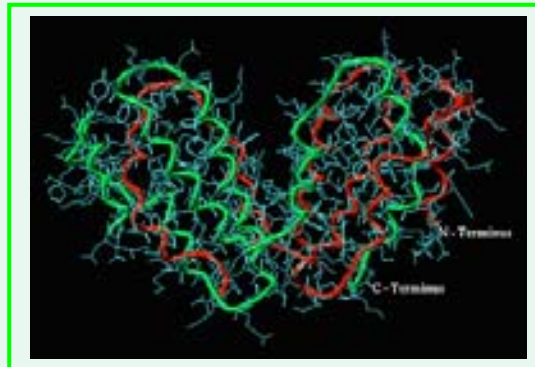


FRANCISCA HOSANA BARRETO DE  
OLIVEIRA

*Interferon gama*

*versus*

*Asma*



RECIFE

2004

**FRANCISCA HOSANA BARRETO DE OLIVEIRA**

*Interferon gama*  
*versus*  
*asma*

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento Materno Infantil do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente

**Orientadora:**

***Prof<sup>a</sup> Dra. Sílvia Wanick Sarinho***

**Co-Orientador:**

***Prof<sup>a</sup> Dr. Emanuel Sávio C. Sarinho***



**RECIFE**  
**2004**

**Título:**

Interferon gama versus asma

**Nome:** Francisca Hosana Barreto de Oliveira

**Tese aprovada em:** 29 / 03 / 04

**Membros da Banca Examinadora:**

- Emília Pessoa Perez \_\_\_\_\_
- Antônio Roberto Leite Campelo \_\_\_\_\_
- Sílvia Maria Lucena Montenegro \_\_\_\_\_

**Recife  
2004**

“É muito melhor lançar-se à luta em busca do triunfo, mesmo correndo risco do insucesso, do que formar filas com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem vitória ou derrota”.

Martin Luther King

## Dedicatória

---

---

Dedico este trabalho a minha família, razão de minha existência, e principal estímulo para mais esta realização.

## **Agradecimentos**

---

---

– A Deus, minha FORÇA SOBERANA pela sua presença constante em minha vida, a quem sempre recorro e encontro forças para vencer todos os obstáculos.

– A meus pais, Ramiro Guarino e Helena Barreto pelo amor incondicional, principal incentivo em tudo que diz respeito ao meu crescimento pessoal.

– A Júnior, meu companheiro e grande amigo, pela paciência e incentivo inesgotável que tanto me ajudou a conquistar mais esta etapa. Esta vitória é nossa.

– A Davi, meu filho, a quem dedico a alegria desta realização.

- Aos meus irmãos, Antônio Lanter e Maria Carla que mesmo à distância deram sua contribuição, nesta fase de minha vida.
  
- A Tereza e Bel, meus dois anjos da guarda.
  
- A professora Sílvia Sarinho, pela orientação, carinhosa atenção dispensada, amizade, e valiosas sugestões.
  
- Ao professor Emanuel Sarinho, meu co-orientador, por seus ensinamentos em Alergia e Imunologia, pela idéia da linha de pesquisa desta dissertação e pela incansável disposição durante o desenvolvimento deste trabalho.
  
- A profa Gisélia Alves, por sua delicada atenção e pertinentes sugestões.
  
- Aos professores José Angelo Rizzo e Almerinda Silva, pelas valiosas contribuições na pré-banca.
  
- A Décio Medeiros, grande amigo e colega de mestrado, pela comunhão em todas as etapas desta caminhada.
  
- Aos colegas da turma de mestrado: José Henrique Moura, Carmina Santos, David Negrão e Betânia Santos, pelo agradável convívio.

- A Cláudia Fonseca fisioterapeuta e mestranda, pelas palavras de incentivo, dispensadas na etapa final desta dissertação.
  
- A Rosângela Queiroz, pela grande contribuição na operacionalização desta pesquisa.
  
- Às amigas, Ana Carla Agra e Martha Tereza Albuquerque pela grande compreensão e cooperação nos plantões ao longo desta etapa.
  
- A Paulo Sérgio Nascimento, pela assistência prestada no decorrer do curso assim como pelo seu alto astral e palavras de ânimo nas horas certas.
  
- Ao Centro de Pesquisa Ageu Magalhães, local onde se realizou a dosagem da citocina. Em especial, a dra Sílvia Montenegro, pela grande colaboração seja na realização da parte técnica laboratorial desta pesquisa, bem como pela indiscutível ajuda na troca do conhecimento científico.
  
- A Secretaria de Saúde de Pernambuco, pela doação do PPD.
  
- Aos pais, crianças e adolescentes que participaram desta pesquisa.



# Sumário

<b>LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS .....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
	<b>p</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Referências bibliográficas .....</b>	<b>04</b>
<b>2. ARTIGO I</b>	
<b>Importância da relação entre interferon gama e asma .....</b>	<b>05</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>06</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>07</b>
<b>2.1 Introdução .....</b>	<b>08</b>
<b>2.2 Interferon tipo II (interferon-<math>\gamma</math>) .....</b>	<b>09</b>
<b>2.3 IFN-<math>\gamma</math> e Atopia .....</b>	<b>09</b>
<b>2.4 IFN-<math>\gamma</math> e Patogênese da Asma .....</b>	<b>13</b>
<b>2.5 IFN-<math>\gamma</math> e BCG .....</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Perspectivas terapêuticas .....</b>	<b>15</b>
<b>2.7 Considerações finais .....</b>	<b>16</b>
<b>2.8 Referências Bibliográficas .....</b>	<b>17</b>

	<b>P</b>
<b>3. ARTIGO II</b>	
<b>Produção de interferon gama em asmáticos com pequena cicatriz de BCG .....</b>	<b>20</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>21</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Introdução .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Casuística e métodos.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.1 Desenho de estudo / População estudada .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2 Operacionalização da pesquisa .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Preparação celular e condições de cultura .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Dosagem da citocina IFN-<math>\gamma</math> .....</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Dosagem de IgE total e específica .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Análise estatística .....</b>	<b>32</b>
<b>3.7 Resultados .....</b>	<b>33</b>
<b>3.7.1 Produção de IFN-<math>\gamma</math> em asmáticos .....</b>	<b>34</b>
<b>3.7.2 Produção de IFN-<math>\gamma</math> relacionados aos níveis de eosinófilos .....</b>	<b>36</b>
<b>3.7.3 Produção de IFN-<math>\gamma</math> relacionados aos níveis de IgE total e específica para ácaros .....</b>	<b>36</b>
<b>3.8 Discussão .....</b>	<b>38</b>
<b>3.9 Referências bibliográficas .....</b>	<b>43</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>47</b>
<b>5. ANEXOS .....</b>	<b>49</b>

# Lista de figura, tabelas e gráficos

## ARTIGO I

		p.
	<b>FIGURA</b>	
<b>Figura 1</b>	Modelo explicativo do papel do interferon gama na relação Th1/Th2 .....	12

## ARTIGO II

		p.
	<b>TABELAS</b>	
<b>Tabela 1</b>	Características demográficas, clínicas e de testes diagnósticos da amostra. Hospital das Clínicas, Recife, 2002 .....	29
<b>Tabela 2</b>	Valores de IFN- $\gamma$ (pg/ml) segundo o tipo de estímulo nos grupos de asmáticos e comparativo. Hospital das Clínicas, Recife, 2002 .....	34

## GRÁFICOS

- Gráfico 1** Produção de IFN- $\gamma$  mensurado através de ELISA de 12 pacientes asmáticos e 7 indivíduos de grupo comparativo, utilizando cultura de sangue total sem estímulo (A), com estímulos PPD (B) e PMA/Iono (C). Foi realizada comparação estatística dentro de cada grupo e o valor de  $p$  está incluído na Figura. Foi considerado  $p < 0,05$  como significativo. A barra horizontal em cada gráfico representa a mediana do grupo ..... 35
- Gráfico 2** Níveis de IFN- $\gamma$  mensurado através de ELISA após estímulo com PPD em 12 asmáticos e 7 indivíduos de grupo comparativo de acordo com: a presença de eosinofilia  $\geq 500$  cels/mm<sup>3</sup> (A), IgE total elevada  $\geq 400$  UI/ml (B), IgE específica para *Dpt*  $\geq 0,5$  kU/l (C) e IgE específica para *Bt*  $\geq 0,5$  kU/l (D). Foi realizada comparação estatística dentro de cada grupo e o valor de  $p$  está incluído na Figura. Considerando  $p < 0,05$  como significativo. A barra horizontal em cada gráfico representa a mediana do grupo ..... 37

## Interferon gama versus asma

### Resumo

Esta dissertação de mestrado é apresentada no formato de dois artigos: um artigo de revisão que tem como título: Importância da relação entre asma e interferon gama e um artigo original cujo tema é: Produção de interferon gama em asmáticos com pequena cicatriz de BCG.

O **objetivo** do artigo de revisão foi realizar uma revisão de literatura acerca do papel do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) na asma. O objetivo principal do artigo original foi verificar se asmáticos, com pequena cicatriz de BCG, apresentam deficiência de produção de IFN- $\gamma$  em relação a um grupo de comparação. E também verificar se há relação entre a produção de IFN- $\gamma$  e a contagem de eosinófilos, os níveis de IgE total, e específica contra ácaros.

**Métodos:** No artigo de revisão, foram pesquisados dados do Medline e Lilacs nos últimos 10 anos. No artigo original foram comparados o sangue de pacientes asmáticos com pequena cicatriz de BCG e indivíduos não asmáticos com grande cicatriz, e avaliada a capacidade de produção de IFN- $\gamma$ , em 3 situações: com estímulo PPD RT-23, com PMA/ Iono e sem estímulo. Também foi analisado os níveis de eosinófilos, IgE total, e IgE específica em relação à produção desta citocina.

**Resultados:** Na revisão de literatura, verificou-se a existência de várias pesquisas relacionando asma e IFN- $\gamma$  que, entretanto, apresentam resultados controversos. No artigo original, observou-se que os asmáticos, quando estimulados com PPD apresentaram uma diminuição na produção de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo de comparação. Entretanto, isto não foi observado nas outras situações. Quanto aos níveis de eosinófilos, IgE total, e específica para ácaros em relação à produção de IFN- $\gamma$ , não foi observada diferença.

**Conclusão:** Na revisão da literatura, ficou evidenciado que a discussão sobre a relação entre IFN- $\gamma$  e asma, ainda é assunto polêmico. No artigo original concluiu-se que asmáticos com pequena cicatriz de BCG apresentam baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$ .

**Palavras chaves:** Interferon gama; citocinas; asma; cicatriz BCG; atopia.

## Interferon gamma versus asthma

### ABSTRACT

**Background:** This master's dissertation is presented in the form of two articles. The title of the first article is 'The importance of the relations between asthma and interferon gamma'. The title of the second article is an original paper entitled 'Production of interferon gamma in asthma patients with small BCG scars'.

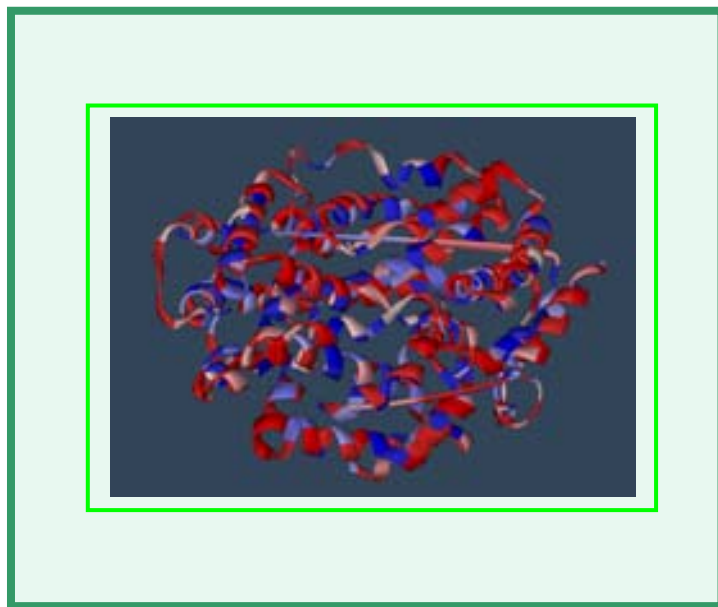
The aim of the first article was to carry out a review of the literature on the role of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in asthma. The principal aim of the second article was to verify if asthma patients with small BCG scars exhibit a deficiency in the production of IFN- $\gamma$  in relation to a comparison group, as well as verify if there is a relation between the production of IFN- $\gamma$  and the eosinophil count, the levels of total IgE and specific IgE against acarus (dust mites).

**Methods:** In the review article, data from Medline and Lilacs over the last ten years served as the research material. In the original article, blood from asthma patients with small BCG scars was compared to non-asthmatic individuals with large scars. The capacity for IFN- $\gamma$  production was evaluated in 3 situations: with PPD RT-23 stimulus; with PMA/Iono; and without stimulus. The levels of eosinophils, total IgE and specific IgE in relation to the production of this cytokine were also analyzed.

