

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

JULIANA SILVA PANCINI GOULART

**HELMINTÍASE INTESTINAL AFETA NEGATIVAMENTE A RESPOSTA
CELULAR ESPECÍFICA CONTRA O *Mycobacterium tuberculosis* EM
PACIENTES CO-INFECTADOS**

Vitória
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA SILVA PANCINI GOULART

**HELMINTÍASE INTESTINAL AFETA NEGATIVAMENTE A RESPOSTA
CELULAR ESPECÍFICA CONTRA O *Mycobacterium tuberculosis* EM
PACIENTES CO-INFECTADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em 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)

G694h Goulart, Juliana Silva Pancini, 1982-
Helmintíase intestinal afeta negativamente a resposta celular
específica contra o *Mycobacterium tuberculosis* em pacientes
co-infectados / Juliana Silva Pancini Goulart. – 2009.
100 f. : il.

Orientador: Rodrigo Ribeiro Rodrigues.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Tuberculose. 2. Helmintíase. 3. Imunidade celular. I.
Rodrigues, Rodrigo Ribeiro. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

Ao Victor, por todo amor e dedicação em todos esses anos juntos, por todos os ensinamentos, e por ter me mostrado o caminho da pesquisa. Meu amor por você é eterno.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus-Pai misericordioso que tudo governa em minha vida.

Ao meu esposo José Victor Goulart Nascimento, por todo amor e dedicação, por estar sempre ao meu lado me protegendo, sofrendo e se alegrando, e por ter sido o meu grande incentivador. Obrigada também pela imprescindível colaboração na confecção desta dissertação.

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues, pela oportunidade e confiança, por todo o empenho devotado ao meu crescimento profissional, e pelo carinho paternal em alguns momentos.

À Dra. Lúcia Renata Meireles de Souza, por ter me inserido no ambiente acadêmico.

À Tatiana de Resende Có, por ter me acolhido no laboratório e, com muito carinho, ter me ensinado a trabalhar com imunologia.

À Dra. Andréa Teixeira, do Centro de Pesquisas René Rachou, por ter gentilmente cedido o protocolo de CBA, e por ter me recebido no curso de “Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo”.

Ao Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira, por ser um grande mestre, por sua solicitude e pela sua exemplar e inalcançável sabedoria.

À professora Solange Alves Vinhas, pela disponibilidade, ensinamentos e carinho.

À professora Dra. Elenice Moreira Lemos que sempre se dispôs a me ajudar.

Ao Dr. Reynaldo Dietze, pela oportunidade e pela atenção nos momentos difíceis.

Aos professores da pós-graduação:

Dra. Angélica Espinosa;

Dr. Moisés Palaci;

Dra. Ethel Maciel;

por todo o incentivo e atenção.

À Juliana Lopes Fávero, pela sua amizade e carinho nos momentos em que mais precisei.

À Fátima Aparecida Pereira, secretária da pós-graduação.

Aos amigos de hoje e sempre do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES.

Aos meus sogros, Carlos Walmir Nascimento e Maria Helena Goulart Nascimento, por todo o cuidado comigo.

Aos meus pais, Antonio Sebastião Pancini e Maria Luzia da Silva Pancini, aos meus irmãos Antonio Júnior e Luis Henrique e aos meus sobrinhos Kaio e Bernardo, pela alegria de suas existências.

*Primum querite bona animi, cetera aut aderunt,
aut non oberunt.*

Procurai primeiro as boas coisas da mente, e o resto vos será proporcionado, ou, então, a falta do resto não será sentida.

Francis Bacon,
De Dignitate et Augmentis Scientiarum,
LivroVIII

RESUMO

Mycobacterium tuberculosis (MTB) é um exemplo clássico de patógeno para o qual a resposta protetora depende da imunidade celular do tipo Th1, que é caracterizada pela presença de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ . Essa citocina ativa mecanismos microbicidas no macrófago infectado, levando à eliminação do bacilo. Evidências sugerem que a progressão para a tuberculose esteja relacionada à presença de mecanismos imunossupressores mediados por citocinas e por células T reguladoras. Acredita-se que a presença de helmintíase intestinal possa prejudicar o desenvolvimento de uma resposta adaptativa capaz de conter ou eliminar o MTB, tornando assim o indivíduo susceptível ao adoecimento. Para aquilatar a influência da infecção por helmintos intestinais na resposta celular durante a tuberculose pulmonar, neste trabalho, foram avaliados os perfis quantitativo e fenotípico de populações celulares de sangue periférico e o padrão de citocinas em culturas de sangue total estimuladas com antígenos de MTB, em pacientes portadores de tuberculose pulmonar apresentando ou não helmintíase intestinal no momento do diagnóstico e durante a terapia antituberculose. Para isso, foram arrolados 53 pacientes com diagnóstico recente de tuberculose pulmonar. Desses, 26% eram portadores de pelo menos uma espécie de helminto intestinal. Pacientes com tuberculose pulmonar apresentaram uma redução significativa nos números de linfócitos T CD8⁺, células NK e NKT. Os indivíduos com helmintíase intestinal associada à tuberculose apresentaram uma maior frequência de células T reguladoras, com ambos os fenótipos CD4⁺CD25^{HIGH} e CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺. Além disso, os resultados sugerem que a presença de infecção por helmintos intestinais tenha induzido um estado de hipoergia em pacientes portadores de tuberculose pulmonar, uma vez que esses pacientes apresentaram concentrações menores das citocinas IL-2, TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10 nos sobrenadantes de culturas em relação às concentrações encontradas no grupo TB e no grupo controle. Portanto, os resultados desse trabalho sugerem que a presença de infecção por helmintos intestinais tenha um impacto negativo na resposta imunitária à tuberculose em pacientes portadores de tuberculose pulmonar.

Palavras-chave: tuberculose, helmintíase intestinal, imunidade celular.

ABSTRACT

The protection against *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) depends on a cell-mediated Th1 type-immune response. This response is characterized by IFN- γ production by CD4⁺ T cells, which activates macrophages to enhance microbicidal mechanisms leading to the bacillus' eradication. Factors related to tuberculosis resistance or susceptibility are not completely understood. There are evidences suggesting that the progress to active disease is related to immune downregulation caused by suppressors cytokines and regulatory T cells. It is believed that the association with helminth infection can disturb the protective immune response that should contain or eliminate MTB. Here, we investigated the role of intestinal helminth infection on *M. tuberculosis* specific immune response during active pulmonar tuberculosis in patients with associated tuberculosis and intestinal helminth infection at the time of diagnosis and during tuberculosis therapy. Quantitative and phenotypic analyses of peripheral blood cells populations were performed and the MTB-stimulated whole blood culture cytokines production was evaluated. Fifty-three patients with newly diagnosed tuberculosis were enrolled for this study. Twenty-six percent of these patients were infected with at least one intestinal helminth (TB + HELM patients). Patients with pulmonary tuberculosis presented a significant reduction in the numbers of TCD8+, NK and NKT cells. Patients with both intestinal helminth infection and tuberculosis presented higher frequency of regulatory T cells, of both phenotype CD4⁺CD25^{HIGH} and CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺, as compared to TB group, to HELM group, and to control group. In addition, the results suggest a hipoergy status in TB + HELM patients because the production of the cytokines IL-2, TNF- α , IL-4, IL-5 and IL-10 decreased in whole blood culture of these patients as compared to both TB patients and healthy controls. The data from this study indicated that the associated intestinal helminth infection has a negative impact on immunity to tuberculosis in patients with tuberculosis.

Keywords: tuberculosis, intestinal helminth infection, cellular immunity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Número estimado de novos casos de tuberculose (todas as formas), por país, em 2006. Fonte: WHO, 2008.....16
- Figura 2** – Micrografia eletrônica do *M. tuberculosis* (quadro à esquerda). O quadro à direita exibe esquematicamente os principais constituintes da parede celular do gênero *Mycobacterium*. Fonte: www.cbc.ca/story/science/national/2006/03/17/tb-who060317.html.....17
- Figura 3** – Contágio da tuberculose e localização da lesão pulmonar típica. Fonte: adaptado de STEWART; ROBERTSON; YOUNG, 2003.....19
- Figura 4** – Representação esquemática dos receptores presentes nas células fagocíticas envolvidos na fagocitose e no reconhecimento do *M. tuberculosis*. Fonte: adaptado de DOHERTY; ARDITI, 2004.....22
- Figura 5** – Distribuição global das helmintíases intestinais em 2006. As áreas em vermelho indicam as regiões onde as helmintíases intestinais são consideradas um problema de saúde pública. Fonte: WHO, 2006. http://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/en/.....30
- Figura 6** – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. A) Gráfico de distribuição pontual Tamanho *versus* Granulosidade utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso, os linfócitos – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD3 *versus* FL2/CD4 utilizado para quantificar o percentual das populações ou subpopulações celulares específicas em R1.....44
- Figura 7** – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras CD4⁺CD25^{HIGH} por citometria de fluxo. A) Gráfico de distribuição pontual Tamanho *versus* Granulosidade utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso os linfócitos – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD25 *versus* FL3/CD4 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras CD4⁺CD25^{HIGH} em R4.....45
- Figura 8** – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ por citometria de fluxo. A) Gráfico de densidade de distribuição de Tamanho *versus* FL3 utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso os linfócitos CD4⁺ – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD25 *versus* FL2/Foxp3 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em R2.....46
- Figura 9** – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras CD4⁺CD25^{HIGH}CD127^{LOW} por citometria de fluxo. A) Gráfico de densidade de distribuição de Tamanho *versus* FL2 utilizado para a

seleção da população de interesse, nesse caso os linfócitos CD127^{LOW} – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD25 *versus* FL3/CD4 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras CD4⁺CD25^{HIGH}CD127^{LOW} em R2.....46

Figura 10 – Gráfico de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) mostrando o posicionamento das esferas de captura na região R1.....49

Figura 11 – Gráfico de fluorescência 2 (FL2) *versus* fluorescência 3 (FL3). A) Representa a leitura do controle negativo. B) Representa a leitura positiva de uma amostra de sobrenadante de cultura.....49

Figura 12 – Números absolutos (células/mm³) de A) linfócitos totais; B) linfócitos T e C) linfócitos B presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■; n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas (p≤0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....56

Figura 13 – Números absolutos (células/mm³) de A) linfócitos T CD4⁺ e B) linfócitos T CD8⁺ presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas (p≤0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....58

Figura 14 – Números absolutos (células/mm³) de A) células NK e B) células NKT presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas (p≤0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....60

Figura 15 – Números absolutos (células/mm³) de eosinófilos encontrados na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal e sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas (p≤0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....61

Figura 16 – Frequência de A) células CD4⁺CD25⁺ e B) células CD4⁺CD25^{HIGH} presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal e sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas (p≤0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....63

Figura 17 – Detecção do fator de transcrição Foxp3. A) Número absoluto (células/mm³) de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ e B) frequência de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal e sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas (p≤0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....65

Figura 18 – Análise da expressão de CD127 como marcador de células T reguladoras. Frequência de células CD4⁺CD25^{HIGH}CD127⁺ presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal e sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas (p≤0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....66

Figura 19 – Níveis da citocina (pg/mL) IL-2 em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas (p≤0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....68

Figura 20 – Níveis da citocina (pg/mL) IFN-γ em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas (p≤0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....68

Figura 21 – Níveis da citocina (pg/mL) TNF- α em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....69

Figura 22 – Níveis da citocina (pg/mL) IL-4 em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....71

Figura 23 – Níveis da citocina (pg/mL) IL-5 em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....71

Figura 24 – Níveis da citocina (pg/mL) IL-10 em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações e subpopulações celulares.....42

Tabela 2 – Dados demográficos dos indivíduos clinicamente saudáveis (grupo controle) e dos pacientes portadores de tuberculose arrolados para o estudo “Análise do Potencial Preditivo de Marcadores Imunológicos e Microbiológicos na Avaliação da Resposta Terapêutica Anti-Tuberculose em Pacientes Adultos HIV-negativos com Baciloscopia Positiva para Tuberculose Pulmonar”52

Tabela 3 – Dados demográficos dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle, arrolados para o estudo “Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar”54

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Célula apresentadora de antígeno

BSA: Albumina bovina sérica

C3: Proteína do complemento

CBA: Cytometric Bead Array

CD: Grupos de diferenciação

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CONEP: Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

CpG: Citosina-poliGuanina

CR: Receptor de complemento

CTLA-4: Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico

DC-SIGN: Receptor de lectina tipo C presente em células dendríticas

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter

Fc: Fração cristalizável de imunoglobulinas

FcR: Receptor para a porção Fc de anticorpos

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FL: Fluorescência

Foxp3: Fator de transcrição *Forkhead box P3*

FSC: Dispersão frontal da luz

HLA: Antígeno leucocitário humano

HLA-DR: Antígeno leucocitário humano – locus DR

HUCAM: Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

ICAM: Molécula de adesão intercelular

IFN- γ : Interferon gama

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

LAM: Lipoarabinomananas

LPS: Lipopolissacarídeos

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MyD88: Myeloid Differentiation Primary-Response Protein 88

NF- κ B: Nuclear Transcription Factor kappa from B cells

NK: Natural Killer

NKT: Natural Killer T

NOD: Nucleotide-Binding and Oligomerisation Domain-like Receptor

PBMC: Células mononucleares de sangue periférico

PBS: Tampão Fosfato Salínico

PE: Ficoeritrina

PE-Cy5: Phycoerythrin - Cyanine-5

PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein

PIM: Phosphatidyl-myo-inositol mannoside

PPD: Derivado Protéico Purificado

RNAm: RNA mensageiro

RNI: Intermediários Reativos do Nitrogênio

ROI: Intermediários Reativos do Oxigênio

RPMI: Meio de cultivo celular

SCID: Imunodeficiência grave combinada

Sp: Proteínas Surfactante

SR: Receptores de Remoção

SSC: Dispersão lateral da luz

TCR: Receptor de Célula T

TDM: Trehalose dimycolate

TGF- β : Fator de crescimento tumoral beta

Th1: Células T CD4+ secretoras de padrão 1 de citocinas

Th2: Células T CD4+ secretoras de padrão 2 de citocinas

TLR: Receptores do Tipo Toll

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

Treg: Células T reguladoras

WHO: Organização mundial da saúde

SUMÁRIO

1 Introdução	16
1.1 A Tuberculose.....	16
1.2 Resposta Imunitária na Tuberculose.....	18
1.3 Células T reguladoras.....	25
1.4 Helmintíases Intestinais.....	29
1.5 Resposta Imunitária nas Helmintíases e Infecções Associadas.....	30
2 Objetivos	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 Pacientes; Material e Métodos	37
3.1 Pacientes	37
3.1.1 Modelo de estudo.....	37
3.1.2 Considerações éticas.....	37
3.1.3 Caracterização dos indivíduos do estudo.....	38
3.2 Material e Métodos	40
3.2.1 Avaliação hematológica.....	40
3.2.2 Imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	40
3.2.2.1 Análise da expressão de marcadores de superfície característicos de leucócitos.....	41
3.2.2.2 Determinação da Expressão de Foxp3.....	42
3.2.2.3 Estratégias de análise dos resultados obtidos pela citometria de fluxo.....	43
3.2.3 Cultura de sangue total.....	47
3.2.4 Quantificação dos níveis de citocinas em sobrenadantes de cultura.....	47
3.2.4.1 Aquisição e análise dos níveis de citocinas em sobrenadante de cultura por citometria de fluxo.....	48
3.2.5 Análises estatísticas.....	50

4 Resultados	52
4.1 Casuística.....	52
4.2 Análise de linfócitos e subpopulações linfocitárias encontrados na circulação periférica dos indivíduos estudados.....	54
4.2.1 Linfócitos e suas subpopulações.....	55
4.2.2 Linfócitos T CD4 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺	57
4.2.3 Células NK e células NKT.....	59
4.3 Avaliação da presença de eosinófilos encontrados na circulação periférica dos indivíduos estudados.....	61
4.4 Caracterização fenotípica de células T reguladoras presentes na circulação periférica dos indivíduos estudados.....	62
4.4.1 Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ ativados (CD4 ⁺ CD25 ⁺) e células T reguladoras (CD4 ⁺ CD25 ^{HIGH})	62
4.4.2 Análise da expressão do fator de transcrição Foxp3 como marcador de células T reguladoras.....	64
4.4.3 Avaliação da expressão da molécula CD127 como marcador de células T reguladoras.....	66
4.5 Perfil de citocinas durante o tratamento antituberculose em pacientes portadores de tuberculose co-infectados (TB+HELM) e não infectados (TB) com helmintos intestinais.....	67
5 Discussão	74
6 Conclusão	84
7 Referências	87

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Tuberculose

Causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, a tuberculose é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, especialmente na África e na Ásia. A Organização Mundial da Saúde estima a ocorrência global em 2006 de 9,2 milhões de novos casos e 1,7 milhões de mortes por tuberculose (WHO, 2008).

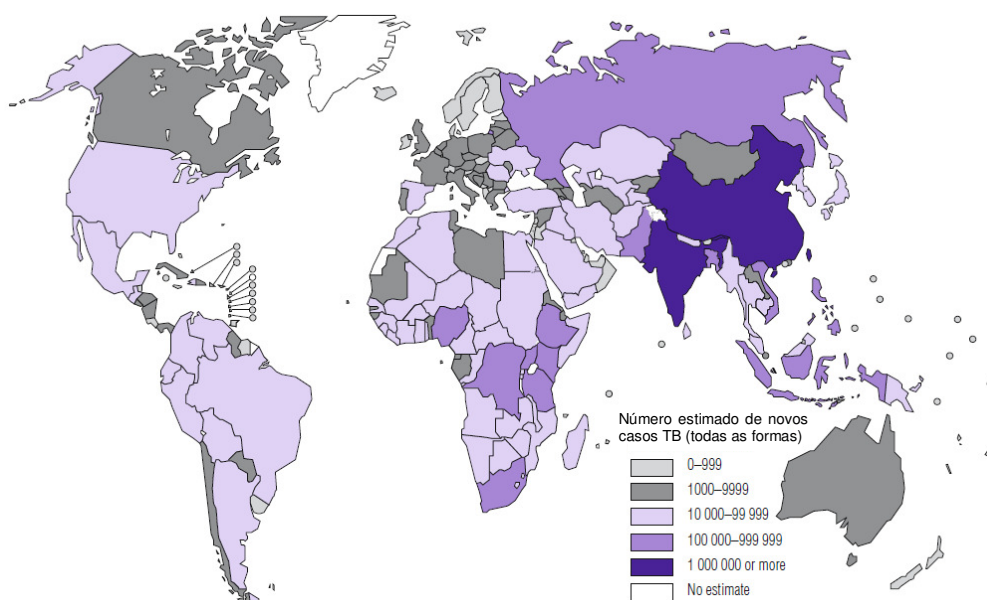


Figura 1 – Número estimado de novos casos de tuberculose (todas as formas), por país, em 2006. Fonte: WHO, 2008.

O Brasil ocupa a décima sexta posição dentre os vinte e dois países responsáveis por 80% de todos os casos de tuberculose no mundo, com uma taxa de prevalência de 55 casos por 100.000 habitantes. Em 2006, foram diagnosticados 94.000 novos casos, o que resulta em uma taxa de incidência de 50 casos por 100.000 habitantes. A mortalidade relatada neste mesmo período foi de 7.600 óbitos (WHO, 2008). No Estado do Espírito Santo foram notificados 1.301 novos casos em 2004, perfazendo uma incidência anual de 39,4 casos por 100.000 habitantes, para todas as formas de tuberculose. A incidência média do Estado está, portanto, abaixo da média nacional e da região Sudeste, que é de 53 casos por 100.000 por ano (BRASIL, 2006).

Descoberto em 1882 pelo cientista alemão Robert Koch, o *M. tuberculosis* é um bacilo aeróbio estrito, mas que possui a capacidade de se multiplicar em ambientes com baixa quantidade de oxigênio. Essa espécie é imóvel, não forma esporos e apresenta um tempo de geração longo, de aproximadamente 18 horas, em temperaturas próximas a 37°C. Compartilha com outros membros do gênero *Mycobacterium* uma parede celular de composição única, formada por 60% de lipídios, incluindo lipoarabinomananas (LAM) e ácidos micólicos, o que o torna resistente ao tratamento com várias substâncias como álcalis, ácidos, anti-sépticos e um amplo espectro de antibióticos. Tal característica é explorada pela técnica de coloração de Ziehl-Neelsen, na qual ocorre a retenção de fucsina básica mesmo na presença de álcool-ácido, conferindo-lhe a denominação de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (COLLINS; KAUFMANN, 2001; NORTH; JUNG, 2004).

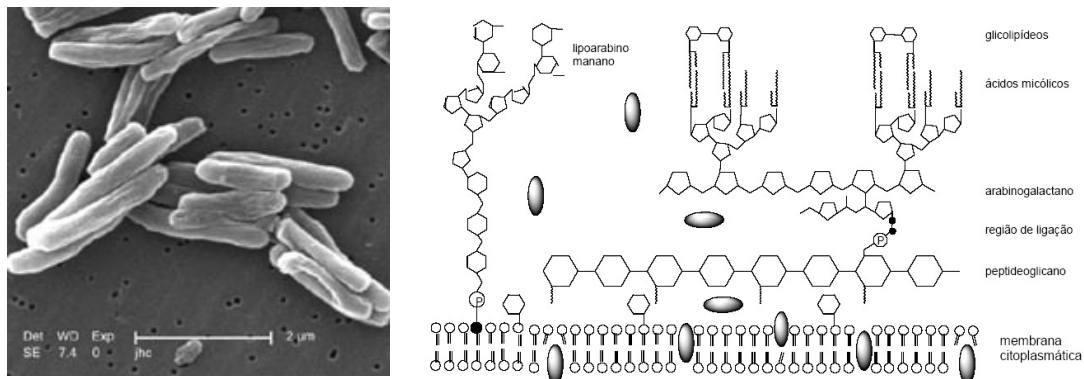


Figura 2 – Micrografia eletrônica do *M. tuberculosis* (quadro à esquerda). O quadro à direita exibe esquematicamente os principais constituintes da parede celular do gênero *Mycobacterium*.
Fonte: www.cbc.ca/story/science/national/2006/03/17/tb-who060317.html

O *M. tuberculosis* é considerado um patógeno intracelular facultativo por sobreviver e multiplicar-se no interior de macrófagos e outras células fagocíticas. Seu tempo de geração longo é responsável pela demora normalmente observada em sua detecção em meios de cultura e na ação das drogas utilizadas no tratamento.

