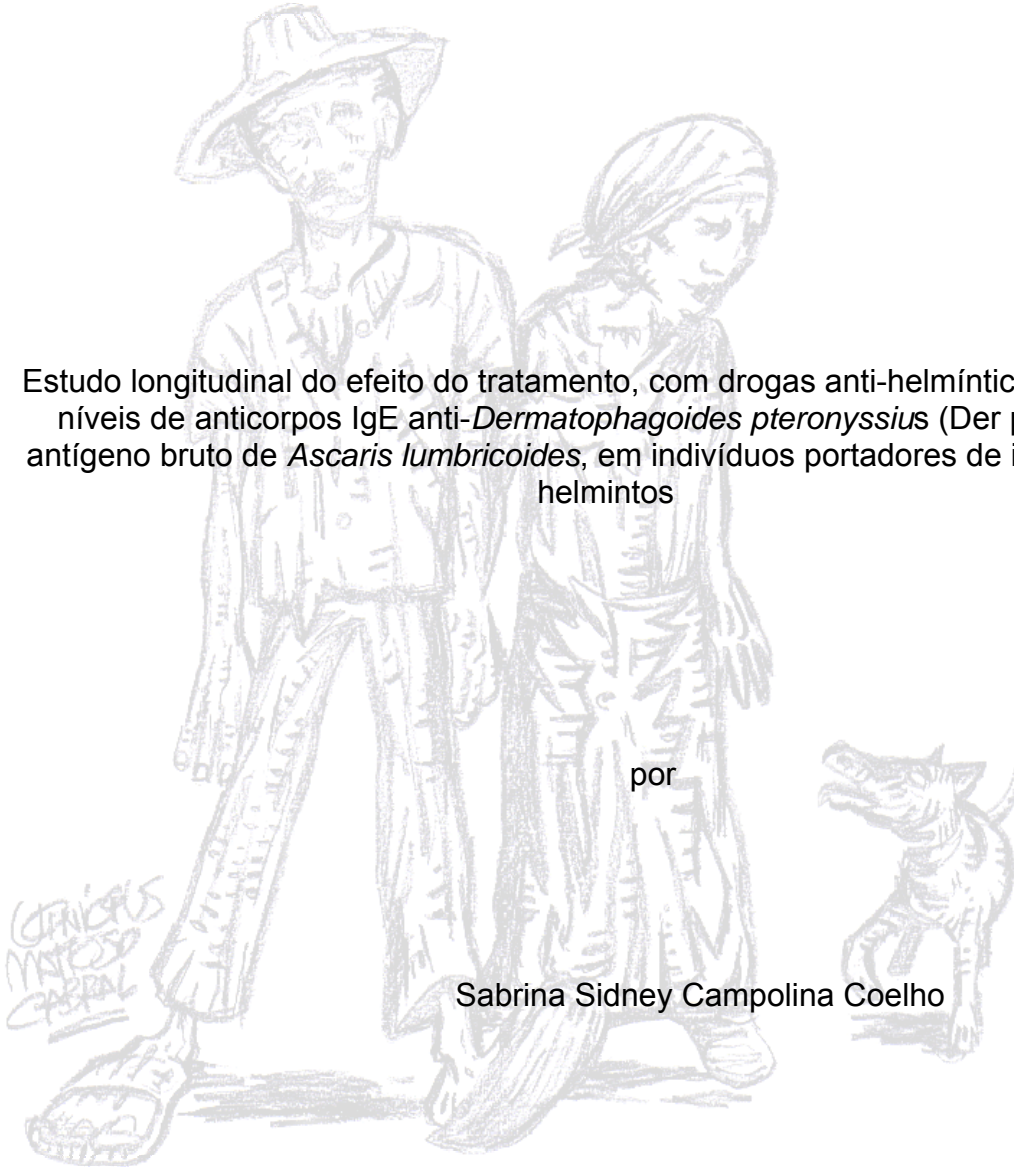


MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Estudo longitudinal do efeito do tratamento, com drogas anti-helmínticas, sobre os níveis de anticorpos IgE anti-*Dermatophagoides pteronyssius* (Der p1) e anti-antígeno bruto de *Ascaris lumbricoides*, em indivíduos portadores de infecção por helmintos

por

Sabrina Sidney Campolina Coelho



Belo Horizonte
Dezembro/2013

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Estudo longitudinal do efeito do tratamento, com drogas anti-helmínticas, sobre os níveis de anticorpos IgE anti-*Dermatophagoides pteronyssius* (Der p1) e anti-antígeno bruto de *Ascaris lumbricoides*, em indivíduos portadores de infecção por helmintos

por

Sabrina Sidney Campolina Coelho

Tese apresentada com vistas à obtenção do Título de Doutor em Ciências na área de concentração de Biologia Celular e Molecular

Orientação: Rodrigo Corrêa Oliveira

Belo Horizonte
Dezembro/2013

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C672e
2013

Coelho, Sabrina Sidney Campolina.

Estudo longitudinal do efeito do tratamento, com drogas anti-helmínticas, sobre os níveis de anticorpos IgE anti-*Dermatophagoides pteronyssius* (Der p1) e anti-antígeno bruto de *Ascaris lumbricoides*, em indivíduos portadores de infecção por helmintos / Sabrina Sidney Campolina Coelho. – Belo Horizonte, 2013.

XV, 76 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 77 - 91

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansoni/imunologia 2. *Schistosoma mansoni*/efeitos de drogas 3. Alergia e Imunologia/tendências 4. Hipersensibilidade Imediata/imunologia I. Título. II. Oliveira, Rodrigo Corrêa (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Estudo longitudinal do efeito do tratamento, com drogas anti-helmínticas, sobre os níveis de anticorpos IgE anti-*Dermatophagoides pteronyssius* (Der p1) e anti-antígeno bruto de *Ascaris lumbricoides*, em indivíduos portadores de infecção por helmintos

por

Sabrina Sidney Campolina Coelho

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira (Presidente)
Prof. Dr. Mariléia Chaves Andrade
Prof. Dr. Denise da Silveira Lemos
Prof. Dr. Edward José de Oliveira
Prof. Dr. Adriana Bozzi de Melo
Suplente: Roberta Oliveira Prado

Tese defendida e aprovada em: 11/12/2013

Dedicatórias

Dedico aos meus amados pais, Lucy e Rogério Campolina, pelos anos de incansável dedicação, apoio, amor incondicional e pelos exemplos de perseverança, honestidade e alegria.

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao meu orientador Dr. Rodrigo Correa Oliveira por me aceitar no laboratório, pela disponibilidade, enorme paciência e principalmente pela confiança no desenvolvimento desse projeto.

A Dra. Andrea Gazzineli pela orientação nos trabalhos em campo, por permitir que fizesse parte desse projeto tão grandioso e importante para as comunidades envolvidas e para o entendimento das verminoses e doenças associadas. Muito obrigada!

Aos membros do laboratório de Imunologia Celular e Molecular em especial a Luciana Lisboa pela amizade e auxílio técnico, Nayara Ingrid, Ciça, Ana Carolina, Izabela, Walisson e Guilherme pela alegria, companheirismo e carinho.

Aos membros do Núcleo de Pesquisas e Estudos em Saúde Coletiva (NUPESC), da Faculdade de Enfermagem da UFMG principalmente a Msc Tércia Maria, aos doutorandos Humberto Qites e Kellen Rosa e ao Dr. Leonardo Matoso pela imensa colaboração nos trabalhos de campo e pelos momentos inesquecíveis que vivemos juntos.

A minha grande amiga Clari, que me ensinou a ser uma pessoa melhor me ajudando nos momentos de conflito e acima de tudo me dando alegria e coragem para seguir em frente.

Ao meu grande amigo Dr. Márcio Sobreira pela amizade por todos esses anos, pelas orientações e conversas científicas e por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava.

As minhas grandes amigas e mentoras, Ana Cristina de Carvalho Botelho e Luciana Maria Silva que me acolheram, moldaram o meu pensamento científico e que sempre me deram um voto de confiança.

A coordenação de Pós- graduação do Instituto René Rachou e secretárias pela possibilidade de participar do programa e pela cordialidade e serviços prestados.

Aos participantes do projeto, moradores de uma região muitas vezes esquecida pelas autoridades do país, mas que mesmo assim não perdem a esperança. Sem eles esse trabalho nunca seria realizado.