**Results:** In the literature review various research studies were found relating asthma to IFN- $\gamma$ , but presenting controversial results. In the original article it was observed that, when stimulated with PPD, asthma patients exhibited a diminished production of IFN- $\gamma$  in relation to the comparison group. However, this was not observed in the other situations. No differences were observed in regards to the levels of eosinophils, total IgE and IgE specific to acarus in relation to IFN- $\gamma$  production.

**Conclusion:** The review of the literature demonstrated that the relation between IFN- $\gamma$  and asthma is a controversial issue. The original paper demonstrated that asthma patients with small BCG scars present low levels of IFN- $\gamma$  production.

**Key words:** Interferon gamma; cytokine; asthma, BCG scar; atopic.



# *1-INTRODUÇÃO*

---

# 1 – Introdução

Diante do progresso social e conseqüente melhoria dos sistemas de saúde, os países desenvolvidos têm apresentado redução na prevalência de doenças infecto-parasitárias de suas crianças e adolescentes. Por conseguinte, esses países têm direcionado sua atenção para doenças de alta prevalência como a asma<sup>1</sup>. No entanto, tem-se verificado que países em desenvolvimento, como o Brasil, a asma também é um importante problema de saúde pública<sup>2</sup>.

Algumas hipóteses tentam explicar a etiopatogenia da asma. Entre estas, há a hipótese que resulta da observação de alguns pesquisadores que correlacionam a redução das doenças infecciosas com o aumento das doenças alérgicas. Eles baseiam-se no fato do sistema imune dos neonatos ser direcionado para células Th2 e necessitar oportunamente de um adequado estímulo ambiental que produza o equilíbrio imunológico (Th1/Th2).

Estudos têm demonstrado que a extensão de um desequilíbrio imunológico entre células Th1 e Th2 (indicado pela diminuição da produção de IFN- $\gamma$ ), durante a fase neonatal pode ser útil em prever o subseqüente desenvolvimento da asma, e outras doenças alérgicas<sup>3,4,5</sup>. Os baixos níveis de IFN- $\gamma$  na idade de 7 a 13 anos pode traduzir a persistência do padrão Th2 da resposta imunológica em crianças asmáticas.



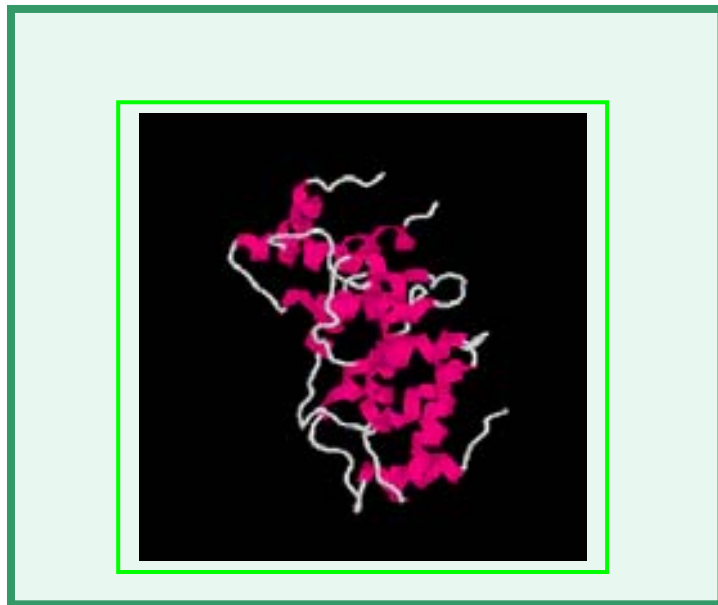
Por outro lado, o diâmetro da cicatriz da vacina BCG (bacilo de Calmette-Guérin) é considerado uma medida útil da resposta imune do indivíduo estando usualmente relacionado a sua dose<sup>6</sup>. Esta vacina induz as reações locais secundárias a sua administração por via intradérmica, conduzindo a um significativo aumento na resposta de citocinas derivadas de linfócitos Th1<sup>7</sup>. Há referência que as reações teciduais que se desenvolvem no sítio da imunização, secundárias a este bacilo, são proporcionais a produção de IFN- $\gamma$  em resposta aos antígenos micobacterianos<sup>8</sup>. Marks et al sugerem que a vacina BCG poderia prever a resposta de células T a alérgenos em crianças de 7 a 13 anos após a vacinação<sup>9</sup>.

Verificar o comportamento da asma do ponto de vista imunológico no nosso meio é importante, uma vez que nossas crianças são expostas aos estímulos do tipo Th1, como a vacina BCG, em idade precoce.

A luz do conhecimento científico, atualmente discute-se a importância da relação entre asma e IFN- $\gamma$ . Este tema será discutido ao longo desta dissertação, organizada em forma de artigos. No primeiro artigo foi realizado uma Revisão de Literatura e tem como título: Importância da Relação entre Interferon gama e Asma. O segundo artigo apresenta-se na forma de artigo original cujo título é: Produção de Interferon gama em Asmáticos com Pequena Cicatriz de BCG.

## 1.1 Referências bibliográficas

- 1 The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC, *Lancet*, 1998;351:1225-32.
- 2 Consenso Brasileiro no Manejo da Asma, II. *J Pneumol*, 1998;24(4):171-278.
- 3 Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD et al. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998;160:4730-7.
- 4 Tang MLK, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 1994;344:983-5.
- 5 Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
- 6 Aggarwal A, Dutta AK. Timing and dose of BCG vaccination in infants as assessed by postvaccination tuberculin sensitivity, *Indian Pediatr* 1995;32:635-9.
- 7 Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, Wolfe I, Ceesay SJ, Groote D, et al. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccination, *J Immunol*, 1999;163:2249-55.
- 8 Kemp EB, Belsh RB, Hoft DF. Immune responses stimulated by percutaneous and intradermal Bacille Calmette-Guérin. *J Infect Dis*, 1996;174:113-9.
- 9 Marks GB, Ng K, Zhou J, Toelle BG, Xuan W, Belousova EG et al. The effect of neonatal BCG vaccination on atopy and asthma at age 7 to 14 years: An historical cohort study in a community with a very low prevalence of tuberculosis infection and a high prevalence of atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003;11:541-9.



---

*2-ARTIGO I*

## Importância da relação entre interferon gama e asma<sup>1</sup>.

### Resumo

**Objetivo:** Revisar a literatura científica acerca do papel do interferon gama (IFN- $\gamma$ ) na doença atópica, especificamente asma.

**Métodos:** Pesquisados dados do Medline e Lilacs nos últimos 10 anos.

**Resultados:** Vários autores discutem a importância da relação entre a secreção de IFN- $\gamma$  e o componente atópico *per se*, por outro lado é questionado se esta citocina tem relação direta com a doença asmática, independente do estado atópico. Foi verificada a existência de várias pesquisas relacionando asma e IFN- $\gamma$ ; entretanto, os resultados destas pesquisas se apresentam controversos.

**Conclusão:** Ainda não se chegou a uma conclusão definitiva do verdadeiro mecanismo de atuação desempenhado pelo IFN- $\gamma$  na doença asmática, é indiscutível a importância de novas pesquisas esclarecedoras sobre este assunto.

**Palavras chaves:** Interferon gama; citocinas; asma; BCG; atopia.

---

<sup>1</sup> Artigo a ser submetido à Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia. As referências bibliográficas obedeceram ao chamado “estilo Vancouver”

## The role of interferon $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) in asthma

### ABSTRACT

**Objective:** To review the scientific literature as to the role of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in atopic diseases, specifically asthma.

**Methods:** An electronic search of the Medline and Lilacs databases in last ten years was carried out.

**Results:** Several studies have discussed the relationship between IFN- $\gamma$  and the atopic status *per se*. However, questions have also been raised as to whether this cytokine actually has a direct relation with asthma, regardless of the atopic state. The existence of a number of research studies was verified relating asthma and IFN- $\gamma$ , but results from these studies have been controversial and, therefore, inconclusive.

**Conclusion:** There has been no definitive conclusion reached thus far on the actual role of IFN- $\gamma$  in the asthma mechanism. The importance of further research on the subject is indisputable.

**Keywords:** Interferon gamma; cytokine; asthma; BCG; atopic.

## 2.1 Introdução

A compreensão dos mecanismos patogênicos intrínsecos das diversas variantes da asma é essencial para identificar os fatores determinantes da resposta inflamatória dessa doença e para entender como os processos imunológicos produzem as anormalidades características das vias aéreas<sup>1</sup>. Especialmente na última década, muito se avançou no conhecimento da fisiopatologia da asma e, em especial no entendimento do papel das citocinas como peças fundamentais do processo imune.

Citocinas são hormônios protéicos que atuam nas fases efetoras das imunidades inata e específica. Na resposta imune específica, elas são uma das unidades fundamentais e podem agir de modo autócrino, parácrino ou endócrino. Proporcionam a comunicação entre as células facilitando diversas funções como crescimento, quimioatração, mudança no isotipo da imunoglobulina, proliferação e diferenciação celular. Muitas das citocinas são reconhecidas por exibir pleiotropismo, ou seja, atuam em diversos tipos de células e estimulam diferentes respostas. As citocinas, entre elas os vários tipos de interferons, funcionam como mediadores inflamatórios exercendo sua ação através dos receptores celulares de superfície de alta afinidade<sup>2,3</sup>.

Os interferons dividem-se em dois tipos: o tipo I que compreende dois grupos de proteínas sorologicamente distintas, interferon alfa (IFN- $\alpha$ ) e beta (IFN- $\beta$ ) e o tipo II, interferon gama (IFN- $\gamma$ ). O tipo I é produzido por monócitos, macrófagos, células linfoblásticas, fibroblastos e células infectadas por vírus; suas principais atividades biológicas são a limitação da propagação de infecções virais e de parasitoses<sup>2,4</sup>.

O IFN- $\gamma$  também chamado interferon imune ou do tipo II, é uma glicoproteína homodimérica<sup>2</sup>. É produzido pelas células Th1 CD4+, células natural Killer (NK), e algumas células T CD8+. Tem ação sinérgica junto ao

IFN- $\alpha$  e ao IFN- $\beta$  na atividade anti-viral e anti-parasitária, mas sua principal atividade é imunomoduladora<sup>1,5</sup>.

## 2.2 Interferon tipo II (interferon- $\gamma$ )

Entre as várias propriedades do IFN- $\gamma$  relacionadas com a imunorregulação são citadas a inibição da proliferação de células que sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e a diminuição de produção de algumas imunoglobulinas em situações especiais, como IgG1, IgG4, e IgE. Estimula a expressão das moléculas das classes I e II dos antígenos do complexo de histocompatibilidade principal ampliando a fase de reconhecimento da resposta imune e facilitando tanto a resposta humoral quanto a celular. Em monócitos e macrófagos estimula a produção de receptores de alta afinidade para IgG (Fc $\gamma$ RI), além de induzir a síntese de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) por estas células. Atua sobre os linfócitos T, promovendo sua diferenciação em Th1, juntamente com outras citocinas entre elas a IL-12. Estas células Th1 são responsáveis pela síntese de IL-2, IL-12, IL-6, IL-18 e IFN- $\gamma$  todas relacionadas à resposta inflamatória<sup>5,6</sup>. Portanto, o efeito final das variadas atividades do IFN- $\gamma$  é promover reações inflamatórias ricas em macrófagos e ao mesmo tempo inibir as reações ricas em eosinófilos dependentes da IgE<sup>2</sup>.

## 2.3 IFN- $\gamma$ e Atopia

Sabe-se que a gravidez em mamíferos, incluindo o homem, é acompanhada pelo desvio do sistema imune materno para a imunidade do tipo Th2 em consequência, a população de células T na medula óssea de recém-nascidos é direcionada para um fenótipo Th2 como resultado de fatores tróficos Th2 da placenta. A extensão de um desequilíbrio entre células Th1 e Th2 (indicado pela diminuição da produção de IFN- $\gamma$ ) durante a

fase neonatal pode ser útil em prever o subsequente desenvolvimento de uma doença alérgica<sup>7, 8, 9</sup>.

Estudo prévio demonstrou que a capacidade de produzir IFN- $\gamma$  é mais baixa nas células T fetais do que em adultos, havendo inclusive evidências do efeito altamente tóxico desta citocina para a placenta<sup>9</sup>. Entretanto, em indivíduos não atópicos a produção de IFN- $\gamma$  tende a aumentar progressivamente do nascimento até os 5 anos de idade<sup>10</sup>.

A relação entre desequilíbrio de citocinas e a expressão de atopia é de grande interesse. A idéia de que a inflamação alérgica resulta de um desequilíbrio entre células Th1 e Th2, chama a atenção para a citocina Th1, IFN- $\gamma$ . Esta citocina inibe a síntese de IgE e a diferenciação de células precursoras para Th2, e sua falta favorece a indução de citocinas Th2 na promoção da inflamação alérgica. Contudo, este modelo tem sido questionado devido a dados que evidenciam aumento de IFN- $\gamma$  no soro, e em no fluido do lavado bronco-alveolar de pacientes com asma grave na fase aguda<sup>11</sup>.