A pesquisa bacteriológica ainda é o método escolhido, quer seja para o diagnóstico, quer seja para o controle da eficácia do tratamento da tuberculose. Esse mesmo método permite também a identificação da principal fonte de transmissão da infecção: o paciente bacilífero. O diagnóstico da tuberculose pode ser realizado por meio da pesquisa dos bacilos em amostras de espécimes clínicos (escarro, líquor,

lavado bronco-alveolar, líquido pleural, linfonodos, etc) através de exame microscópico (baciloscopia) ou através do isolamento dos mesmos em cultura. Apesar de a baciloscopia ser a forma mais rápida, simples e menos onerosa para se diagnosticar a tuberculose, sua sensibilidade é baixa, visto que apenas entre 40% e 60% dos casos de doença pulmonar são detectados por esse método. Por outro lado, a cultura convencional em meio sólido tem sensibilidade e especificidade superiores às da baciloscopia, mas requer de 3 a 6 semanas para a detecção dos casos positivos. Entretanto, a cultura é ainda o único recurso bacteriológico disponível para análise fenotípica de resistência a drogas antituberculose e como fonte de material biológico (cepas) para estudos de epidemiologia molecular (GARG et al., 2003).

Desde o final da década de 70, os regimes terapêuticos antituberculose passaram a incluir as drogas isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina, de forma combinada, em razão de suas características antimicrobianas e farmacológicas (COLE; TELENTI, 1995). Atualmente no Brasil, são recomendados pelo Ministério da Saúde quatro esquemas de tratamento da tuberculose, os quais diferem entre si quanto à indicação, duração e tipos de drogas utilizadas (CASTELO FILHO et al., 2004). Esses esquemas multiterápicos permitem, quando utilizados de forma regular e adequada, que mais de 90% dos pacientes com tuberculose sejam curados, mesmo quando os bacilos presentes tenham adquirido resistência a uma determinada droga, sendo eliminados pela ação das demais drogas (JACOBS, 1994).

1.2 Resposta Imunitária na Tuberculose

A infecção com o *M. tuberculosis* ocorre através da inalação de aerossol contendo bacilos viáveis que são eliminados a partir das lesões pulmonares de um doente, através da tosse, espirro, riso ou fala. Os bacilos se depositam nos espaços aéreos terminais e os sítios iniciais de exposição são freqüentemente os lobos médios e inferiores do pulmão, devido à maior ventilação nessas regiões. Estima-se que 30% das pessoas expostas ao bacilo se infectem. Desse total, entre 5% e 10% desenvolvem alguma forma clínica da doença (NORTH; JUNG, 2004). A tuberculose

primária se desenvolve dentro de 1 a 2 anos depois da infecção inicial e, particularmente em crianças, está associada com uma manifestação disseminada (STEWART; ROBERTSON; YOUNG, 2003). Na maioria dos casos, porém, o indivíduo infectado gera uma resposta imunitária eficiente em inibir o crescimento do patógeno resultando em uma infecção latente, com a bactéria persistindo em estado de dormência (KORBEL; SCHNEIDER; SCHAIBLE, 2008). No adulto, a tuberculose ocorre tipicamente como doença pós-primária, resultante da reativação de focos contendo a bactéria, e se manifesta predominantemente no pulmão, promovendo um extenso dano tecidual e favorecendo uma eficiente disseminação do bacilo por aerossol (STEWART; ROBERTSON; YOUNG, 2003).

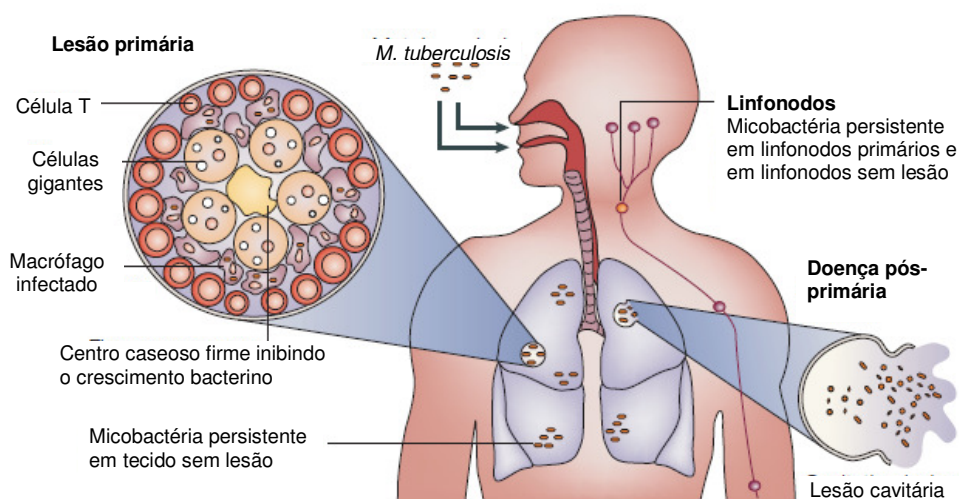


Figura 3 – Contágio da tuberculose e localização da lesão pulmonar típica.
Fonte: adaptado de STEWART; ROBERTSON; YOUNG, 2003

A lesão típica observada na tuberculose é o granuloma, normalmente apresentando características bastante específicas. No centro da lesão existem uma ou mais células gigantes multinucleadas, circundadas por diversas células epitelióides. Na periferia, encontram-se numerosos linfócitos, alguns macrófagos e poucos plasmócitos. Dois ou mais desses granulomas podem se fundir, originando nódulos macroscopicamente visíveis – os tubérculos. Frequentemente, ocorre uma necrose caseosa de extensão variável no centro do granuloma. Os mecanismos responsáveis pela necrose não são bem conhecidos, mas parecem dever-se à ação de linfotoxinas e de produtos

excretados por macrófagos, como enzimas e radicais livres (PROLLA et al., 2000).

O primeiro evento ocorrido após a entrada do *M. tuberculosis* no pulmão é sua fagocitose pelos macrófagos alveolares. Também participam do processo de captação e reconhecimento as células dendríticas e os macrófagos derivados de monócitos (HENDERSON; WATKINS; FLYNN, 1997). A variedade de estruturas presentes na superfície do *M. tuberculosis* permite que diferentes receptores nessas células sejam utilizados. Os bacilos não opsonizados são reconhecidos e englobados pelos macrófagos e células dendríticas via receptores de manose, que reconhecem resíduos de manose na superfície da micobactéria. Os receptores de complemento também participam do processo de fagocitose do bacilo. Uma vez opsonizado pelo componente C3 do complemento, o bacilo é reconhecido e endocitado via receptores 1 (CR1), 3 (CR3) e 4 (CR4) do complemento. Receptores para a porção Fc de anticorpos (FcR), CD14 e receptores de remoção (SR, de *Scavenger Receptors*) também participam da entrada do *M. tuberculosis* nas células fagocíticas, e as proteínas surfactantes A e D (Sp-A e Sp-D, de *Surfactant protein-A* e *Surfactant protein-D*) aumentam a sua captação pelos macrófagos (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002; BHATT; SALGAME, 2007).

Embora esteja bem estabelecido que a resposta imunitária adaptativa (descrita a seguir) seja o elemento crucial para o controle da infecção, essa resposta é regulada pelos eventos iniciais de reconhecimento do microrganismo invasor. Além disso, o destino do bacilo dentro do macrófago é influenciado pelos sinais produzidos em seu englobamento (STEWART; ROBERTSON; YOUNG, 2003). A fagocitose da micobactéria opsonizada por imunoglobulina G (IgG) via FcR induz a produção de Intermediários Reativos do Oxigênio (ROI, do inglês *Reactive Oxygen Intermediates*) e permite a fusão do fagossoma ao lisossoma, enquanto a ligação ao CR3 pode levar a uma entrada silenciosa, em que não ocorre a produção de ROI (COLLINS; KAUFMANN, 2001). A interação de lipoarabinomananas com os receptores DC-SIGN (*Dendritic cells-specific intracellular-adhesion-molecule-3 grabbing non-integrin*, um receptor de lectina tipo C presente em células dendríticas) gera um sinal antiinflamatório, estimulando a produção de IL-10 (STEWART; ROBERTSON; YOUNG, 2003; BHATT; SALGAME, 2007).

Juntamente com receptores fagocíticos, macrófagos e células dendríticas também expressam os receptores do tipo *Toll* (TLR, de *Toll-like receptors*), que reconhecem padrões moleculares conservados presentes nos diferentes patógenos. A ligação aos diferentes TLR induz distintos padrões de expressão gênica que não somente levam à ativação da imunidade inata, mas, também, instruem o desenvolvimento da imunidade adquirida antígeno-específica. A maioria dos sinais recebidos pelos TLR se propaga através do recrutamento da proteína adaptadora MyD88 (do inglês *myeloid differentiation primary-response protein 88*) (DOHERTY; ARDITI, 2004) e essa via de transdução de sinais culmina na translocação do fator de transcrição NF- κ B (do inglês, *Nuclear Transcription Factor kappa from B cells*) para o núcleo, estimulando a secreção de moléculas pró-inflamatórias, como IL-12, TNF- α e quimiocinas CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES) e CXCL10 (IP-10); e a ativação de macrófagos (BHATT; SALGAME, 2007).

O *M. tuberculosis* possui uma pletera de ligantes para os TLR. A lipoproteína de 19kDa (LpqH, um antígeno secretado pelo bacilo) interage especificamente com TLR2 e induz a produção de TNF- α (do inglês *Tumoral Necrosis Factor- α*) e óxido nítrico em macrófagos humanos e murinos (BRIGHTBILL et al., 1999, apud BHATT; SALGAME, 2007). Os TLR2 formam dímeros com TLR1 ou TLR6 e, além da LpqH, possuem como agonistas outras lipoproteínas micobacterianas, lipomanana, PIM (de *Phosphatidyl-myo-inositol mannoside*) e TDM (de *Trehalose dimycolate*). Os TLR4 – os receptores clássicos para lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas – promovem a ativação celular em resposta a um fator micobacteriano sensível ao calor, ainda não caracterizado (MEANS et al., 1999). Em um trabalho publicado em 2006, Chang et al. encontraram um aumento significativo dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) para TLR2, TLR1, TLR6 e TLR4 em células do sangue periférico de pacientes com tuberculose, comparados com indivíduos saudáveis. Além desses ligantes, o DNA do bacilo contém motivos CpG (Citosina-poliGuanina) que são reconhecidos pelos TLR9, e essa via de ligação se mostrou importante para a secreção de IL-12 por células dendríticas e para a indução de uma rápida resposta antimicobacteriana em macrófagos (BHATT; SALGAME, 2007).

Dentre os receptores de reconhecimento de padrões, um novo membro denominado NOD2 (*nucleotide-binding and oligomerisation domain-like receptor-2*) também pode

induzir ativação celular após infecção pelo *M. tuberculosis*, levando à produção de mediadores pró-inflamatórios. Os receptores NOD2 sinalizam tanto pela via NF- κ B quanto pela via inflamossoma/caspase1 (KORBEL; SCHNEIDER; SCHAIBLE, 2008).

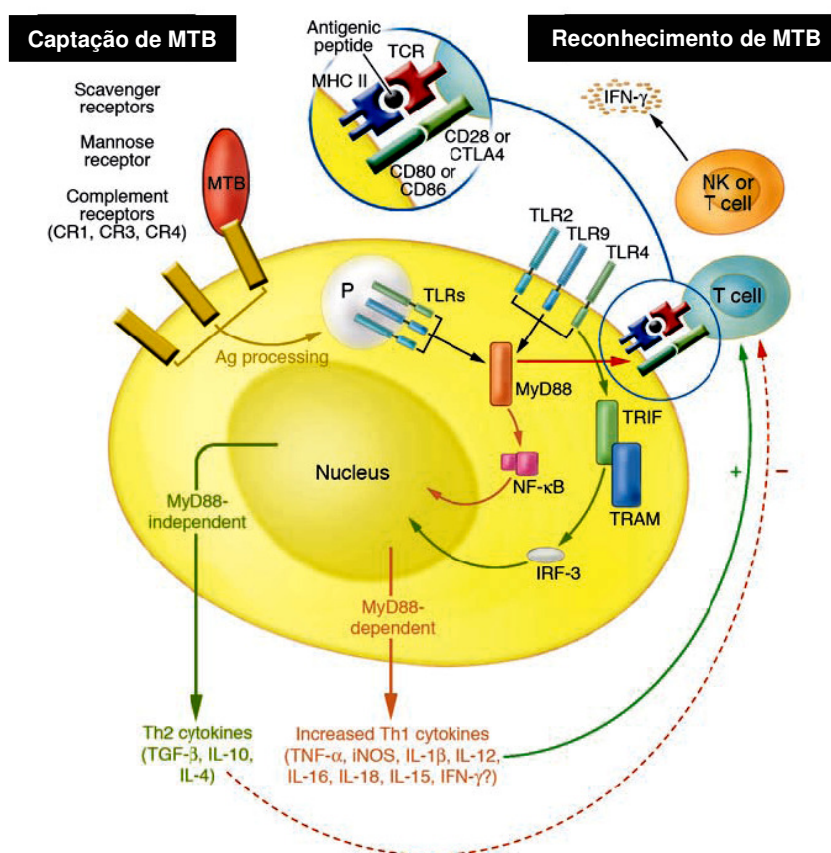


Figura 4 – Representação esquemática dos receptores presentes nas células fagocíticas envolvidos na fagocitose e no reconhecimento do *M. tuberculosis*.

Fonte: adaptado de DOHERTY; ARDITI, 2004

Além das células fagocíticas, outras células da resposta imunitária inata estão envolvidas na resposta inicial na tuberculose, dentre elas, as células NK (*natural killer*), as células NKT (*natural killer T*) e as células T $\gamma\delta$. As células NK podem tanto lisar o bacilo diretamente, bem como macrófagos infectados com o bacilo. Adicionalmente, estas células podem estar envolvidas com a produção não-específica de IFN- γ , citocina chave na resposta imunitária da tuberculose, como veremos adiante (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002; RAJA, 2004). Em 2002, Chackerian et al. sugeriram a participação de células NKT na

tuberculose. Essas células podem participar da resposta protetora pela rápida produção de IFN- γ , pela sua atividade citolítica ou pela ativação de células NK (GODFREY et al., 2000). As células T $\gamma\delta$ também participam da produção de IFN- γ na resposta inata, visto que tais células reconhecem diretamente pequenas porções protéicas da micobactéria, independente da célula apresentadora de antígeno (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002; BOOM et al., 2003). Também já foi relatada a atividade citolítica das células T $\gamma\delta$ na presença de antígenos micobacterianos, como demonstrado por Munk et al. em 1990.

Após a fagocitose e reconhecimento do *M. tuberculosis*, as células dendríticas locais tornam-se ativadas, migram para os linfonodos regionais e apresentam antígenos micobacterianos aos linfócitos T, dando início à resposta imunitária específica contra o bacilo. A localização fagossomal do *M. tuberculosis* assegura que seus antígenos tenham acesso ao mecanismo de processamento via MHC de classe II resultando na ativação de linfócitos T CD4⁺. A produção de IL-12 e IL-18 pelas células fagocíticas direciona a diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ virgens em linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1, do inglês *T helper 1*) produtores de IFN- γ , que é a citocina crucial para o controle da infecção através da ativação de macrófagos e subsequente indução de mecanismos microbicidas (LADEL et al., 1997; HENDERSON; WATKINS; FLYNN, 1997; KAUFMANN, 2001; KORBEL; SCHNEIDER; SCHAIBLE, 2008).

O controle efetivo da infecção por *M. tuberculosis* depende tanto de linfócitos T CD4⁺ quanto de linfócitos T CD8⁺. Em humanos e camundongos as células T CD4⁺ são 2 vezes mais abundantes do que as células T CD8⁺ no sítio da infecção; e a depleção de linfócitos T CD4⁺ tem um efeito prejudicial mais precoce e mais intenso do que a eliminação de linfócitos T CD8⁺ no controle da infecção em camundongos (MOGUES et al., 2001). Os linfócitos T CD8⁺ contribuem para a imunidade contra o bacilo da tuberculose por pelo menos 3 mecanismos: secreção de IFN- γ , a lise de células infectadas e a lise direta da bactéria através do mecanismo de secreção de granzima e perforina (KAUFMANN, 2001). O mecanismo de *crosspriming* mediado por vesículas apoptóticas oriundas de macrófagos infectados com micobactéria para reconhecimento e ativação de linfócitos T CD8⁺ representa uma via alternativa de ativação da resposta imunitária do hospedeiro para o controle de patógenos que não

acessam classicamente a via de processamento de MHC classe I (WINAU et al., 2006). Nesse contexto, a apoptose de macrófagos ativados induzida por TNF- α é mais um mecanismo favorável à proteção do hospedeiro (KAUFMANN, 2001; BHATT; SALGAME, 2007).

Na tuberculose, o IFN- γ é produzido ainda precocemente pelas células NK, macrófagos, linfócitos T $\gamma\delta$ e linfócitos restritos ao CD-1 e, após o desenvolvimento da resposta adaptativa pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (VAN CREVEL; OTTENHOFF; VAN DER MEER, 2002). O papel fundamental dessa citocina na resposta imunitária ao *M. tuberculosis* foi demonstrado em vários trabalhos. Cooper et al., em 1993, demonstraram que camundongos *knockout* para o gene do IFN- γ são altamente susceptíveis à infecção pelo *M. tuberculosis* (FLYNN et al., 1993; NEWPORT et al., 1996; OTTENHOFF; KUMARARATNE; CASANOVA, 1998). Da mesma forma, indivíduos com deficiência em genes do IFN- γ ou de seu receptor são mais susceptíveis a infecções micobacterianas, incluindo o *M. tuberculosis* (JOUANGUY et al., 1997; DORMAN; HOLLAND, 1998).

A função principal do IFN- γ é ativar o macrófago infectado e, dessa maneira, induzir que essa célula exerça seu papel microbicida pela ativação da produção de ROI e de RNI (Intermediários Reativos do Nitrogênio, do inglês *Reactive Oxygen Intermediates*), necessários para a eliminação do bacilo (SCHLUGER; ROM, 1998; FLYNN; CHAN, 2001). Além disso, o IFN- γ estimula o macrófago a liberar TNF- α (FLYNN et al., 1995; ROACH et al., 2002).

A infecção pelo *M. tuberculosis* leva, também, à secreção de TNF- α por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T (FLYNN; CHAN, 2001). Essa citocina exerce um papel fundamental na formação do granuloma e no controle da extensão da infecção. Camundongos deficientes para essa citocina ou para seu receptor mostram um aumento na susceptibilidade à infecção e um retardo no recrutamento inicial de monócitos para o sítio da infecção (FLYNN et al., 1995). Apesar da ativação normal de linfócitos T específicos, a resposta inflamatória é irregular, caracterizada por um acentuado influxo de neutrófilos, resultando na formação de um granuloma estruturalmente distinto daqueles classicamente descritos na tuberculose. Além disso, ocorre a formação de um grande número de lesões

necróticas e crescimento bacteriano descontrolado. Em humanos, foi observado um aumento na susceptibilidade à tuberculose após o bloqueio da ação do TNF- α com o uso de anticorpos monoclonais para tratamento de artrite reumatóide (FELDMANN; MAINI, 2001).

Apesar de serem observadas na tuberculose evidências de uma ativação crônica da resposta imunitária contra o *M. tuberculosis*, paradoxalmente, uma supressão dessa resposta também é encontrada. Alguns autores encontraram a ocorrência de hipergamaglobulinemia policlonal, aumento de níveis séricos de TNF- α e um aumento na expressão de marcadores de ativação (como o HLA-DR) nas células T circulantes de pacientes com tuberculose pulmonar (WALLIS; ELLNER, 1994; KAPLAN; FREEDMAN, 1996; VANHAM et al., 1996). Por outro lado, também é amplamente descrita na literatura a diminuição da produção de citocinas características da resposta imunitária Th1, tais como IFN- γ e IL-2, que é normalmente acompanhada de um aumento de IL-10 e TGF- β (GONG et al., 1996; VANHAM et al., 1997; ELLNER, 1997; TORRES et al., 1998; HIRSCH et al., 1999; DE LA BARRERA et al., 2004). Essa imunodepressão foi também demonstrada *in vitro* utilizando-se células obtidas de pacientes com tuberculose pulmonar que quando estimuladas com antígenos micobacterianos (derivado protéico purificado – PPD e antígeno 30Kd) apresentavam uma diminuição na produção de IL-2 e IFN- γ em relação aos níveis produzidos por células de indivíduos saudáveis. Esses mesmos ensaios evidenciaram que pacientes com tuberculose apresentavam uma resposta linfoproliferativa antígeno-específica inferior àquela observada em indivíduos saudáveis (TOOSI; KLEINHENZ; ELLNER, 1986; TORRES et al., 1994; HIRSCH et al., 1996; TORRES et al., 1998). Ademais, recentemente foi descrita a participação na patogênese da tuberculose de uma subpopulação das células T CD4⁺ que expressam altos níveis de receptores CD25 (CD4⁺CD25^{HIGH}) e possuem propriedades supressoras e são denominadas células T reguladoras (GUYOT-REVOL et al., 2006; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006; CHEN et al., 2007).

1.3 Células T reguladoras

A idéia da existência de células T “supressoras” com especificidade antigênica e que podem ativamente regular a resposta imunitária foi inicialmente sugerida no início dos anos 70. Entretanto, a complexidade inerente ao isolamento e crescimento dessas células, bem como à caracterização de sua função supressora, fizeram com que essa idéia fosse abandonada, e a maioria dos imunologistas apoiavam-se no mecanismo de deleção clonal de células T auto-reativas (seleção negativa) para explicar a tolerância imunológica. No final dos anos 90, vários grupos de pesquisa forneceram evidências da ocorrência de células T que podiam regular a atividade de outras células T *in vivo* (ANNACKER et al. 2001). Em 2001, Shimon Sakaguchi e colaboradores identificaram uma subpopulação de células T produzidas pelo timo que expressavam as proteínas de superfície CD4 e CD25 e mostravam-se naturalmente anérgicas e supressivas (SAKAGUCHI et al., 2001). A partir daí, as células supressoras renasceram como células T reguladoras (MALOY; POWRIE; 2001).