Aos meus pais, irmãos, cunhadas e sobrinhos que sempre estiveram ao meu lado acreditando no meu potencial e na realização desse trabalho.

Ao meu querido marido, companheiro e colaborador Bernardo Coelho Horta, pelo incentivo, pela paciência e amor nos momentos de estresse e ansiedade. Você sempre foi e será meu porto seguro.

Ao Abílio Augusto e Mathilda Thereza pela alegria e pelos sorrisos sempre que chego a casa.

Em especial, ao Doutor Olindo de Assis Martins Filho. Palavras, gestos e admiração são poucos para expressar a minha gratidão pelo tempo, o carinho e a atenção que me foram dados. Sem o seu apoio científico e, sobretudo emocional, eu não teria conseguido. Muito obrigada.

A agência financiadora Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pela concessão da bolsa.

Sumário

Lista de Figuras.....	X
Lista de Tabelas.....	XI
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XII
Resumo.....	XIV
Abstract.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
4.1 Geohelmintoses.....	19
4.2 Esquistossomose.....	21
4.3 Tratamento das helmintoses.....	23
4.4 Resposta imunológica humana frente às infecções helmínticas.....	25
4.5 Doenças alérgicas.....	26
4.6 Hipótese da higiene.....	31
4.7 Infecções helmínticas e doenças alérgicas.....	34
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
5.1 Caracterização da população.....	38
5.2 Pesquisa parasitológica.....	41
5.3 Coleta de sangue.....	41
5.4 Hemograma.....	42
5.5 Avaliação da reatividade de Imunoglobulina E anti-antígenos Der p1 e Ascaris....	42
5.6 Entrevistas.....	43
5.7 Questionários para investigação das doenças alérgicas e dos fatores associados	44
5.8 Análises estatísticas.....	44
5.9 Grupos amostrais.....	45
6 RESULTADOS.....	47
6.1 Ocorrência de infecções por ancilostomídeos e <i>S. mansoni</i> antes e após o tratamento.....	47
6.2 Análise dos níveis do anticorpo anti-Der p1 em indivíduos residentes em áreas com distintas prevalências de infecções por Ancilostomídeos e <i>S. mansoni</i>	48
6.3 Efeito do tratamento na frequência de altos produtores de IgE anti- Der p1.....	50
6.4 Análise do índice de IgE anti-Der p1e sua relação com a infecção helmíntica e co-infecção e a intensidade da infecção.....	51
6.5 Correlação dos níveis de reatividade de IgE anti-Ascaris versus reatividade de IgE anti-Der p1.....	52
7 DISCUSSÃO.....	54
8 CONCLUSÃO.....	60
9 ANEXOS.....	61
9.1 Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa- COEP/ UFMG.....	61
9.2 Anexo B - Questionário ISAAC adaptado.....	62
9.3 Anexo C - Questionário fatores de risco.....	65
9.4 Anexo D - Tabela dos fatores de risco.....	66
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura capa - Retirantes vidas secas. Fonte: http://cidadedesapaulo.wordpress.com	I
Figura 1 - Esquema do ciclo de vida do helminto <i>A. duodenale</i>	20
Figura 2 - Mapa mundial mostrando a proporção de crianças em idades entre 1- 14 anos que necessitam de quimioterapia para geohelmintos por país.....	24
Figura 3 - Mesorregião Jequitinhonha composta por cinco microrregiões: Diamantina, Capelinha, Araçuaí, Pedra Azul e Almenara.....	39
Figura 4 - Parâmetros demográficos dos participantes do estudo em relação ao gênero e idade.....	40
Figura 5 - Ocorrência de infecções helmínticas e intensidade de infecção relacionada com a idade e a carga parasitária nas duas localidades.....	48
Figura 6 - Análises dos fatores de risco em duas áreas endêmicas para infecção por helmintos.....	49
Figura 7 - Impacto do tratamento na produção de IgE anti-Der p1 em duas áreas endêmicas para infecções por helmintos.....	51
Figura 8 - Index de IgE anti-Der p1.....	52
Figura 9 - Correlação dos níveis de IgE anti- Der p1 e anti- <i>Ascaris</i>	53

LISTA DE TABELAS

Tabela dos fatores de risco.....	66
----------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

AAM - do inglês, “alternatively activated macrophage”, ou seja, macrófago alternativamente ativado.

CD - do inglês, “Cluster of differentiation”, ou seja, agrupamento de diferenciação, nomenclatura normalizada para as diversas moléculas de superfície de células do sistema imune.

COEP - Comitê de ética em pesquisa.

CTL - do inglês, “C type lectin”, ou seja, lectina tipo - C.

Derp 1 - primeiro alérgeno identificado da espécie de ácaro *Dermatophagoides pteronyssius*.

EDTA - do inglês, “Ethylenediamine tetraacetic acid”, ou seja, ácido etilendiamino tetra-acético.

ELISA - do inglês, “Enzyme - Linked Immunosorbent Assay”, ou seja, teste imunoenzimático.

epg - do inglês “egg per gram” ou seja, ovos por grama de fezes.

Fc γ RI - receptor de alta afinidade de IgE.

hab/Km² - Habitantes por quilômetro quadrado.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IFN - interferon.

IgE - imunoglobulina da classe E.

IgG - imunoglobulina da classe G.

IL - interleucina.

ISAAC – do inglês, International Study of Asthma and Allergy in Childhood, ou seja Estudo Internacional de Asma e Alergia na Infância.

M – Molar.

mg/Kg - miligrama por quilograma.

MHC - do inglês, Main Histocompatibility Complex, ou seja, Complexo de Histocompatibilidade Principal.

nm – nanômetro.

NOD - do inglês, “Nucleotide Oligomerization Domain”, ou seja, domínio de oligomerização de nucleotídeos.

OMS - Organização Mundial de Saúde.

OPD – do inglês, Ortho-Phenylenediamine, ou seja, orto-fenilenodiamina.

OPG - Ovos por grama de fezes.

PAMP - do inglês, pathogen- associated molecular pattern, ou seja, padrão molecular associado a patógenos.

PBS - do inglês, “Phosphate Buffered Saline”, ou seja, solução tampão salínico fosfatado.

PBS-T - solução tampão salínico fosfatado detergente.

PDA - do inglês “Personal Digital Assistant”, ou seja, assistente pessoal digital.

pH - potencial Hidrogênico.

PNUD - Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento.

PRR - do inglês, “pattern recognition receptor”, ou seja, receptores de reconhecimento de padrão.

rpm - Rotações por minuto.

SPJ - São Pedro do Jequitinhonha.

Th1 - do inglês, “T helper”, ou seja, linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 1.

Th2 - do inglês, “T helper”, ou seja, linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 2.

Th17 - do inglês, “T helper”, ou seja, linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 17.

TGF - do inglês, “Transforming Growth Factor”, ou seja, fator de transformação do crescimento.

TLR - do inglês, “toll like receptor”, ou seja, receptores do tipo Toll.

TNF - do inglês, “Tumor Necrosis Factor”, ou seja, fator de necrose tumoral.

T reg - linfócitos T reguladores.

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

No presente trabalho investigou-se a relação entre infecções por geohelmintos e *S. mansoni* e os fatores de risco para alergia em duas áreas endêmicas com diferentes prevalências de infecção e co-infecção. A intensidade das infecções, eosinofilia, fatores de risco para alergia, co-infecção e os níveis de IgE anti-Der p 1 e anti-*Ascaris* antes e 2 anos (população 1) e 3 anos (população 2) após o tratamento com drogas anti-helmínticas foram avaliados. Observou-se que na população com baixa prevalência e intensidade de infecção (população 2) apresentou menor contagem de eosinófilos ($>600/\text{mm}^3$) e maior contato com animais do que a população com alta prevalência e intensidade de parasitos (população 1). Após o tratamento a intensidade da infecção por *S. mansoni* diminuiu, mas não foram observadas mudanças nos indivíduos infectados por geohelmintos ou co-infectados. Na população 1, o tratamento anti-helmíntico aumentou os níveis de densidade óptica pelo método de ELISA de IgE anti-Der p1 e anti-*Ascaris* nos subgrupos que se tornaram negativos para infecção helmíntica independente da condição prévia ao tratamento. Diante disso, avaliou-se o index de reatividade de IgE anti-Der p1, e a razão (após/antes tratamento) foi significativamente maior em pacientes co-infectados antes do tratamento. Por outro lado, nenhuma associação entre o index de reatividade de IgE anti-Der p1 e a intensidade foram observados. Conclui-se que o tratamento antihelmíntico de indivíduos de áreas endêmicas com alta prevalência para infecções por geohelmintos e *S. mansoni* aumenta os níveis de IgE anti-Der p1 e que há uma correlação direta entre os níveis de IgE anti-Der p1 com os níveis de IgE e anti-*Ascaris*, mostrando que altos níveis de IgE anti-*Ascaris* e não somente a infecção, é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas.