Efetivamente vários autores questionam se a diminuição na produção de IFN- $\gamma$  é um defeito primário do estado atópico, pois foi observado uma produção significativamente mais baixa de IFN- $\gamma$  em culturas de células do cordão umbilical de crianças com *prick test* positivo aos doze meses de idade, do que naqueles com teste negativo. Esta reduzida produção de IFN- $\gamma$  antes do início dos sintomas sugere que o defeito no IFN- $\gamma$  é uma característica intrínseca do atópico e pode ser um importante fator predisponente para o desenvolvimento da doença alérgica. Interessante é que esses achados demonstram que a alteração do IFN- $\gamma$  não tem relação direta com a história familiar de atopia, mas sim com o desenvolvimento da doença atópica<sup>8</sup>. Outras pesquisas reforçam essa hipótese ao admitir que uma característica do fenótipo atópico é a persistência pós-natal da imunidade Th2 alérgeno-específica a inalantes, ao invés de existir o re-

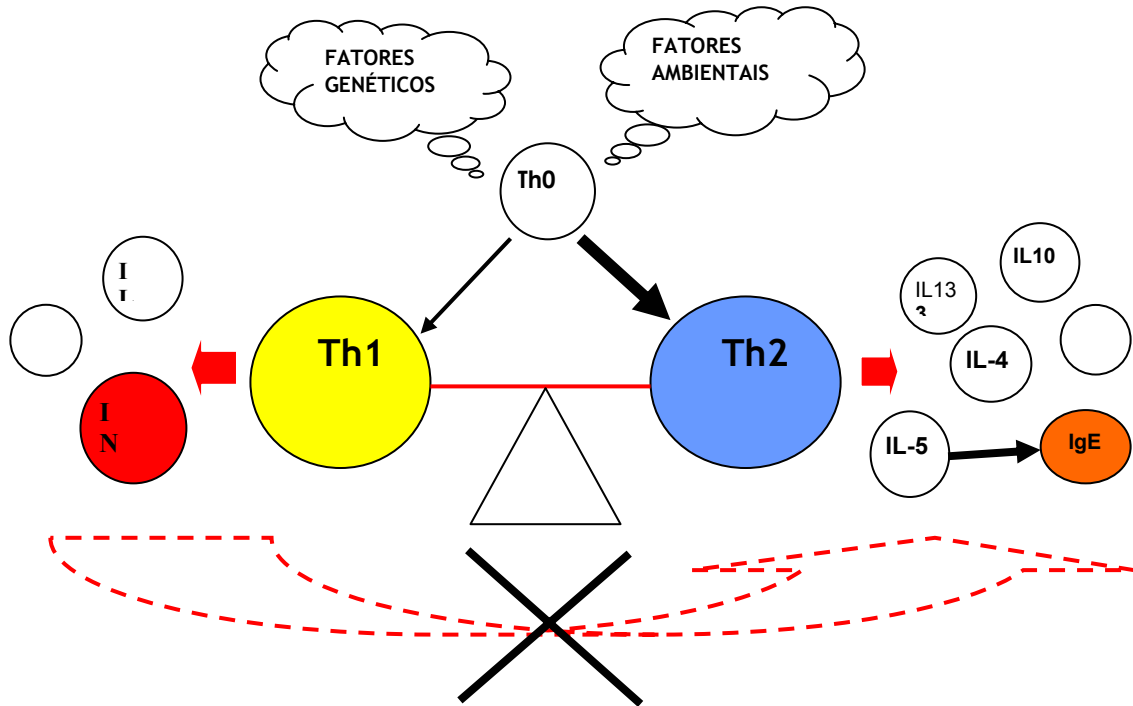


direcionamento (desvio imune) dessa resposta a citocinas de fenótipo Th1 que ocorre normalmente no indivíduo não atópico, sugerindo que a falha desse processo de desvio imune está associada com a capacidade diminuída para sintetizar citocinas Th1 em especial, o IFN- $\gamma$ <sup>10</sup>.

Os níveis reduzidos do IFN- $\gamma$  em relação ao adulto, que ocorre em lactentes normais é parcialmente atribuído a co-estimulação ineficiente pelas células acessórias, tais como os monócitos<sup>12</sup>. Entretanto, esta redução torna-se de grande amplitude em indivíduos geneticamente de risco para atopia e tende a persistir podendo ser decorrente de um defeito intrínseco das células T dos atópicos. Portanto, a baixa capacidade de produzir IFN- $\gamma$  durante o início da exposição extra-uterina aos alérgenos ambientais pode comprometer o processo de desvio imune, favorecendo o mecanismo intrínseco que envolve a inibição mediada pelo IFN- $\gamma$  no crescimento das células Th2<sup>10</sup>.

No que diz respeito aos níveis de IgE na doença alérgica, apesar de evidências demonstrarem correlação negativa entre a produção de IFN- $\gamma$  e os níveis de IgE sérica<sup>13,14</sup>, parece existir melhor correlação entre doença alérgica com baixos níveis de IFN- $\gamma$  que com níveis elevados de IgE total<sup>8</sup>.

Embora a natureza do defeito na secreção de IFN- $\gamma$  não seja conhecida, estudos recentes indicam antes a ocorrência de um defeito pós-transcrição de secreção do que propriamente uma falta de células produtoras de IFN- $\gamma$ <sup>15</sup>. Por ser inibidor da síntese de IgE, a redução do IFN- $\gamma$  pode ser um importante fator indutor indireto da elevação desta imunoglobulina na doença atópica<sup>8</sup> (figura1).

**MODELO EXPLICATIVO DO PAPEL DO INTERFERON GAMA NA RELAÇÃO Th1/Th2**

**Figura 1.** As células Th1 e Th2 derivam de uma única célula (Th0), que sofre influência de fatores genéticos e ambientais. As células Th1 e Th2 produzem citocinas diferentes com ação contra-reguladora. O IFN- $\gamma$  atua inibindo a síntese de IgE e a diferenciação de células precursoras para Th2, em consequência à sua falta, há um desequilíbrio entre células Th1 e Th2 favorecendo citocinas Th2 e a inflamação alérgica.

## 2.4 IFN- $\gamma$ e Patogênese da Asma

Em relação a patogênese da asma, o IFN- $\gamma$  desempenha um papel a nível de células alvos tais como macrófagos, células T-CD4+, T-CD8+, e NK. Nos macrófagos esta citocina é responsável pela diferenciação, ativação, e direcionamento de expressão dos receptores, das moléculas de classe I e II. Ainda interfere aumentando a síntese do óxido nítrico, de IL-1 e do fator de necrose tumoral. Quanto ao efeito na imunidade celular o IFN- $\gamma$  atua nas células T CD4+ induzindo o perfil de citocinas de um padrão de citocinas Th2 para Th1 e no aumento da expressão dos receptores de IL-2. Nas células TCD8+, atua aumentando a citotoxicidade; e nas células NK produzindo sua ativação<sup>1</sup>.

As tentativas iniciais em determinar quais citocinas estavam presentes na asma demonstraram um aumento da expressão de células produtoras de RNAm para IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, e GM-CSF. Por outro lado, não houve aumento na expressão de células produtoras de RNAm na produção de IFN- $\gamma$ <sup>16,17</sup>. Este perfil de expressão de citocinas direciona a subclasse de células Th2 descritas previamente em ratos que preferencialmente expressam IL-4 e IL-5<sup>18</sup>. Essas células tipo Th2 diferenciam-se de células nativas tipo Th0 sob a influência de IL-4. Ao contrário, células tipo Th1 expressam IFN- $\gamma$  e IL-2 e são induzidas a partir de linfócitos Th0 pela presença de IL-12. Portanto, atualmente se aceita que o tipo de citocina presente no momento da exposição do antígeno são um dos principais determinantes diretos que direcionam as células T seja para um tipo de resposta Th1 ou Th2. As origens das células produtoras de IL-4 e IL-12 que induz a polarização da produção de citocinas célula-T são ainda incertas. Além disso, essa área tem se tornado consideravelmente mais complexa devido às recentes evidências de que diferentes tipos de células dendríticas podem iniciar a resposta imune com IFN- $\gamma$  ou prostaglandina E-2 (PGE-2) e assim desenvolver células do tipo Th1 ou Th2, respectivamente<sup>19</sup>. Do ponto de vista fisiopatológico, indivíduos asmáticos atópicos e não

atópicos parecem ter um mecanismo imunopatológico comum que promove aumento em IL-4, IL-5, e IgE total e específica<sup>20</sup>. Em contrapartida, estudos demonstraram diferenças na produção de citocinas especificamente IFN- $\gamma$  e IL-4, na asma atópica sugerindo ser esta uma característica do estado atópico *per se*<sup>13,14</sup>.

## 2.5 IFN- $\gamma$ e BCG

Existe a hipótese de que determinadas infecções na infância podem alterar fortemente o desenvolvimento do sistema imune, tanto sistemicamente quanto dentro dos pulmões, incluindo sarampo e tuberculose. Algumas destas infecções induzem um ambiente imunológico do tipo Th1 com a presença de IL-12 e IFN- $\gamma$  como citocinas predominantes; atuando estas citocinas como inibidores das funções de citocinas Th2, e assim sendo a ausência de tais infecções liberariam um mecanismo imune Th2 e a conseqüente desordem alérgica<sup>21</sup>.

A vacina BCG, quando administrado por via intradérmica inclusive em recém-nascidos, induz um significativo aumento na resposta de citocinas derivadas de linfócitos Th1<sup>22</sup>. Há referências que as reações teciduais que se desenvolvem no sítio da imunização, secundárias a este bacilo, são proporcionais a produção de IFN- $\gamma$  em resposta aos antígenos micobacterianos<sup>23</sup>. Portanto, o diâmetro da cicatriz é considerado uma medida útil da resposta imune do indivíduo a esta vacina, estando usualmente relacionado a dose desta e as reações locais secundárias a administração da mesma<sup>24</sup>. Marks et al sugerem que a vacina BCG poderia predizer a resposta de células T a alérgenos 7 a 14 anos após a vacinação<sup>25</sup>.

Quanto ao estímulo tuberculínico (PPD), a aplicação deste estimula os linfócitos e ativa uma série de eventos que conduzem a uma reação de hipersensibilidade retardada. A reatividade dérmica envolve

vasodilatação, edema, e infiltração de linfócitos, basófilos, monócitos e neutrófilos na aplicação do antígeno. Linfócitos T antígeno específicos proliferam e liberam citocinas, as quais mediam o acúmulo de outras células no sítio da aplicação<sup>26</sup>. Shirakawa et al em estudo realizado no Japão, sugeriram que respondedores a tuberculina apresentem níveis significativamente mais baixos de citocinas Th2 (IL4, IL-10 e IL-13) e maiores níveis de citocina Th1 entre elas, o IFN- $\gamma$ <sup>27</sup>. Entretanto, outros autores encontraram resultados divergentes do resultado japonês<sup>28,29,30</sup>.

## 2.6 Perspectivas terapêuticas

As doenças atópicas estão associadas com uma mudança na resposta imune onde há desvio de um padrão Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2) para um padrão Th2 (IL-4, IL-5, e IL-13). Portanto, um defeito na produção de IFN- $\gamma$  poderá predispor ao desenvolvimento de doenças alérgicas e asma; acredita-se que a correção deste desequilíbrio poderia estar associado a resolução da doença alérgica<sup>31</sup>.

A ausência de um sinal inibitório Th2 efetivo no período pós-natal precoce é um fator decisivo podendo permitir uma maturação e expansão precoce de células de memória funcionalmente Th2, tal que o controle negativo via competição de células Th1 não consegue ser rapidamente obtido. Isto confirmaria a hipótese de que a infância precoce seria o único período em que as respostas imunes pudessem ser potencialmente manipuladas terapêutica e profilaticamente<sup>10</sup>.

Análogos sintéticos de IFN- $\gamma$  apesar dos efeitos colaterais, têm tido uso clínico em algumas doenças tais com na fibrose pulmonar idiopática, em algumas neoplasias, e na arteriosclerose, mas até o momento não parecem ser promissoras na terapêutica das doenças alérgicas já estabelecidas<sup>32,33</sup>.

## 2.7 Comentários finais

Estudo caso-controle de Sarinho e colaboradores (2000)<sup>34</sup> analisando a relação entre tamanho de cicatriz de BCG e asma, sugeriram que a presença de grande cicatriz de BCG parece ser um fator de proteção para a asma. Da mesma maneira Queiroz RM (2002)<sup>35</sup> em estudo caso-controle, avaliou o tamanho cicatriz de BCG demonstrando que pacientes asmáticos apresentam uma maior probabilidade de apresentar uma cicatriz de BCG < 5 mm em relação aos controles.