Classicamente a molécula CD25 tem sido o marcador mais utilizado para obtenção de células T CD4⁺ reguladoras, essa proteína corresponde à cadeia α do receptor para IL-2 e, portanto, é expressa em todas as células T ativadas. Além dessa molécula, as células T reguladoras expressam constitutivamente outros marcadores como: CD103, CD62L, CD45RB, CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*), GITR (*Glucocorticoid-induced TNF-Receptor-related protein*), CD127 (BANHAM; POWRIE; SURI-PAYER, 2006). Assim como o CD25, esses marcadores também não são exclusivos dessa subpopulação. Além disso, é bem provável que nem todos esses marcadores sejam críticos para a função das células T reguladoras. Por outro lado, essas moléculas podem exercer funções cruciais para a atividade dessas células como *homing* e homeostase, as quais influenciam indiretamente sua capacidade supressora *in vivo*, mas não contribuem diretamente para sua atividade inibitória.

A recente descoberta do fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3) como regulador mestre do desenvolvimento, manutenção e função das células T reguladoras veio satisfazer a demanda por um marcador específico para essa população celular (ZIEGLER, 2006; VIGNALI, COLLISON, WORKMAN, 2008). O

RNAm de Foxp3 é expresso em células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ e, ao contrário dos marcadores de superfície usados para caracterizá-las, a expressão deste RNAm não foi observada em células T convencionais que se diferenciam em Th1/Th2, nem mesmo em células NKT (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003). Adicionalmente, a expressão ectópica de Foxp3 pode converter células T virgens CD4⁺CD25⁺ em células com características fenotípicas e funcionais de células T reguladoras (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003).

Atualmente, alguns autores dividem as células T reguladoras em dois subtipos: as células T reguladoras naturais e as células T reguladoras adaptativas. Esses subtipos diferem em suas vias de desenvolvimento e em seus mecanismos de supressão. As células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ são também chamadas de células T reguladoras que ocorrem naturalmente. As células denominadas reguladoras adaptativas são subdivididas em tipo 1 (Tr1) e TH3, e são induzidas após estimulação antigênica a secretar IL-10 e TGF-β, respectivamente. Através da liberação destas citocinas elas são capazes de inibir as respostas Th1 e Th2 e emergem *in vivo* e *in vitro* após exposição crônica a antígenos ou na presença de APCs (*Antigen-Presenting Cells*) especializadas (MILLS; MCGUIRK, 2004; HELMBY; BICKLE, 2006).

De uma perspectiva funcional, as células T reguladoras utilizam basicamente quatro mecanismos de supressão que podem ser agrupados como descrito a seguir (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). O primeiro é a supressão pela ação de citocinas inibitórias, dentre as quais têm recebido destaque IL-10 e TGF-β. Alguns estudos demonstram que a supressão mediada por Tr1 ou TH3 pode ser revertida com o uso de anticorpos anti-IL-10 e anti-TGF-β (MILLS, 2004). Mais recentemente a citocina IL-35 (um novo membro da família da IL-12) tem sido descrita ser expressa preferencialmente por células T reguladoras, sendo requerida para uma atividade supressiva máxima surgiu como um fator significativo na função das células T reguladoras (COLLISON, et al., 2007, apud VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). O segundo mecanismo é a supressão por citólise. Em humanos, a lise mediada por células T reguladoras é dependente de granzima A e perforina (GROSSMAN et al., 2004). O terceiro mecanismo de supressão utilizado por células T reguladoras é o distúrbio metabólico. O mecanismo mais comumente estudado

envolve o consumo local de IL-2, por meio da alta expressão de CD25, privando as células T efectoras de uma citocina essencial para sua proliferação (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008). O quarto mecanismo tem como alvo de ação as células dendríticas. De forma complementar ao efeito direto das células T reguladoras sobre a função de células T, essas células podem também modular a maturação e/ou função de células dendríticas afetando a ativação de células T efectoras (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

É postulado que as células T reguladoras possuam ainda um mecanismo de supressão dependente de contato intercelular (MILLS, 2004). Mas, na verdade, os ensaios de *transwell* medem mais especificamente proximidade do que contato, isso porque mediadores solúveis são mais efetivos próximos à fonte que os geraram. A proximidade mantém alta a concentração de citocina local, o que pode ser importante para a função da IL-2 (KAPLAN, 1996). É importante salientar que as várias formas de atuação das células T reguladoras não são mutuamente exclusivas e a importância de cada mecanismo depende do microambiente em que a resposta imunitária está se desenvolvendo. Não somente o potencial supressor, mas também a localização apropriada determina a capacidade supressora das células T reguladoras *in vivo* (HUEHN; HAMANN, 2005).

As células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ representam aproximadamente 5-10% dos linfócitos T CD4⁺ periféricos de humanos e de camundongos (SAKAGUCHI, 2003). Essas células expressam constitutivamente vários marcadores de ativação, são pouco responsivas à estimulação *in vitro* e podem suprimir a resposta de células T CD4⁺, T CD8⁺, NK, células dendríticas (RUDENSKY; CAMPBELL, 2006) e linfócitos B (D'AMBROSIO, 2006). Embora tenham sido descobertas como células capazes de prevenir o desenvolvimento de doença autoimune órgão-específica em camundongos, atualmente as células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ adquiriram um papel mais abrangente, como reguladoras da resposta imunitária (PICCIRILLO; THORNTON, 2004). Dentro desse contexto, as células T reguladoras podem: prevenir uma resposta exacerbada em infecções intestinais (MALOY et al., 2005); mediar a tolerância a transplantes (WOOD; SAKAGUCHI, 2003); regular a resposta alérgica (UMETSU; DEKRUYFF, 2006); e participar da indução de tolerância materno-fetal (ALUVIHARE; BETZ, 2006). Entretanto, a ativação destas células nem sempre é benéfica ao hospedeiro já que pode impedir a imunidade antitumoral

(SAKAGUCHI et al., 2001) e a imunidade protetora contra patógenos (BELKAID et al. 2002; BELKAID, 2007).

A inflamação e a resposta imunitária à patógenos são reguladas por vários mecanismos supressores. Um deles é a produção de citocinas antiinflamatórias pelas células do sistema imunitário inato em resposta a produtos derivados de patógenos. Além disso, o sistema imunitário adaptativo pode também ajudar a controlar a agressão induzida pela infecção por meio da geração de células T reguladoras com especificidade antigênica (MILLS, 2004). Porém, é possível que patógenos possam utilizar a expansão de células T reguladoras para subverter a resposta imunitária protetora do hospedeiro. Esse aspecto é bem evidente no caso das infecções crônicas em que o patógeno persiste no hospedeiro porque uma resposta adequada para a sua eliminação não se desenvolve ou é suprimida. A expansão de células T reguladoras em infecções crônicas como a tuberculose (GUYOT-REVOL et al., 2006; RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006; CHEN et al., 2007) e a helmintíase (RAUSH, et al., 2008; WANG; CAO; SHI, 2008) tem sido descrita na literatura.

Em um trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo, observamos que o número de células circulantes com fenótipo CD4⁺CD25^{HIGH} em pacientes portadores de tuberculose era 3 vezes maior do que o observado em indivíduos saudáveis. Além disso, a produção de IFN- γ em culturas de células mononucleares de sangue periférico na ausência de células reguladoras era aumentada em comparação a culturas em que estas estavam presentes (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006). Corroborando esses resultados, Guyot-Revol et al. (2006) também demonstraram um aumento do número de células T reguladoras nos pacientes portadores de tuberculose e sugeriram a participação destas células na supressão da resposta Th1 observada durante esta infecção. Recentemente, outros autores também relataram que o aumento na frequência de células CD4⁺CD25⁺ ou CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foi inversamente proporcional à produção de IFN- γ em pacientes com tuberculose (CHEN et al., 2007).

1.5 Resposta Imunitária nas Helmintíases e Infecções Associadas

Helmintos apresentam uma grande diversidade biológica. Possuem como hospedeiros intermediários diferentes organismos, desde caramujos – no gênero *Schistosoma*, até moscas – no caso de vermes filarióides. A rota utilizada para a infecção também pode diferir, de infecção oral (por exemplo, *Ascaris lumbricoides*) à penetração direta na pele humana (espécies do gênero *Schistosoma*) ou picada de moscas (*Onchocerca volvulus*). Adicionalmente, helmintos podem viver dentro do hospedeiro humano em diferentes estágios de desenvolvimento, tais como ovos, larvas ou vermes adultos. Finalmente, diferentes espécies afetam diferentes órgãos, incluindo o cólon, o intestino delgado, os vasos linfáticos, os pulmões e o fígado. Apesar desse amplo espectro de características, a maior parte desses parasitos induz uma resposta imunitária adaptativa similar no hospedeiro humano. A resposta imunitária típica nas helmintíases é dependente de células com padrão Th2, caracterizada pela produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Essas citocinas induzem linfócitos B a produzirem anticorpos IgE (VAN RIET; HARTGERS; YAZDANBAKHSH, 2007), além de estimularem o desenvolvimento de células efetoras específicas, como mastócitos, eosinófilos e basófilos (ANTHONY et al., 2007). A polarização da resposta imunitária para um perfil Th2 influencia negativamente a resposta do tipo Th1 inibindo a proteção imunológica do hospedeiro frente à patógenos cuja resposta protetora é Th1-dependente (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996). As células Th2 produzem IL-10 que age sobre macrófagos bloqueando a síntese de IL-12 por essa célula e inibindo a ativação de resposta Th1. As células Th2 produzem ainda TGF- β que atua diretamente sobre as células Th1 impedindo a sua proliferação (JANEWAY et al., 2005).

As helmintíases são associadas ainda à hiporresponsividade imunitária, o que pode afetar a resposta a infecções associadas que ocorrem com alta frequência em áreas endêmicas para helmintos (VAN RIET; HARTGERS; YAZDANBAKHSH, 2007). Borkow et al. (2000), estudando pacientes com helmintíases crônicas sugeriram que a ativação persistente do sistema imunitário causada pelos helmintos está associada a uma hiporresponsividade e anergia. Essa hiporresponsividade se manifesta através de deficiência na transdução de sinais na célula T, diminuição na expressão

de CD28 com concomitante aumento na expressão de CTLA-4, redução na secreção de quimiocinas e diminuição de resposta imunitária do tipo tardia.

Adicionalmente ao estímulo de uma vigorosa resposta Th2, as infecções helmínticas podem ser acompanhadas pela expansão de células T reguladoras (SATOQUINA et al., 2002; MCKEE; PEARCE, 2004; RAUSH, et al., 2008; WANG; CAO; SHI, 2008). Em 2004, McKee e Pearce demonstraram que células CD4⁺CD25⁺ de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* produziam IL-10 e inibiam o desenvolvimento de resposta Th1 pela diminuição na secreção de IL-12, e suprimiam a proliferação de células T CD4⁺ estimuladas com antígenos do ovo do *S. mansoni*. Resultados semelhantes foram encontrados por Raush et al. (2008) estudando camundongos cronicamente infectados com o nematóide *Heligmosomoides polygyrus*. Esses autores demonstraram que células T reguladoras provenientes de camundongos infectados significativamente suprimiram a proliferação *in vitro* de células T CD4⁺ e representaram uma fonte importante de IL-10 (RAUSH et al., 2008).

A proteção na tuberculose é dependente de uma forte resposta Th1 específica para o *M. tuberculosis*, dessa forma, como dito anteriormente, a associação com infecções helmínticas pode prejudicar o desenvolvimento de uma resposta que detenha ou elimine o bacilo, tanto por afetar o equilíbrio Th1/Th2, quanto por induzir mecanismos antiinflamatórios e imunossupressivos (VAN RIET; HARTGERS; YAZDANBAKHS, 2007).

Nesse contexto, a importância da associação entre as helmintíases intestinais e as doenças micobacterianas tem sido avaliada por nosso grupo. Em um trabalho em que foram realizados exames parasitológicos de fezes em indivíduos portadores de hanseníase com diferentes formas clínicas observou-se que 30% dos indivíduos avaliados também eram portadores de helmintíase. Os resultados demonstraram ainda que a frequência de helmintos intestinais foi significativamente maior entre os pacientes com as formas multibacilares da doença (38,3%) em relação aos pacientes com formas paucibacilares (24,6%) sugerindo que a infecção por nematóides intestinais pode aumentar o risco de desenvolver uma forma mais grave da hanseníase (DINIZ et al., 2001).

Para avaliar se a tuberculose poderia estar associada à presença de helmintos intestinais, como ocorre na hanseníase, um outro estudo foi conduzido por TRISTÃO-SÁ et al. em 2002. Os resultados indicaram uma associação positiva entre a tuberculose e a infecção por helmintos. Os dados evidenciaram uma prevalência significativamente maior de nematóides intestinais em pacientes com tuberculose pulmonar (57,8%) em relação ao grupo controle (20,9%), sendo o *Strongyloides stercoralis* o helminto mais prevalente (24,5%) encontrado entre os pacientes portadores de tuberculose avaliados (TRISTÃO-SÁ et al., 2002).

Resultados publicados por nosso grupo em 2007 demonstraram que a presença de helmintíase intestinal teve um impacto negativo na resposta imunitária contra o *M. tuberculosis* em pacientes com tuberculose pulmonar, bem como na resposta clínica à terapia antituberculose (RESENDE CÓ et al., 2007). Esse trabalho evidenciou que pacientes portadores de tuberculose pulmonar associada à infecção helmíntica apresentavam, na ocasião do diagnóstico de tuberculose, uma redução significativa nos números de linfócitos totais, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e células NKT em relação aos pacientes portadores de tuberculose não infectados por helmintos intestinais (RESENDE CÓ et al., 2007). De forma semelhante, a avaliação da produção de IFN- γ em culturas de sangue total estimuladas com antígenos de *M. tuberculosis* mostrou que nos pacientes portadores de tuberculose e helmintíase a produção de IFN- γ foi menor em relação àquela observada nos pacientes com tuberculose sem helmintíase. Esse decréscimo de produção de IFN- γ pelo grupo de pacientes contendo ambas as infecções foi observado tanto no início quanto no término do tratamento antituberculose (RESENDE CÓ et al., 2007).

Visando dar continuidade a investigação dos mecanismos imunitários presentes na associação entre infecção por *M. tuberculosis* e helmintos intestinais, o objetivo do nosso estudo foi avaliar aspectos da resposta imunitária adaptativa de pacientes portadores de tuberculose pulmonar infectados ou não por helmintos intestinais.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o fenótipo celular e o perfil de citocinas apresentados por pacientes portadores de tuberculose pulmonar infectados ou não por helmintos intestinais e avaliar o impacto da presença desses parasitas na resposta imunitária específica durante o tratamento da tuberculose.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar quantitativa e fenotipicamente populações celulares de amostras de sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar apresentando ou não helmintíase intestinal e relacionar com o número de células em indivíduos clinicamente saudáveis e indivíduos portadores de helmintíase intestinal sem tuberculose;
2. Identificar e quantificar células T reguladoras através de diferentes marcadores em sangue periférico de pacientes portadores de tuberculose pulmonar apresentando ou não helmintíase intestinal e relacionar com o número de células T reguladoras em indivíduos clinicamente saudáveis e indivíduos portadores de helmintíase intestinal sem tuberculose;
3. Avaliar a produção de citocinas do padrão de resposta Th1 e Th2 em pacientes portadores de tuberculose pulmonar associada ou não à infecção por helmintos intestinais em culturas de sangue total estimuladas com antígeno de *Mycobacterium tuberculosis*.

Pacientes; Material e Métodos

3 PACIENTES; MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

3.1.1 Modelo de estudo

O presente trabalho é um estudo descritivo e os dados utilizados para a sua confecção foram obtidos durante a realização de dois estudos que ocorreram em períodos diferentes.

No primeiro estudo, intitulado “Análise do Potencial Preditivo de Marcadores Imunológicos e Microbiológicos na Avaliação da Resposta Terapêutica Antituberculose em Pacientes Adultos HIV-negativos com Baciloscopia Positiva para Tuberculose Pulmonar”, desenvolvido no período de junho de 2000 a março de 2002, foi realizada uma avaliação longitudinal de pacientes portadores de tuberculose pulmonar, infectados ou não por helmintos intestinais.

No segundo estudo, intitulado “Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar”, desenvolvido no período de junho de 2008 a janeiro de 2009, foi realizada uma avaliação transeccional de pacientes portadores de tuberculose pulmonar e/ou helmintíase intestinal. Ambos os estudos foram conduzidos pelo laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

3.1.2 Considerações éticas

O projeto intitulado “Análise do Potencial Preditivo de Marcadores Imunológicos e Microbiológicos na Avaliação da Resposta Terapêutica Antituberculose em Pacientes Adultos HIV-negativos com Baciloscopia Positiva para Tuberculose Pulmonar” obteve aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

(CONEP), parecer nº 919/2000, e do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (CEP local), memo nº 006/99. Ao CEP local foi submetido ainda o projeto intitulado “Avaliação do impacto da helmintíase intestinal na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar”, obtendo também parecer favorável (memo nº 012/07).

Todos os indivíduos arrolados para o estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.1.3 Caracterização dos indivíduos do estudo

Para a realização do primeiro projeto descrito nos itens anteriores, no período de junho de 2000 a março de 2002 foram coletadas amostras de sangue e fezes de 40 pacientes portadores de tuberculose pulmonar atendidos pelo Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM), Vitória - Espírito Santo. Como critério de inclusão no estudo, os pacientes deveriam

- a) ter idade entre 18 e 60 anos,
- b) apresentar baciloscopia e cultura de escarro positivas para *M. tuberculosis*,
- c) possuir sorologia negativa para HIV,
- d) não possuir história pregressa de tuberculose, e
- e) não ter iniciado o tratamento com as drogas tuberculostáticas.

Também foram coletadas amostras de 25 indivíduos clinicamente saudáveis para constituírem o grupo controle.

Para o segundo projeto, no período de junho de 2008 a janeiro de 2009 foram coletadas amostras de sangue e fezes de 17 pacientes portadores de sintomas sugestivos de tuberculose pulmonar atendidos pelo Centro de Pesquisa Clínica do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) ou pela Unidade de Saúde de Maruípe, no município de Vitória - Espírito Santo, ou pela Policlínica de Itacibá, no município de Cariacica - Espírito Santo. Foram utilizados os mesmos

critérios de inclusão do estudo anterior, à exceção do intervalo de idade, pois nesse estudo foram admitidos indivíduos com idade entre 14 e 60 anos.

Como grupo controle foram utilizados 12 indivíduos clinicamente saudáveis.

Após o diagnóstico clínico e laboratorial, os pacientes (de ambos os estudos) portadores de tuberculose iniciaram o tratamento com as drogas tuberculostáticas do Esquema I preconizado pelo Ministério da Saúde. Este esquema de tratamento dura 6 meses, sendo que nos primeiros 2 meses de tratamento os pacientes recebem doses diárias de isoniazida, rifampicina e pirazinamida, e nos 4 meses restantes, doses diárias de isoniazida e rifampicina (CASTELO FILHO et al., 2004).

Para avaliar a prevalência de helmintíases intestinais nos pacientes portadores de tuberculose e o impacto da infecção helmíntica na tuberculose, foram realizados exames parasitológicos de fezes em todos os indivíduos do estudo. Para o diagnóstico foram utilizadas 3 amostras de fezes para cada indivíduo coletadas em dias consecutivos. As amostras foram analisadas pelo Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da UFES utilizando 3 métodos: método de sedimentação espontânea (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934, apud DE CARLI, 2007, p. 127); método de Baermann-Moraes (BAERMANN, 1917, apud DE CARLI, 2007, p. 127); método de Kato, modificado por Katz et. al. (KATZ et al., 1972, apud DE CARLI, 2007, p. 127).

Todos os pacientes com diagnóstico positivo para helmintíase intestinal foram tratados com drogas anti-helmínticas apropriadas para cada tipo de helminto intestinal encontrado.

O exame parasitológico de fezes permitiu separar os pacientes do primeiro estudo portadores de tuberculose em dois grupos: a) pacientes portadores de tuberculose co-infectados por helmintos intestinais, denominado grupo TB + HELM (n=11) e b) pacientes portadores de tuberculose sem infecção por helmintos intestinais, denominado grupo TB (n=29). Posteriormente compararam-se os parâmetros imunológicos desses dois grupos.

Para o segundo estudo, os pacientes foram agrupados da seguinte forma, com base no exame parasitológico de fezes:

- a) aqueles com cultura positiva para *M. tuberculosis* e com resultado negativo para helmintos intestinais foram incluídos no grupo denominado TB (n=10);
- b) aqueles com cultura positiva para *M. tuberculosis* e com resultado positivo para helmintos intestinais foram incluídos no grupo denominado TB+HELM (n=3);
- c) aqueles com cultura negativa para *M. tuberculosis* e com resultado positivo para helmintos intestinais foram incluídos no grupo denominado HELM (n=5);

Posteriormente compararam-se os parâmetros imunológicos desses três grupos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Avaliação hematológica

Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação hematológica no início do estudo. A avaliação hematológica consistiu na realização de hemograma para contagem global e diferencial de leucócitos, e foi realizada pelo Laboratório Henrique Tommasi Netto Análises Clínicas Ltda. Para este foram utilizadas amostras de sangue coletadas com anticoagulante EDTA (BD Vacutainer) e os parâmetros hematológicos avaliados em contador automático de células (Coulter STKS).

3.2.2 Imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Neste trabalho, apenas os indivíduos arrolados para o estudo intitulado **“Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar”** foram submetidos à avaliação imunofenotípica dos leucócitos do sangue periférico.