ABSTRACT

In this work were investigated the relationship between Hookworm/*S. mansoni* infections and allergy related risk factors in two endemic areas with distinct prevalence of infections and co-infection. The intensity of infections, eosinophilia, allergy risk factors, infections status and anti-Der p1 IgE levels before and two years (population 1) and three years (population 2) after anthelmintic treatment, were evaluated. It was observed that the population with lower prevalence and intensity of infection (population 2) had lower eosinophils counts ($>600/\text{mm}^3$) and higher animal contact than the population with higher parasites intensity (population 1). After anthelmintic treatment the intensity of *S. mansoni* single infection decreased, but no changes were observed in Hookworm and co-infected individuals. The anthelmintic treatment also enhanced anti-Der p1 IgE optical density in ELISA on the subgroups that became negative for helminth infection regardless of their previous infection condition in population 1. Facing that, we evaluated the anti-Der p1 IgE reactivity index, and the ratio (after/before treatment) was significantly higher in patients co-infected before treatment. On the other hand, no association between anti-Der p1 IgE reactivity index and the intensity of infections were observed. In conclusion, effective anthelmintic therapy of subjects from endemic areas with high prevalence of Hookworm and *S.mansoni* infections enhances anti-Der p1 IgE levels and there is a relationship between the anti-*Ascaris* IgE levels and IgE anti- Der p1, showing that the first one, not only the infection, is a risk factor to allergic disorders development.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil apesar de todo o avanço científico e tecnológico, mas não sócio econômico, ocorrido nos últimos anos, as helmintoses persistem como um grande problema de saúde pública, ocorrendo em diversas regiões, seja em zona rural ou urbana e em diferentes faixas etárias (Silva et al., 2011). O crescimento desordenado das cidades e as acentuadas diferenças sociais fazem com que parcelas da população brasileira vivam em situações precárias com condições de saneamento básico deficitárias e desnutrição, propiciando a transmissão e agravos das helmintoses (Fonseca et al., 2010). A somatória desses fatores faz com que o controle das parasitoses intestinais seja complexo e a reinfecção após o tratamento ocorra frequentemente em áreas endêmicas (Buck et al., 1978; Chamone et al., 1990; Silveira et al., 1998; Brito et al., 2006; Grant et al., 2008; Vasconcelos et al., 2009; Enk et al., 2010).

A ocorrência e a intensidade de infecção por helmintos estão associadas a fatores socioeconômicos como acesso limitado à água limpa e tratada, ambientais como clima tropical e baixa altitude, e também a fatores inerentes ao hospedeiro como idade, predisposição genética e fatores imunológicos e fisiológicos (Silveira et al., 2004; Alemu et al., 2011).

Apesar dos aspectos negativos das infecções helmínticas, após a hipótese da higiene proposta por Starchan (1989), tais doenças foram investigadas como um dos fatores para a distribuição e prevalência das doenças alérgicas.

Nos países desenvolvidos e nos grandes centros urbanos da América Latina, por exemplo, as doenças alérgicas têm se tornado um problema de saúde pública sobrecarregando os sistemas de saúde e causando a diminuição da produtividade de indivíduos (Wong et al., 2001; Cooper et al., 2008). Vários estudos demonstram que a prevalência das doenças alérgicas é menor nas áreas rurais e acredita-se que diversos fatores tais como a pobreza, estilo de vida, dieta, famílias numerosas e a ocorrência de infecções helmínticas podem conferir proteção para essas doenças (Cooper et al., 2008; Cooper, 2009). A influência do ambiente parece ter um papel extremamente importante uma vez que indivíduos que mudam para centros urbanos desenvolvem doenças alérgicas (Nicolau et al., 2005; Cooper, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Nas últimas três décadas houve um aumento considerável de doenças inflamatórias autoimunes nos países desenvolvidos incluindo diabetes do tipo I, esclerose múltipla, artrite reumatoide, doença de Cruz (Bach, 2002; Zaccane et al., 2006) entre outras doenças como asma e doenças alérgicas (Cooper, 2009).

Atualmente mais de 130 milhões de pessoas no mundo sofrem de asma e o número está aumentando. Por outro lado, a prevalência de doenças alérgicas é menor em países em desenvolvimento (Yazdanbakhsh et al., 2002). Mesmo nos países em desenvolvimento as doenças alérgicas tornaram-se um importante problema de saúde pública. Os centros urbanos da América Latina parecem ser os mais afetados e apresentam as maiores prevalências de asma do mundo. Por outro lado, a prevalência de asma e outras doenças alérgicas é menor nas áreas rurais, sugerindo que a exposição aos fatores ambientais de áreas rurais na primeira infância pode ter um efeito protetor às alergias (Cooper, 2009).

Uma vez que as infecções por helmintos têm fortes efeitos modulatórios sobre a resposta inflamatória do hospedeiro humano, estes podem ter um papel importante no quadro epidemiológico das doenças alérgicas em países onde estas infecções são endêmicas. No entanto, ainda não há muita clareza sobre o assunto em questão, sendo necessárias investigações adicionais que avaliem o papel real da infecção helmíntica na doença alérgica e que determinem se a infecção parasitária reduz, de fato, as manifestações alérgicas ou se o resultado dessa associação é mais dependente das condições locais de exposição e sensibilização na área de estudo (Sorensen & Sakali, 2006).

Além disso, tem sido demonstrado que o tratamento extensivo e por tempo prolongado com drogas anti-helmínticas, em populações endêmicas aumenta os sintomas de doenças alérgicas. Então, faz-se necessário o entendimento das consequências dos programas de tratamento em massa ou de indivíduos infectados.

Sendo assim, neste trabalho propomos avaliar a hipótese de que o tratamento com drogas helmínticas é capaz de alterar a resposta imunológica a alérgenos em indivíduos previamente infectados por helmintos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar longitudinalmente a reatividade do anticorpo IgE ao antígeno bruto de *Ascaris lumbricoides* e ao alérgeno da poeira doméstica Der p1, em indivíduos portadores de infecção por diferentes espécies de geohelmintos e *Schistosoma mansoni* tratados com drogas anti-helmínticas.

3.2 Objetivos específicos

- I. Comparar a porcentagem de eosinófilos dos indivíduos dos municípios de São Pedro do Jequitinhonha e Caju antes e após tratamento com anti-helmíntico;
- II. Avaliar a reatividade de anticorpos IgE contra o antígeno bruto do *Ascaris lumbricoides* em amostras de soro de indivíduos residentes em área endêmica para helmintoses, antes e após o tratamento;
- III. Avaliar a reatividade de anticorpos IgE contra o antígeno bruto do ácaro *Dermatophagoides pteronyssius* em amostras de soro de indivíduos residentes em área endêmica para helmintoses, nos diferentes tempos amostrais;
- IV. Avaliar a existência de correlação entre os níveis de reatividade das IgE, avaliadas e o número de eosinófilos circulantes;
- V. Avaliar a existência de correlação entre os níveis de reatividade da IgE séricos obtidas e idades dos participantes;
- VI. Avaliar a existência de correlação entre os níveis de reatividade da IgE anti-antígeno bruto de *Dermatophagoides pteronyssius* aos dados obtidos pelo questionário padrão sobre asma e doenças alérgicas do *International Study of Asthma and Allergies in Childhood – ISAAC*.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Geohelmintoses

As helmintoses estão entre as doenças infecciosas mais prevalentes nos países localizados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Estima-se que atualmente, dois bilhões de indivíduos estejam infectados por pelo menos uma espécie de helminto, sendo as espécies de geohelmintos as mais comuns. No entanto, a prevalência das helmintoses varia entre países, e até mesmo, entre regiões dentro de um mesmo país. A estimativa para a América Latina, por exemplo, é de que 20 a 30% da população esteja infectada por alguma espécie de geohelmintos (Fonseca et al., 2010). Em áreas endêmicas, as geohelmintoses são altamente prevalentes em crianças em idade escolar, residentes em áreas rurais com baixo índice de saneamento básico (Bethony et.al, 2006; Cooper et al., 2011).