Considerando que a vacina BCG é indutora de resposta Th1, e que as reações teciduais da vacina provavelmente decorrem da produção de IFN- $\gamma$ . É interessante a realização de novos estudos que busquem elucidar a relação do diâmetro de cicatriz de BCG como uma medida útil de resposta imune, assim como a associação das diversas citocinas, entre elas o IFN- $\gamma$ , com a asma.

## 2.8 Referências Bibliográficas

- 1 Busse, WW & Lemanske JR., RF. Asthma. *New Engl J Med* 2001; 344:350-362.
- 2 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Citocinas Imunologia Celular e Molecular*, 3ª edição, Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2000:256-275. ISBN 85-7309-364-1.
- 3 Hamid QA, Minsshall EM. Molecular pathology of allergic disease. I. Lower airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 20-36.
- 4 Varella PP, Forte WC. *Citocinas: revisão. rev. bras. alerg. imunopatol.* 2001;24:146-154.
- 5 De Maeyer E, De Maeyer-Guinard J. Interferon-gamma. *Curr Opin Immunol.* 1992;4:321-326.
- 6 Roitt, Brostoff, Male. *Imunologia*, 5ª edição, São Paulo: Ed. Manole. 1999;123-124.
- 7 Prescott SL, Macaubas C, Holt BJ, Smallacombe TB, Loh R, Sly PD et al. Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998;160:4730-7.
- 8 Tang MLK, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ. Reduced interferon-gamma secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 1994;344:983-5
- 9 Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
- 10 Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999;353:196-200.
- 11 Corrigan CJ, Kay AB. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma: relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:970-7.
- 12 Wilson CB, Westall J, Johnston L, Lewis DB, Dover SK, Apert AR. Decreased production of interferon gamma by human neonatal cells: intrinsic and regulatory deficiencies. *J Clin Invest* 1986;77:860-7.

- 13 Tang MLK, Coleman J, Kemp AS. Interleukin-4 and interferon-gamma production in atopic and non-atopic children with asthma. *Clin Exp Allergy* 1994;25:515-21.
- 14 Bettiol J, Bartsch P, Louis R, De Groote D, Gevaerts Y, Louis E et al. *Allergy* 2000;55(12):1134-41.
- 15 Tang ML, Varigos G, Kemp AS. Reduced interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) secretion with increased IFN- $\gamma$  mRNA expression in atopic dermatitis: evidence for a post-transcriptional defect. *Clin Exp Immunol* 1994;97:483-90.
- 16 Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, et al. IL-5 mRNA in mucosal bronchial biopsies from asthmatic subjects. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;94:169-70.
- 17 Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 1992;326:298-304.
- 18 Mossman TR. Cytokine secretion patterns and cross-regulation of T cell subset. *Immunol Res* 1991;10:183-8.
- 19 Kanpsenberg ML, Hilkens CM, Wierenga EA, Karlinski P. The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells: implications for atopic allergy. *Clin Exp Allergy* 1999;29(2 Suppl):33-36.
- 20 Humbert M, Grant JA, Taborda-Barata L, Durham SR, Pfister R, Menz G et al. High-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI)-bearing cells in bronchial biopsies from atopic and nonatopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*; 1996;153:1931-7.
- 21 Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ. Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 1996;347:1792-6.
- 22 Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, Wolfe I, Ceesay SJ, Groote D, et al. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin vaccination, *Journal of Immunology*, 1999; 163:2249-55.
- 23 Kemp EB, Belsh RB, Hoft DF. Immune responses stimulated by percutaneous and intradermal Bacille Calmette-Guérin. *The Journal of Infectious Diseases*, 1996; 174:113-9.
- 24 Aggarwal A, Dutta AK. Timing and dose of BCG vaccination in infants as assessed by postvaccination tuberculin sensitivity, *Indian Pediatrics* 1995;32:635-9.



- 25 Marks GB, Ng K, Zhou J, Toelle BG, Xuan W, Belousova EG et al. The effect of neonatal BCG vaccination on atopy and asthma at age 7 to 14 years: An historical cohort study in a community with a very low prevalence of tuberculosis infection and a high prevalence of atopic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2003;11:541-9.
- 26 Huebner RE, Schein MF, Bass JB. The tuberculin skin test. *Clinical Infectious Diseases* 1993;17:968-75.
- 27 Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77-9.
- 28 Yilmaz M, Bingöl G, Altintas D, Kendirli SG. Correlation between atopic diseases and tuberculin responses. *Allergy*; 2000;55:664-667.
- 29 Alm JS, Lilja G, P Pershagen G, Scheynius A. Early BCG vaccination and development of atopy. *Lancet* 1997;350:400-403.
- 30 Wong GWK, Hui DSC, Tam CM, Chan HH, Fok TF, Chan-Yeng M et al. Asthma, atopy and tuberculin responses in Chinese schoolchildren in Hong Kong. *Thorax* 2001;56:770-773.
- 31 Busse WW, Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S799-804.
- 32 Ziesche R, Hofbauer E, Wittman K, Petkov V, Block LH. A preliminary study of long term treatment with interferon-gamma-1b and low dose predinolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *New Eng J Med.* 1999;341:1264-9.
- 33 Carson WE. Pre-treatment of malignant melanoma tumor with interferon-gamma potetiates IFN- $\alpha$  jak-satat signaling: potential role for IL-12 therapy. *Am Soc Clin Oncol.* 1998;20:420-30.
- 34 Sarinho E, Schor D, Veloso M, Lima M. BCG scar diameter and asthma: A case control study. *J allergy Clin Immunol* 2000;106:1199-200.
- 35 Queiroz RM. Diâmetro médio da cicatriz de BCG em crianças e adolescentes asmáticos 2002. 82 páginas. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) Departamento Materno Infantil. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Pernambuco. Recife.



## *3-ARTIGO II*

---

## Produção de interferon gama em asmáticos com pequena cicatriz de BCG<sup>2</sup>

### Resumo

**Introdução:** Estudos têm sugerido que um defeito da secreção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é uma característica da atopia, outros referem relação desta citocina com a asma, independente do estado atópico. Em contrapartida, recente pesquisa demonstrou relação entre asma e o diâmetro da cicatriz vacinal de BCG, sugerindo uma associação do tamanho desta cicatriz com a baixa produção de IFN- $\gamma$ .

**Métodos:** Foi comparado o sangue total de 12 pacientes asmáticos com diâmetro médio da cicatriz da vacina BCG < 5mm com o sangue total de 7 indivíduos não asmáticos com diâmetro médio  $\geq$  5mm e avaliada a capacidade de produção de IFN- $\gamma$ , em 3 situações: com estímulo PPD RT-23, com estímulo PMA/ Iono e sem estímulo. Também foi analisado os níveis de eosinófilos, IgE total, e IgE específica para ácaros em relação a produção de IFN- $\gamma$  após estímulo das células sanguíneas com PPD.

**Resultados:** Foi observado que os pacientes asmáticos, quando estimulados com PPD apresentaram uma diminuição ( $p < 0.05$ ) na produção de IFN- $\gamma$  em relação ao grupo comparativo. Entretanto, isto não foi observado com relação aos mesmos pacientes quando se realizou o estímulo inespecífico com PMA/ Iono ou quando não houve estímulo. Quanto aos níveis de eosinófilos, IgE total, e específica para ácaros em relação a produção de IFN- $\gamma$ , não foi observado diferença significativa.

<sup>2</sup> Artigo será submetido a Revista Allergy. As referências bibliográficas encontram-se sob o estilo Vancouver.

**Conclusão:** Asmáticos com pequena cicatriz de BCG apresentam deficiência de produção de IFN- $\gamma$  e esta provavelmente, é uma característica intrínseca dos mesmos.

**Palavras Chaves:** Interferon gama; citocinas; asma; cicatriz de BCG; atopia

## Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) levels in asthmatic subjects with small BCG scar diameter

### ABSTRACT

**Background:** Studies have reported a possible abnormal decrease in IFN- $\gamma$  production among subjects with atopic diseases. Other authors have shown a relationship between this cytokine and asthma, regardless of the atopic state. More recently, an inverse relationship has been demonstrated in research studies between asthma and the diameter of BCG scar. This suggests an association between IFN- $\gamma$  production and BCG scar size.

The main goal of this study was to verify whether infants with asthma diagnosis and small BCG scars exhibit an abnormal production of IFN- $\gamma$  by comparing these patients to non-asthmatic subjects with normal BCG scars.

**Methods:** An experimental study was carried out comparing IFN- $\gamma$  production in two different groups: group A (12 asthmatic children: 4 boys and 8 girls between 7 and 13 years, with a mean age of 9.5 years and with a BCG scar < 5 mm); and group B (7 non-asthmatic children: 4 boys and 3 girls between 8 and 13 years, with a mean age of 9.71 years and with a BCG scar  $\geq$  5mm). The IFN- $\gamma$  production was verified in relation to different stimuli: PPD RT-23, PMA/Iono and without stimulation. The levels of eosinophils, total IgE and IgE specific to acarus (dust mites) were also analyzed in relation to IFN- $\gamma$  production after stimulation of the blood cells with PPD.

**Results:** It was demonstrated that asthmatic patients have a decreased production of IFN- $\gamma$  when stimulated by PPD ( $p < 0.05$ ). However, the same was not observed when there was stimulation with PMA/Iono and/or when there was no stimulation. Concerning the eosinophil count, total IgE and IgE specific to acarus in relationship to IFN- $\gamma$  production, no significant differences were observed.

**Conclusion:** Asthmatic subjects with small BCG scar diameters exhibit a deficiency in IFN- $\gamma$  production, which is probably an intrinsic characteristic of asthmatics.

**Keywords:** Interferon gamma; cytokine; asthma; BCG scar; atopic.

### 3.1 Introdução

A asma é uma doença inflamatória eosinofílica das vias aéreas<sup>1</sup> decorrente de um desequilíbrio imunológico entre as subclasses de linfócitos T, Th1 e Th2. Em relação ao nível de citocinas, ocorre uma redução de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-2 oriundas dos linfócitos Th1 e um aumento de IL-4, IL-5, IL-13 provenientes dos linfócitos Th2<sup>2</sup>. O IFN- $\gamma$ , destaca-se como importante citocina Th1, pois inibe a síntese de IgE e a diferenciação de células precursoras para Th2 resultando na inibição da inflamação alérgica<sup>3</sup>.

Estudos em células mononucleares do sangue periférico têm sugerido que um defeito da secreção de IFN- $\gamma$  é o componente primário do estado atópico. Observou-se que mitógenos estimulando células mononucleares de neonatos com história familiar de atopia ou de lactentes que desenvolveram atopia, secretaram menos IFN- $\gamma$  que indivíduos controles<sup>4,5,6,7</sup>. Outros estudos evidenciam uma redução significativa da produção de IFN- $\gamma$  pelas células mononucleares em pacientes com asma grave<sup>8</sup> e em outras doenças alérgicas como na alergia ao leite de vaca<sup>9</sup>, e na dermatite atópica<sup>10</sup>.

Sarinho et al<sup>11</sup> em estudo recente, em que se avaliou o diâmetro da cicatriz da vacina BCG em crianças com asma, demonstrou que essas crianças produzem menor diâmetro de cicatriz do que os controles, sugerindo uma correlação do tamanho da cicatriz de BCG com a baixa produção de IFN- $\gamma$ .

A pesquisa atual deu seqüência a estudo realizado por Queiroz em 2002<sup>12</sup>, cujo objetivo principal foi avaliar a existência de associação entre asma e diâmetro da cicatriz de BCG e cujos resultados demonstraram que asmáticos apresentaram um risco 3,2 vezes maior de ter um diâmetro de

cicatriz < 5mm do que indivíduos não asmáticos, independentes de serem eles atópicos ou não.

O objetivo principal deste estudo foi verificar se crianças asmáticas, com pequena cicatriz de BCG, apresentam deficiência de produção de IFN- $\gamma$  em relação a um grupo comparativo de indivíduos não asmático e com grande cicatriz de BCG. Analisamos também, nas crianças estudadas, a relação entre a produção de IFN- $\gamma$  e a contagem de eosinófilos, os níveis de IgE total, e níveis de IgE específica contra ácaros.

## **3.2 Casuística e método**

### **3.2.1 Desenho de estudo / População estudada**

Realizou-se um estudo *quasi experimental*<sup>13</sup>, no qual o grupo experimental (asmáticos) foi selecionado a partir de pacientes acompanhados regularmente no Ambulatório de Alergia e Imunologia em Pediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil, participantes da pesquisa anteriormente mencionada<sup>12</sup>. O grupo comparativo foi obtido da mesma pesquisa, todos procedentes do serviço de Pronto Atendimento em Pediatria (HC-UFPE).

O tamanho amostral foi determinado considerando-se: o objetivo principal de comparar a diferença significativa entre os grupos (asmáticos e comparativo) em relação ao valor médio de IFN- $\gamma$ ; o nível de significância de 5%; o poder do teste com nível de 80%; as estimativas dos valores médios  $m_1$  e  $m_2$  populacionais e dos desvios padrão dos dois grupos



obtidos através do trabalho de Walker et al<sup>14</sup>. A razão entre os grupos foi igual 1,00.