Os anticorpos monoclonais foram adquiridos na BD Biosciences (San Jose, CA, USA) e na eBioscience (San Diego, CA, USA) e utilizados segundo o protocolo proposto pelo fabricante, modificado conforme descrito a seguir.

3.2.2.1 Análise da expressão de marcadores de superfície característicos de leucócitos

As populações de células do sangue periférico dos indivíduos estudados foram caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície utilizando anticorpos monoclonais específicos conjugados a fluorocromos.

Em tubos de poliestireno de 12 x 75mm foram adicionados 5µl do anticorpo monoclonal de interesse (Tabela 1). Para cada análise foram distribuídos em cada tubo 100µl de sangue periférico coletado a vácuo em tubos de 5 ml contendo EDTA (BD Vacutainer). Após homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas por 20 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos utilizando 1 ml de solução de lise comercial (BD FACS™ Lysing Solution – BD Biosciences) diluída 10 vezes em água destilada. Após nova homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e, então, submetidas à centrifugação (400 g, 7 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas utilizando 2 ml de tampão fosfato salínico contendo 1% soroalbumina bovina (pH 7,4), nas mesmas condições de centrifugação descritas anteriormente. Em seguida, as amostras foram fixadas utilizando 400µl de solução fixadora (paraformaldeído 1%, cacodilato de sódio 1,08%, NaCl 0,67%). Após um período adicional de 15 minutos a 4°C, as células foram adquiridas em FACSort™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram adquiridos 20.000 eventos por tubo. As células foram selecionadas pelo programa CellQuest™ de acordo com parâmetros de tamanho (*forward scatter* – FSC), granulosidade (*side scatter* – SSC) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *Phycoerythrin - Cyanine-5* (PE-Cy5) ou *peridinin chlorophyll protein* (PerCP) e analisados empregando diferentes estratégias de análises, como será descrito no item **3.2.2.3 – Estratégias de análise dos resultados obtidos pela citometria de fluxo.**

Tabela 1 – Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análises de populações e subpopulações celulares.

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Células-alvo
Anti-IgG1κ	FITC	P3	-
Anti-IgG2a	PE	eBM2a	-
Anti-IgG2b	PE-Cy5	eBMG2b	-
Anti-CD3	FITC	OKT3	Linfócitos T
Anti-CD3*	PerCP	SK7	Linfócitos T
Anti-CD4*	FITC	SK3	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD4	PE-Cy5	RPA-T4	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8*	PE	SK1	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD16	PE	eBioCB16	Células NK
Anti-CD19	PE	HIB19	Linfócitos B
Anti-CD25	FITC	BC96	Linfócitos T ativados Linfócitos T reguladores
Anti-CD45	PE-Cy5	HI30	Leucócitos
Anti-CD56	PE	B159	Células NK e NKT
Anti-CD127	PE	eBioRDR5	Linfócitos T reguladores
Anti-CD152 (CTLA-4)	PE	14D3	Linfócitos T ativados Linfócitos T reguladores

*Reagente BD TriTEST CD4FITC/CD8PE/CD3PerCP

3.2.2.2 Determinação da Expressão de Foxp3

Para uma investigação mais acurada da presença de células T reguladoras, avaliou-se a expressão de Foxp3, intracelular, concomitantemente com a expressão de superfície das moléculas CD4 e CD25.

O tubo contendo as células destinadas à análise da expressão de Foxp3 foi submetido ao procedimento descrito no subitem anterior para a marcação das moléculas CD4 e CD25, tendo sido interrompido, porém, na etapa prévia à

adição de solução fixadora. Após a última lavagem iniciou-se o protocolo de permeabilização celular e marcação com o anti-Foxp3 (PE, clone 236A/E7, eBioscience) utilizando-se o *Kit Foxp3 Staining Buffer set* (eBioscience, San Diego, CA, USA), segundo instruções do fabricante. Conforme esse protocolo, seguindo a lavagem, as células foram homogeneizadas em vortex, e 1 ml da solução de fixação/permeabilização (recentemente preparada) foi adicionado a cada amostra. Após nova homogeneização, as amostras foram incubadas por 30-60 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Em seqüência, as amostras foram lavadas 2 vezes pela adição de 2 ml do tampão de permeabilização 1x com posterior centrifugação (400 g, 7 minutos, temperatura ambiente) e descarte do sobrenadante. Cem microlitros do tampão de permeabilização 1x e 5 µl do anticorpo anti-Foxp3 foram consecutivamente acrescentados às amostras, com subsequente homogeneização em vortex e incubação por pelo menos 30 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. As amostras foram depois lavadas com tampão de permeabilização 1x e centrifugadas (400 g, 7 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e as amostras foram fixadas utilizando 400µl de solução fixadora (paraformaldeído 1%, cacodilato de sódio 1,08%, NaCl 0,67%). As populações celulares foram adquiridas em FACSTMSort (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Foram adquiridos 20.000 eventos por tubo. As células foram selecionadas pelo programa CellQuestTM de acordo com parâmetros de tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com PE, FITC e PE-Cy5 e analisados empregando diferentes estratégias de análises, como descrito no item **3.2.2.3 – Estratégias de análise dos resultados obtidos pela citometria de fluxo.**

3.2.2.3 Estratégias de análise dos resultados obtidos pela citometria de fluxo

Os dados obtidos através da imunofenotipagem dos leucócitos de sangue periférico foram analisados utilizando-se estratégias diferentes, dependendo do fenótipo celular estudado. Assim, empregando os recursos múltiplos do programa CellQuestTM, foram adotadas diferentes estratégias para a análise fenotípica das células obtidas, como descrito a seguir:

3.2.2.3.1 Análise convencional

Consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (FIGURA 6A). Após a seleção da região de interesse (R1), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência (FL), incluindo as modalidades FL1 *versus* FL2, FL2 *versus* FL3 e FL1 *versus* FL3 (FIGURA 6B).

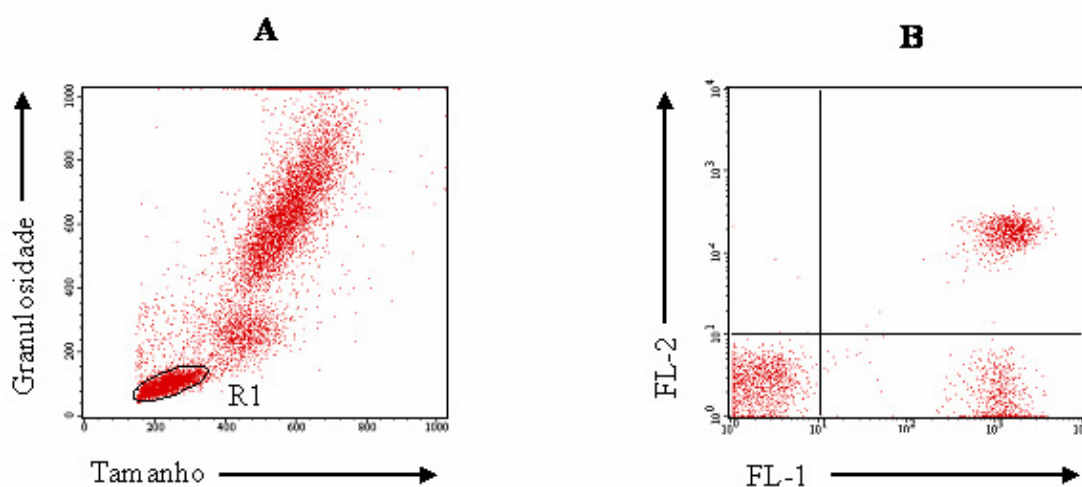


Figura 6 – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. A) Gráfico de distribuição pontual Tamanho *versus* Granulosidade utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso, os linfócitos – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD3 *versus* FL2/CD4 utilizado para quantificar o percentual das populações ou subpopulações celulares específicas em R1.

3.2.2.3.2 Análise de células T reguladoras

A análise de células T reguladoras foi realizada utilizando os marcadores de superfície CD25, CD127 e CD152 e o marcador intracelular Foxp3. A expressão de CD25 foi analisada segundo o protocolo proposto por Baecher-Allan et al. (2001), no qual as células T reguladoras são definidas como aquelas apresentando o fenótipo $CD4^+CD25^{HIGH}$. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos através de gráficos de tamanho e granulidade (Figura 7A), gráficos de FL1/CD25 e FL2/CD4 foram construídos, permitindo identificar a segregação da população $CD4^+$ em 3 subpopulações: $CD4^+CD25^-$ (R2), $CD4^+CD25^{LOW}$ (R3) e $CD4^+CD25^{HIGH}$ (R4) (Figura 7B). A população celular em R4 representa o valor percentual de células reguladoras na população de linfócitos totais considerando-se a expressão de CD25.

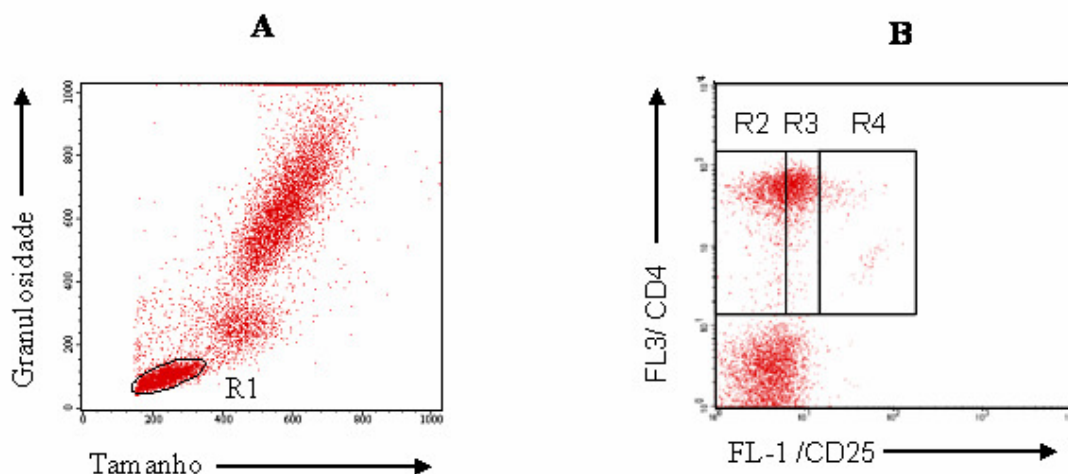


Figura 7 – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}$ por citometria de fluxo. A) Gráfico de distribuição pontual Tamanho *versus* Granulidade utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso os linfócitos – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD25 *versus* FL3/CD4 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}$ em R4.

A expressão de Foxp3 foi analisada utilizando-se a seguinte estratégia: a seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de densidade de distribuição de granulidade (SSC) *versus* FL3 (CD4 PE-Cy5) (Figura 8A). A partir de R1, gráficos de FL1/CD25 e FL2/Foxp3 foram construídos, permitindo identificar o fenótipo $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ (Figura 8B – R2) que é também utilizado para definir a população de células T reguladoras.

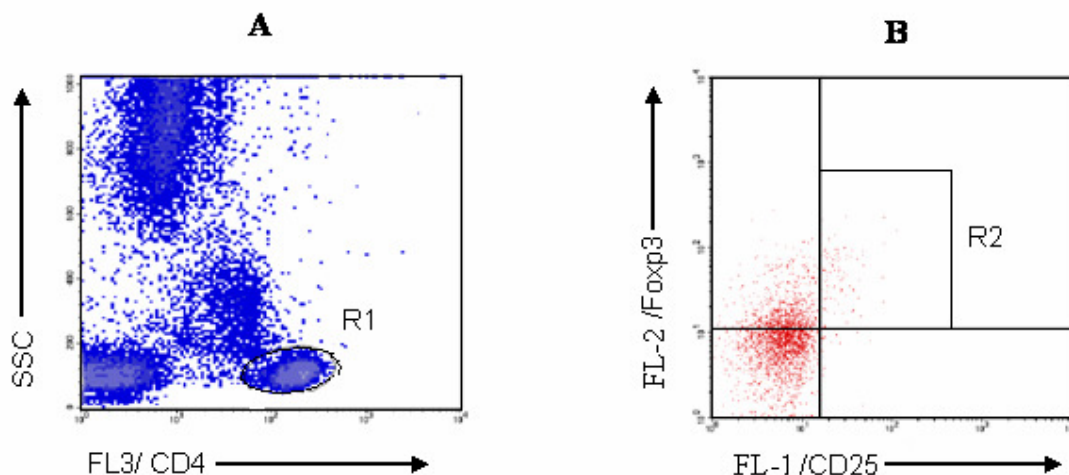


Figura 8 – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ por citometria de fluxo. A) Gráfico de densidade de distribuição de Tamanho *versus* FL3 utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso os linfócitos $CD4^+$ – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD25 *versus* FL2/Foxp3 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$ em R2.

A expressão de CD127 foi analisada utilizando-se a seguinte estratégia: a seleção da região de interesse (R1) foi realizada em gráficos de densidade de distribuição de granulosidade (SSC) *versus* FL2 (CD127 PE) (Figura 9A). A partir de R1, gráficos de FL1/CD25 e FL3/CD4 foram construídos, permitindo identificar o fenótipo $CD4^+CD25^{HIGH}CD127^{LOW}$ (Figura 9B – R2) que é também utilizado para definir a população de células T reguladoras.

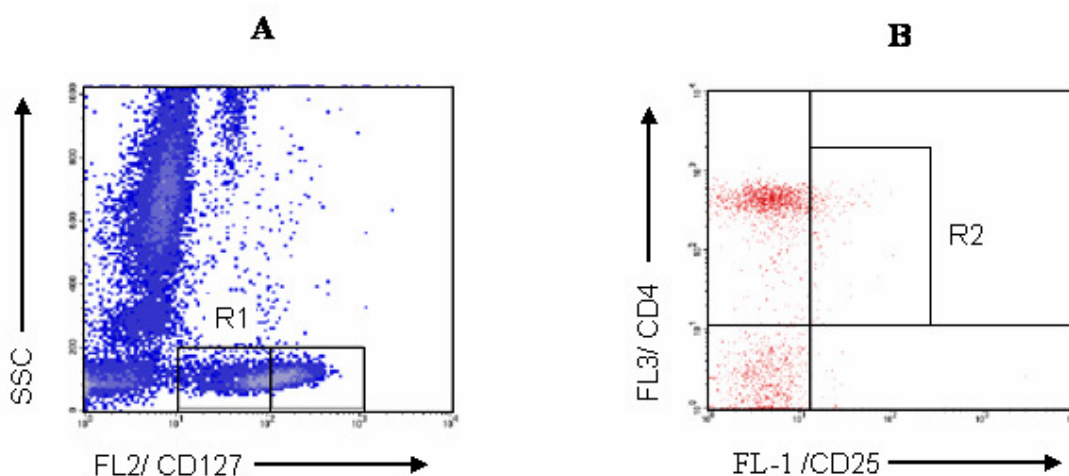


Figura 9 – Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}CD127^{LOW}$ por citometria de fluxo. A) Gráfico de densidade de distribuição de Tamanho *versus* FL2 utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso os linfócitos $CD127^{LOW}$ – R1. B) Gráfico de distribuição pontual FL1/CD25 *versus* FL3/CD4 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}CD127^{LOW}$ em R2.

3.2.3 Cultura de sangue total

Neste trabalho, apenas os indivíduos arrolados para o estudo intitulado “**Análise do Potencial Preditivo de Marcadores Imunológicos e Microbiológicos na Avaliação da Resposta Terapêutica Antituberculose em Pacientes Adultos HIV-negativos com Baciloscopia Positiva para Tuberculose Pulmonar**” foram submetidos à quantificação dos níveis de citocinas em sobrenadantes de culturas de sangue total.

Um volume de 0,5 mL de sangue heparinizado foi diluído em 4,5 mL de RPMI suplementado com penicilina (50UI/mL), estreptomicina (50µg/mL) e L-glutamina (2mM). Alíquotas de 1 mL desta mistura foram distribuídas em 4 poços de uma placa de cultura de tecidos, estéril, de 24 poços, com fundo chato. Em dois poços, adicionou-se 5 µL de filtrado de cultura de *Mycobacterium tuberculosis* (5µg/mL). Os dois poços restantes não foram estimulados, sendo adicionado apenas meio de cultura (controles negativos). A placa foi, então, incubada em estufa úmida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Os sobrenadantes das culturas livres de células foram coletados após 5 dias de incubação e armazenados a -70°C até o uso para determinação do nível de citocinas.

3.2.4 Quantificação dos níveis de citocinas em sobrenadantes de cultura

Os níveis de IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 foram quantificados em sobrenadantes de culturas de amostras de sangue coletadas antes do tratamento (dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (mês 6). A determinação dos níveis de citocinas foi realizada através de Citometria de Fluxo, utilizando-se o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) com o *Human Th1/Th2 Cytokine Kit* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante modificado como descrito a seguir (gentilmente cedido pelo Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ-MG).

Alíquotas de sobrenadante de cultura foram descongeladas em banho-maria a 37°C e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos e reservadas. Uma mistura das esferas de captura conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 (*Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit*) foi preparada no volume desejado e, posteriormente, alíquotas de 15 μ l dessa mistura foram adicionadas em tubos de poliestireno de 12 x 75mm. Em seguida, foram acrescentadas alíquotas de 25 μ l de padrões previamente preparados em diluições seriadas com diluente G (uma solução protéica tamponada, *Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit*) nas concentrações 5000pg/ml (1:1), 2500pg/ml (1:2), 1250pg/ml (1:4), 625pg/ml (1:8), 312,5pg/ml (1:16), 156pg/ml (1:32), 80pg/ml (1:64), 40pg/ml (1:128) e 20pg/ml (1:256). Uma alíquota de 25 μ L contendo apenas o diluente G foi utilizada como controle negativo da reação. Vinte e cinco microlitros do sobrenadante de cultura (diluído 30 vezes em diluente G) foram coletados e transferidos para os mesmos tubos. Por último, foram adicionados 18 μ l do reagente de detecção – uma mistura de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (reagente B – *Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit*) e os tubos foram homogeneizados e incubados por 90 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L de tampão de lavagem F (tampão fostato salínico, *Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit*), centrifugadas a 600 x g, por 7 minutos a 18°C, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 μ l de reagente F e imediatamente adquiridas no citômetro de fluxo FACSTM (BD Biosciences).

3.2.4.1 Aquisição e análise dos níveis de citocinas em sobrenadante de cultura por citometria de fluxo

Para aquisição das amostras, o aparelho foi calibrado utilizando esferas de calibração (*Cytometer setup beads – Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit*) (BD Biosciences) segundo protocolo sugerido pelo fabricante. O ajuste do aparelho consiste em definir os parâmetros de tamanho e granulosidade adequados para o

posicionamento das esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulosidade. Após a seleção das esferas, procedeu-se o ajuste da intensidade de FL3 para permitir a segregação das esferas apresentando diferentes intensidades de fluorescência em histogramas unidimensionais. Para cada tubo processado foram adquiridos 1800 eventos dentro da região selecionada R1 (300 eventos por citocina testada) em um gráfico de FSC *versus* SSC (Figura 10).

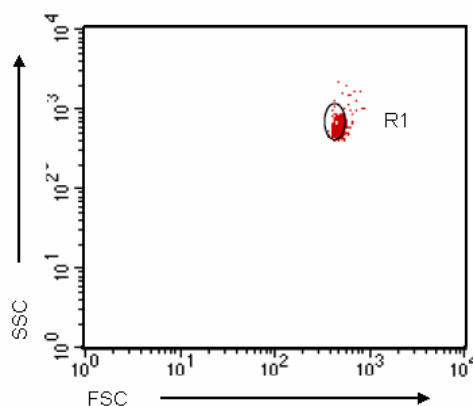


Figura 10 – Gráfico de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) mostrando o posicionamento das esferas de captura na região R1.

As seis citocinas analisadas foram separadas e quantificadas em gráficos de intensidade média de fluorescências FL-2 x FL-3, nos quais as seis esferas com intensidades de fluorescência distintas foram separadas no eixo Y (FL-3) e quantificadas através do deslocamento das mesmas no eixo X (FL-2) (Figuras 11A e 11B).

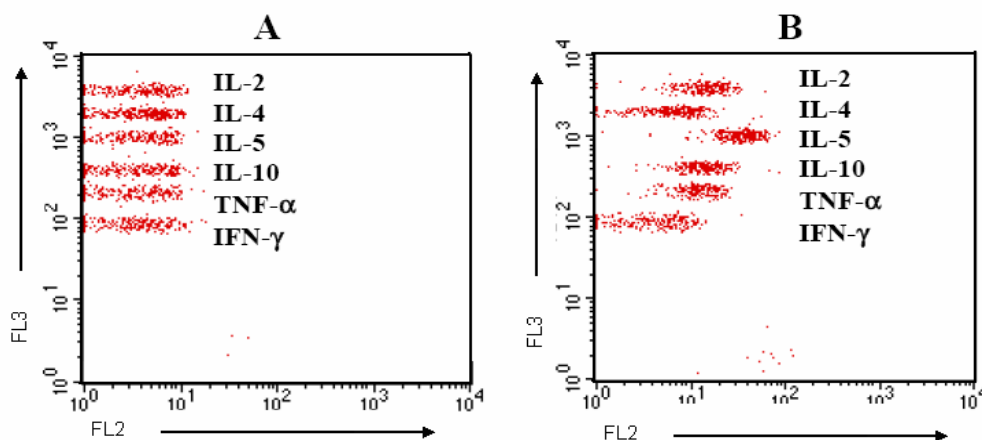


Figura 11 – Gráfico de fluorescência 2 (FL2) *versus* fluorescência 3 (FL3). A) Representa a leitura do controle negativo. B) Representa a leitura positiva de uma amostra de sobrenadante de cultura.

A análise dos dados foi feita com o BD CBA *Analysis Software*TM (BD Biosciences) por meio de curvas de calibração obtidas com os padrões de citocinas cujas concentrações eram conhecidas (20pg/ml – 5000pg/ml).. Após a construção das curvas, a concentração dos analitos na amostra foi determinada em pg/mL, a partir dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI) obtidos na leitura do canal FL2. Um modelo de ajuste através da curva de 4-parâmetros logísticos foi utilizado, o que permitiu o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras que não caíam dentro dos limites da curva padrão. Quando a amostra apresentou uma concentração de citocina inferior ao limite de detecção, o valor zero foi usado.