Encontram-se descrito na literatura 341 espécies de helmintos infectando o homem. No entanto, apenas 25 apresentam relevância epidemiológica (Stoll, 1999). Dentre as espécies mais importantes de geohelmintos estão o *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichura* e *Strongyloides stercoralis* (Brooker, 2010). Essas espécies são parasitos nematódeos transmitidos pelo solo e possuem ciclo de vida restrito ou não, ao sistema digestivo do hospedeiro, não envolvendo um hospedeiro intermediário ou um vetor (Greiger et al., 2004). Nas espécies *A. duodenale* e *N. americanus*, por exemplo, os ovos presentes no solo diante de temperatura e umidade adequadas eclodem dando origem a larvas filarióides infectante que ativamente penetram na pele do hospedeiro. Através da circulação sanguínea, elas são carregadas para o coração e conseqüentemente para os pulmões. As larvas permanecem nos pulmões de dez a quatorze dias para maturação, depois penetram a parede alveolar, ascende o tronco brônquico até a garganta e são engolidas. Quando alcançam o intestino delgado se tornam adultas e parasitam o hospedeiro. Entre a ingestão de ovos e a ovoposição de fêmeas adultas são necessários de dois a três meses (Miller, 1979). O ciclo de vida da espécie *A. duodenale* e *N. americanus* está exemplificado na Figura 1.

A espécie *T. trichura* por sua vez, é restrita ao trato digestivo. As fêmeas liberam por dia de dois a dez mil ovos que são eliminados pelo hospedeiro através

das fezes. Em condições favoráveis no solo, esses ovos se tornam infectantes em três semanas. Após serem ingeridos, os ovos eclodem no intestino delgado e as larvas penetram os vilos continuando assim seu desenvolvimento. As larvas jovens se deslocam para o ceco, penetram na mucosa tornando-se vermes adultos (Cross, 1996).

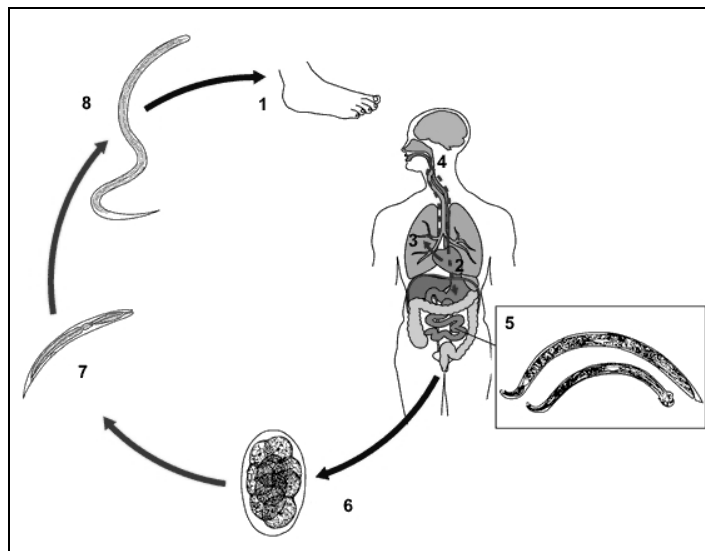


Figura 1: Esquema do ciclo de vida do helminto *A. duodenale*. 1- Penetração da larva filarióide (L3) pela pele; 2- Larvas carregadas pela circulação sanguínea até os pulmões; 3- Larvas rompem os capilares e caem nos alvéolos, sofrendo uma nova muda (L4). As larvas migram para a faringe; 4- As larvas podem ser expulsas por expectoração ou então serem deglutidas; 5- As larvas deglutidas atingem o duodeno onde sofrem uma nova muda (L5) e posteriormente amadurecem sexualmente transformando-se em adultos. As fêmeas após a cópula iniciam a ovoposição; 6- Eliminação dos ovos pelas fezes e contaminação do ambiente; 7- Evolução dos ovos férteis no solo até se tornarem larvas rabditóides (L1) que posteriormente se desenvolvem em L2; 8- transformação para larva filarióide infectante (L3). Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx

Apesar das infecções por geohelmintos serem raramente letais, elas acarretam grandes deficiências nutricionais, físicas, intelectuais e cognitivas causando morbidade significativa (Lozoff et al., 2006; Brooker, 2010). As infecções causadas pelas espécies *A. duodenale* e *N. americanus* podem causar sangramento intestinal e perda de proteínas proporcional à carga parasitária. A perda de sangue também é observada nas infecções por *T. trichura*, porém em menor intensidade, mas quando associadas a outras geohelmintoses podem agravar a deficiência de ferro causando anemia. A gravidade dos sintomas também

está relacionada à condição nutricional do hospedeiro (Hotez et.al, 2004; Brooker, 2010).

As infecções por *A. lumbricoides* são, na maioria das vezes assintomáticas, mas complicações além das intestinais ou relacionadas ao alto número de parasitos (Stephenson et al., 1989; Gyorkos et al., 2006) estão geralmente associadas ao comprometimento na digestão de gordura, absorção reduzida de vitaminas e intolerância temporária a lactose (Van Eijk et al., 2009).

4.2 Esquistossomose

A esquistossomose é outra infecção helmíntica relevante sendo endêmica em 76 países com a prevalência de cerca 200 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo (Engels et al., 2002; Grant et al., 2008; Alemu et al., 2011). No Brasil a esquistossomose abrange 19 estados com dois milhões e meio de indivíduos infectados e vinte seis milhões expostos ao risco de infecção (Coura & Amaral, 2004).

Os agentes etiológicos da esquistossomose apresentam uma distribuição geográfica bastante definida. As três principais espécies de *Schistosoma*, que infectam o homem, são as espécies *S. mansoni* presente no Brasil e em outros países da América do Sul, em partes da África e no Oriente Médio; *S. haematobium* presente na África e Oriente Médio e é a única espécie em que os ovos são eliminados na urina e não nas fezes; *S. japonicum* presente na China, sudeste da Ásia e Filipinas (Grant et al., 2008). As espécies *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. malayensis* são restritas geograficamente apresentando pequena relevância epidemiológica no cenário mundial. Além disso, outras espécies de esquistossomatídeos que infectam aves e outros mamíferos podem causar dermatite cercariana em humanos (Kolárová et al., 2010).

O ciclo de vida dos esquistossomatídeos é diferente do ciclo dos geohelmintos, pois é necessária a presença do hospedeiro intermediário, onde o parasito sofre reprodução assexuada. Em relação ao hospedeiro intermediário, três espécies do gênero *Biomphalaria* apresentam importância epidemiológica no Brasil, sendo elas as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (Carvalho, 1992).

O ciclo inicia-se quando o hospedeiro definitivo infectado elimina os ovos do parasita próximo aos cursos de água doce. Em condições adequadas os ovos eclodem e liberam os miracídios que nadam livremente até penetrarem no

hospedeiro intermediário. Nele os miracídios multiplicam assexuadamente e dão origem a duas gerações de esporocistos e conseqüentemente a produção de milhares de cercarias. O homem infecta-se ao entrar em contato com águas contaminadas com cercarias, que penetram ativamente pela pele ou mucosas e se transformam em equistossômulos. Os equistossômulos migram para vários órgãos como os pulmões através do fluxo sanguíneo venoso. Os parasitos saem dos vasos sanguíneos, que irrigam as vísceras, para alcançarem o sistema porta-hepático aonde se tornam vermes adultos. Os vermes acasalam e migram para as veias mesentéricas da parede do intestino (Barbosa et al., 1978).

As formas e rotas de migração que o verme traça em seu hospedeiro definitivo são responsáveis por diferentes respostas imunológicas e conseqüentemente, diferentes manifestações clínicas. De maneira geral, a esquistossomose pode ser dividida em duas fases. A primeira é a fase aguda que compreende a dermatite cercariana que é caracterizada por edema e prurido, na região de penetração da cercaria na pele. Os indivíduos residentes de área endêmica por outro lado podem ser assintomáticos não apresentando nenhum sintoma. A segunda fase é a fase crônica e suas manifestações variam de acordo com a localização do parasita e a carga parasitária. A fase crônica pode apresentar as formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica compensada ou descompensada, sendo a última a forma mais grave da doença principalmente em áreas onde a doença e as baixas condições sócio-econômicas são prevalentes (Kloetzel, 1963).