O valor de cada grupo foi de 8 pacientes, determinado através da fórmula:

$$n = \frac{2s^2 c (t_{\alpha,v} + t_{\beta,v})}{(m_1 - m_2)^2}$$

Os cálculos foram efetuados através do programa “Sample Size 2.1”.

Após o início da coleta dos dados, de acordo com os primeiros resultados do estudo, foi recalculada a amostra. Considerando todas as informações utilizadas para o cálculo da amostra apresentados anteriormente, o poder (*Power*) do teste para uma amostra de 12 pacientes no grupo experimental e 7 indivíduos no grupo comparativo corresponderia ao valor de 0,86.

O estudo foi elaborado para avaliar a hipótese de que células sanguíneas de pacientes asmáticos com pequena cicatriz de BCG apresentam deficiência de produção de IFN- $\gamma$  quando estimulado com PPD RT-23. Com essa finalidade, dezenove indivíduos de 7 a 13 anos, de ambos os sexos participaram do estudo, sendo doze pacientes asmáticos com diâmetro médio da cicatriz da vacina BCG, aplicada nos primeiros três meses de vida, menor que 5mm, e sete indivíduos sem antecedentes pessoais de asma, sem antecedentes de atopia, sem hipersensibilidade IgE mediada aos aeroalérgenos, sem IgE sérica específica positiva, sem eosinofilia, e com grande cicatriz da BCG aplicada no mesmo período, ou seja, com diâmetro médio maior ou igual a 5mm, cujas características estão expressas na Tabela 1.

Além disso, os participantes foram agrupados (independente da condição de asmáticos ou de grupo comparativo) de acordo com os níveis de eosinófilos, IgE total, e IgE específica para ácaros e comparados com a produção de IFN- $\gamma$  após estímulo das células sanguíneas com PPD.

A asma foi diagnosticada com base na história clínica. Todos os pacientes apresentaram, após o terceiro ano de vida, antecedentes de no mínimo três episódios de chiado no peito (sibilância recorrente e ou dispnéia) com boa resposta ao uso de broncodilatador; inclusive, a maioria deles apresentou idas ao Pronto-Socorro nos três meses anteriores à pesquisa (Tabela 1). No dia da coleta do sangue, todos os pacientes (ou responsáveis) negaram relato de exacerbação aguda nos últimos trinta dias ou uso de corticóide oral neste período. Quanto ao grupo comparativo, todos participaram de pesquisa no ano anterior<sup>12</sup> em que já eram caracterizados como indivíduos sem história pessoal de alergia, e por ocasião da coleta dos dados desse trabalho, foram novamente revalidados como apresentando história clínica prévia negativa para rinite alérgica, tosse crônica, asma ou eczema (anexo 1), segundo informação do responsável. Todos os indivíduos do grupo comparativo realizaram tratamento antiparasitário há cerca de 6 meses, e apresentavam a contagem de eosinófilos no sangue menor que 500 cels/mm<sup>3</sup>.

Foi investigado em todos os participantes a hipersensibilidade IgE-mediada, através de teste cutâneo de puntura (*prick-test*), que foi considerado positivo quando o diâmetro médio foi > 3 mm em relação ao controle negativo; também foi realizada a avaliação da IgE total e específica para os aeroalérgenos oriundos dos ácaros mais comuns na região do estudo que são o *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Blomia tropicalis*<sup>15</sup> sendo considerado valor positivo quando  $\geq 0,5$  kU/l, pela técnica Pharmacia CAP System (Pharmacia Upjohn Uppsala, Sweden). Interessante observar na Tabela 1 que três pacientes asmáticos não apresentaram sensibilidade

aos aeroalérgenos testados pelo *prick-test* e nem aos ácaros estudados através da dosagem de IgE específica.

**Tabela 1** - Características demográficas, clínicas e de testes diagnósticos da amostra. Hospital das Clínicas, Recife, 2002

Idade (anos)	Sexo	3 ou + crises	Resposta a BCD	Emergência últimos 3 meses	Asma por exercício	Cicatriz de BCG	Teste cutâneo HDM	IgE Total (UI/ml)	IgE Derm pt (kU/L)	IgE Blom t (kU/L)	Eosinófilo céls/mm <sup>3</sup>
<b>Grupo de Asmáticos</b>											
9	M	S	S	0	N	4	NEG	280	<0,5	<0,5	1526
9	M	S	S	0	S	3	POS	364	1,8	69,1	1515
7	F	S	S	1	S	3	NEG	165	<0,5	<0,5	489
13	F	S	S	1	S	4	POS	261	1,0	<0,5	200
8	F	S	S	1	S	4	POS	627	>100	41,1	640
11	F	S	S	4	N	4	POS	2170	26,3	69,8	792
13	F	S	S	1	N	3	POS	295	2,9	<0,5	700
10	M	S	S	3	N	3	POS	307	<0,5	23,6	382
7	F	S	S	3	S	4	NEG	1335	<0,5	<0,5	660
7	M	S	S	3	S	3	POS	645	16,7	2,8	903
13	F	S	S	2	N	4	POS	372	8,3	<0,5	1282
10	F	S	S	2	N	4	POS	548	42,7	<0,5	793
<b>Grupo Comparativo</b>											
8	M	N	N	0	N	9	NEG	387	<0,5	<0,5	189
11	M	N	N	0	N	5	NEG	135	<0,5	<0,5	253
8	M	N	N	0	N	6	NEG	63	<0,5	<0,5	356
13	M	N	N	0	N	11	NEG	257	<0,5	<0,5	241
10	F	N	N	0	N	8	NEG	306	<0,5	<0,5	244
8	F	N	N	0	N	5	NEG	443	<0,5	<0,5	451
11	F	N	N	0	N	7	NEG	135	<0,5	<0,5	282

3 ou + crises = 3 ou mais crises após os 3 anos de idade; BCD = broncodilatador

HDM = house dust mite

Derm pt = *Dermatophagoides pteronissinus*; Blom t = *Blomia tropicalis*

S = sim; N = não

### **3.2.2 Operacionalização da pesquisa**

A seleção dos participantes foi feita a partir do formulário de pesquisa prévia<sup>12</sup>. Todos foram escolhidos de maneira aleatória (sorteados), e convidados através de contato telefônico ou por carta, a comparecer ao serviço no período de 27/09/02 a 08/11/02. Neste novo contato, foram revalidados os formulários de pesquisa e triagem (anexo 1), utilizados anteriormente. O comitê de ética em pesquisa em humanos da Universidade Federal de Pernambuco aprovou este projeto (anexo 2). O termo de consentimento informado foi obtido dos pais ou responsáveis dos pacientes antes do início do estudo (anexo 3). Esta pesquisa recebeu financiamento do CNPq.

### **3.3 Preparação celular e condições de cultura**

Foram coletados 5 ml de sangue venoso com heparina (10 U/ml) do grupo experimental e grupo comparativo, e em seguida, se procedeu à contagem global e diferencial dos leucócitos. Os esfregaços sangüíneos, para a contagem diferencial, foram feitos em duplicata em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas e posteriormente coradas pelo Giemsa, durante 15 minutos (5 gotas para 1 ml de água destilada). Para a contagem global de leucócitos, o sangue foi diluído na proporção de 1:20 com o líquido de Turck (ácido acético glacial a 2%, violeta de genciana a 1% em água destilada) e os leucócitos contados em câmara de Neubauer. Em seguida, 2 ml de sangue foram transferidos para um tubo falcon de 15 ml e centrifugados a 500 x g por 5 minutos, a temperatura ambiente para a obtenção do plasma que, em seguida foi coletado e armazenado a – 70°C para posterior dosagem de anticorpos da classe IgE através de ELISA. O sangue restante (3 ml) foi cultivado de acordo com

Groot DE et al e Montenegro SML et al<sup>16,17</sup> e após esta etapa, foram acrescentados 0,7 ml da cultura às placas de 48 poços, procedendo-se à estimulação com acetato de miristato forbol 50 ng/ml (PMA; Sigma Chemical Co) associado com a ionomicina 1 µg/ml (Iono; Sigma Chemical Co) e, PPD RT23 1 µg/ml (Statens Serum Institut Denmark).

As culturas foram então, incubadas a 37<sup>0</sup>C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida e os sobrenadantes foram coletados após 96 h de cultivo e congelados a -70<sup>0</sup>C para determinação da produção da citocina IFN-γ.

### 3.4 Dosagem da citocina IFN-γ

Para a determinação da citocina IFN-γ, procedeu-se segundo as instruções para uso do Kit Quantikine imunoensaio para IFN-γ humana (R&D systems; Catalog number DIF50), que é um ensaio imunoenzimático tipo sandwich, onde placas de poliestireno de 96 poços foram pré-sensibilizadas com anticorpos policlonais específicos anti IFN-γ humana. O padrão da citocina foi preparado a partir da adição de 5,4ml de diluente a IFN-γ recombinante humana liofilizada, resultando em uma solução estoque de 1000 pg/ml de concentração, que foi aliqotada e armazenada a - 70°C até o uso. A partir da solução estoque (1000 pg/ml), foram realizadas diluições com fator 2 em diluente apropriado, sendo o mesmo usado também como o padrão zero (branco). Em seguida, foram adicionados 100 µl em cada poço da placa do tampão protéico diluente do ensaio e, posteriormente 100 µl/poço dos sobrenadantes e padrões diluídos foram adicionados em duplicata. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 horas e depois lavadas com solução tampão por três vezes. Após essa etapa, foi adicionados 200 µl de anticorpos policlonais específicos para IFN-γ conjugados à enzima peroxidase, e a placa foi incubada novamente a temperatura ambiente por 2 horas. Após a lavagem com

solução tampão, foi adicionados 200  $\mu$ l de uma solução de substrato formada por volumes iguais dos reagentes de cor A (peróxido de hidrogênio) e B (tetrametilbenzidina, cromógeno) e a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois desse período, foram adicionados 50  $\mu$ l de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N para interromper a reação. A intensidade da cor produzida foi medida em um espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 450/595 nm.

### 3.5 Dosagem de IgE Total e Específica

A determinação da IgE total foi realizada através de um imunoenensaio de eletroquimiluminescência utilizando os analisadores Roche Elecsys 1010/2010 e Modular ANALYTICS E170.

Quanto a dosagem da IgE específica esta foi determinada através da técnica Pharmacia CAP System (Pharmacia Upjonh Uppsala, Sweden)<sup>18</sup>.

### 3.6 Análise estatística

Para análise dos dados foram utilizadas técnicas de estatística descritiva e inferencial<sup>19,20</sup>. As técnicas de estatística descritiva compreenderam a obtenção de estatísticas: valor mínimo, valor máximo, média, e desvio padrão da dosagem do interferon gama (citocina). Como técnica de estatística inferencial foi utilizado o teste t-Student de variâncias iguais em cada tipo de estímulo (sem estímulo, com estímulo PDD e com estímulo PMA) para a comparação entre os grupos e o teste F para a hipótese de igualdade de variâncias.

Destaca-se que por se tratar de dados de titulação obteve-se média geométrica e para aplicação desta medida, nos testes estatísticos e nos gráficos utilizou-se à transformação logarítmica dos dados acrescentados de uma unidade.

Os dados foram digitados e analisados através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 11. O nível, de significância, utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5%.

### **3.7 Resultados**

Conforme demonstramos na Tabela 1 a amostra constou de 8 meninos e 11 meninas. A idade dos asmáticos variou de 7 a 13 anos, com média de 9,50 anos, desvio padrão de 2,20 anos e coeficiente de variação de 23,11% indicando uma variabilidade reduzida para esta característica. No grupo comparativo a idade variou de 8 a 13 anos, média de 9,71 anos, desvio padrão de 1,98 anos, e coeficiente de variação de 20,34%, com baixa variabilidade.

Os valores do IFN- $\gamma$  mediante os três diferentes estímulos encontram-se na Tabela 2.



**Tabela 2** – Valores de IFN- $\gamma$  (pg/ml) segundo o tipo de estímulo nos grupos de asmáticos e comparativo. Hospital das Clínicas, Recife, 2002.