3.2.5 Análises estatísticas

Todos os valores são expressos como média \pm erro padrão da média. O Teste *t* de Student foi utilizado para a comparação das médias de dois grupos de indivíduos com variáveis apresentando distribuições normais, denominados dados paramétricos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa STATATM 8.2 para Windows (STATA Corporation, College Station, TX, USA). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Casuística

Sessenta e cinco pacientes aceitaram participar do estudo intitulado “**Análise do Potencial Preditivo de Marcadores Imunológicos e Microbiológicos na Avaliação da Resposta Terapêutica Antituberculose em Pacientes Adultos HIV-negativos com Baciloscopia Positiva para Tuberculose Pulmonar**”, sendo que desses, 40 eram pacientes portadores de tuberculose pulmonar, com confirmação clínica e radiológica (grupo TB), e 25 eram indivíduos clinicamente saudáveis (grupo controle). O exame parasitológico de fezes revelou que 11 (27,5%) dos 40 pacientes portadores de tuberculose também eram portadores de alguma espécie de helminto intestinal (grupo TB + HELM), e que, dentre os pacientes com ambas as infecções, o helminto mais freqüente foi o *Strongyloides stercoralis*, encontrado em 72,7% dos casos, seguido pelo *Trichuris trichiura* (18,2%) e *Ascaris lumbricoides* (9,1%). A Tabela 2 demonstra os dados demográficos dos indivíduos arrolados para esse estudo.

Tabela 2 – Dados demográficos dos indivíduos clinicamente saudáveis (grupo controle) e dos pacientes portadores de tuberculose arrolados para o estudo “Análise do Potencial Preditivo de Marcadores Imunológicos e Microbiológicos na Avaliação da Resposta Terapêutica Antituberculose em Pacientes Adultos HIV-negativos com Baciloscopia Positiva para Tuberculose Pulmonar”.

Grupo	Número de Indivíduos			Idade (anos)
	Homens	Mulheres	Total	Mediana/Intervalo
TB	31	9	40	35,0 (18-53)
Controle	15	10	25	26,0 (20-50)

Neste trabalho, os indivíduos arrolados para o estudo citado acima foram submetidos à quantificação dos níveis de citocinas em sobrenadantes de culturas de sangue total. Desses indivíduos, os que compuseram os grupos TB, TB + HELM e controle foram assim distribuídos:

Grupo TB: 12 indivíduos;

Grupo TB + HELM: 8 indivíduos;

Grupo controle: 8 indivíduos.

Outros vinte e nove indivíduos aceitaram participar do estudo intitulado “**Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar**”, os quais foram agrupados segundo o resultado do exame parasitológico de fezes da seguinte forma:

Grupo TB: 10 pacientes portadores de tuberculose pulmonar, com confirmação clínica e laboratorial, e resultado negativo no exame parasitológico de fezes;

Grupo TB + HELM: 3 pacientes portadores de tuberculose pulmonar, com confirmação clínica e laboratorial, e resultado positivo no exame parasitológico de fezes para algum helminto intestinal. Cada paciente estava infectado por apenas um helminto, e foram encontradas as espécies *Strongyloides stercoralis* (33.3%), *Hymenolepis nana* (33.3%) e *Enterobius vermicularis* (33.3%). Considerando o total de indivíduos com tuberculose arrolados (n=13), encontramos uma prevalência de helmintíase intestinal de aproximadamente 23%;

Grupo HELM: 5 pacientes com baciloscopia e cultura de escarro negativos (não portadores de tuberculose pulmonar) e resultado positivo no exame parasitológico de fezes para algum helminto intestinal. A espécie mais freqüente foi o *Strongyloides stercoralis*, encontrado em 3 pacientes (60% dos casos). O *Schistosoma mansoni* foi encontrado em 2 pacientes, sendo que um deles também estava infectado pelo *Strongyloides stercoralis*. A espécie *Enterobius vermicularis* foi encontrada em 1 paciente;

Grupo controle: 12 indivíduos clinicamente saudáveis e com resultado negativo no exame parasitológico de fezes.

A Tabela 3 demonstra os dados demográficos dos indivíduos arrolados para esse estudo.

Tabela 3 – Dados demográficos dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle, arrolados para o estudo “Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar”.

Grupo	Número de Indivíduos			Idade (anos)
	Homens	Mulheres	Total	Mediana/Intervalo
TB	5	5	10	34,0 (22-56)
TB + HELM	3	-	3	24,0 (18-38)
HELM	4	1	5	31,0 (14-38)
Controle	8	4	12	49,5 (20-60)

Cinquenta e três pacientes com tuberculose foram arrolados para os dois estudos sendo que 14 deles também eram portadores de infecção por helmintos intestinais (26,4%).

4.2 Análise de linfócitos e subpopulações linfocitárias encontrados na circulação periférica dos indivíduos estudados

Neste trabalho, apenas os indivíduos arrolados para o estudo intitulado “Avaliação do impacto da helmintíase intestinal, na resposta clínica, microbiológica e imunológica em pacientes com tuberculose pulmonar” foram submetidos à avaliação imunofenotípica dos leucócitos do sangue periférico.

4.2.1 Linfócitos e suas subpopulações

Os números de linfócitos totais e dos subtipos T (CD3⁺) e B (CD19⁺) encontrados na circulação periférica dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle estão representados na Figura 12. A análise desses resultados mostrou que os indivíduos do grupo TB (portadores de tuberculose pulmonar) apresentaram uma redução significativa no número de linfócitos totais em relação ao grupo controle (Figura 12A). Os resultados mostraram ainda que o grupo TB apresentou um número de linfócitos T significativamente reduzido quando comparado ao grupo controle ($p=0,027$) (Figura 12B). Entretanto, não houve diferença no número de linfócitos B desse grupo em relação ao grupo controle (Figura 12C).

Para avaliar o efeito das helmintíases intestinais no perfil celular dos pacientes portadores de tuberculose pulmonar, os números de linfócitos e suas subpopulações foram comparados entre os grupos TB e TB + HELM (pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal). Os resultados encontrados para o grupo TB + HELM foram comparados ainda ao grupo de pacientes portadores de helmintíase intestinal sem tuberculose (grupo HELM) e ao grupo controle.

O grupo TB + HELM não apresentou diferença significativa nos números de linfócitos totais, linfócitos T e linfócitos B em relação ao grupo controle, ao grupo TB e ao grupo HELM (Figuras 12A, 12B e 12C). O mesmo ocorreu para os grupos HELM e controle quando comparados entre si (figuras 12A, 12B e 12C).

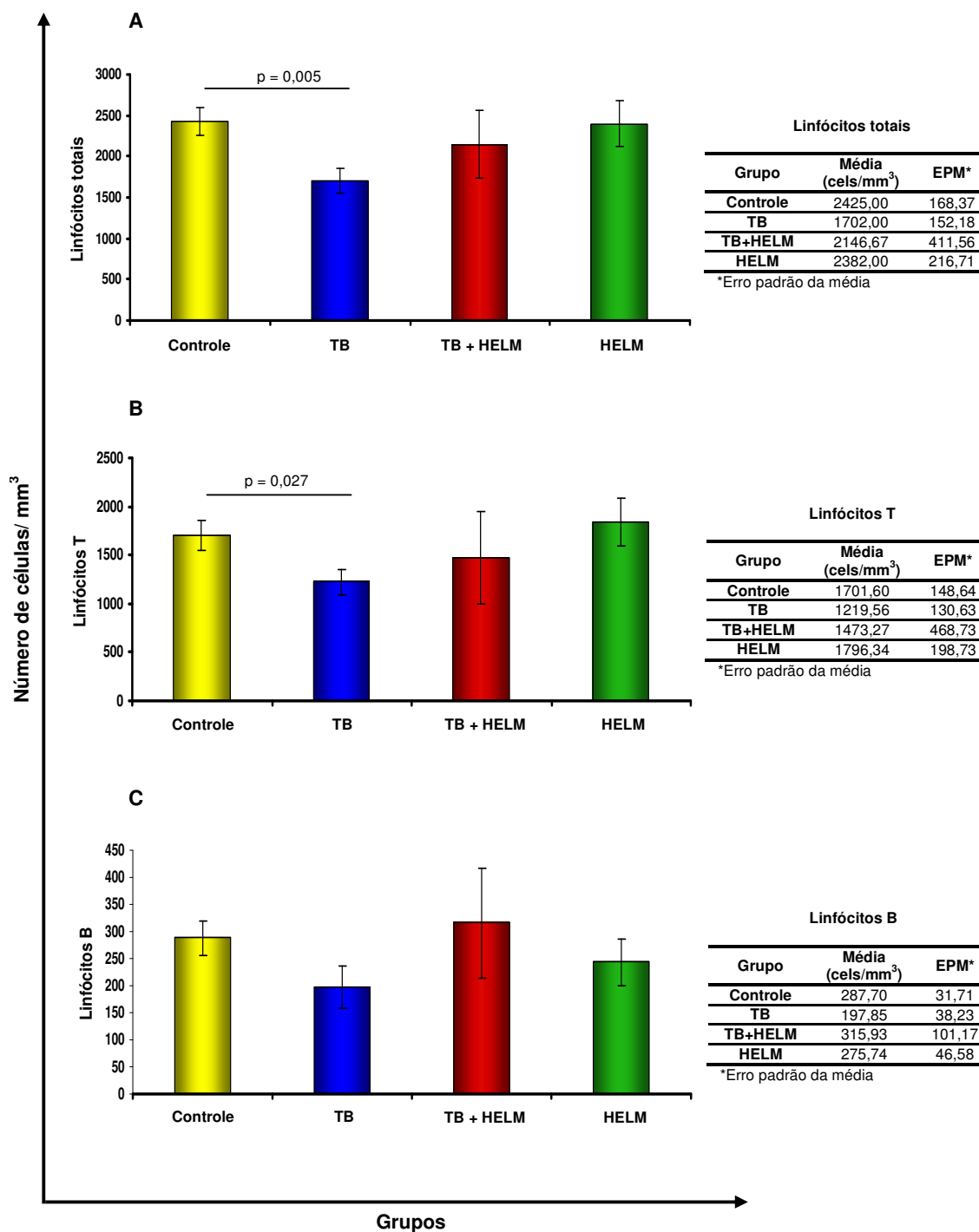


Figura 12 – Números absolutos (células/mm³) de A) linfócitos totais; B) linfócitos T e C) linfócitos B presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■; n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas (p<0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

4.2.2 Linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺

Os resultados dos números de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ encontrados na circulação periférica dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle são apresentados na Figura 13. A análise desses resultados evidenciou que os pacientes portadores de tuberculose não infectados por helmintos intestinais (grupo TB) apresentaram uma redução significativa no número de linfócitos T CD8⁺ (Figura 13B), em relação ao grupo controle. De maneira semelhante, a média do número de linfócitos T CD4⁺ foi menor no grupo TB em relação ao grupo controle, porém essa redução não foi significativa (Figura 13A).

Não foram identificadas diferenças significativas nas concentrações dessas subpopulações linfocitárias nos outros grupos estudados quando os mesmos foram comparados entre si e com o grupo controle (Figuras 13A e 13B).

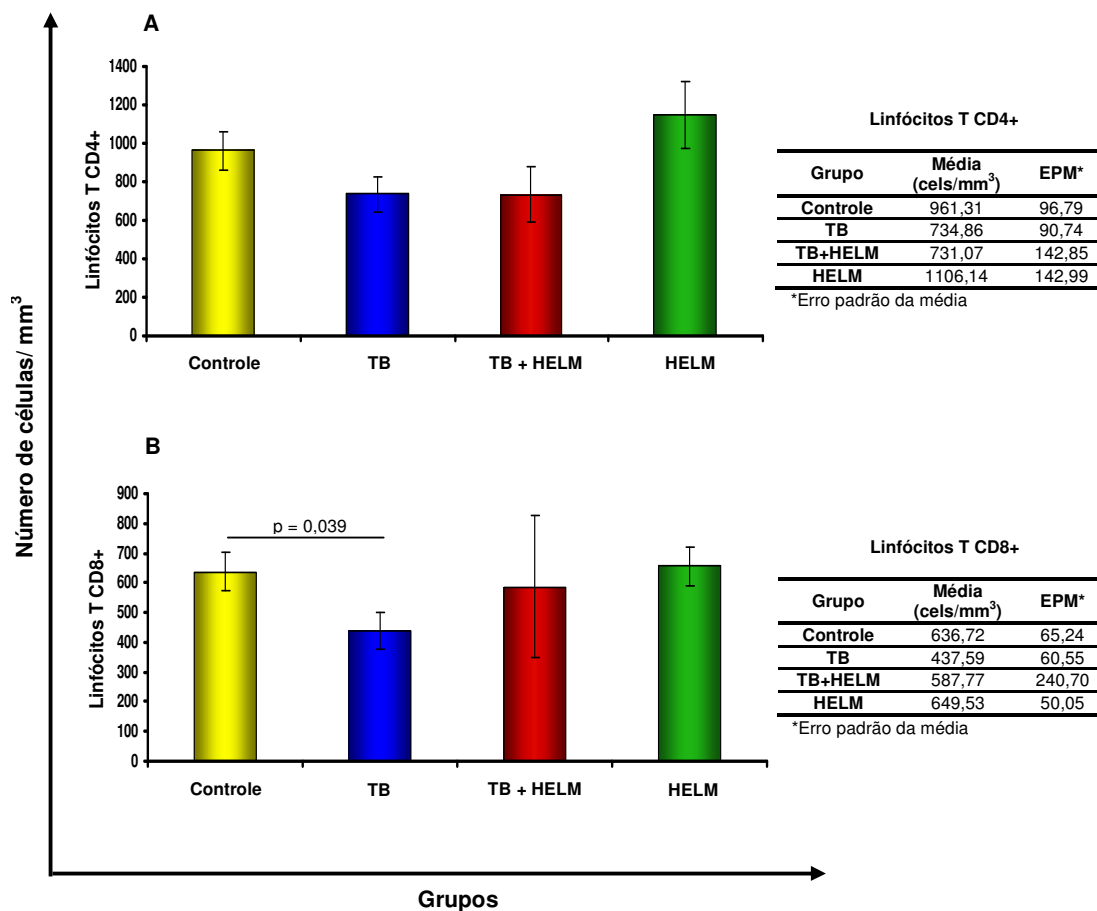


Figura 13 – Números absolutos (células/mm³) de A) linfócitos T CD4⁺ e B) linfócitos T CD8⁺ presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

4.2.3 Células NK e células NKT

A Figura 14 mostra os números de células NK (CD16⁺CD56⁺) e de células NKT (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) encontrados na circulação periférica dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle. A análise desses dados revelou que os pacientes do grupo TB apresentaram uma redução significativa no número de células NK (Figura 14A) e de células NKT (Figura 14B) em relação ao grupo controle. Da mesma forma, quando os grupos TB e TB + HELM foram comparados entre si, o número dessas populações celulares também se mostrou reduzido significativamente no grupo TB (Figuras 14A e 14B). O grupo TB + HELM não apresentou diferença significativa nos números de células NK e células NKT quando comparado ao grupo controle (Figuras 14A e 14B) e ao grupo de pacientes sem tuberculose e portadores de helmintíase intestinal (HELM) (Figuras 14A e 14B).

A análise dos números de células NK e células NKT (Figuras 14A e 14B) mostrou também a ausência de diferença significativa quanto ao número dessas populações celulares quando o grupo HELM é comparado aos grupos controle e TB + HELM.

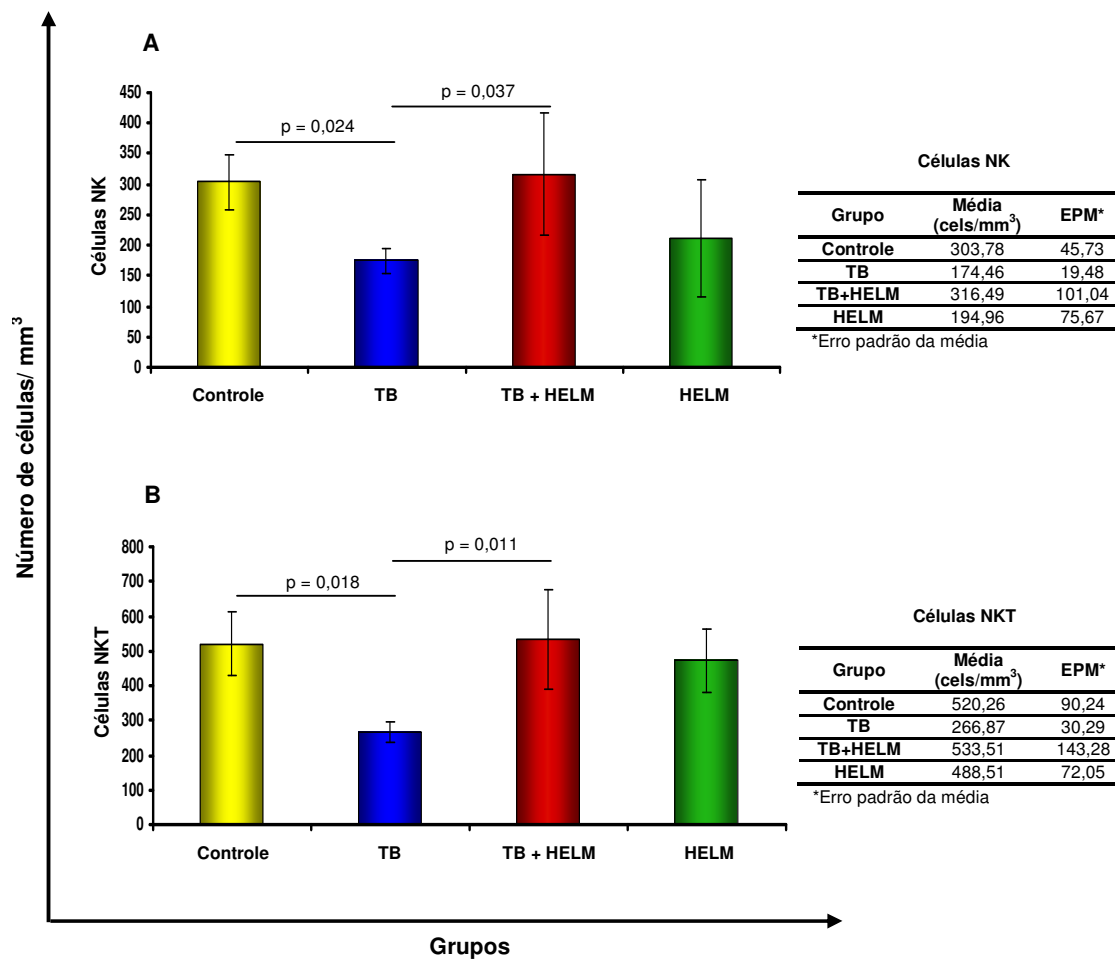


Figura 14 – Números absolutos (células/mm³) de A) células NK e B) células NKT presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

4.3 Avaliação da presença de eosinófilos encontrados na circulação periférica dos indivíduos estudados

Os números de eosinófilos encontrados na circulação periférica dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle são apresentados na Figura 15.

A análise desses resultados evidenciou a presença de concentrações significativamente aumentadas de eosinófilos nos grupos de indivíduos com helmintíase intestinal (grupo TB + HELM e grupo HELM) quando comparados a indivíduos saudáveis (Figura 15).

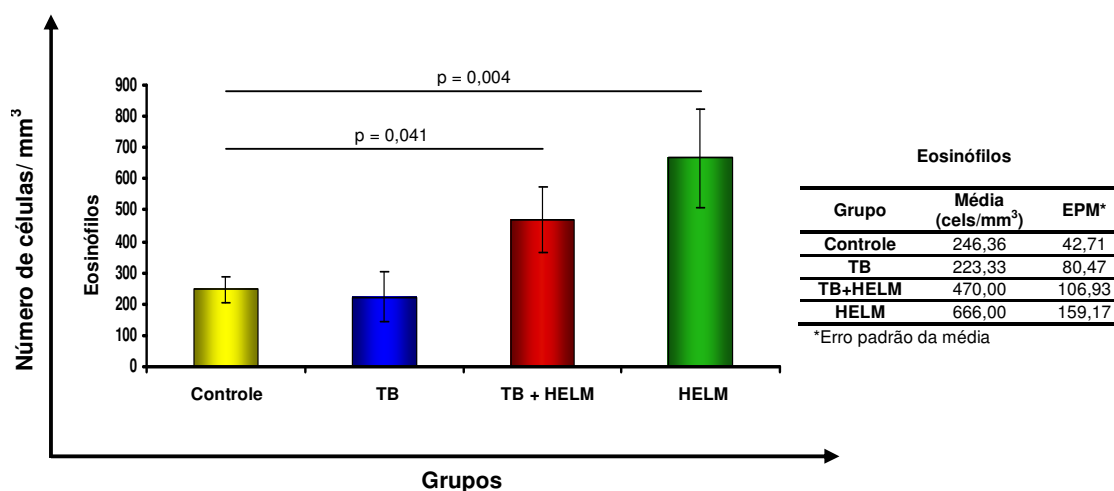


Figura 15 – Números absolutos (células/mm³) de eosinófilos encontrados na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal e sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas (p<0,05) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

4.4 Caracterização fenotípica de células T reguladoras presentes na circulação periférica dos indivíduos estudados

4.4.1 Frequência de linfócitos T CD4⁺ ativados (CD4⁺CD25⁺) e células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH})

A frequência de linfócitos T CD4⁺ que co-expressam CD25 (linfócitos T CD4⁺CD25⁺ - linfócitos T CD4⁺ ativados) no total de linfócitos T CD4⁺ presentes na circulação periférica dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle está representada na Figura 16A. A análise dos resultados demonstrou que não houve diferença significativa na frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ entre os grupos estudados (Figura 16A).

