pos	Mtb	N	6100	490	2180	290
VT-29	57	M	NR	Mtb	N	8100	710	1550	80
VT-23	14	M	Pos	N	<i>S. mansoni</i>	10200	730	2320	670
VT-12	37	M	Pos	N	<i>S. sterc./Schist.</i>	6100	500	1760	340
VT-02	31	M	Pos	N	<i>S. stercoralis</i>	7700	500	2900	1000
VT-13	38	M	Pos	N	<i>S. stercoralis</i>	6900	620	2100	1040
VT-21	16	F	Pos	N	<i>E. vermicularis</i>	7100	480	2830	280
CA-02	61	F	Pos	N	N	5500	530	3340	100
CA-03	55	M	Pos	N	N	10400	950	3500	120
CA-04	53	M	Pos	N	N	9400	390	2660	140
CA-07	35	M	Pos	N	N	6600	340	2080	450
VT-09	52	M	Pos	N	N	8600	450	1900	1940
VT-10	54	M	Pos	N	N	6300	600	2040	450
VT-11	18	F	Pos	N	N	8400	600	2080	80
VT-16	50	F	Pos	N	N	4800	430	2020	210
VT-17	26	F	Pos	N	N	8800	590	2580	440
VT-20	36	F	Pos	N	N	12200	620	2870	260
VT-27	50	M	Pos	N	N	5900	1000	2370	280
VT-24	20	M	Pos	N	N	5300	450	2140	100
VT-25	47	M	Pos	N	N	10780	400	1600	160

Dados contidos nas fichas e nos resultados de PPD, cultura para MTB e exames parasitológicos. Os códigos VT e CA representam os municípios Vitória e Cariacica, onde os participantes foram arrolados. Estes indivíduos foram ainda classificados de acordo com a idade, gênero/sexo, PPD (positivo (Pos) ou não realizado (NR)), Tuberculose (presença de *Mtb* ou não (N)), e helmintíase intestinal (ausência/negativo (N), ou presença, definida pelo tipo de parasito. Os indivíduos foram divididos em grupos, quais sejam: grupo TB+HELM (vermelho), grupo TB (azul), grupo HELM (verde) e grupo controle (preto). Os valores de monócitos e linfócitos (células/mm<sup>3</sup>) foram obtidos através de hemograma, realizado no laboratório Tommasi.

Tabela 5 – Imunofenotipagem de células dendríticas – gate em linfócitos

Pacientes	Linfócitos (mil/mm <sup>3</sup> )	Lin-CD11c		Lin-CD123		Lin-CD209		Lin-TLR2		Lin-TLR4		Lin-TLR9		Lin-CD86		Lin-CD40	
		% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>
TB+HELM CA-06	2220	0,05	1	0,71	16	0	0	0,2	4	0	0	0,24	5	0,96	21	0,16	4
TB+HELM VT-03	2820	0,46	13	2,41	68	0	0	0,05	1	0,05	1	3,3	93	2,09	59	0,05	1
TB CA-01	1830	0	0	0,77	14	0	0	0,12	2	0,64	12	1,19	22	0,39	7	0,12	2
TB CA-05	1120	0,13	1	1,41	16	0	0	0,12	1	0	0	1,11	12	0,86	10	0	0
TB VT-01	1530	0	0	0,85	13	0,19	3	0,68	10	0,81	12	1,59	24	1,91	29	0	0
TB VT-04	2550	0,25	6	0,73	19	0	0	0,18	5	0	0	1,66	42	0,1	3	0	0
TB VT-05	1300	0,11	1	3,38	44	0	0	0	0	0,11	1	4,92	64	1,38	18	0	0
TB VT-06	2140	0,34	7	1,71	37	0	0	0,21	4	0	0	3,1	66	1,26	27	0	0
TB VT-07	1730	0,25	4	2,2	38	0	0	0,08	1	0	0	3,04	53	2,11	37	0	0
HELM VT-02	2900	0	0	0,28	8	0	0	0	0	0	0	2	58	1,45	42	0	0
HELM VT-12	1760	0,06	1	2,36	42	0	0	0	0	0,63	11	5,71	100	2,61	46	0	0
Controles																	
PPD+ CA-02	3340	0,06	2	0,53	18	0	0	0,09	3	0,22	7	3,8	127	3,64	122	0,09	3
PPD+ CA-03	3500	0,35	12	0,9	32	0,05	2	0	0	0	0	1,43	50	0,7	25	0	0
PPD+ CA-04	2660	0,33	9	1,13	30	0	0	0,08	2	0,24	6	2,36	63	0,73	19	0	0
PPD+ CA-07	2080	0,39	8	2,52	52	0,07	1	0,2	4	0,06	1	4,53	94	1,13	24	0	0
PPD+ VT-09	1900	0,13	2	0,87	17	0	0	0	0	0	0	1,73	33	0,51	10	0	0