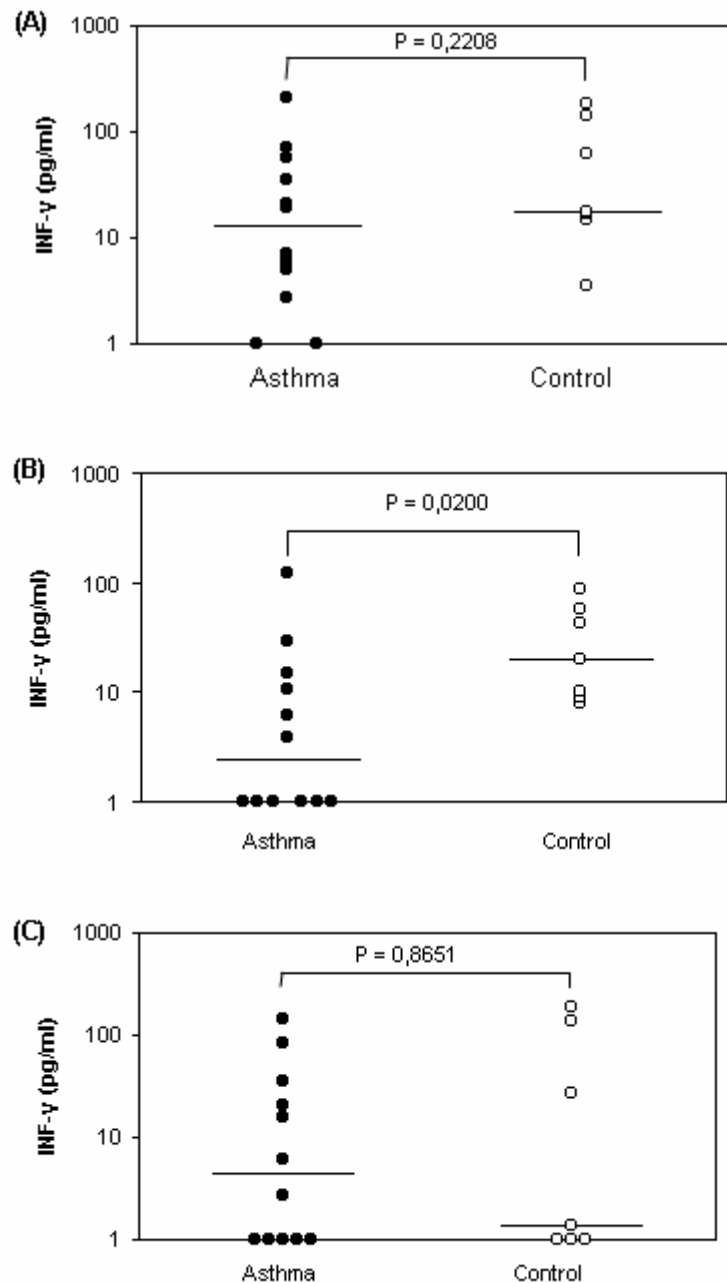
Tipo de estímulo	Estatística	Grupo		Valor de p
		Asmáticos N = 12	Comparativo N = 7	
<b>Sem estímulo</b>				
	Valor mínimo	0,00	2,58	p = 0,2208
	Valor máximo	204,41	180,76	
	Média Geométrica	11,75	30,90	
	Desvio Padrão	58,02	71,13	
<b>Com estímulo PPD</b>				
	Valor mínimo	0,00	7,01	p = 0,0200
	Valor máximo	118,78	84,48	
	Média Geométrica	3,89	22,91	
	Desvio Padrão	33,80	29,67	
<b>Com estímulo PMA/ Iono</b>				
	Valor mínimo	0,00	0,00	p = 0,8651
	Valor máximo	142,02	189,61	
	Média Geométrica	6,03	7,24	
	Desvio Padrão	43,97	79,27	

p = valor de p através do teste t-Student com variâncias iguais

### 3.7.1 Produção de IFN- $\gamma$ em asmáticos

Quando comparamos o sangue do grupo de asmáticos com o sangue do grupo comparativo, avaliando a capacidade de produção de IFN- $\gamma$ , em 3 situações: com estímulo PPD, com estímulo PMA/Iono e sem estímulo, observamos que os pacientes asmáticos, quando estimulados com PPD RT-23 apresentaram uma diferença significativa (p = 0.02) na produção de IFN- $\gamma$  em relação aos outros indivíduos (Gráfico 1B). Entretanto, isto não

foi observado com relação aos mesmos grupos quando se realizou o estímulo inespecífico com PMA/Iono ou quando não houve estímulo (Gráfico 1A e 1C). Quanto aos três pacientes asmáticos não atópicos, estes apresentaram produção de interferon semelhante aos demais.



**Gráfico 1** - Produção de IFN- $\gamma$  mensurado através de ELISA de 12 pacientes asmáticos e 7 indivíduos de comparação, utilizando cultura de sangue total sem estímulo (A), com estímulos PPD (B) e PMA/Iono (C). Foi realizada

comparação estatística dentro de cada grupo e o valor de p está incluído nos Gráficos. Foi considerando  $p < 0,05$  como significativo. A barra horizontal em cada gráfico representa a mediana do grupo.

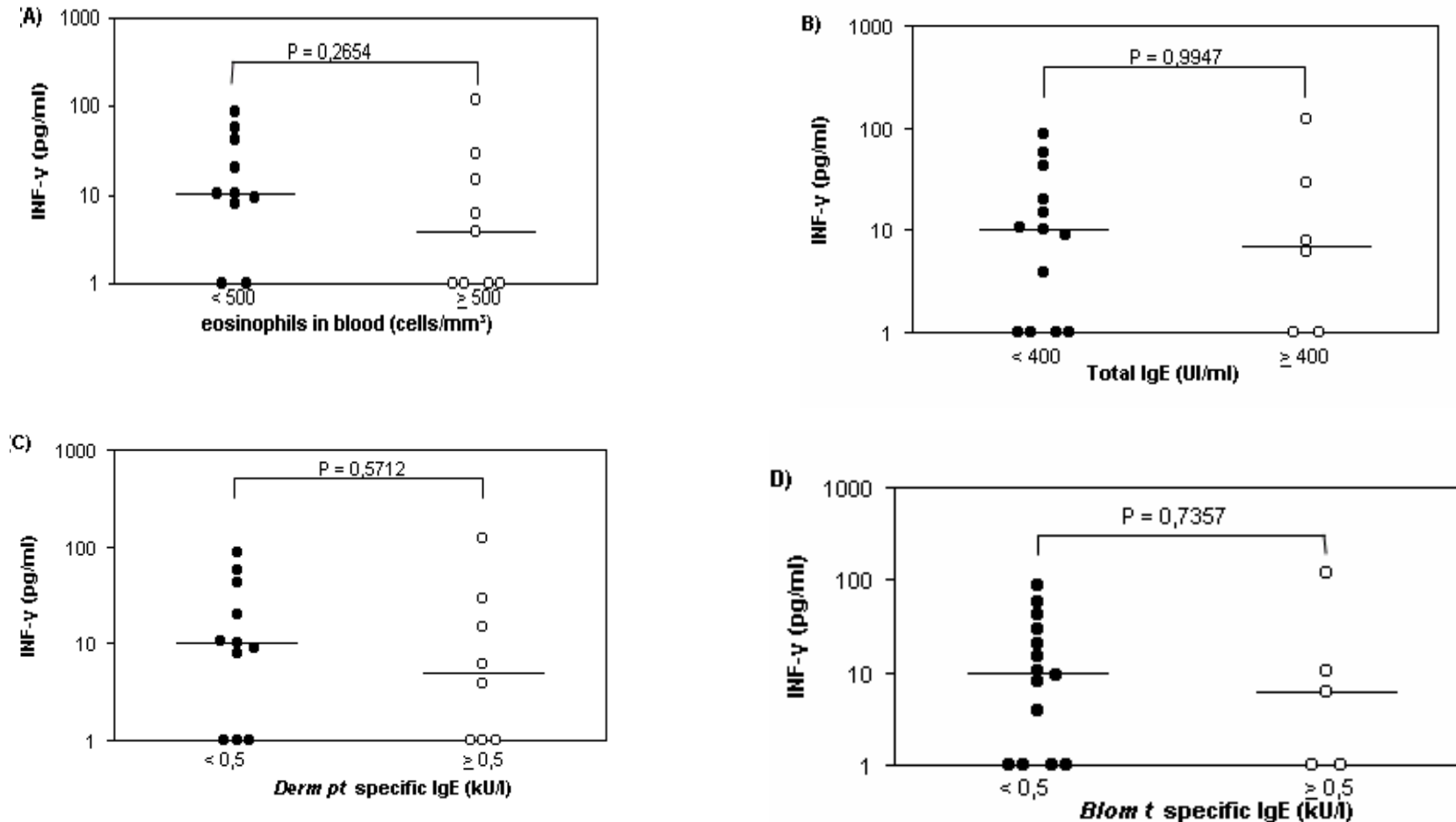
### **3.7.2 Produção de IFN- $\gamma$ relacionados aos níveis de eosinófilos**

De acordo com o Gráfico 2A, ao compararmos número absoluto de eosinófilos com a produção de IFN- $\gamma$ , (considerando eosinofilia, contagem de eosinófilos  $\geq 500$  cels/mm<sup>3</sup>), observamos que não houve diferença significativa entre os grupos.

Observamos que três entre os pacientes asmáticos, não apresentaram eosinofilia (Tabela 1).

### **3.7.3 Produção de IFN- $\gamma$ relacionados aos níveis de IgE Total e específica para ácaros**

Não houve diferença significativa quando comparamos os pacientes com IgE total elevada ( $\geq 400$  UI/ml) e a produção de IFN- $\gamma$  (Gráfico 2B). Isto também ocorreu, quando se realizou comparação com a IgE específica para *Dermatophagoides pteronissinus* e para *Blomia tropicalis* (Gráfico 2C e 2D).



**Gráfico 2.** Níveis de IFN- $\gamma$  mensurado através de ELISA após estímulo com PPD em 12 asmáticos e 7 indivíduos de grupo comparativo de acordo com : a presença de eosinofilia  $\geq$  500 cels/mm<sup>3</sup> (A), IgE total elevada  $\geq$  400 UI/ml (B), IgE específica para *Dpt*  $\geq$  0,5 kU/l (C) e IgE específica para *Bt*  $\geq$  0,5 kU/l (D). Foi realizada comparação estatística dentro de cada grupo e o valor de **p** está incluído na Figura. Considerando  $p < 0,05$  como significativo. A barra horizontal em cada gráfico representa a mediana do grupo.

### 3.8 Discussão

Neste estudo foi demonstrado pela primeira vez, que células sanguíneas de asmáticos com pequena cicatriz de BCG após estímulo com o PPD apresentaram déficit de produção de IFN- $\gamma$ . Quando não houve estímulo, a produção de IFN- $\gamma$  foi semelhante entre asmáticos e o grupo comparativo (Gráfico 1 A), e isto foi esperado porque uma mesma célula T humana apresenta capacidade de produzir ambos tipos de citocinas, Th1 e Th2<sup>21</sup>. Do mesmo modo, quando se comparou os grupos com o estímulo mitógeno inespecífico (PMA/ Iono), os asmáticos produziram IFN- $\gamma$  em quantidade semelhante ao grupo comparativo, o que é justificado porque as células dos pacientes não são imunodeprimidas, funcionando este estímulo como o controle positivo do experimento (Gráfico 1C). Contudo, quando foi colocado o estímulo PPD, e comparado os dois grupos, observou-se que o grupo de asmáticos com cicatriz de BCG pequena, apresentou significativa redução na produção de IFN- $\gamma$  em comparação ao grupo de indivíduos com grande cicatriz de BCG ( $p = 0,02$ ; Gráfico 1B).

Estudo anterior usando o estímulo com ácaros da poeira doméstica demonstrou que a produção de IFN- $\gamma$  foi mais baixa em asmáticos atópicos do que em controles<sup>22</sup>. Além disso, asmáticos mostraram uma tendência a apresentar uma pequena cicatriz de BCG<sup>11</sup>, o que pode sugerir que estes indivíduos já no início da vida, apresentaram uma deficiência de produção de IFN- $\gamma$  e assim o nosso resultado reforça a idéia de uma persistência desse déficit ao longo da infância e da adolescência.

A relação entre desequilíbrio de citocinas e a expressão de atopia e asma tem sido de considerável importância. É consenso que, a doença atópica está associada a um déficit na resposta imune de um padrão Th1 (IFN- $\gamma$ ), e um predomínio do padrão Th2 (IL-4, IL-5, IL-13)<sup>2</sup>. Considerando esses fatos, a intensidade entre as respostas Th1 e Th2, como indicativo da produção diminuída de IFN- $\gamma$ , durante a fase neonatal

pode ser útil no prognóstico do desenvolvimento subsequente de doenças alérgicas<sup>6,23</sup>.

Estudo prévio tem mostrado que a capacidade de produzir IFN- $\gamma$  foi mais baixa nas células T fetais do que em adultos<sup>24</sup>, pois esta citocina é altamente tóxica para a placenta<sup>25</sup>. Alguns indivíduos podem apresentar persistência pós-natal de mecanismos que limitam a capacidade de indução de respostas Th1, especialmente aquelas envolvendo IFN- $\gamma$ <sup>25,26</sup>. Isto é muito mais freqüente nos indivíduos geneticamente de risco para alergia, sugerindo que há um defeito intrínseco nas células T de atópicos, que precedem a exposição a alérgenos e ao desenvolvimento de alergia clínica<sup>6, 26, 27</sup>. É visto que lactentes com doença alérgica no primeiro ano de vida têm reduzida produção de IFN- $\gamma$  ao nascimento, antes mesmo do início dos sintomas<sup>6</sup>. Foi proposto, que a característica do fenótipo atópico parece ser decorrente de um reforço da imunidade fetal Th2 alérgeno específica, em oposição ao re-direcionamento (desvio imune) dessas respostas ao fenótipo da citocina Th1, que ocorre em não atópicos<sup>26</sup>. Estudo realizado no Japão observou que indivíduos com forte reação à tuberculina apresentaram níveis significativamente mais baixos de citocinas Th2 (IL4, IL-10, IL-13) e maiores de citocinas Th1, em especial de IFN- $\gamma$ <sup>28</sup>.