A análise da frequência de linfócitos T CD4⁺CD25^{HIGH} (células T reguladoras) no total de linfócitos T CD4⁺ na circulação periférica dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle (Figura 16B) demonstrou que os indivíduos do grupo TB não apresentaram diferença significativa no número de linfócitos T CD4⁺CD25^{HIGH} quando comparados aos indivíduos do grupo controle, apesar de poder ser observado no grupo TB uma frequência média dessas células superior àquela do grupo controle (Figura 16B). Por outro lado, a análise do grupo TB + HELM mostrou que esses indivíduos apresentaram uma frequência de linfócitos T CD4⁺CD25^{HIGH} significativamente maior que o grupo controle ($p=0,053$) (Figura 16B). Quando a frequência dessas células foi comparada entre os grupos TB e TB + HELM, não foi encontrada diferença significativa entre eles (Figura 16B).

O grupo HELM apresentou uma frequência de linfócitos T CD4⁺CD25^{HIGH} inferior ao valor encontrado para o grupo TB + HELM (Figura 16B), contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,069$).

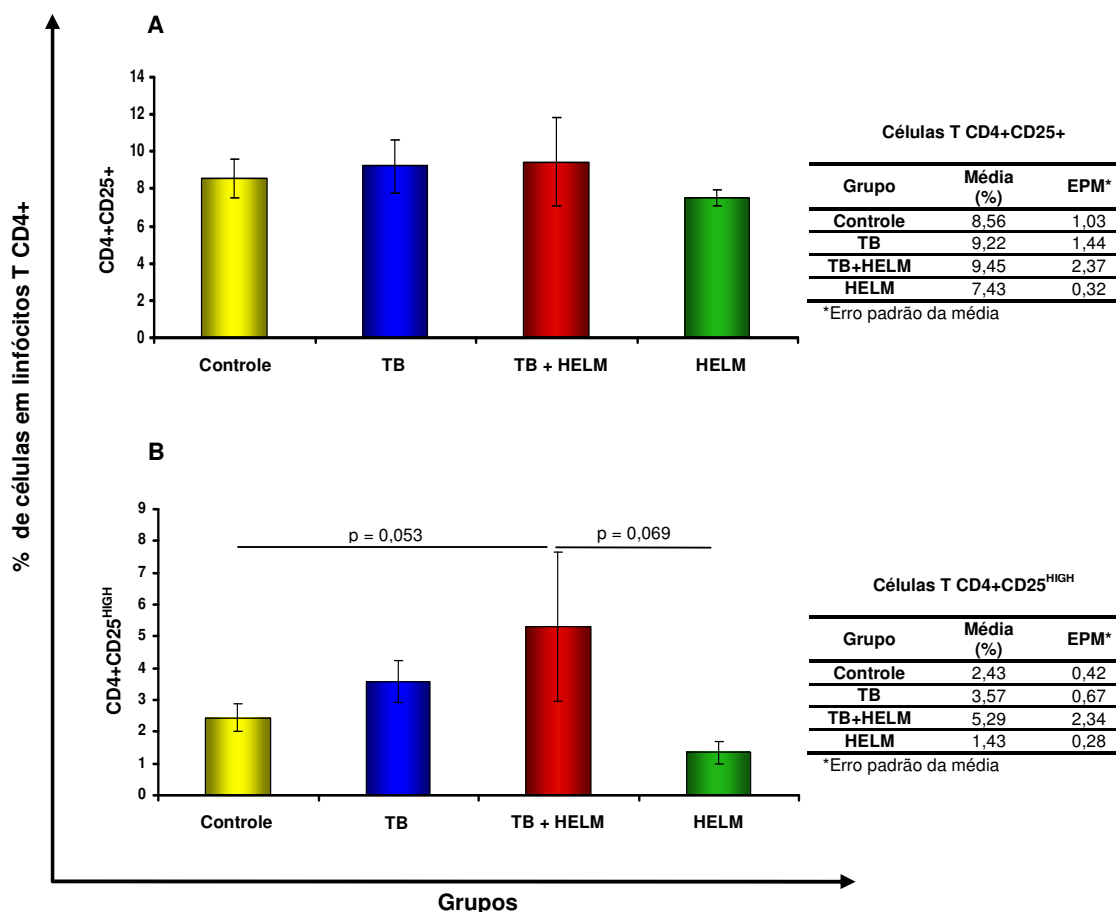


Figura 16 – Frequência de A) células CD4⁺CD25⁺ e B) células CD4⁺CD25^{HIGH} presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal e sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

4.4.2 Análise da expressão do fator de transcrição Foxp3 como marcador de células T reguladoras

O fator de transcrição *forkhead box P3* (Foxp3) é considerado o regulador mestre do desenvolvimento, manutenção e função das células T reguladoras, e sua expressão é utilizada como um marcador específico dessa população celular (VIGNALI, COLLISON, WORKMAN, 2008). Dessa forma, o fenótipo CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ também foi pesquisado para avaliar a presença de células T reguladoras nos indivíduos estudados.

O número de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ encontrado na circulação periférica dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle está representado na Figura 17A. A avaliação desses resultados demonstrou que não houve diferença significativa no número de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ entre os grupos TB e controle (Figura 17A). Por outro lado, o grupo TB + HELM apresentou um número significativamente maior de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em relação ao grupo controle (Figura 17A), resultado este que concorda com aquele encontrado para linfócitos T CD4⁺CD25^{HIGH}. Quando comparado ao grupo TB, o valor médio dessas células no grupo TB + HELM mostrou-se elevado, entretanto, esse aumento não foi significativo (Figura 17A). Ainda, em comparação com o grupo HELM o número de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ no grupo TB + HELM foi significativamente maior (Figura 17A).

A Figura 17B mostra a freqüência das células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ encontrada na circulação periférica dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle. Os resultados apresentados em valor percentual (freqüência – Figura 17B) mostraram-se concordantes com os valores absolutos (Figura 17A), exceto para a relação entre os grupos TB + HELM e HELM. A comparação dos valores absolutos desses grupos demonstrou um aumento significativo das células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ no grupo TB + HELM (Figura 17A), enquanto a comparação das freqüências dessas células não demonstrou diferença significativa entre eles, apesar de ter havido uma tendência de aumento no grupo TB + HELM (Figura 17B).

A análise da presença de células T reguladoras nos grupos estudados, utilizando tanto o fenótipo CD4⁺CD25^{HIGH} quanto o fenótipo CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺, sugere que

o aumento dessa população celular deve ter ocorrido como consequência da associação entre a infecção por *M. tuberculosis* e a infecção por helminto intestinal.

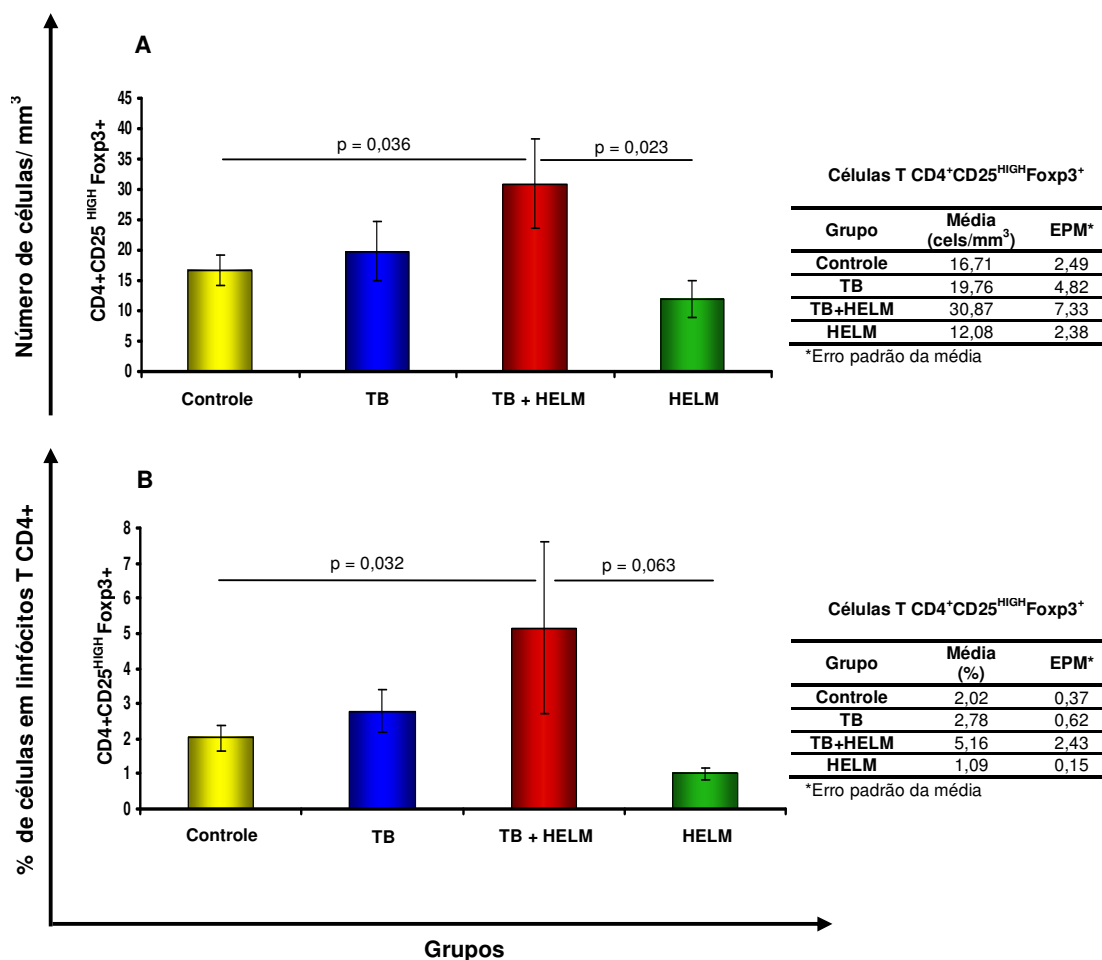


Figura 17 – Detecção do fator de transcrição Foxp3. A) Número absoluto (células/mm³) de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ e B) freqüência de células CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal e sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

4.4.3 Avaliação da expressão da molécula CD127 como marcador de células T reguladoras

A frequência de linfócitos T $CD4^+CD25^{HIGH}CD127^{LOW/-}$ encontrada na população de células T $CD4^+$ presente na circulação periférica dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM, HELM e controle são apresentados na Figura 18.

Em oposição aos resultados encontrados para os outros marcadores de células T reguladoras testados, não foram evidenciadas diferenças significativas na frequência de células T $CD4^+CD25^{HIGH}CD127^{LOW/-}$ entre os grupos estudados (Figura 18).

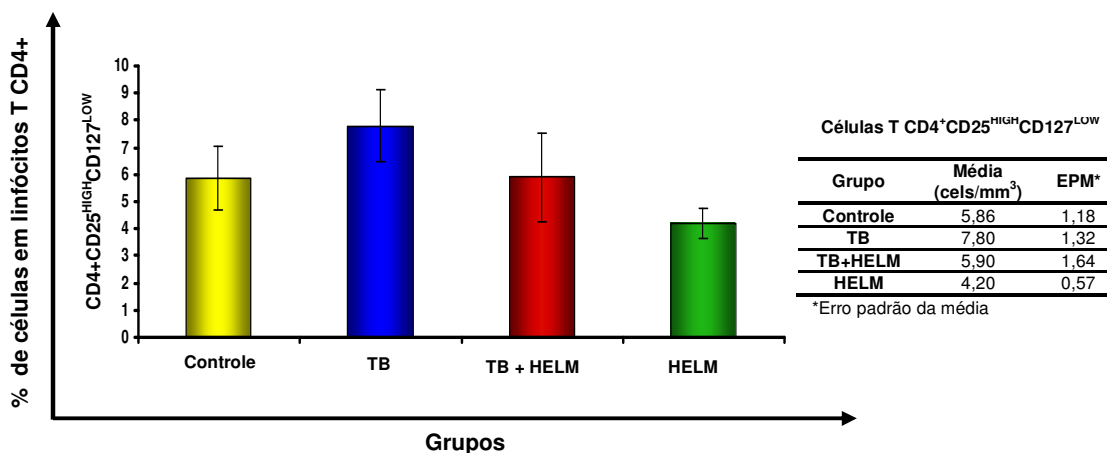


Figura 18 – Análise da expressão de CD127 como marcador de células T reguladoras. Frequência de células $CD4^+CD25^{HIGH}CD127^+$ presentes na circulação periférica de indivíduos clinicamente saudáveis (grupo Controle ■, n=12), indivíduos com tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=10), indivíduos com tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=3) e indivíduos com helmintíase intestinal e sem tuberculose (grupo HELM ■, n=5). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média dos valores absolutos de células/mm³. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

4.5 Perfil de citocinas durante o tratamento antituberculose em pacientes portadores de tuberculose pulmonar infectados (TB+HELM) e não infectados (TB) com helmintos intestinais

Considerando-se que a presença de helmintíase intestinal em pacientes portadores de tuberculose está associada a alterações no perfil celular desses pacientes, quando comparados, tanto com pacientes portadores de tuberculose sem helmintos, quanto com indivíduos saudáveis, é possível que a presença de helmintos intestinais possa também afetar a produção de citocinas nesses pacientes. Os níveis das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-5, IL-4 e IL-2 foram avaliados em sobrenadantes de culturas de sangue total, estimuladas com filtrado de cultura de *M. tuberculosis*, de pacientes dos grupos TB, TB+HELM e controle, com o objetivo de avaliar o impacto da presença de helmintos intestinais na produção de citocinas dos padrões de resposta Th1 e Th2 no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24).

As médias das concentrações de IL-2 encontradas em sobrenadantes de culturas de sangue total nos grupos TB, TB + HELM e controle são apresentadas na Figura 19.

Os indivíduos do grupo TB + HELM apresentaram uma redução significativa na produção dessa citocina quando comparados aos indivíduos dos grupos TB ($p=0,001$) e controle ($p=0,0007$) (Figura 19). A redução da produção de IL-2 apresentada pelo grupo TB + HELM em relação ao grupo TB se manteve significativa durante as semanas 4 e 16 após o tratamento. Nenhuma diferença significativa entre esses grupos foi detectada na semana de conclusão do tratamento (semana 24).

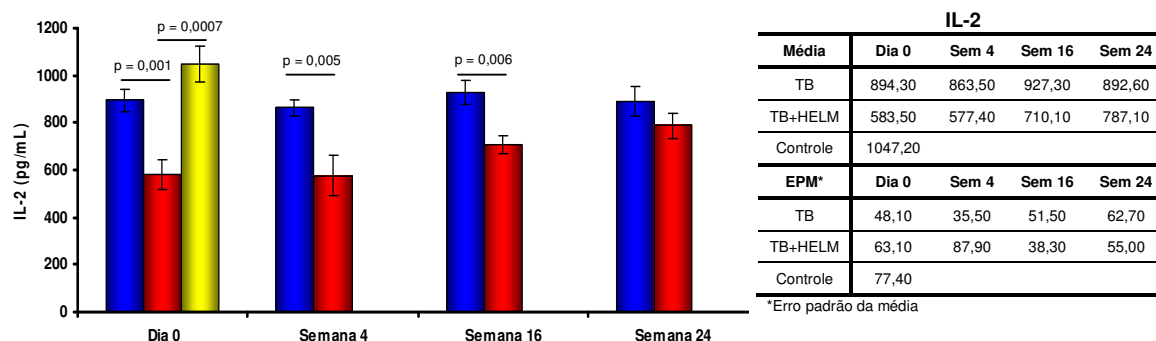


Figura 19 – Níveis da citocina (pg/mL) IL-2 em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

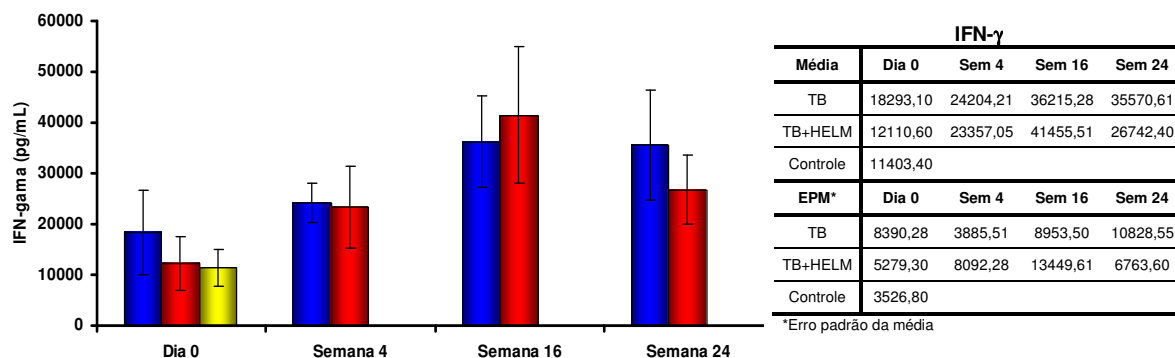


Figura 20 – Níveis da citocina (pg/mL) IFN-γ em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

As concentrações da citocina IFN- γ , encontradas em sobrenadantes de culturas de sangue total, nos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM e controle são apresentadas na Figura 20.

A análise desses dados revelou que não houve diferença significativa na produção (após estímulo de culturas de sangue total com filtrado de cultura de *M. tuberculosis*) de IFN- γ pelos indivíduos dos três grupos estudados (Figura 20).

A análise da produção de TNF- α pelos indivíduos grupos TB, TB + HELM e controle é demonstrada na Figura 21. Os resultados mostraram que a produção de TNF- α no início do tratamento (Dia 0) foi significativamente reduzida nos indivíduos do grupo TB + HELM quando comparado aos indivíduos do grupo TB ($p=0,026$) e do grupo controle ($p=0,001$) (Figura 21). Essa redução também ocorreu nas semanas 4 e 16 após o tratamento e, ao término, na semana 24, não tendo sido, entretanto, estatisticamente significativa. Por outro lado, os indivíduos portadores de tuberculose e sem infecção helmíntica apresentaram um valor médio da concentração de TNF- α semelhante ao encontrado no grupo controle (Figura 21). Tais observações sugerem que a presença de helmintíase intestinal afeta negativamente a produção de TNF- α em pacientes portadores de tuberculose pulmonar.

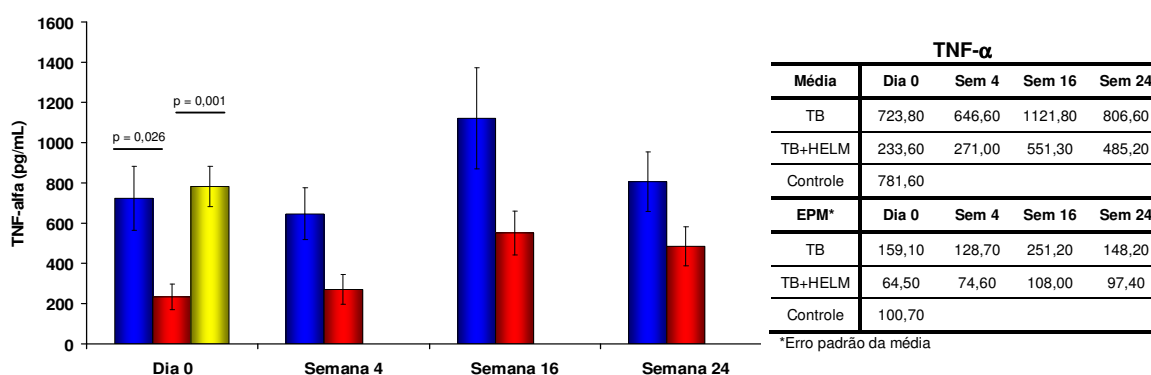


Figura 21 – Níveis da citocina (pg/mL) TNF- α em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculoso (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, $n=12$), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, $n=8$) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, $n=8$). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p .

A Figura 22 demonstra a produção de IL-4 após estímulo de culturas de sangue total nos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM e controle.

Os indivíduos do grupo TB + HELM apresentaram uma redução significativa na produção dessa citocina quando comparados aos indivíduos dos grupos TB ($p=0,007$) e controle ($p=0,001$) (Figura 22).

A comparação da produção de IL-4 entre os grupos TB + HELM e TB nas semanas 4 e 16 após o tratamento e, ao término, na semana 24, não revelou diferença significativa entre eles, apesar de ter havido uma tendência de diminuição no grupo TB + HELM (Figura 22).

A análise da produção de IL-5 em culturas de sangue total dos indivíduos dos grupos TB, TB + HELM e controle encontra-se demonstrada na Figura 23.

A análise desses dados mostrou que a produção de IL-5 no início do tratamento (Dia 0) nos pacientes do grupo TB + HELM foi reduzida quando comparada à produção dessa citocina pelos pacientes do grupo TB (Figura 23), porém, essa redução não se mostrou significativa. No entanto, a comparação do grupo TB + HELM com o grupo controle demonstrou que houve uma redução significativa na produção de IL-5 no grupo TB + HELM. Ainda, não houve diferença significativa entre os grupos TB e controle, cujos valores médios da concentração de IL-5 foram semelhantes. A média da concentração de IL-5 no grupo TB + HELM permaneceu reduzida na semana 4 após o início do tratamento em relação ao grupo TB. Essa redução foi significativa (Figura 23). Na semana 16 após o início do tratamento antituberculose e, ao término, semana 24, as médias das concentrações de IL-5 entre os grupos TB + HELM e TB assumem valores muito próximos que se assemelham, ainda, ao valor encontrado para o grupo controle.