Representação da imunofenotipagem de células dendríticas através dos marcadores Lin<sup>+</sup> FITC, HLA-DR<sup>+</sup>PECy5 e marcadores conjugados com PE: CD11c<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup>, CD209<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup> ou TLR9<sup>+</sup> **no gate em linfócitos**. O valor da primeira coluna de cada marcação (coluna %) representa o percentual obtido nas análises em citometria. Os valores da coluna células/mm<sup>3</sup> resultam da multiplicação dos percentuais pelo valor de linfócitos conseguidos no hemograma. Análises de linfócitos (R2), pois os gates/regiões (R1+R2) no gráfico de distribuição pontual para células dendríticas foram feitos nestas duas populações celulares. Estes números absolutos foram utilizados para obtenção das médias e erros-padrão para a montagem dos gráficos. Indivíduos em vermelho (primeira coluna) representam o grupo TB+HELM, em azul o grupo TB, em verde o grupo HELM e os demais o grupo controle PPD+ (em preto).

Tabela 6 – Imunofenotipagem de células dendríticas – gate em monócitos

Pacientes	Monócitos (mil/mm <sup>3</sup> )	Lin-CD11c		Lin-CD123		Lin-CD209		Lin-TLR2		Lin-TLR4		Lin-TLR9		Lin-CD86		Lin-CD40	
		% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>	% células/mm <sup>3</sup>
TB+HELM CA-06	1010	0,78	8	0,81	8	0,15	2	0,62	6	0,18	2	0,74	7	0,48	75	0,08	1
TB+HELM VT-03	680	0,25	2	0,2	1	0	0	0	0	0	0	0,42	3	0,91	19	0,03	0
TB CA-01	470	0,44	2	0,82	4	0	0	0,13	1	0,18	1	0,35	2	0,98	8	0	0
TB CA-05	470	0,13	1	0,2	1	0,03	0	0,14	1	0	0	0,3	1	0,06	7	0,03	0
TB VT-01	990	0,3	3	0,88	9	0,05	0	0,62	6	0,84	8	0,74	7	0,36	73	0,06	1
TB VT-04	500	1,03	5	2,32	12	0	0	0,07	0	0	0	1,99	10	1,32	50	0,13	1
TB VT-05	1010	0,16	2	0,24	2	0	0	0,07	1	0,04	0	0,09	1	0,46	9	0	0
TB VT-06	1009	0,09	1	0,67	7	0,03	0	0,3	3	0	0	0,53	5	0,34	54	0	0
TB VT-07	970	0,61	6	1,96	19	0,08	1	0,26	3	0,29	3	2,08	20	1,08	196	0	0
HELM VT-02	500	0,51	3	1,72	9	0	0	0,07	0	0,07	0	1,09	5	2,04	27	0	0
HELM VT-12	500	0,68	3	2,99	15	0,26	1	1,22	6	1,21	6	5,03	25	4,44	126	0,17	1
Controles																	
PPD+ CA-02	530	0,27	1	0,57	3	0	0	0,12	1	0,16	1	2,35	12	1,92	66	0,04	0
PPD+ CA-03	950	0,24	2	0,27	3	0	0	0,08	0	0	0	0,23	2	0,38	21	0	0
PPD+ CA-04	390	0,37	1	0,72	3	0	0	0,08	0	0	0	0,07	0	0,25	1	0	0
PPD+ CA-07	340	0,88	3	1,69	6	0,16	1	0,47	2	0,2	1	1,53	5	1,79	18	0,18	1
PPD+ VT-09	450	0,47	2	0,74	3	0	0	0,23	1	0	0	0,55	2	0,45	11	0,06	0
PPD+ VT-10	600	0,74	4	0,97	6	0,08	0	0,05	0	0	0	0,82	5	0,5	30	0,05	0
PPD+ VT-11	600	0,38	2	0,66	4	0,03	0	0,16	1	0	0	0,47	3	0,29	17	0	0