Outra forma clínica de alta gravidade é a neuroesquistossomose e os sintomas observados são: aumento da pressão intracranial, mielopatia e radiculopatia. Os estudos de caso sugerem que as complicações clínicas observadas são decorrentes da deposição de ovos e conseqüente migração de vermes adultos para o cérebro e medula espinhal (Ferrari et al., 2008; Ross et al., 2012). Apesar do grande número de pessoas infectadas, menos de 5% apresentam complicações clínicas decorrentes da doença (Araújo et al., 2004).

O método diagnóstico Kato-Katz é o padrão para determinar a presença de ovos nas fezes. Essa técnica foi uma modificação feita por Katz ao método de esfregaço de gota espessa para análise de amostras fecais descrito previamente por Kato e Miura (1954), para que fosse facilmente utilizado nos trabalhos em campo. Essa nova técnica foi adotada pela OMS para o diagnóstico qualitativo e

quantitativo das infecções causadas por helmintos tais como *A. lumbricoides*, *T. trichura*, *A. duodenale* e *S. mansoni* (WHO, 2011).

4.3 Tratamento das helmintoses

Em maio de 2001, durante a Assembleia Mundial da Saúde, a Organização Mundial de Saúde (OMS) defendeu a necessidade urgente dos governantes controlarem a morbidade associada às infecções causadas pelos geohelmintos através da administração regular de drogas anti-helmínticas. O objetivo era tratar 75% das crianças em idade escolar e outros grupos com alto fator de risco até o ano de 2010. No entanto, esse objetivo não foi alcançado, como podemos observar no mapa que mostra a proporção de crianças com idades entre 1-14 anos que necessitam de quimioterapia contra geohelmintos de acordo com cada país (Figura 2) (WHO, 2011).

O Ministério da Saúde recomenda que infecções causadas por *A. duodenale* e *N. americanus* devem ser tratadas com Mebendazol (100mg) duas vezes ao dia, durante três dias consecutivos. O uso desse medicamento não é recomendado para gestantes. O Albendazol é um medicamento ovicida, larvicida e vermicida e é administrado também por via oral sendo preconizado 400mg em dose única. A dose desses medicamentos independe do peso corporal. O Pamoato de Pirantel pode ser usado na dose de 20-30mg/kg/dia, durante três dias. O controle de cura é realizado no 7°, 14° e 21° dias após o tratamento, mediante exame parasitológico das fezes (Ministério da Saúde, 2010).

Durante a Ascariíase, infecção causada pelo *A. lumbricoides*, o Mebendazol e o Albendazol são utilizados pelo mesmo regime com exceção do Albendazol, que em crianças deve ser administrado em dose única 10mg/Kg. O Levamizol também pode ser utilizado sendo que em adultos devem administrados 150mg por via oral em dose única, em crianças abaixo de 8 anos devem ser utilizadas 40mg e naquelas acima de 8 anos, 80mg (Ministério da Saúde, 2010).

Apesar do tratamento em massa ter sido preconizado por alguns autores (Fallah et al., 2002) há uma preocupação crescente em relação à administração de medicamentos anti-helmínticos em larga escala uma vez que existe a possibilidade de desenvolvimento de vermes resistentes a drogas, como já foi observado na medicina veterinária, e em algumas regiões endêmicas como Zanzibar e Vietnã

nas quais uma única dose de mebendazol não foi eficiente no tratamento de geohelmintos (Keiser & Utzinger, 2008). A resistência aos medicamentos contra geohelmintos também foi observada em humanos (Diawara et al., 2013; Rana & Misra-Bhattacharya, 2013).

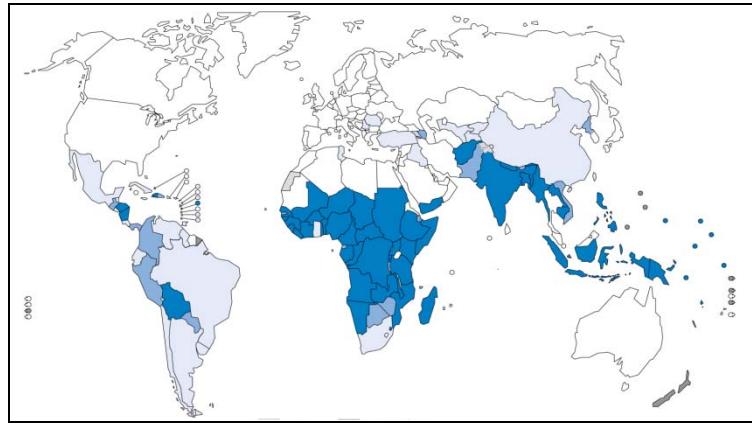


Figura 2: Mapa mundial mostrando a proporção de crianças em idades entre 1-14 anos que necessitam de quimioterapia para geohelmintos por país. Legenda: □ menos de 1/3 da população; □ entre 1/3 e 2/3 da população e □ acima de 2/3 da população; □ nenhuma quimioterapia preventiva é necessária; □ nenhum dado está disponível; □ não se aplica. Fonte: *World Health Organization, 2011.*

Para o tratamento da esquistossomose, os medicamentos praziquantel e oxaminiquina são utilizados. O praziquantel é administrado por via oral, em dose única de 50mg/Kg de peso para adultos e 60 mg/Kg de peso em crianças. Como segunda escolha, a Oxaminiquina é utilizada em cápsulas de 250mg e solução de 50mg/mL, para uso pediátrico. Para adultos recomenda-se 15mg/Kg e crianças, 20mg/Kg, via oral, em dose única, uma hora após uma refeição. A medicação anti-esquistossomótica não deve ser utilizada por gestantes, lactantes, crianças abaixo de dois anos, indivíduos com insuficiência hepática grave e renal. As medidas de controle através da identificação e tratamento dos portadores de *S. mansoni*, por meio de inquéritos coproscópicos a cada dois anos, deve fazer parte da programação de trabalho das secretarias municipais de saúde das áreas endêmicas (Ministério da Saúde, 2010).

4.4 Resposta imunológica humana frente às infecções helmínticas

Os helmintos são parasitos que evoluíram com o sistema imune humano. Eles estimulam o desenvolvimento das respostas imunoreguladoras no hospedeiro provocando uma infecção assintomática na maioria dos indivíduos permitindo sua permanência no trato digestivo (Anthony et al., 2007; Maizels et al., 2009; Danilowicz-Luebert et al., 2011).

Os principais tipos celulares presentes nas respostas imunes durante as infecções por helmintos são os linfócitos T CD4⁺ que quando ativados podem se diferenciar nas linhagens do tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2), tipo 17 (Th17) e reguladora (T reg) (Bourke et al., 2011; Leon-Cabrera & Flisser, 2012). A resposta imune do organismo pode diferir entre as espécies e o estágio de desenvolvimento do helminto durante uma mesma infecção (Harris & Gause, 2011).

A presença dos helmintos na luz intestinal e de seus componentes induz a polarização da resposta para Tipo 2. Combinada com a supressão de citocinas pró-inflamatória, durante a evolução da infecção, ocorre a modulação na expressão de moléculas co-estimulatórias nas células dendríticas, levando a indução da resposta Tipo 2 (Carvalho et al., 2008; Danilowicz-Lueber et al., 2011).

A resposta Tipo 2 envolve a rápida ativação e comprometimento dos eosinófilos, basófilos e mastócitos (células da resposta imune inata) e linfócitos T CD4⁺. Essas células produzem interleucinas (IL-4), que apresenta papel central nesta resposta, como IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL- 25 e IL-33 e um conjunto de citocinas que levam a mudanças fisiológicas nos órgãos afetados como intestino e pulmões, caracterizadas pela hiperplasia de células produtoras de mucina e contração da musculatura lisa. Durante uma infecção helmíntica a resposta Tipo 2 promove a troca de classes de isotipos das células B para IgE e IgG (Carvalho et al., 2008; Hotez et al., 2008; Perrigoue et al., 2008).