Neste estudo foi verificado baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$  em asmáticos, inclusive naqueles não atópicos, que se assemelhou ao estudo de Queiróz<sup>12</sup>, o qual observou a associação de asma e pequena cicatriz de BCG independente da presença ou não de atopia. Os outros estudos, também sugerem que as células Th2 podem desempenhar um importante papel na asma não atópica e que este fenótipo Th2 caracteriza a asma independente da presença de atopia<sup>29</sup>. Uma série de estudos de biópsias brônquicas, usando hibridização *in situ* e/ou imunohistoquímica, caracterizam ambas as variantes da doença por: infiltração de eosinófilos e células Th2 secretoras de IL4 e/ou IL5, presença de células com receptor de alta afinidade para IgE (Fc $\epsilon$ RI+) e células que expressam RNA mensageiro para cadeia pesada  $\epsilon$  da IgE.

Por outro lado, há grande evidência da participação dos eosinófilos na asma. Estas células são ativadas principalmente pela IL-5, que é uma citocina da subclasse Th2 das células T CD4<sup>+</sup><sup>30</sup>. Uma vez que é sugerido que as citocinas Th1 e Th2 tem ações reciprocamente inibitórias, e que na asma predomina o padrão Th2<sup>31</sup>, estudos tentam correlacionar inversamente o número de eosinófilos e citocinas Th1 (IFN- $\gamma$ ), entretanto neste estudo isto não foi observado. O resultado desta pesquisa também diferiu de pesquisas experimentais que relacionam a vacina BCG com uma redução de IgE a nível sérico, no tecido pulmonar e no lavado bronco alveolar<sup>32</sup>. Esta diferença pode ter ocorrido pelo fato do tamanho da amostra não ter sido calculada para este fim, no entanto pode resultar também de uma diferença qualitativa de resposta destes pacientes, pelo fato da dose estímulo do estudo experimental não ser de grande magnitude. Em relação a produção de IgE específica e IFN- $\gamma$ , assim como Smart et al<sup>27</sup> não observaram correlação entre elas sob estímulo Th2, os resultados desta pesquisa também não mostram essa correlação apesar de ter sido utilizado estímulo Th1 (PPD).

Shirakawa et al<sup>28</sup> encontraram uma correlação inversa entre a positividade ao teste tuberculínico e o desenvolvimento de atopia e asma, sugerindo que uma redução no número de infecções tais como a tuberculose seria uma das responsáveis pelo aumento da prevalência das doenças atópicas nas últimas décadas. Também Aaby et al<sup>33</sup>, em estudo realizado na África concluíram que a vacina BCG quando aplicada no início da infância era um potente indutor da resposta Th1 e pareceu prevenir o desenvolvimento de atopia em crianças africanas. Entretanto, essa questão tem sido muito discutida e diversos autores discordam desses achados. Estudos realizados por Yilmaz et al<sup>34</sup>, Alm<sup>35</sup>, e Wong<sup>36</sup>, respectivamente, na Turquia, Suíça e China não encontraram qualquer relação entre a resposta à tuberculina e o estado de atopia na vida nos indivíduos imunizados com BCG.

O Brasil possui altos índices de cobertura vacinal com BCG, entretanto observa-se elevada prevalência de asma e rinite alérgica segundo dados do *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC)<sup>37</sup>. Outro exemplo é a Turquia, país em desenvolvimento, onde a incidência de tuberculose se mantém, e a prevalência de doenças atópicas é tão alta quanto em países desenvolvidos<sup>34,38</sup>. Nossos resultados evidenciam que o grupo de asmáticos apesar de terem recebido vacinação BCG no início da vida, apresentam baixa produção de IFN- $\gamma$  sob estímulo do PPD-RT23 em relação aos demais indivíduos, concordando com a sugestão de Herz<sup>32</sup>, de que a correlação observada por Shirakawa<sup>28</sup> pode ter sido uma consequência e não uma causa, ou seja, não estariam os reatores fortes à tuberculina protegidos de atopia, mas sim os pacientes alérgicos é que apresentariam uma resposta Th1 prejudicada à tuberculina subcutânea. Já foi demonstrado que a capacidade de responder a vacina BCG durante a infância é atenuada em indivíduos que desenvolvem atopia subsequente<sup>11</sup> sugerindo, que a maturação pós-natal retardada da função Th1 nas crianças atópicas parece estar relacionada a um defeito específico de reconhecimento e de resposta aos sinais microbianos<sup>39</sup>. Da mesma forma, Alm et al<sup>40</sup> consideraram que uma resposta tuberculínica negativa em crianças vacinadas com BCG era sugestiva de atopia que tinham dificuldade de montar uma resposta Th1 apropriada após a vacinação.

Tang et al<sup>6</sup>, ao constatarem baixa produção de IFN- $\gamma$  no sangue do cordão umbilical de indivíduos atópicos, consideraram que os níveis desta citocina era uma característica primária do estado atópico, que estava presente antes do aparecimento dos sintomas. Da mesma forma, existe a possibilidade de que a reatividade tuberculínica, apesar de aparecer após estímulo específico sob impacto ambiental, seja pré-determinada geneticamente havendo uma relação entre esta ausência de reatividade ao PPD e atopia<sup>41</sup>, além disso, estudos mais recentes realmente sugerem que se o BCG tiver algum papel na prevenção de atopia, é um papel muito restrito e ocorre apenas na ausência de uma forte influência genética<sup>42</sup>.



Concluindo, nossos resultados sugerem que os asmáticos com pequena cicatriz de BCG apresentam deficiência de produção de IFN- $\gamma$  provavelmente como uma característica intrínseca dos mesmos e que esta não é modificada pelo estímulo com BCG. Contudo, é interessante a realização de estudos posteriores com um número maior de indivíduos incluindo pacientes asmáticos com pequena e grande cicatriz de BCG, assim como é de interesse a avaliação de IL4 e de outras citocinas Th2 para que possamos ampliar a força de generalização desta hipótese.

### 3.9 Referências bibliográficas

- 1 Holgate S. Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax* 1993;48:103-109.
- 2 Busse WW, Rosenwasser LJ. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S799-804.
- 3 Busse WW, Lemanske Jr. RF. Asthma. *New Engl J Med* 2001;344(5):350-362.
- 4 Rinas U, Horneff G, Wahn V. Interferon-gamma production by cord-blood mononuclear cells is reduced in newborns with a family history of atopic disease and is independent from cord blood IgE levels. *Pediatr Allergy Immunol* 1993;4(2):60-4.
- 5 Liao SY, Liao TN, Chiang BL, Huang MS, Chen CC, Chou CC, et al. Decreased production of IFN-gamma and increase production of IL-6 by cord blood mononuclear cells of newborns with a high risk of allergy. *Clin Exp allergy* 1996;26(4):397-405.
- 6 Tang MLK, Kemp AS, Thorburn J, Hill DJ. Reduced interferon- $\gamma$  secretion in neonates and subsequent atopy. *Lancet* 1994;344:983-5.
- 7 Martinez FD, Stern DA, Wright AL, Holberg CJ, Taussing LM, Halonen M. Association of interleukine-2 and interferon- $\gamma$  production by blood mononuclear cells in infancy with parental allergy skin tests and with subsequent development of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:652-60.
- 8 Nurse B, Haus M, Puterman AS, Weinberg EG, Potter PC. Reduced interferon- $\gamma$  but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:662-8.
- 9 Soumalainen H, Soppi E, Laine S, Isolauri E. Immunologic disturbances in cow's milk allergy. 2. Evidence for defective interferon-gamma generation. *Pediatr Allergy Immunol* 1993;4:203-207.
- 10 Tang M, Kemp A. Production and secretion of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) in children with atopic dermatitis. *Clin Exp Immunolog* 1994;95:6672.
- 11 Sarinho E, Schor D, Veloso M, Lima M. BCG scar diameter and asthma: A case control study. *J allergy Clin Immunol* 2000;106:1199-200.

- 12 Queiroz RM. Diâmetro médio da cicatriz de BCG em crianças e adolescentes asmáticos 2002. 82 páginas. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) Departamento Materno Infantil. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Pernambuco. Recife.
- 13 De Poy E, Gitlin LN. Introduction to research. St Louis, Mosby 1994.
- 14 Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow J-C Jr. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:109-115.
- 15 Sarinho E, Rizzo MC, Just E, Fernandez-Caldas E, Solé D. Sensibilização aos ácaros domésticos em crianças atópicas e não-atópicas de Recife, PE, Brasil. *Rev Bras Alergia Imunopatol* 2000;23(3):105-10.
- 16 Groot DE et al. Direct stimulation of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and GM-CSF) in whole blood in comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 1992;(4):239-248.
- 17 Montenegro SML et al. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *Journal of Infectious Disease* 1999;(179):1502-1514.
- 18 Bernenstein, SWW. Practice parameters for allergy diagnosing testing. *Annals of Allergy, Asthma and Immunol* 1995;(75):543-625.
- 19 Altman DG, Hall C. *Practical Statistics for Medical Research*. London, 1991,611
- 20 Zar JH *Biostatistical Analysis* 4<sup>a</sup>ed Prentice Hall. New Jersey, 1999,929
- 21 Cohen S. Cytokine profile data. *Immunol Today* 2000;21(3):199-200.
- 22 Nurse B, Puterman AS, Haus M, Berman D, Weinberg EG, Potter PC. PBMCs from both atopic asthmatic and nonatopic children show a Th2 cytokine response to house dust mite allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:84-91.
- 24 Holt PG. Postnatal maturation of immune competence during infancy and early childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 1995;6:59-70.

- 25 Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today* 1993;14:353-6.
- 26 Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999;353:196-200.
- 27 Smart JM, Horak E, Kemp AS, Robertson CF, Tang MLK. Polyclonal and allergen-induced cytokine responses in adults with asthma: Resolution of asthma is associated with normalization of IFN- $\gamma$  responses. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110:450-6.
- 28 Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997;275:77-9.
- 29 Humbert M, Menz G, Ying S; Corrigan CJ, Robinson, DS, Durham, et al. The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunology Today* 1999;20(11):528-33.
- 30 Garlisi CG, Kung TT, Wang P, Minnicozzi M, Umland SP, Chapman RW et al. Effects of chronic anti-interleukin-5 monoclonal antibody treatment in a murine model of pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(2):248-55.
- 31 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA and Coffman RL. Two types of murine helper T-cell clone.1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
- 32 Herz U, Gerhold K, Grüber C, Braun A, Wahn U, Renz H et al. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:867-874.
- 33 Aaby P, Shaheen SO, Heyes CB, Goudiaby A, Hall AJ, Shiell AW, et al. Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. *Clin Exp Allergy* 2000;30:644-650.
- 34 Yilmaz M, Bingöl G, Altintas D, Kendirli SG. Correlation between atopic diseases and tuberculin responses. *Allergy*;2000:664-667.
- 35 Alm JS, Lilja G, P Pershagen G, Scheynius A. Early BCG vaccination and development of atopy. *Lancet* 1997;350:400- 403.

- 36 Wong GWK, Hui DSC, Tam CM, Chan HH, Fok TF, Chan-Yeng M et al. Asthma, atopy and tuberculin responses in Chinese schoolchildren in Hong Kong. *Thorax* 2001;56:770-773.
- 37 Solé D, Naspitz CK,. Epidemiologia da asma: estudo ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) / Epidemiology of asma: ISSAC study (International Study of Allergies in childhood). *Rev Bras Alergia Immunopatol* 1998;21(2):38-45.
- 38 Kendirli SG, Altintas D, Alparslan N, Akmanlar N, Yurdakul Z, Bolat B. Prevalence of childhood allergic diseases in Adana, southern Turkey. *Eur J Epidemiol* 1998;1474:347-50.
- 39 Holt PG, Sly PD, Björkstén B. Atopic versus infections diseases in childhood: a question of balance? *Pediatr Allergy Immunol* 1997;8:53-58.
- 40 Alm JS, Lija G, Pershagen G, Scheynius A. BCG vaccination does not seem to prevent atopy in children with atopic heredity. *Allergy* 1998;53:537.
- 41 Grüber C, Paul KP. Tuberculin reactivity and allergy. *Allergy* 2002;57:277-280.
- 42 Silverman M. BCG vaccination and atopy—unfinished business? *Lancet* 1997;350:380-381.