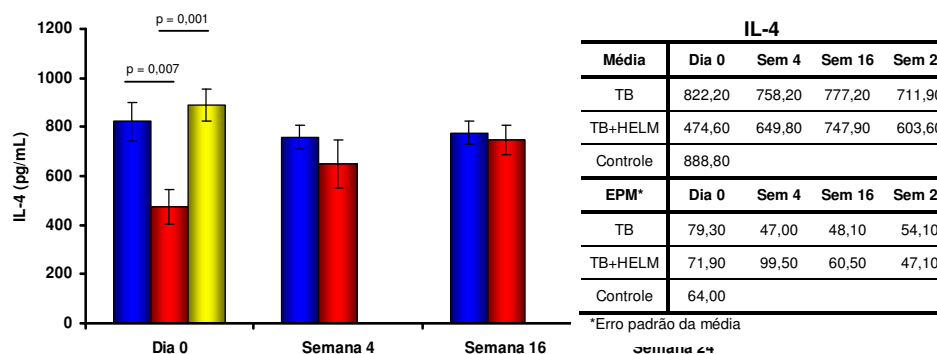


Figura 22 – Níveis da citocina (pg/mL) IL-4 em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

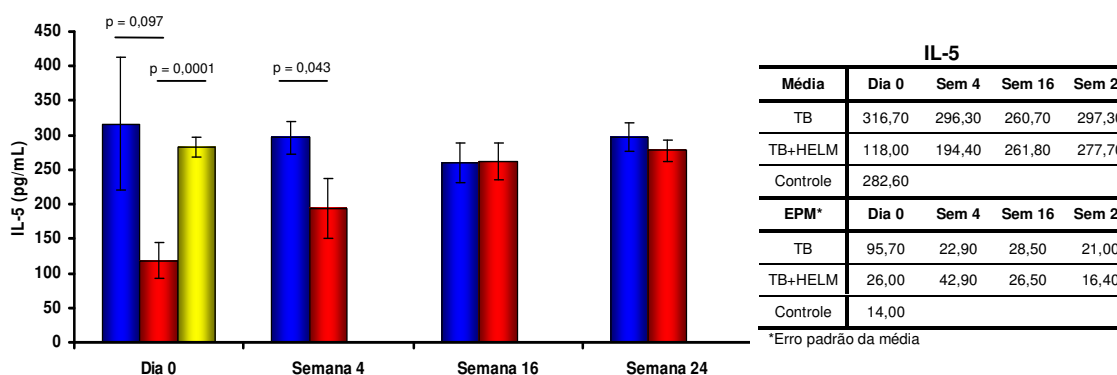


Figura 23 – Níveis da citocina (pg/mL) IL-5 em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupoTB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

As médias das concentrações de IL-10 encontradas em sobrenadantes de culturas de sangue total nos grupos TB, TB + HELM e controle são apresentadas na Figura 19.

De maneira similar ao que ocorreu com a produção de TNF- α , a produção de IL-10 no início do tratamento (Dia 0) foi significativamente reduzida nos pacientes portadores de tuberculose pulmonar infectados com helmintos intestinais (grupo TB + HELM) quando comparado aos pacientes sem helmintíase intestinal ($p=0,0002$) e aos indivíduos do grupo controle ($p=0,030$) (Figura 19). Essa diferença entre os grupos TB + HELM e TB se manteve nas semanas 4 e 16 após o tratamento e, ao término, na semana 24, permanecendo significativa nas semanas 4 e 24 (Figura 19).

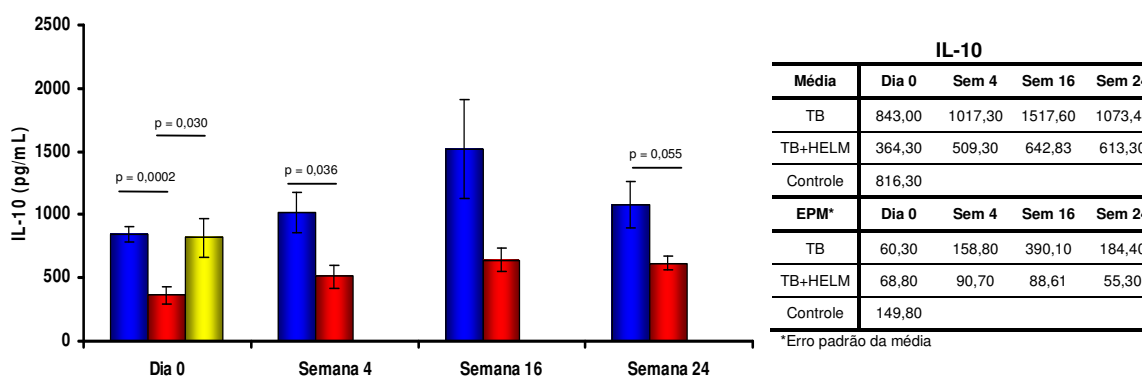


Figura 24 – Níveis da citocina (pg/mL) IL-10 em sobrenadantes de cultura de sangue total, no início do tratamento (Dia 0), após quatro e dezesseis semanas (semanas 4 e 16) de tratamento e no fim do tratamento antituberculose (semana 24), em pacientes portadores de tuberculose não infectados com helmintos intestinais (grupo TB ■, n=12), nos pacientes portadores de tuberculose associada à helmintíase intestinal (grupo TB+HELM ■, n=8) e em indivíduos saudáveis (grupo controle ■, n=8). Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão da média da concentração da citocina. As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) estão indicadas nas figuras com os respectivos valores de p.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Mycobacterium tuberculosis é um exemplo clássico de patógeno para o qual a resposta protetora depende da imunidade celular do tipo Th1. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são essenciais para uma resposta imunitária bem sucedida na tuberculose, essas células possuem várias funções efetoras, sendo responsáveis pela produção de citocinas envolvidas na resposta antimicobacteriana, como IFN- γ e TNF- α , e pela atividade citolítica (DAVOUDI et al., 2008). Em nosso estudo, observamos uma diminuição significativa nos números de linfócitos totais e linfócitos T na circulação periférica de indivíduos portadores de tuberculose não infectados por helmintos intestinais, quando comparados a indivíduos saudáveis. Nossos dados estão em acordo com a literatura (SINGHAL et al., 1989; VEENSTRA et al., 2006; DAVOUDI et al., 2008; AL MAJID; ABBA, 2008) e confirmam resultados prévios publicados pelo nosso grupo (RESENDE CÓ et al., 2007). Entretanto, ao compararmos a população de linfócitos B no sangue periférico de indivíduos dos grupos TB e controle não encontramos diferenças significativas entre esses grupos. Uma redução na concentração de linfócitos B em pacientes com tuberculose foi observada por Veenstra et al., 2006 e Resende Có et al., 2007. As subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ de linfócitos T no grupo de pacientes com tuberculose e sem helmintíase intestinal apresentaram-se reduzidas em comparação ao grupo controle, mas essa redução não foi significativa para a concentração de linfócitos T CD4⁺. A diminuição na concentração de células T CD4⁺ no sangue periférico durante a tuberculose também foi relatada por outros autores (SINGHAL et al., 1989; RODRIGUES et al., 2002; VEENSTRA et al., 2006; RESENDE CÓ et al., 2007; DAVOUDI et al., 2008; AL MAJID; ABBA, 2008). Em relação às células T CD8⁺, os dados são conflitantes, pois alguns autores relataram a redução dessa população celular (RODRIGUES et al., 2002; RESENDE CÓ et al., 2007; DAVOUDI et al., 2008), enquanto Singhal et al., 1989, encontraram um aumento no número dessas células na circulação periférica. É interessante destacar que esses trabalhos descrevem a redução de linfócitos totais, linfócitos T e suas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ no momento do diagnóstico de tuberculose, e que, essas populações celulares têm seus valores re-estabelecidos a valores semelhantes aos dos indivíduos saudáveis após o tratamento (SINGHAL et al., 1989; RODRIGUES et al., 2002; VEENSTRA et al.,

2006). Em um trabalho publicado recentemente por Davoudi et al., 2008, em que são comparados grupos com diferentes formas clínicas de tuberculose entre si e com indivíduos saudáveis, as reduções nos níveis de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são associadas ainda às formas mais graves de tuberculose – meningite tuberculosa e tuberculose miliar. Tais observações nos remetem à correlação entre a diminuição nos números de linfócitos T e suas subpopulações e a imunodepressão apresentada pelos indivíduos com tuberculose, representada, entre outros aspectos, pelo decréscimo na produção de citocinas cruciais para uma resposta protetora como IFN- γ . Várias hipóteses têm sido sugeridas para a diminuição no número de células T CD4⁺ na tuberculose. A compartimentalização de linfócitos no tecido pulmonar afetado, aumento nos níveis de apoptose (RODRIGUES et al., 2002) ou mesmo uma deficiência da função tímica (OZEKI et al., 1997) são alguns exemplos.

Com o objetivo de avaliar o impacto da presença de helmintos intestinais na resposta imunitária contra o *M. tuberculosis*, foram estudados em indivíduos com tuberculose pulmonar associada à infecção por helmintos intestinais os números de linfócitos, e seus subtipos B e T, bem como as subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ de linfócitos T. Nosso trabalho não evidenciou alteração significativa nos números de linfócitos totais, linfócitos T e suas subpopulações T CD4⁺ e CD8⁺ nos indivíduos com tuberculose e helmintíase intestinal, em comparação a indivíduos saudáveis. Quando comparamos os números dessas populações celulares no grupo TB + HELM e no grupo TB, também não encontramos nenhuma diferença significativa entre eles. No estudo realizado em nosso laboratório (citado acima) foi encontrado um decréscimo significativo nos números de linfócitos totais, linfócitos T e suas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ nesse grupo de pacientes, tanto em comparação a indivíduos saudáveis, quanto em relação a indivíduos portadores de tuberculose pulmonar e não infectados por helmintos intestinais (RESENDE CÓ et al., 2007). Portanto, esses resultados não concordam com aqueles publicados anteriormente por nosso grupo (RESENDE CÓ et al., 2007). Essas diferenças podem ser devidas às características intrínsecas dos pacientes estudados. No estudo publicado em 2007, os pacientes do grupo TB + HELM apresentavam formas clínicas mais graves da tuberculose pulmonar (pacientes bacilíferos 3+ e 4+), enquanto que o estudo atual não utilizou esse parâmetro como critério de inclusão e todos os pacientes arrolados para o grupo TB + HELM possuíam baciloscopia 1+.

As células *Natural Killer* (NK) são células granulares, de origem linfóide, que participam da resposta imunitária inata, e apresentam fenótipo CD3⁻, CD16⁺ e/ou CD56⁺. Na circulação periférica e nos tecidos inflamados, as células NK são geralmente CD16⁺CD56⁺, fenótipo este que as caracteriza como células maduras com atividade citotóxica capaz de destruir células-alvo sem a necessidade de sensibilização prévia e restrição ao MHC (ROBERTSON; RITZ, 1990; MORETTA et al., 2008). Em adição às suas funções citotóxicas efetoras (mediadas pelos mecanismos granzima/perforina e pela ligação Fas/FasL), as células NK secretam citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ (KORBEL; SCHNEIDER; SCHAIBLE, 2008) e suas interações no sítio inflamatório também influenciam o desenvolvimento da resposta adaptativa do tipo Th1 (MORETTA et al., 2008). As células NK humanas podem diretamente destruir monócitos e macrófagos infectados por *M. tuberculosis* (DENIS, 1994), além de produzir IFN- γ (KORBEL; SCHNEIDER; SCHAIBLE, 2008). Adicionalmente, um trabalho recente identificou células NK com o potencial de destruir células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ que proliferaram durante a infecção com o *M. tuberculosis* (ROY et al., 2008). De maneira semelhante às células NK, as células NKT também participam da resposta antimicrobiana (CHACKERIAN; PERERA; BEHAR, 2002). Ao contrário das células NK, as células NKT são identificadas pelo fenótipo CD3⁺CD56⁺ (adotamos a marcação CD3⁺CD16⁺CD56⁺ para a caracterização das células NKT, bem como, a marcação CD16⁺CD56⁺ para identificar as células NK). Poucos estudos apresentam dados clínicos sobre a participação de células NK e NKT na tuberculose e esses dados são controversos. Em 2006, VEENSTRA et al. descreveram um decréscimo na concentração de células NK e NKT (estatisticamente significativo para as células NKT) na circulação periférica de indivíduos portadores de tuberculose pulmonar no momento do diagnóstico em comparação a um grupo controle saudável, dados que concordam com os resultados encontrados em nosso estudo. No entanto, Resende Có et al. 2007, não encontraram diferenças significativas nos números dessas populações celulares circulantes quando compararam pacientes com tuberculose pulmonar e indivíduos saudáveis. Em um outro estudo, publicado em 2006, os autores encontraram uma diminuição do número de células NK no grupo de pacientes com tuberculose em relação ao grupo controle e um aumento do número de células NKT quando os mesmos grupos foram comparados (BARCELOS et al. 2006).

Em relação às células NK e NKT no grupo com tuberculose e helmintíase intestinal (TB + HELM), nós encontramos um aumento significativo dessas células quando esse grupo foi comparado aos indivíduos com tuberculose não infectados por helmintos intestinais (TB). Alguns trabalhos demonstram a presença de células NK ativadas durante infecção helmíntica, incluindo células NK residentes no intestino que produziram IL-13 durante a infecção por *Trichuris muris* em camundongos com SCID (*severe combined immunodeficiency*) (HSIEH et al., 2003; McDERMOTT et al., 2005). Células NK têm a capacidade de secretar citocinas Tipo 2 (células NK2), incluindo IL-4 e IL-5, quando expostas a larvas filarióides vivas (BABU; BLAUVELT; NUTMAN, 2007).

Os eosinófilos são células tipicamente associadas com a resposta tipo Th2 observada nas helmintíases. Seguindo a infecção helmíntica, os eosinófilos proliferam abundantemente e migram para o sítio da infecção, onde atuam liberando o conteúdo de seus grânulos. A IL-5 (uma citocina típica do padrão de resposta Th2) é requerida para a manutenção da eosinofilia (ANTHONY et al., 2008). Em nosso estudo, observamos um aumento significativo no número de eosinófilos nos indivíduos portadores de helmintíase intestinal com ou sem tuberculose pulmonar, em comparação ao grupo de indivíduos clinicamente saudáveis. Em um trabalho publicado em 2002, Tristão-Sá et al. relataram eosinofilia (semelhante àquela por nós observada) em pacientes com tuberculose pulmonar infectados com nematóides.

A proliferação de células T reguladoras é bem descrita na tuberculose e pode contribuir para a supressão da resposta protetora Th1 por inibir a produção de IFN- γ e estimular a produção de IL-10 e TGF- β (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006; GUYOT-REVOL, 2006; CHEN et al., 2007). As infecções helmínticas podem induzir o desenvolvimento de células T reguladoras em humanos e camundongos (VAN DEN BIGGELAAR et al., 2000; SAUNDERS et al., 2007), sugerindo um papel para essas células na imunomodulação observada nas infecções helmínticas (SATOQUINA et al., 2002; BELKAID et al., 2005). Com base nesses dados, o nosso objetivo foi avaliar a presença de células T reguladoras em pacientes com tuberculose pulmonar e aquilatar o impacto da ocorrência associada de infecção por helmintos intestinais no número dessas células e na resposta imunitária ao *M.*

tuberculosis. Para a detecção de células T reguladoras foram utilizados marcadores descritos como definidores dessa população. Nós avaliamos a presença de células T CD4⁺CD25^{HIGH} e a presença concomitante do marcador mestre de células T reguladoras, Foxp3.

Nossos resultados mostraram que os pacientes portadores de tuberculose pulmonar apresentaram uma frequência aumentada de células T CD4⁺CD25^{HIGH}. A frequência de células T CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ também aumentou, porém, essas duas observações não apresentaram significância estatística. Um estudo feito anteriormente pelo nosso grupo mostrou que o número de células circulantes com fenótipo CD4⁺CD25^{HIGH} em pacientes portadores de tuberculose era 3 vezes maior do que o observado em indivíduos saudáveis. Além disso, a produção de IFN- γ em cultura na presença e na ausência de células reguladoras foi quantificada para avaliar a participação dessas células na modulação da resposta imune. O resultado mostrou que a depleção das células reguladoras levou a uma produção aumentada de IFN- γ pelas células mononucleares de sangue periférico (RIBEIRO-RODRIGUES et al., 2006). Corroborando esses resultados, Guyot-Revol et al. (2006) também evidenciaram um aumento semelhante no número de células T reguladoras em pacientes portadores de tuberculose e sugeriram a participação dessas células na supressão da resposta Th1 observada durante esta infecção. Estes dois estudos forneceram as primeiras evidências do papel das células T reguladoras na tuberculose e são consistentes com a hipótese de que as células T reguladoras participam da supressão da resposta imunitária observada na doença. Em 2007, Chen et al. demonstraram a expansão do fenótipo T CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ em pacientes com tuberculose pulmonar ativa e evidenciaram uma atividade supressiva dessas células em culturas de PBMC estimuladas com antígenos de *M. tuberculosis*.

Sustentando nossa hipótese de que a helmintíase intestinal pode ter um impacto negativo na resposta antimicobacteriana, nossos resultados mostram que o número de células T reguladoras foi maior no grupo de pacientes com tuberculose pulmonar infectados por helmintos intestinais do que no grupo TB. Em relação ao grupo sem tuberculose e com helmintíase intestinal, o grupo TB + HELM também apresentou um valor significativamente aumentado de células T reguladoras, tanto quando analisamos o fenótipo T CD4⁺CD25^{HIGH}, quanto quando analisamos o fenótipo T

CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺. O grupo com helmintíase intestinal não apresentou diferença significativa em relação ao número de células T reguladoras na circulação periférica quando comparado ao grupo controle. Em um trabalho publicado recentemente, Rausch et al. identificaram um aumento de células T reguladoras no tecido intestinal inflamado de camundongos infectados com o nematódeo *Heligmosomoides polygyrus* (RAUSCH et al. 2008). Assim, a falta de correlação entre a presença de helmintíase intestinal e o aumento no número de células T reguladoras observada em nosso estudo poderia estar relacionada à compartimentalização dessas células na mucosa intestinal.

Dessa forma, concluímos que a associação entre a tuberculose e a helmintíase intestinal induz uma proliferação de células T reguladoras ainda mais acentuada do que na ocorrência de uma dessas infecções isoladamente. Os fenótipos T CD4⁺CD25^{HIGH} e CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ sofreram expansões concordantes. Esse resultado discorda em parte da avaliação da presença de células T reguladoras feita anteriormente pelo nosso grupo (RESENDE CÓ et al., 2007). Naquela ocasião, encontramos um número reduzido de células T reguladoras no grupo TB + HELM em comparação ao grupo TB, não obstante aquele grupo ter apresentado valores significativamente maiores quando comparado ao grupo controle. Os autores acreditavam que a redução na frequência de células T reguladoras no grupo TB + HELM observada na circulação periférica, tenha sido devida à retenção dessas células nos sítios acometidos – pulmão, na tuberculose pulmonar, e intestino, na helmintíase intestinal (RESENDE CÓ et al., 2007). As discrepâncias observadas podem ser devidas aos marcadores mais específicos, portanto mais sensíveis que foram utilizados durante nosso estudo, como a combinação de CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺, enquanto que no estudo anterior foi utilizada apenas a marcação CD4⁺CD25^{HIGH}.

Recentemente, a expressão de Foxp3 em células reguladoras T CD4⁺ tem sido relacionada negativamente à expressão do receptor da citocina IL-7 (CD127), e a molécula CD127 pode representar o melhor marcador de superfície para a identificação de células T reguladoras, através do fenótipo CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} (LIU et al., 2006). A subpopulação CD4⁺CD25⁺CD127^{LOW/-} representa aproximadamente 80% das células CD4⁺Foxp3⁺ em PBMC de indivíduos normais (LIU et al., 2006). Por esse motivo, nós analisamos a expressão de CD127 em

linfócitos do sangue periférico em pacientes com tuberculose apresentando ou não helmintíase intestinal, numa tentativa de caracterizar as células T reguladoras por meio do fenótipo $CD4^+CD25^{HIGH}CD127^{LOW/-}$ e correlacionar esse fenótipo com os demais utilizados para identificar células T reguladoras. Nossos resultados mostraram que a identificação de células T reguladoras baseada na expressão de CD127 não foi semelhante à identificação baseada nos fenótipos $CD4^+CD25^{HIGH}$ e $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+$. A presença de células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}CD127^{LOW/-}$ na circulação periférica foi maior no grupo TB do que no grupo TB + HELM, com um perfil inverso ao encontrado para os outros fenótipos estudados. Além disso, não houve diferença significativa na concentração dessa população celular entre os grupos estudados. Por outro lado, sabe-se que células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}Foxp3^+CD127^{LOW/-}$ proliferam *in vitro* após linfócitos do sangue periférico de indivíduos com teste tuberculínico positivo serem estimulados com BCG (HOUGARDY et al. 2007).

A análise do perfil de citocinas produzidas por pacientes portadores de tuberculose sem helmintíase intestinal frente ao estímulo de sangue total com filtrado de cultura de *M. tuberculosis* revelou que, à época do diagnóstico, esses pacientes produziram IL-2, IFN- γ e TNF- α em níveis semelhantes àqueles produzidos pelos indivíduos do grupo controle (PPD+). Porém, as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 (que são compatíveis com um padrão de resposta Th2) foram também detectadas nos pacientes portadores de tuberculose. Outros estudos já documentaram a presença de linfócitos Th2 no sangue periférico de pacientes com tuberculose. Surcel et al., 1994, estimulando *in vitro* células mononucleares de sangue periférico com antígenos micobacterianos, demonstrou que pacientes com tuberculose apresentaram um aumento no número de células secretando IL-4 quando comparado com células de indivíduos saudáveis (PPD+), enquanto o número de células secretando IFN- γ foi semelhante entre os dois grupos. Em 1994, Sánches et al. demonstraram, usando células da circulação periférica estimuladas com PPD, que pacientes com tuberculose apresentavam um padrão de resposta Th2, enquanto indivíduos saudáveis PPD positivos apresentavam um padrão de resposta do tipo Th1. Recentemente, van Crevel e colaboradores encontraram um aumento significativo na produção de IL-4 por linfócitos T circulantes de pacientes com tuberculose pulmonar cavitária quando comparados ao grupo com tuberculose não cavitária,

sendo que a produção de IL-4 nos dois grupos foi significativamente maior que a detectada nos indivíduos saudáveis (VAN CREVEL et al., 2000). Em um outro trabalho, os pesquisadores estudaram os segmentos pulmonares afetados, radiograficamente definidos, em pacientes com tuberculose pulmonar cavitária, e concluíram que a tuberculose pulmonar cavitária exibe uma resposta Th2 predominante. Esses dados são consistentes com aqueles disponíveis para outras doenças infecciosas, como a hanseníase e a leishmaniose, em que linfócitos Th2 são associados a uma forma mais grave da doença. Assim, é possível que o desenvolvimento de uma resposta Th2 possa estar relacionado com a ausência de uma resposta protetora na patogênese da tuberculose.