A produção desses dois isotipos é dependente da ligação entre os linfócitos T e B e da presença da IL-4. Sendo assim, as infecções helmínticas estão associadas a uma grande produção de IgE policlonal. Essa imunoglobulina é responsável pela ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos através da ligação aos receptores Fc γ RI promovendo a desgranulação e a liberação de mediadores solúveis produzidos por essas células. Desta forma, a resposta Tipo 2 tem como

objetivos eliminar o parasita e diminuir o efeito patológico causado pela inflamação (Anthony et al., 2007).

Embora os helmintos possam causar imunopatologia grave, a maioria das infecções permanece crônica e assintomática. Isso acontece porque além de estimular uma resposta Tipo 2, as infecções helmínticas são também capazes de induzir a multiplicação de células reguladoras. As células TCD4⁺ reguladoras naturais (Treg) expressam o fator de transcrição Foxp3, receptor de cadeia alfa para IL-2 (CD 25), CTLA-4 e produzem proteínas imunossupressoras como IL-10 e fator de necrose tumoral beta (TGF-β) (Danilowicz-Lueber et al., 2011). Essas células reguladoras constituem de 5 a 10% dos linfócitos T CD4⁺ periféricos em humanos e suprimem várias respostas potencialmente patogênicas, especialmente aquelas a antígenos próprios (Wang, Cao, Shi, 2008). As células T reg são importantes para reduzir a patologia no hospedeiro através da supressão das respostas Tipo 1 e Tipo 2. Em modelos murinos para a esquistossomose, células Treg CD4⁺CD25⁺ expressando grandes quantidades de IL-10 demonstraram ter um papel importante na redução da imunopatologia, especialmente na fase crônica da doença (Malaquias et al., 1997; Danilowicz-Lueber et al., 2011).

4.5 Doenças alérgicas

Assim como as helmintoses, as doenças alérgicas são patologias crônicas associadas a altos níveis de citocinas da resposta imune Tipo 2, de Imunoglobulina E (IgE) e eosinofilia (Pacífico et al., 2009). As manifestações clínicas podem se apresentar na forma de rinite e asma alérgicas, alergia alimentar, inflamações alérgicas da pele, alergia ocular e choque anafilático (Akdis, 2009).

Nas últimas três décadas a prevalência das doenças alérgicas do trato respiratório tem aumentado significativamente nos países desenvolvidos e nos centros urbanos de países em desenvolvimento. Em países da Europa, na Austrália e nos Estados Unidos, 1 a cada 5 indivíduos sofre de doenças alérgicas sendo que em outros países elas são incomuns (Bell, 1996).

A rinite alérgica é um problema de saúde mundial afetando pacientes de todas as idades e etnias. É uma enfermidade do trato respiratório, ocasionada por uma resposta inflamatória nas vias aéreas superiores podendo se estender até as vias aéreas inferiores (Bousquet et al., 2008).

A prevalência da rinite alérgica varia entre os diferentes continentes do mundo, mas observou-se um aumento considerável nos últimos 50 anos. Na Europa, a prevalência dessa doença na população de adultos varia de 17 a 28,5% entre diferentes localidades. Estimativas consideram que mais de 600 milhões de pessoas sofrem dessa doença e diferenças na incidência entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, aéreas rurais e urbanas, são observadas (Yazdanbakhsh et al., 2002).

O diagnóstico da rinite alérgica é feito através da observação de três sintomas cardinais no paciente que são: obstrução nasal, rinorréia e espirro sendo também descrito lacrimejamento dos olhos e sinusite associados a estes sintomas. No entanto, muitos pacientes são subdiagnosticados muitas vezes porque os sintomas não são percebidos. A rinite alérgica pode ser dividida em intermitente ou persistente e a gravidade da doença depende dos sintomas e de como eles afetam as atividades diárias do paciente (Bousquet et al., 2008).

Além da rinite alérgica, a asma é uma doença respiratória que afeta grande parte da população mundial e apresenta sintomas mais graves que a rinite. A asma é a denominação dada à inflamação crônica resultante de uma hiperresponsividade nas vias aéreas inferiores, levando a broncoconstrição e conseqüentemente, a limitação do fluxo de ar. Essa doença é mais comum em crianças, interferindo de forma significativa no desempenho escolar e desenvolvimento (Cooper, 2009). No mundo 300 milhões de pessoas são acometidas pela doença e anualmente ocorrem 250.000 mortes decorrentes de suas complicações, sendo que a maioria dos óbitos ocorre nos países em desenvolvimento (Pawankar et al., 2008).

O estudo internacional de asma e alergia na infância do inglês *International Study of Asthma and Allergy in Childhood* (ISAAC) foi desenvolvido para maximizar os valores epidemiológicos da pesquisa em asma e doenças alérgicas, estabelecendo uma metodologia padrão para facilitar a colaboração internacional. Os objetivos dessa metodologia foram descrever a prevalência e a gravidade da asma, rinite e eczema em indivíduos, moradores de diferentes centros, e fazer comparações entre regiões de um mesmo país e entre países; fornecer dados para uma avaliação de tendências futuras sobre a prevalência e gravidade dessas doenças e fornecer uma visão geral para futuros estudos epidemiológicos, genéticos, ambientais e de assistência médica relacionados a estas doenças (Asher & Weiland, 1998; Solé et al., 1998).

O método ISAAC é composto por três fases. A fase I é um questionário destinado para estimar a prevalência e a gravidade da asma, rinite e eczema em duas diferentes faixas etárias, de 6 a 7 anos e de 13 a 14 anos, no entanto, vários estudos o utilizam em indivíduos acima dos 14 anos (Montefort et al., 2009; Uthaisangsook, 2010; Al Ghobain et al., 2012). A fase II investiga possíveis fatores etiológicos e a fase III é a repetição da fase I para avaliar as tendências da prevalência (Bousquet et al., 2008).

Os dados obtidos pelo método ISAAC mostraram que por serem doenças do trato respiratório, a associação entre rinite e asma são frequentes. Entre os pacientes asmáticos 80% também apresentam sintomas de rinite e de 10 a 40% dos pacientes, que apresentam rinite tem asma (Bousquet et al., 2008). Indonésia, Albânia, Romênia, Grécia e Geórgia são os países com as menores prevalências (<5%) de asma e rinite alérgica no mundo. Os países com as maiores prevalências (> 30%) de asma e rinite alérgica foram Austrália, Nova Zelândia e Reino Unido. A prevalência de asma no Brasil é de 20%, de rinite alérgica é de 16% e 4% para eczema (Bousquet et al., 2008). Nas últimas décadas o que se observa é o aumento crescente da incidência e prevalência de doenças alérgicas, principalmente em países desenvolvidos e em grandes centros urbanos de países em desenvolvimento, principalmente os da América Latina, acarretando em prejuízos na vida do paciente e sobrecarga no sistema único de saúde (Cooper, 2009).

A etiologia das doenças alérgicas é ambiental, genética e imunológica, porém os riscos atribuídos a cada um desses fatores ainda são incertos. Exposições diárias a novas moléculas presentes no ar, água e na dieta, o aumento da poluição no ambiente, o menor número de infecções e fatores genéticos como a alta produção de IgE (atopia), são as principais causas para o desenvolvimento de sintomas das doenças alérgicas (Akdís, 2009). Os aeroalérgenos ou alérgenos inalados estão frequentemente associados ao desenvolvimento da rinite alérgica e asma. O termo alérgeno pode ser definido como moléculas que apresentam como propriedades a sensibilização do sistema imune induzindo a produção de anticorpos de alta afinidade, especialmente IgE, e a promoção de uma reação alérgica (Aalberse, 2000).

Os alérgenos são proteínas, glicoproteínas ou glicanas originados de uma grande variedade de animais, plantas, insetos ou fontes ocupacionais e que

apresentam importantes atividades biológicas tais como: inibição enzimática, transporte e regulação de outras proteínas e enzimas. Os aeroalérgenos são divididos em internos estando presentes em ácaros, pelo de animais, insetos e mofo e externos como os encontrados no pólen e agentes ocupacionais. A prevalência da IgE resultante da sensibilização aos alérgenos internos como os de ácaro da poeira doméstica e alérgenos de gato está positivamente relacionada com a frequência e gravidade da asma (Bousquet et al., 2008).