Representação da imunofenotipagem de células dendríticas através dos marcadores Lin<sup>1</sup> FITC, HLA-DR<sup>+</sup>PECy5 e marcadores conjugados com PE: CD11c<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup>, CD209<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup> ou TLR9<sup>+</sup> no gate em monócitos. O valor da primeira coluna de cada marcação (coluna %) representa o percentual obtido nas análises em citometria. Os valores da coluna células/mm<sup>3</sup> resultam da multiplicação dos percentuais pelo valor de linfócitos conseguidos no hemograma. Analisou monócitos (R1), pois os gates/regiões (R1+R2) no gráfico de distribuição pontual para células dendríticas foram feitos nestas duas populações celulares. Estes números absolutos foram utilizados para obtenção das médias e erros-padrão para a montagem dos gráficos. Indivíduos em vermelho (primeira coluna) representam o grupo TB+HELM, em azul o grupo TB, em verde o grupo HELM e os demais o grupo controle (PPD+ em preto).



Tabela 7 – imunofenotipagem de monócitos/macrófagos

Pacientes	Monócitos (mil/mm <sup>3</sup> )	CD14/CD209 % células/mm <sup>3</sup>	CD14/CD86 % células/mm <sup>3</sup>	CD14/CD40 % células/mm <sup>3</sup>	CD14/CD16 % células/mm <sup>3</sup>	CD14/TLR2 % células/mm <sup>3</sup>	CD14/TLR4 % células/mm <sup>3</sup>	CD14/TLR9 % células/mm <sup>3</sup>
TB+HELM CA-06	1010	17,44	96,42	12,78	24,58	69,63	43,46	95,72
TB+HELM VT-03	680	10,31	98,24	9,48	27,09	74,17	30,43	95,01
TB+HELM VT-08	400	7,03	92,16	7,58	30,32	47,02	17,33	94,66
TB CA-01	470	2,79	95,66	10,52	49,444	73,43	345,121	40,91
TB CA-05	470	16,63	96,66	53,01	249,147	88,7	416,89	65,29
TB VT-01	990	12	118,8	101,692	28,96	85	841,5	73,4
TB VT-04	500	15,17	88,43	18,76	93,8	77,61	388,05	34,1
TB VT-05	1010	3,93	98,17	3	30,3	83,37	842,037	29,85
TB VT-06	1009	5,33	96,33	9,01	90,9109	79,61	803,2649	28,11
TB VT-07	970	4,81	89,94	9,93	96,321	74,69	724,493	28,34
TB VT-08	250	6,07	84,04	10,15	25,375	31,17	77,925	40,62
TB VT-28	490	1,46	93,42	1,98	9,702	55,41	271,509	34,71
TB VT-29	710	4,18	97,19	10,06	71,426	81,2	576,52	65,48
HELM VT-02	500	8,22	91	5,39	26,95	68,84	344,2	16,41
HELM VT-12	500	5,86	77,3	5,37	386,5	27,08	135,4	12,34
HELM VT-13	620	6,3	39,06	1,99	12,338	31,55	195,61	28,05
HELM VT-21	480	23,85	93,78	19,31	92,688	80,7	387,36	43,13
HELM VT-23	730	21,69	158,337	15,91	116,143	82,75	604,075	37,86
Controles								
PPD+ CA-02	530	1,8	80,7	1,78	9,434	19,53	103,509	17,66
PPD+ CA-03	950	12,27	116,565	10,09	95,855	85,43	811,585	24,14
PPD+ CA-04	390	22,48	87,672	18,64	72,696	80,27	313,053	44,41
PPD+ CA-07	340	9,03	30,702	5,46	18,564	19,75	85,84	291,856
PPD+ VT-09	450	10,13	45,585	12,63	56,835	25,57	115,065	48,89
PPD+ VT-10	600	6,09	36,54	2,96	17,76	79,33	475,98	55,72
PPD+ VT-11	600	9,46	56,76	4,08	24,48	81,59	489,54	35,22
PPD+ VT-16	430	5,57	23,951	5,32	22,876	79,33	341,119	11,41
PPD+ VT-17	590	5,65	33,335	4,46	26,314	68,38	403,442	36,95
PPD+ VT-20	620	25,08	155,496	24,92	154,504	70,04	434,248	42,36
PPD+ VT-24	450	15,75	70,875	15,53	69,885	75,22	338,49	28,34
PPD+ VT-25	400	5,87	16,32	4,08	16,32	28,44	113,76	22,18
PPD+ VT-27	1000	3,84	28,5	2,85	28,5	52,3	291,1	29,11