## *4-CONSIDERAÇÕES FINAIS*

---

## 4 – Considerações finais

---

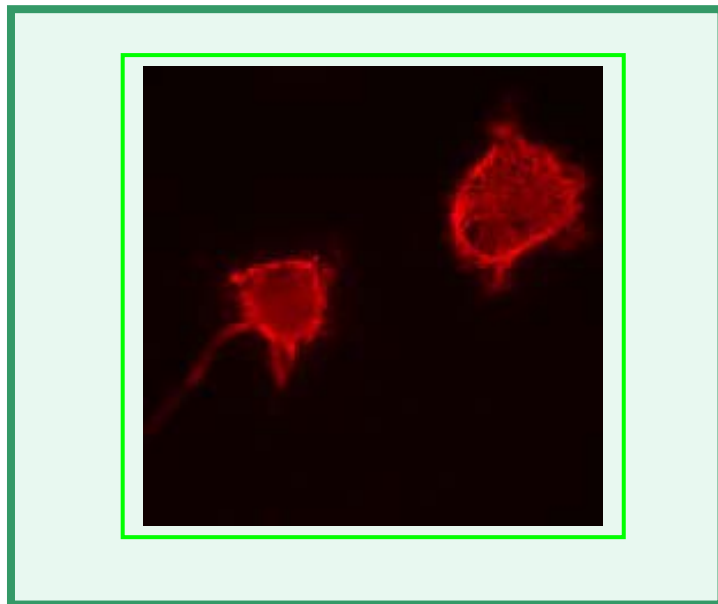
---

No artigo original verificou-se que asmáticos com pequena cicatriz de BCG apresentam baixos níveis de produção de IFN- $\gamma$  em relação a um grupo de comparação.

Sugere-se que lactentes com pequena cicatriz de BCG, com história de sibilância devem ser observados mais atentamente quanto a possibilidade de vir a apresentar asma.

Na revisão da literatura, ficou evidenciado que a discussão sobre a relação entre IFN- $\gamma$  e asma, ainda é assunto polêmico.

Estudos futuros são necessários para esclarecimento do verdadeiro papel do interferon gama na asma assim como de outras citocinas Th2 (IL-4 e IL-5).



---

*5-ANEXOS*



## 5 – Anexos

---

---

**Anexo - 1** – **Formulário de triagem**

**Anexo – 2** – **Aprovação do Comitê de Ética**

**Anexo – 3** – **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Formulário de triagem**

**Pesquisas: Asma e diâmetro da cicatriz BCG**

1) Nome \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

2) Idade \_\_\_\_\_

3) Data de nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

4) Procedência:

1-( ) Abreu e Lima 2-( ) Araçoiaba 3-( ) Cabo 4-( ) Camarajibe 5-( ) Igarassu

6-( ) Ipojuca 7-( ) Itamaracá 8-( ) Itapissuma 9-( ) Jaboatão 10-( ) Moreno

11-( ) Olinda 12-( ) Paulista 13-( ) Recife 14-( ) São Lourenço da Mata

99-( ) não informado

5) Nos últimos 12 meses a criança teve no mínimo três episódios de doença aliviados com o uso de broncodilatador (salbutamol, fenoterol, brometo de ipratrópio, aminofilina, tebutalina)?

Sim ( ) Não ( )

6) Medicamentos em uso: \_\_\_\_\_

Data de início \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Tempo de uso \_\_\_\_\_

7) Doenças associadas \_\_\_\_\_

8) Seu filho vacinou-se para sarampo, rubéola, caxumba ou pólio oral nos últimos 30 dias?

Sim ( ) Não ( )

9) Criança, pai, mãe e irmãos apresentam/ apresentaram alguma vez na vida:

(1) Chiado no peito? (cansaço, sibilos, piado)

Criança 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado ( )

Pai 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado ( )

Mãe 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado ( )

Irmãos 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado ( )

(2) Três ou mais episódios de chiado no peito (cansaço, sibilos, piado) aliviados com o uso de broncodilatador, com idade superior a três anos?

Criança 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Pai 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Mãe 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Irmãos 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

(3) Coriza, coceira no nariz, espirros ou nariz entupido, sem estar resfriado ou gripado?

Criança 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Pai 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Mãe 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Irmãos 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

(4) Manchas com coceira na pele que apareciam e desapareciam por pelo menos seis meses?

Criança 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Pai 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Mãe 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Irmãos 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

(5) Manchas na pele, com coceira afetando as regiões de dobras: nos joelhos, frente dos tornozelos, abaixo das nádegas, em volta do pescoço, orelha e olhos?

Criança 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Pai 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Mãe 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

Irmãos 1- sim ( ) 2-não ( ) 9- não informado

10) Vacina BCG no primeiro mês de vida: Sim ( ) Não ( )

11) Tem 2ª dose de BCG? : Sim ( ) Não ( )

12) Exame físico do aparelho respiratório - em crise: Sim ( ) Não ( )

14) Alguma vez na vida a criança apresentou alguma reação indesejável\* após ingestão de camarão ou comidas preparadas com camarão? Sim ( ) Não ( )

\* manchas na pele / coceira, inchaço nos lábios/olhos, cansaço/falta de ar/ tosse/outras

8- Quantos irmãos mais novos tem seu filho (a)? \_\_\_\_\_

10- Quantas pessoas moram na casa? \_\_\_\_\_ crianças \_\_\_\_\_ adultos \_\_\_\_\_

total = \_\_\_\_\_ 99 - ( ) não informado

11- No mês passado, quanto foi a renda familiar?

valor total = \_\_\_\_\_ 9999 - ( ) não informado

12- Renda per capita: \_\_\_\_\_ 9 - ( ) não informado

15- Quantos cômodos tem a sua casa? \_\_\_\_\_ 99 - ( ) não informado

31- Seu filho já teve tuberculose? 1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

32- Seu filho já teve contato com alguém com tuberculose? (dentro de casa ou com alguma pessoa que frequenta sua casa)

1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

33- Seu filho já teve contato com pessoa (dentro de casa ou que frequenta sua casa) com doença de pulmão ou tosse crônica\* que tomava remédio dado no posto todo mês (por 6 meses)? \*tosse por mais de um mês

1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

#### IV - PERGUNTAS SOBRE ASMA E OUTRAS DOENÇAS ALÉRGICAS

34- Com que idade seu filho cansou pela primeira vez?

1 - ( ) no primeiro ano de vida 2 - ( ) no segundo ano de vida

3 - ( ) entre 2 e 5 anos 4 - ( ) entre 6 e 10 anos

5 - ( ) entre 11 e 14 anos 9 - ( ) não informado

35- Quantas crises de asma seu filho teve nos últimos três meses? \_\_\_\_ 99- ( ) não informado

36- Com que frequência seu filho apresentou os seguintes sintomas ( chiado, aperto no peito, falta de ar, tosse ), nos últimos 3 meses?

1 - ( ) não apresentou 2 - ( ) apenas com exercício

3 - ( )  $\square$  duas vezes/semana 4 - ( ) > duas vezes por semana, não contínuos

5 - ( ) contínuos 9 - ( ) não informado

37- Houve restrição das atividades habituais\* de seu filho nos últimos 3 meses, devido à asma? \* Ir à escola, brincar

1 - ( ) nenhuma 2 - ( ) raramente

3 - ( ) frequentemente 9 - ( ) não informado

38- Quantos dias de aula seu filho perdeu nos últimos 3 meses escolares, devido à asma? \_\_\_\_ 99 - ( ) não informado

39- Qual a duração da maioria das crises de asma de seu filho (em horas)?

\_\_\_\_ 999 - ( ) não informado

40- No tratamento das crises de asma seu filho há necessidade de usar corticóide\*





Especificar as

drogas \_\_\_\_\_

posologia \_\_\_\_\_

início do tratamento \_\_\_\_\_

45- Se faz uso de corticóide inalatório, a dose é, atualmente:

1 - ( ) baixa 2 - ( ) média

3 - ( ) alta 9 - ( ) não informado

46- Cumpre o tratamento?

1 - ( ) regularmente 2 - ( ) irregularmente

3 - ( ) não cumpre 9 - ( ) não informado

47- Seu filho internou-se devido à asma nos últimos 12 meses?

\*Permanência hospitalar por período  12 horas

1 - ( ) sim 2 - ( ) não 99 - ( ) não informado

48- Se sim, quantas vezes seu filho foi internado\* por asma nos últimos 12 meses? \_\_\_\_\_

\*Permanência hospitalar por período  12 horas

99 - ( ) não informado

49- Nos últimos 3 meses seu filho foi atendido em emergências por motivo de asma?

1 - ( ) sim 2 - ( ) não 99 - ( ) não informado

50- Se sim, quantas vezes seu filho foi atendido em emergências, por motivo de asma,

nos últimos 3 meses? \_\_\_\_\_ 99 - ( ) não informado

51- Alguma vez seu filho foi internado em UTI, por motivo de asma?

1 - ( ) sim 2 - ( ) não 99 - ( ) não informado

52- Se sim, quantas vezes seu filho foi internado em UTI, por motivo de asma? \_\_\_\_\_

99 - ( ) não informado

53- Em relação ao controle ambiental, quais medidas são tomadas:

Colchão e travesseiro encapados 1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

Remoção de tapetes do quarto 1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

Remoção de cortinas do quarto 1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

Remoção de brinquedos felpudos 1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

Limpeza da casa com pano úmido 1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

54- Na sua opinião, o que pode desencadear asma nas crianças?

Exercícios 1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

Emoção	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Exposição a cigarro	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Exposição à poeira da casa	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Gatos	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Cachorros	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Aves	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Exposição a mofo	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Baratas	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Umidade	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Frio	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Perfumes	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Alimentos	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Medicamentos	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Resfriados	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado
Outros _____	1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

#### V - DADOS ANTROPOMÉTRICOS

71-Peso (em gramas): \_\_\_\_\_ 99999 - ( ) não informado

72-Altura (em centímetros): \_\_\_\_\_ 999 - ( ) não informado

#### VI - INFORMAÇÕES ADICIONAIS

1. Seu filho apresentou algum quadro febril nas últimas 24 horas?

1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

2. Seu filho fez algum exame parasitológico de fezes nos últimos 12 meses?

1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

2.1. Se o parasitológico de fezes foi negativo, qual o número de exames feitos?

1 - ( ) um 2 - ( ) dois 3 - ( ) três ou mais 9 - ( ) não informado

3. Seu filho recebeu algum tratamento para parasitose intestinal nos últimos 12 meses?

1 - ( ) sim 2 - ( ) não 9 - ( ) não informado

3.1. Se recebeu, qual a medicação utilizada? \_\_\_\_\_

3.2. Qual a dose? \_\_\_\_\_

3.3. Quando foi feito o tratamento e por quanto tempo? \_\_\_\_\_



Serviço Público Federal  
Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa

Ofício n.º 079/2001 – CEP/CCS

Recife, 04 de abril de 2001.

Prezada Senhora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde analisou o Protocolo de Pesquisa n.º 006/2001-CEP/CCS, intitulado "*Asma e diâmetro da cicatriz BCG.*", aprovando-o sem pendência, em 04 de abril de 2001, bem como o Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, podendo ser iniciado.

Atenciosamente,

  
Prof.ª Vânia Pinheiro Ramos  
Vice-coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa CCS/ARPE

A  
Dra. Rosângela de Melo Queiroz  
Prog. De Pós-graduação em Pediatría

---

Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Fone: 81 271 8972,  
Fax: 81 271 8500, e-mail: [cepeccs@npsl.ufpe.br](mailto:cepeccs@npsl.ufpe.br)

Foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde a pesquisa que originou o Banco de Dados analisados nesta dissertação.



**ANEXO**

**Consentimento livre e esclarecido**

**Pesquisa: Asma e diâmetro da cicatriz BCG**

ROSÂNGELA DE MELO QUEIROZ, pediatra, está realizando uma pesquisa sobre a relação entre o tamanho da cicatriz da vacina BCG e asma, em crianças de 6 a 14 anos. Gostaria que seu filho(a) participasse da mesma e para isso preciso de sua autorização.

As crianças que participarem desta pesquisa serão pesadas, medidas, terão o diâmetro da cicatriz da vacina BCG medido, serão submetidas a coleta de 5ml de sangue periférico para a realização de exames, farão testes alérgicos para detectar alergia a poeira doméstica e testes intradérmicos com tuberculina e com candidina; as reações locais que podem ocorrer com estes testes são dor, irritação local, desconforto, coceira e vermelhidão na pele e as reações sistêmicas como urticária e sintomas respiratórios são raras. Estes procedimentos são rotineiramente feitos na clínica deste ambulatório. Utilizaremos na pesquisa os resultados dos exames e também as respostas dos formulários aplicados aos adultos responsáveis que estiverem acompanhando as crianças. Estes dados serão mantidos em sigilo pela pesquisadora.

A participação nesta pesquisa é voluntária, seu filho participa se você quiser, participando ou não, seu atendimento será o mesmo. Também é seu direito desistir em qualquer etapa da pesquisa.

**Declaração do paciente**

Tendo sido lido por mim ou por um acompanhante que me fez entender todo o texto, autorizo meu filho \_\_\_\_\_ a participar da referida pesquisa.

Rocife, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão digital da mãe ou adulto responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura da 1ª testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da 2ª testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura da médica responsável