Os ácaros da poeira doméstica são as principais fontes de alérgenos. Esses animais pertencem ao filo Artropoda, classe Arachnida, subclasse Acarina, família Pyroglyphidae. As espécies mais importantes são o *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Euroglyphus maynei*, *Lepidoglyphus destructor* e *Blomia tropicalis* (Mary et al., 2008)

Os exemplares dos gêneros *Dermatophagoides* e *Euroglyphus* se alimentam de restos de pele humana descamada e desta forma, são abundantes em lençóis, colchões, travesseiros, carpetes, estofados e pelúcias. Os alérgenos estão presentes nas fezes e no exoesqueleto desses animais e sua inalação ocorre quando tais partículas são suspensas nos ambientes contaminados. Muitos pacientes apresentam sintomas durante todo o ano, porém, há uma exacerbação nos períodos úmidos, isso porque os ácaros apesar de estarem presentes nas casas durante todo o ano, estes apresentam crescimento máximo em temperaturas acima de 20°C e umidade relativa de 80% (Bousquet et al., 2008).

O desenvolvimento das doenças alérgicas requer a sensibilização de indivíduos susceptíveis a um antígeno específico. Essa sensibilização pode acontecer em qualquer momento da vida, embora crianças e indivíduos no início da adolescência tenham maior propensão. Quando os alérgenos entram no organismo, estes são capturados e processados pelas células apresentadoras de antígeno que apresentam peptídeos através da molécula de MHC aos linfócitos T CD4⁺. A resposta imunológica depende do reconhecimento e interações de vários receptores e do microambiente de citocinas sendo que a IL-4 direciona para a resposta Tipo 2 e IFN- γ para o perfil Tipo 1 (Wong et al., 2001; Luger et al., 2010; Powe et al., 2010).

As doenças alérgicas são caracterizadas pela resposta Tipo 2 que promove a migração e povoamento da submucosa das vias aéreas por eosinófilos e linfócitos. Esse tipo de resposta está associado à ativação de linfócitos B

específicos e não específicos, que se transformam em plasmócitos. Os plasmócitos sintetizam IgE específica que se liga a receptores presentes na membrana plasmática de eosinófilos, basófilos e mastócitos os quais atuam como efetores da inflamação alérgica através da produção de fatores vasoconstritores, pro inflamatórios e fibrinogênicos como a histamina, leucotrienos, fator de ativação de plaquetas, triptase, entre outros que são responsáveis pela obstrução e hiperatividade dos brônquios (Erazo et al., 2007; Li & Boussiotis, 2008; Akdis, 2009).

Além disso, os eosinófilos, basófilos e mastócitos, juntamente com os linfócitos Th2, produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que possuem importantes funções na resposta imune. As citocinas IL-4 e IL-5 são cruciais para a ativação e infiltração de eosinófilos para o local da inflamação. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que suprime a secreção de citocinas pro inflamatórias, a inflamação das vias aéreas induzida pelo alérgeno e a respostas inespecíficas nas vias aéreas. Já a IL-13 compartilha receptores, vias de sinalização e muitas atividades biológicas com a IL-4 que tem o papel na indução e manutenção da produção da IgE e na resposta alérgica mediada pela IgE quando a produção de IL-4 é baixa ou ausente. Além disso, as citocinas IL-13 e IL-4 têm efeito sinérgico com TNF- α e IL-5 na ativação de eosinófilos (Wong et al., 2001; Erazo et al., 2007; Li & Boussiotis, 2008; Akdis, 2009; Voehringer, 2009; Luger et al., 2010; Powe et al., 2010).

Durante muitos anos, o estabelecimento das doenças alérgicas foi atribuído a produção anormal de células T resultante do desequilíbrio entre as citocinas das respostas Tipo 1 e Tipo 2. No entanto, estudos recentes demonstram que a regulação das células T é crucial para o desenvolvimento de uma resposta imunológica saudável impedindo o surgimento de alergias. Sendo assim, as alergias parecem estar na quantidade e atividade de células das subpopulações de linfócitos T (Fujita et al., 2012).

A tolerância central é o principal mecanismo para estabelecer o repertório de linfócitos T através da seleção tímica positiva e negativa. Porém, a deleção de linfócitos T nocivos é incompleta fazendo com que o sistema imune desenvolva estratégias de regulação imunológica em órgãos linfoides periféricos a fim de prevenir respostas imunológicas aberrantes. A regulação periférica é feita por mecanismos intrínsecos e extrínsecos das células T sendo que os mecanismos

intrínsecos envolvem a anergia dessas células, mudança de fenótipo e apoptose. Já os mecanismos extrínsecos estão relacionados com regulação de células T pelas células T reg, citocinas supressoras, principalmente IL-10 e TGF- β , e pelas células apresentadoras de antígeno (Wong et al., 2001; Erazo et al., 2007; Li & Boussiotis, 2008; Luger et al., 2010).

Indivíduos saudáveis e alérgicos apresentam as três principais subpopulações de linfócitos T (Th1, Th2 e T reg), porém em proporções diferentes. Indivíduos saudáveis apresentam a subpopulação de células reguladoras para alérgenos ambientais comuns maiores que as outras subpopulações enquanto que em indivíduos alérgicos a subpopulação celular mais evidente é a Th2. As células T reg suprimem o desenvolvimento das doenças alérgicas através de vários mecanismos que incluem a supressão de células dendríticas, linfócitos T auxiliares, mastócitos, eosinófilos e basófilos; inibição da migração de células inflamatórias para os tecidos e diminuição da produção de IgE total e alérgeno específica, aumentando simultaneamente a IgG4. Todas essas atividades são controladas pelas citocinas IL-10 e TGF- β (Fujita et al., 2012).

4.6 Hipótese da higiene

O aumento da incidência de doenças alérgicas tem evidenciado a necessidade de estratégias preventivas efetivas. No entanto, antes que essas sejam traçadas é importante determinar os eventos que levam a sensibilização alérgica e identificar marcadores preditivos que podem distinguir indivíduos susceptíveis (Warner & Warner, 2000).

Como a prevalência das doenças alérgicas em áreas rurais é menor, isso sugere que as exposições a componentes ambientais presentes nas áreas rurais durante as fases iniciais da vida podem ter ação protetora contra a alergia (Cooper, 2009). Essa observação foi feita inicialmente pelo epidemiologista Strachan (1989) que relatou uma relação inversa entre o tamanho da família e desenvolvimento de desordens atópicas. A diminuição da incidência de infecções transmitidas por um ambiente não higiênico poderia ser a causa do aumento das doenças alérgicas. Desta forma, sua teoria foi denominada hipótese da higiene.

Posteriormente, essa teoria foi explorada por especialistas em alergia e imunologia evoluindo para um conceito mais amplo o qual considera a diminuição

das infecções como a principal causa no aumento da atopia. A atopia é uma predisposição genética dos indivíduos a serem sensibilizados por alérgenos ambientais, sendo um importante fator de risco para as doenças alérgicas. No entanto, uma pequena proporção de indivíduos atópicos desenvolve os sintomas clínicos da alergia. A manifestação clínica dos sintomas alérgicos em indivíduos atópicos é influenciada por fatores ambientais como poluição do ar, dieta e exposição aos patógenos, levando a uma distribuição heterogênea das doenças atópicas mundialmente (Rujeni et al., 2012).

A diminuição das infecções nas populações pode ser atribuída a melhorias das condições sanitárias das populações como tratamento de água e esgoto, acesso facilitado aos sistemas de saúde, utilização de antibióticos, dieta com alimentos industrializados, campanhas de vacinação e até mesmo o êxodo rural (Zaccone et al., 2006; Smits et al., 2010).

No entanto, a exposição a microrganismos ocorre sem que haja infecção, pois suas partes viáveis e inviáveis estão em todos os lugares em diferentes concentrações. Essas substâncias microbianas são reconhecidas pelo sistema imune inato, induzindo uma resposta imunológica sem que ocorra uma infecção. A exposição ambiental basal e constante aos produtos microbianos pode ser crucial para a maturação do sistema imune na infância, desenvolvendo tolerância a componentes naturalmente presentes no ambiente como os alérgenos (Kabesch & Lauener, 2004).