Representação da imunofenotipagem de monócitos/macrófagos através dos marcadores CD14<sup>+</sup>FITC, HLA-DR<sup>+</sup>PECy5 e marcadores conjugados com PE: CD209<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, TLR2<sup>+</sup>, TLR4<sup>+</sup> ou TLR9<sup>+</sup>. O valor da primeira coluna de cada marcação (coluna %) representa o percentual obtido nas análises em citometria. Os valores da coluna células/mm<sup>3</sup> resultam da multiplicação dos percentuais pelo valor de monócitos conseguidos no hemograma. Estes números absolutos foram utilizados para obtenção das médias e erros-padrão para a montagem dos gráficos. Indivíduos em vermelho (primeira coluna) representam o grupo TB+HELM, em azul o grupo TB, em verde o grupo HELM e os demais o grupo controle (em preto).

Tabela 8 – Dosagem de citocinas pelo kit CBA inflammation.

GRUPO	IL-12		TNF-a		IL-10		IL-6		IL-1b	
	Ø	Ag Mtb	Ø	Ag Mtb	Ø	Ag Mtb	Ø	Ag Mtb	Ø	Ag Mtb
<b>TB+HELM CA-06</b>	8,0	54,2	40,3	3065,4	6,8	597,5	810,5	13208,2	40,5	11590,2
<b>TB+HELM VT-03</b>	12,8	58,3	18,2	2430,4	5,3	159,8	211,6	5130,2	25,1	4720,8
<b>TB+HELM VT-18</b>	23,4	53,7	10,7	1783,5	8,9	195,3	15,2	4410,4	13,2	2016,5
<b>TB CA-01</b>	10,7	47,3	24,6	2149,6	5,7	240,9	347,1	6951,4	17,2	2425,7
<b>TB CA-05</b>	10,5	27,1	8,2	4159,7	5,7	226,0	29,5	14270,7	11,7	11247,6
<b>TB VT-01</b>	9,9	45,0	72,8	3547,8	24,6	697,7	1787,6	15089,8	70,2	4720,8
<b>TB VT-04</b>	11,4	60,4	26,0	2783,9	7,9	883,6	1051,0	8270,3	54,4	6326,5
<b>TB VT-05</b>	12,8	44,0	12,5	1177,0	5,1	310,3	147,0	3123,7	12,5	2704,3
<b>TB VT-06</b>	13,0	41,7	12,4	2848,1	5,9	701,1	123,6	11653,2	16,8	8008,6
<b>TB VT-07</b>	10,2	57,8	10,8	3762,2	6,7	788,6	215,9	11343,4	13,9	7931,3
<b>TB VT-08</b>	20,2	82,0	22,8	3897,8	7,8	335,8	861,3	7463,8	63,2	11648,3
<b>TB VT-15</b>	2,0	68,0	9,6	1600,6	2,9	190,0	68,8	4242,9	8,9	3030,3
<b>HELM VT-02</b>	8,0	53,2	16,1	1531,2	6,7	684,5	305,9	8185,4	14,9	2371,5
<b>HELM VT-12</b>	6,6	43,6	7,8	1181,4	4,8	157,4	11,6	11061,7	6,2	2596,1
<b>HELM VT-13</b>	5,9	23,8	6,2	1303,7	3,7	172,5	5,7	15375,1	7,9	4422,1
<b>Controles</b>										
<b>CA-02</b>	11,6	36,0	15,8	1293,6	6,3	256,9	227,1	9128,0	12,4	2869,0
<b>CA-03</b>	10,7	35,5	7,3	2272,6	5,1	440,4	9,8	8356,2	9,1	3992,6
<b>CA-04</b>	12,3	49,2	11,8	1600,6	7,7	86,9	457,6	7775,3	19,4	3883,3
<b>CA-07</b>	6,4	32,9	6,0	891,1	3,0	103,8	10,4	3229,3	9,7	1700,7
<b>VT-09</b>	14,6	73,7	9,0	1307,3	7,5	303,2	13,6	3094,2	13,6	3351,3
<b>VT-10</b>	15,8	36,4	9,8	3270,0	6,9	264,1	13,9	4744,0	12,1	7447,6
<b>VT-11</b>	11,6	29,6	6,9	2056,6	4,7	210,0	44,8	6642,7	10,6	7816,7
<b>VT-16</b>	5,4	46,4	8,7	2630,1	4,4	274,0	26,4	6223,3	8,3	2414,7
<b>VT-17</b>	13,8	62,5	15,2	2247,4	7,3	375,5	77,7	6069,8	15,2	3476,6
<b>VT-20</b>	11,1	73,7	8,5	1968,0	4,7	279,0	11,8	4161,7	9,5	3382,2