A citocina IL-10 é uma importante mediadora da supressão causada por células T reguladoras em alguns, mas não todos, sistemas experimentais (SAKAGUCHI, 2004). Scott-Browne et al., 2007, estudaram a produção de IL-10 após estímulo policlonal de células T reguladoras retiradas do pulmão e de linfonodos pulmonares de camundongos C57BL/6 infectados com *M. tuberculosis* (cepa H37Rv). Os autores observaram que não houve produção de IL-10 por essas células, sugerindo que a produção de IL-10 não seja o mecanismo utilizado por células T reguladoras para mediar a imunodepressão na tuberculose em camundongos C57BL/6 (SCOTT-BROWNE et al., 2007). Entretanto, outras vias supressivas como a produção de TGF- β e o mecanismo de privação de citocinas podem estar envolvidos. Dessa forma, a produção de IL-10 detectada em sobrenadantes de cultura de sangue total de pacientes com tuberculose estimulada com filtrado de cultura de *M. tuberculosis* neste trabalho pode ter sido proveniente do desenvolvimento de uma resposta antimicobacteriana do tipo Th2, e não da ação de células T reguladoras presentes nesses pacientes.

A análise da produção de citocinas no grupo de pacientes com tuberculose pulmonar associada à infecção por helmintos intestinais mostrou que a secreção de todas as citocinas investigadas nesse grupo, foi significativamente reduzida, à exceção de IFN- γ , tanto em comparação ao grupo TB quanto em comparação ao grupo de indivíduos saudáveis positivos para o teste tuberculínico (PPD+). Apesar de a produção de IFN- γ pelo grupo com tuberculose e helmintíase apresentar um valor médio inferior ao do grupo TB, essa diferença não foi significativa.

A citocina IL-2 é o principal mediador de proliferação e diferenciação de células T ativadas, sendo, por isso, considerada um fator de crescimento de células T. Sua secreção é estimulada em células T após o reconhecimento de antígenos por essa célula (JANEWAY et al., 2005). A importância dessa citocina para o desenvolvimento da resposta imunitária adaptativa é bem ilustrada pelo uso de medicamentos imunossupressores para evitar a rejeição de transplantes. Esses medicamentos inibem a produção de IL-2 e a sinalização por meio dela para suprimir uma resposta imunitária indesejada (JANEWAY et al., 2005). A produção da citocina IL-2 pelos indivíduos do grupo TB + HELM apresentou-se significativamente reduzida em comparação à produção pelos indivíduos dos grupos TB e controle e essa redução se manteve significativa durante as semanas 4 e 16 após o tratamento, voltando a apresentar um valor próximo ao do grupo controle apenas na semana 24. O impacto da diminuição na secreção de IL-2 sobre a resposta imunitária adaptativa pode ser observado quando analisamos a produção das demais citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5 e IL-10), todas apresentaram uma redução em relação aos grupos TB e controle. Portanto, nossos resultados sugerem que a ocorrência conjunta de infecção por helmintos intestinais possa determinar/estimular um estado de hipoergia em pacientes com tuberculose pulmonar. Dados anteriores demonstram que a ativação persistente do sistema imunitário durante a helmintíase intestinal ocasiona uma deficiência na transdução de sinais em células da resposta imunitária resultando em hiporresponsividade e anergia (BORKOW et al., 2000).

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Considerações finais

1. Pacientes portadores de tuberculose pulmonar apresentam uma redução nos números de linfócitos totais e linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, circulantes, em relação a indivíduos clinicamente saudáveis.
2. Pacientes com tuberculose pulmonar apresentam uma redução nas concentrações de células NK e NKT na circulação periférica em relação a indivíduos saudáveis. Por outro lado, quando há a ocorrência concomitante de tuberculose pulmonar e helmintíase intestinal, as concentrações dessas células são aumentadas.
3. Pacientes portadores de tuberculose pulmonar associada à infecção por helmintos intestinais apresentam um aumento significativo na frequência de células T reguladoras na circulação periférica, quando comparados a indivíduos saudáveis e a indivíduos com helmintíase sem tuberculose. Esses pacientes apresentam, também, uma tendência a uma maior frequência dessas células em relação aos pacientes com tuberculose pulmonar e sem helmintíase. Dessa forma, concluímos que a associação entre duas infecções crônicas, como a tuberculose e a helmintíase, pode induzir uma expansão mais acentuada de células T reguladoras daquela observada na ocorrência de uma dessas infecções isoladamente.
4. A utilização dos fenótipos CD4⁺CD25^{HIGH} e CD4⁺CD25^{HIGH}Foxp3⁺ para a identificação de células T reguladoras na tuberculose pulmonar mostra resultados semelhantes. A identificação dessas células baseada na expressão de CD127 não apresentou correlação com os marcadores de células T reguladoras supracitados.
5. Apesar de secretarem IL-2, IFN- γ e TNF- α em níveis semelhantes aos de indivíduos saudáveis com teste tuberculínico positivo (PPD+), pacientes com tuberculose pulmonar também secretam IL-4, IL-5 e IL-10 após estímulo de sangue total com filtrado de cultura de *M. tuberculosis*, apresentando um perfil de resposta imunitária com características mistas entre o padrão de resposta do tipo Th1 e Th2.

6. Acreditamos que a presença de helmintíase intestinal em pacientes portadores de tuberculose pulmonar possa induzir um estado de hipergia nesses indivíduos, como pode ser observado através da redução significativa na presença das citocinas IL-2 e TNF- α em sobrenadantes de culturas de sangue total estimuladas com filtrado de cultura de *M. tuberculosis* de pacientes do grupo TB + HELM quando comparados aos grupos TB e controle.

CONCLUSÃO

Finalmente, nossos dados confirmam dados anteriores sobre o impacto negativo da presença de infecção por helmintos intestinais em pacientes portadores de tuberculose pulmonar.

Referências

7 REFERÊNCIAS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**. 1996;383(6603):787-93.

Al Majid FM, Abba AA. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in pulmonary tuberculosis. **J Postgrad Med**. 2008;54(1):7-11.

Aluvihare VR, Betz AG. The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance. **Immunol Rev**. 2006;212:330-43.

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Bandeira A. On ontogeny and physiology of regulatory T cells. **Immunol Rev**. 2001;182:5-17.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF Jr, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat Rev Immunol**. 2007;7(12):975-87.

Babu S, Blauvelt CP, Nutman TB. Filarial Parasites Induce NK Cell Activation, Type 1 and Type 2 Cytokine Secretion, and Subsequent Apoptotic Cell Death. **J Immunol**. 2007;179:2445-56.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol**. 2001;167(3):1245-53.

Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. Foxp3⁺ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. **Eur J Immunol**. 2006;36:2832-36.

Barcelos W, Martins-Filho OA, Guimarães TM, Oliveira MH, Spíndola-de-Miranda S, Carvalho BN, Toledo VdeP. Peripheral blood mononuclear cells immunophenotyping in pulmonary tuberculosis patients before and after treatment. **Microbiol Immunol**. 2006;50(8):597-605.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**. 2002;420(6915):502-7.

Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol**. 2005;6:353-60.

Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. **Nat Rev Immunol**. 2007;7:875-888.

Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. **Lancet**. 2006;367(9521):1521-32.

Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Immunol**. 2007;27(4):347-62.

Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. Human immunity to *M. tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing. **Tuberculosis** (Edinb). 2003;83(1-3):98-106.

Borkow G, Leng Q, Weisman Z, Stein M, Galai N, Kalinkovich A, Bentwich Z. Chronic immune activation associated with intestinal helminth infections results in impaired signal transduction and anergy. **J Clin Invest**. 2000;106(8):1053-60.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: relatório de situação: Espírito Santo. Brasília, 2006.

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**. 1999;285(5428):732-36.

Castelo Filho A, Kristski AL, Barreto AW *et al.* II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. **J. Bras. Pneumol.** 2004;30(1):S57-S86.

Chackerian A, Alt J, Perera V, Behar SM. Activation of NKT cells protects mice from tuberculosis. **Infect Immun.** 2002;70(11):6302-09.

Chang JS, Huggett JF, Dheda K, Kim LU, Zumla A, Rook GAW. Mycobacterium tuberculosis induces selective up-regulation of TLRs in the mononuclear leukocytes of patients with active pulmonary tuberculosis. **J Immunol.** 2006;176:3010-18.

Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. **Clin Immunol.** 2007;123(1):50-9.

Cole ST, Telenti A. Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Eur Respir J Suppl.** 1995;20:701s-713s.

Collins HL, Kaufmann SH. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology.** 2001;103:1-9.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature.** 2007;450:566-569.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. **J Exp Med.** 1993;178(6):2243-7.

D'Ambrosio D. Regulatory T cells: How do they find their space in the immunological arena? **Semin Cancer Biol.** 2006;16:91-97.

Davoudi S, Rasoolinegad M, Younesian M, Hajiabdolbaghi M, Soudbakhsh A, Jafari S, EmadiKouchak H, Mehrpouya M, Lotfi H. CD4+ Cell Counts in Patients with Different Clinical Manifestations of Tuberculosis. **Braz J Infect Dis**. 2008;12(6):483-86.

de Carli GA. Parasitologia Clínica. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

de la Barrera S, Aleman M, Musella R, Schierloh P, Pasquinelli V, Garcia V, Abbate E, Sasiain Mdel C. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. **Clin Exp Immunol**. 2004;138(1):128-38.

Denis M. Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of natural killer cells toward Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes. **Cell Immunol**. 1994;156(2):529-36.

Diniz LM, Zandonade E, Dietze R, Pereira FE, Ribeiro-Rodrigues R. Short report: do intestinal nematodes increase the risk for multibacillary leprosy? **Am J Trop Med Hyg**. 2001; 65(6):852-4.

Doherty TM, Arditi M. TB, or not TB: that is the question – does TLR signaling hold the answer? **J Clin Invest**. 2004;114(12):1699-703.

Dorman SE, Holland SM. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. **J Clin Invest**. 1998;101(11):2364-9.

Ellner JJ. Regulation of the human immune response during tuberculosis. **J Lab Clin Med**. 1997; 130(5):469-75.

Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annu Rev Immunol**. 2001;19:163-96.

Ferreira CS, Ferreira MU, Nogueira MR. Prevalência e intensidade de infecção por *Ascaris lumbricoides* em amostra populacional urbana (São Paulo, SP). **Cadernos de Saúde Pública**. RJ,7(1):82-89.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Exp Med**. 1993;178(6):2249-54.

Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW, Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**. 1995;2(6):561-72.

Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol**. 2001;19:93-129.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat Immunol**. 2003;4:330-336.

Garg SK, Tiwari RP, Tiwari D, Singh R, Malhotra D, Ramnani VK, Prasad GBKS, Chandra R, Fraziano M, Colizzi V, Bisen PS. Diagnosis of tuberculosis: available Technologies, limitations and possibilities. **J Clin Lab Anal**. 2003;17:155-63.

Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. **Immunol Today**. 2000;21(11):573-83.

Gong JH, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y, Barnes PF. Interleukin-10 downregulates *Mycobacterium tuberculosis*-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. **Infect Immun**. 1996;64(3):913-8.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. **Immunity**. 2004;21:589-601.

Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med.** 2006;173(7):803-10.

Helmbly H, Bickle Q. Immune modulation by helminth infections. **Parasite Immunol.** 2006;28:479-81.

Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol.** 1997;159(2):635-43.

Hirsch CS, Hussain R, Toossi Z, Dawood G, Shahid F, Ellner JJ. Cross-modulation by transforming growth factor beta in human tuberculosis: suppression of antigen-driven blastogenesis and interferon gamma production. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1996;93(8):3193-8.

Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, Wallis RS, Edmonds K, Okwera A, Mugerwa R, Peters P, Ellner JJ. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. **J Infect Dis.** 1999;180(6):2069-73.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science.** 2003;299:1057-61.

Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. **Microbes Infect.** 2004;6:745-751.

Hougardy JM, Verscheure V, Locht C, Mascart F. In vitro expansion of CD4(+)CD25(high)FOXP3(+)CD127(low/-) regulatory T cells from peripheral blood lymphocytes of healthy *Mycobacterium tuberculosis*-infected humans. **Microbes Infect.** 2007;9(11):1325-32.

Hsieh GCF, Loukas A, Wahl AM, Bhatia M, Wang Y, Williamson AL, Kehn KW, Maruyama H, Hotez PJ, Leitenberg D, Bethony J, Constant SL. A secreted protein from the human hookworm *Necator americanus* binds selectively to NK cells and induces IFN- γ production. **J Immunol**. 2004;173:2699-704.

http://www.who.int/intestinal_worms/epidemiology/en/

Huehn J, Hamann A. Homing to suppress: address codes for T reg migration. **Trends Immunol**. 2005;26:632-6.

Jacobs RF. Multiple-drug-resistant tuberculosis. **Clin Infect Dis**. 1994;19(1):1-8.

Janeway, CA; Travers, P; Walport, M; Shlomchik, M. Immunobiology: the immune system in health and disease. 6 ed. New York: Garland Science, 2005.

Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Fondaneche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, Emile JF, Gaillard JL, Schreiber R, Levin M, Fischer A, Hivroz C, Casanova JL. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. **J Clin Invest**. 1997;100(11):2658-64.

Kaplan G, Freedman VH. The role of cytokines in the immune response to tuberculosis. **Res Immunol**. 1996;147(8-9):565-72.

Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**. 2001;1(1):20-30.

Korbel DS, Schneider BE, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. **Microbes Infect**. 2008;10(9):995-1004.

Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufmann SH. Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. **Infect Immun**. 1997;65(5):1936-8.

Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Groth BFS, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JRA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **J Exp Med**. 2006;203:1701-11.

Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nat Immunol**. 2001;2:816-22.

Maloy KJ, Antonelli LR, Lefevre M, Powrie F. Cure of innate intestinal immune pathology by CD4+CD25+ regulatory T cells. **Immunol Lett**. 2005;97:189-92.

McDermott JR, Humphreys NE, Forman SP, Donaldson DD, Grencis RK. Intraepithelial NK Cell-Derived IL-13 Induces Intestinal Pathology Associated with Nematode Infection. **J Immunol**. 2005;175:3207-13.

McKee AS, Pearce EJ. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J Immunol**. 2004;173(2):1224-31.

Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**. 1999;163:3920-27.

Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat Rev Immunol**. 2004;4(11):841-55.

Mills KH, McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells – their induction and role in infection. **Semin Immunol**. 2004;16:107-17.

Mogues T, Goodrich EM, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cells subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **J Exp Med**. 2001;193:271-80.

Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. **Cell Death Differ.** 2008;15(2):226-33.

Munk ME, Gatrill AJ, Kaufmann SH. Target cell lysis and IL-2 secretion by gamma/delta T lymphocytes after activation with bacteria. **J Immunol.** 1990;145(8):2434-9.

Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, Levin M. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. **N Engl J Med.** 1996;335(26):1941-9.

North RJ, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. **Annu Rev Immunol.** 2004;22:599-623.

Ottenhoff TH, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. **Immunol Today.** 1998;19(11):491-4.

Ozeki Y, Kaneda K, Fujiwara N, Morimoto M, Oka S, Yano I. *In vivo* induction of apoptosis in the thymus by administration of mycobacterial cord factor. **Infect Immun.** 1997;65(5):1793-99.

Piccirillo CA, Thornton AM. Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. **Trends Immunol.** 2004;25:374-80.

Prolla JC, Porto NS, Ulbrich-Kulczynski JM, Bogliolo L. Pulmões. Pleura. Mediastino. In: Brasileiro Filho G, Pittella JEH, Pereira FEL, Bambilra EA, Barbosa AJA. Patologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Raja A. Immunology of tuberculosis. **Indian J Med Res.** 2004;120(4):213-32.

Rausch S, Huehn J, Kirchhoff D, Rzepecka J, Schnoeller C, Pillai S, Loddenkemper C, Scheffold A, Hamann A, Lucius R, Hartmann S. Functional Analysis of Effector and Regulatory T Cells in a Parasitic Nematode Infection. **Infect Immun.** 2008;76(5):1908-19.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. **J Exp Med.** 2000;192(2):295-302.

Resende Có T. Avaliação do impacto da presença de helmintos intestinais na resposta imune celular contra o Mycobacterium tuberculosis em pacientes com tuberculose pulmonar. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.

Resende Có T, Hirsch CS, Toossi Z, Dietze R, Ribeiro-Rodrigues R. Intestinal helminth co-infection has a negative impact on both anti-Mycobacterium tuberculosis immunity and clinical response to tuberculosis therapy. **Clin Exp Immunol.** 2007;147(1):45-52.

Ribeiro-Rodrigues R, Resende Co T, Rojas R, Toossi Z, Dietze R, Boom WH, Maciel E, Hirsch CS. A role for CD4+CD25+ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis. **Clin Exp Immunol.** 2006;144(1):25-34.

Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **J Immunol.** 2002;168(9):4620-7.

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. **Blood.** 1990;76:2421-38.

Rodrigues DS, Medeiros EA, Weckx LY, Bonnez W, Salomao R, Kallas EG. Immunophenotypic characterization of peripheral T lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis infection and disease. **Clin Exp Immunol.** 2002;128(1):149-54.

Roy S, Barnes PF, Garg A, Wu S, Cosman D, Vankayalapati R. NK Cells Lyse T Regulatory Cells That Expand in Response to an Intracellular Pathogen. **J Immunol.** 2008;180(3):1729-36.

Rudensky AY, Campbell DJ. In vivo sites and cellular mechanisms of T reg cell-mediated suppression. **J Exp Med**. 2006;203:489-92.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol Rev**. 2001;182:18-32.

Sakaguchi S. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. **Nat Immunol**. 2003;4(1):10-1.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annu Rev Immunol**. 2004;22:531-62.

Sánchez FO, Rodríguez JI, Agudelo G, García LF. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. **Infect Immun**. 1994;62(12):5673-8.

Satoguina J, Mempel M, Larbi J, Badusche M, Loliger C, Adjei O, Gachelin G, Fleischer B, Hoerauf A. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). **Microbes Infect**. 2002;4(13):1291-300.

Saunders, KA, Raine T, Cooke A, Lawrence CE. Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. **Infect Immun**. 2007;75(1):397-407.

Scott-Browne JP, Shafiani S, Tucker-Heard G, Ishida-Tsubota K, Fontenot JD, Rudensky AY, Bevan MJ, Urdahl KB. Expansion and function of Foxp-3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. **J Exp Med**. 2007;204(9):2159-2169.

Singhal M, Banavalikar JN, Sharma S, Saha K. Peripheral blood T lymphocyte subpopulations in patients with tuberculosis and the effect of chemotherapy. **Tubercle**. 1989 Sep;70(3):171-8.

Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. **Nat Rev Microbiol.** 2003 Nov;1(2):97-105.

Surcel HM, Troye-Blomberg M, Paulie S, Anderson G, Moreno C, Pasvol G, Ivanyi J. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. **Immunol.** 1994;81(2):171-6.

Tavares-Dias M, Grandini AA. Prevalence and epidemiological aspects of enteroparasites in the population of Sao Jose da Bela Vista, Sao Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop.** 1999;32(1):63-5.

Toossi Z, Kleinhenz ME, Ellner JJ. Defective interleukin 2 production and responsiveness in human pulmonary tuberculosis. **J Exp Med.** 1986;163(5):1162-72.

Torres M, Mendez-Sampeiro P, Jimenez-Zamudio L, Teran L, Camarena A, Quezada R, Ramos E, Sada E. Comparison of the immune response against Mycobacterium tuberculosis antigens between a group of patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts. **Clin Exp Immunol.** 1994;96(1):75-8.

Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. **Infect Immun.** 1998;66(1):176-80.

Tristao-Sá R, Ribeiro-Rodrigues R, Johnson LT, Pereira FE, Dietze R. Intestinal nematodes and pulmonary tuberculosis. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2002;35(5):533-5.

Umetsu DT, DeKruyff RH. The regulation of allergy and asthma. **Immunol Rev.** 2006;212:238-55.

van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RH, van der Meer JW. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. **J Infect Dis.** 2000;181(3):1194-7.

van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. **Clin Microbiol Rev.** 2002;15(2):294-309.

van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. Decreased atopy in children infected with Schistosoma haematobium: a role for parasite-induced interleukin-10. **Lancet.** 2000;356:1723-7.

Vanham G, Edmonds K, Qing L, Hom D, Toossi Z, Jones B, Daley CL, Huebner B, Kestens L, Gigase P, Ellner JJ. Generalized immune activation in pulmonary tuberculosis: co-activation with HIV infection. **Clin Exp Immunol.** 1996;103(1):30-4.

Vanham G, Toossi Z, Hirsch CS, Wallis RS, Schwander SK, Rich EA, Ellner JJ. Examining a paradox in the pathogenesis of human pulmonary tuberculosis: immune activation and suppression/anergy. **Tuber Lung Dis.** 1997;78(3-4):145-58.

van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. **Immunobiology.** 2007;212(6):475-490.

Veenstra H, Baumann R, Carroll NM, Lukey PT, Kidd M, Beyers N, Bolliger CT, van Helden PD, Walzl G. Changes in leucocyte and lymphocyte subsets during tuberculosis treatment; prominence of CD3dimCD56+ natural killer T cells in fast treatment responders. **Clin Exp Immunol.** 2006;145(2):252-60.

Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. **Nat Rev Immunol.** 2008;8:523-532.

Wallis RS, Ellner JJ. Cytokines and tuberculosis. **J Leukoc Biol.** 1994;55(5):676-81.

Wang LJ, Cao Y, Shi HN. Helminth infections and intestinal inflammation. **World J Gastroenterol.** 2008;14(33):5125-32.

WHO Report 2008: Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing. World Health Organization. Geneva, 2006.

Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, Sandhoff K, Brinkmann V, Kaufmann SH, Schaible UE. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity** 2006;24:105-17.

Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. **Nat Rev Immunol.** 2003;3:199-210.

www.cbc.ca/story/science/national/2006/03/17/tb-who060317.html

Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. **Annu Rev Immunol.** 2006;24:209-26.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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