Dados brutos da dosagem de citocinas, em pg/mL, pelo kit CBA inflammation. Dosagem na presença ou ausência (Ø) de estímulo antigênico. Indivíduos em vermelho grupo TB+HELM, em azul grupo TB, em verde grupo HELM, e em preto, o grupo controle PPD+.

Tabela 9 – Dosagem de quimiocinas pelo kit CBA chemokine.

GRUPO	CXCL10-IP10	CCL2-MCP1	CXCL9-MIG	CCL5-RANTES	CXCL8-IL8
TB+HELM CA-06	0	0,2	0	0	16,96
TB+HELM VT-03	4,23	1	0	0	13,46
TB+HELM VT-18	0,00	1	0	0	169,79
TB CA-01	16,99	0	0	0	9,38
TB CA-05	0,20	1	0	0	190,28
TB VT-01	0,00	0	0	0	14,20
TB VT-04	3,81	0	0	0	14,51
TB VT-05	0,90	1	0	2	7,29
TB VT-06	1,32	1	0	2	52,83
TB VT-07	0,08	0	0	0	83,52
TB VT-08	0	0	0	0	13,53
TB VT-15	0,00	1	1	0	30,70
HELM VT-02	0,36	1	0	1	17,49
HELM VT-12	1,04	1	0	0	191,64
HELM VT-13	10,94	3	0	0	612,49
<b>Controles</b>					
<b>CA-02</b>	0,66	1	0	4	20,37
<b>CA-03</b>	0	7,05	0	0	347,84
<b>CA-04</b>	0,29	0	0	0	6,97
<b>CA-07</b>	1,03	2	0	0	429,71
<b>VT-09</b>	1,07	1	0	0	152,94
<b>VT-10</b>	0,65	1	0	0	251,09
<b>VT-11</b>	0,63	1	0	0	162,20
<b>VT-16</b>	3,98	1	0	0	102,96
<b>VT-17</b>	0,43	1	0	0	78,58
<b>VT-20</b>	1,01	1	0	0	278,02

Dados brutos da dosagem de quimiocinas, em pg/mL, pelo kit CBA chemokine. Dosagem da razão entre a presença e a ausência ( $\emptyset$ ) de estímulo antigênico. Indivíduos em vermelho grupo TB+HELM, em azul grupo TB, em verde grupo HELM e, em preto, grupo controle PPD+.