Até a pouco tempo, acreditava-se que os recém-nascidos eram imunologicamente imaturos e que o desenvolvimento de uma resposta específica estava restrito ao período após o nascimento. No entanto, hoje se sabe que os neonatos possuem a capacidade de criar uma resposta imune a antígenos ambientais comuns que só pode ser desenvolvida na vida intrauterina. O estudo de células mononucleares de sangue periférico de fetos evidenciou que a resposta a alérgenos é observada na 22^a semana gestacional (Warner & Warner, 2000).

Os fatores que influenciam no desenvolvimento do sistema imune da descendência estão distribuídos em quatro etapas. A primeira etapa ocorre antes da gestação em que o status nutricional materno, os genes parentais e a programação epigenética influenciam no desenvolvimento imune da possível prole. No desenvolvimento intrauterino fatores como a exposição materna a

microrganismos, ligação antígeno-anticorpo, o microambiente de citocinas, estresse, tabagismo, nutrição materna, fatores placentários e bom funcionamento das glândulas uterinas estimulam a maturação do sistema imune do feto. A terceira etapa ocorre durante o parto e no período que o sucede. Os fatores importantes no desenvolvimento do sistema imunológico do neonato são a forma de parto (cesariana ou parto normal), a utilização de antibióticos perinatal, forma de alimentação (aleitamento materno ou formulações) e colonização inicial do trato gastrointestinal. A última etapa é o início da infância e os fatores envolvidos são a dieta da criança (introdução de possíveis alérgenos), infecções (exposições ao antígeno), colonização continuada do intestino e tabagismo dos pais (Kaplan et al., 2011).

Essas observações ganharam força com os estudos que mostram que a exposição a patógenos presentes na comida ou orofecais como a hepatite A, *Toxoplasma gondii* e *Helicobacter pylori* reduzem em 60% o risco de atopia. Além disso, diferenças nas taxas das espécies de microrganismos comensais colonizadoras do intestino também estão envolvidas na predisposição a doenças alérgicas (Yazdanbakhsh et al., 2002; Kabesch & Launer, 2004).

A primeira explicação imunológica para a hipótese da higiene foi baseada no balanço entre a resposta Tipo 1 associada às infecções bacterianas e virais e doenças autoimunes e a resposta Tipo 2 associada às helmintoses e as doenças alérgicas. A exposição limitada a patógenos bacterianos e virais durante os primeiros anos de vida resultariam na estimulação insuficiente de células Th1 que desta forma não poderiam contrabalancear a expansão das células Th2 resultando na predisposição a alergia (Rook, 2008).

Essa hipótese foi confirmada em modelos animais através de ensaios que promoveram a prevenção das doenças alérgicas através da indução de respostas Tipo 1 alérgeno específicas após vacinação com o bacilo *Calmette-Guerin* (BCG) (Yazdanbakhsh et al., 2002). No entanto, essa nunca foi uma teoria muito forte uma vez que as citocinas presentes na resposta Tipo 1 como INF- γ também estão presentes em grandes quantidades na asma e na dermatite atópica. Além disso, defeitos nas vias de produção da IL-12 e INF- γ não levam ao aumento da gravidade ou incidência das doenças alérgicas sugerindo que em humanos a resposta Tipo 1 não é um regulador fisiológico de resposta Tipo 2. Além disso, observou-se que a estimulação da proliferação de células Th1 em uma inflamação

mediada por células Th2 leva ao sinergismo da inflamação ao invés da modulação da imunopatologia (Rook, 2008).

A incongruência sobre a hipótese do balanço entre as respostas Tipo 1/Tipo 2 foi exaustivamente discutida e documentada no final da década de 90 quando se observou um aumento simultâneo nas doenças inflamatórias crônicas como diabetes do tipo 1, esclerose múltipla e doença inflamatórias do intestino ocorrendo nos mesmos países que apresentaram um aumento das doenças alérgicas. Além disso, indivíduos infectados por helmintos, que apresentam uma resposta Tipo 2 efetiva, apresentam menor sensibilização alérgica e o desenvolvimento de doenças alérgicas (Yazdanbakhsh et al., 2002; Rook, 2008).

4.7 Infecções helmínticas e doenças alérgicas

O questionamento do efeito protetor dos helmintos nas doenças alérgicas teve início nas décadas de 60 e 70 quando estudos epidemiológicos juntamente com experimentos animais mostraram que as helmintoses, em especial as causadas pelas espécies de *Schistosoma* e de geohelmintos, conferem um efeito protetor no desenvolvimento das doenças alérgicas. No entanto, os mecanismos pelos quais os helmintos suprimem as respostas alérgicas em humanos ainda não foram completamente esclarecidos (Bashir et al., 2002; Wohleben et al., 2004; Wilson et al., 2005; Mangan et al., 2006).

Atualmente existem três hipóteses relacionadas com a IgE para explicar a inibição da resposta a aeroalérgenos em indivíduos moradores de áreas endêmicas para as helmintoses: (1) altos níveis de citocinas regulatórias produzidas durante a infecção helmíntica, como a IL-10 que suprime a resposta a antígenos não relacionados, (2) a competição entre a IgE policlonal induzida pela infecção por helmintos e a IgE aeroalérgeno-específica por receptores de alta afinidade; (3) a inibição da síntese de IgE pelos altos níveis de IgE policlonal (Araujo et al., 2004a).

Van den Biggelaar e colaboradores (2004) encontraram uma associação entre o estágio da infecção por *S. mansoni* e positividade no teste de hipersensibilidade imediata que estava associada a grandes quantidades de IL-10 no soro dos pacientes. Esse resultado foi o precursor para a proposição de que IL-10 juntamente ou não com TGF- β secretados pelas células apresentadoras de

antígeno e pelas células T reg em resposta a uma infecção crônica pode interferir diretamente nos mecanismos alérgicos efetores através da inibição da degranulação de mastócitos ou inibição da proliferação de células comprometidas com a resposta Tipo 2 (Yazdanbakhsh et al., 2002; Araujo et al., 2004b). Esses dados foram corroborados por experimentos animais que demonstraram a supressão da resposta alérgica de camundongos infectados por helmintos era dependente da IL-10 e de células reguladoras CD4⁺ Foxp3⁺ (Bashir et al., 2002; Wohleben et al., 2004; Wilson et al., 2005; Kitagaki et al., 2006; Pacífico et al., 2009).

Porém, antes da resposta reguladora e a imunossupressão fossem adotadas como a melhor explicação para a supressão das doenças alérgicas pelos helmintos, a hipótese de bloqueio da IgE foi frequentemente utilizada para explicar esse fenômeno (Trujillo-Vargas et al. 2007). A IgE é a classe de anticorpo menos abundante na circulação sendo por isso descoberta após décadas da descoberta das IgG, IgM, IgD e IgA. A justificativa para as baixas concentrações de IgE na circulação está na sua pequena meia vida de apenas um dia ou dois no plasma muito menor da IgG que apresenta a média de 3 semanas. Isso ocorre devido ao número reduzido de células B comprometidas com a síntese de IgE e a sua rápida absorção pelos tecidos aonde se ligam com os receptores presentes nos mastócitos. A estrutura da IgE é comum às outras imunoglobulinas, cada IgE é um tetrâmero formado de duas cadeias pesadas idênticas e duas leves. A porção N-terminal das cadeias leve e pesada determina um sítio único de ligação do antígeno com o anticorpo determinando sua especificidade. As porções C-terminal das cadeias pesadas possui uma região constante (Fc) feita de quatro repetições C que confere as funções específicas para esse isotipo como a ligação com os receptores presentes na membrana celular e solúveis (Burton & Oetgen, 2011).

A manifestação clínica da alergia ocorre quando há uma interação bivalente na qual duas IgEs capturam um único alérgeno e se ligam a diferentes receptores (Fc ϵ R1) presentes nos mastócitos, basófilos e eosinófilos, induzindo a liberação de mediadores inflamatórios. As helmintoses frequentemente estão associadas à produção de IgE policlonal que pode saturar os receptores Fc ϵ R1 presente nos mastócitos bloqueando a ligação da IgE específica contra os antígenos do parasita e alérgenos ambientais e isso poderia inibir a degranulação e a resposta imediata

aos alérgenos. A metodologia que confirma essa teoria é o teste de Prausnitz-Kustner (P-K) que é baseado na sensibilização passiva de mastócitos através da injeção dérmica de soro contendo IgE alérgeno-específica, seguida do desafio cutâneo com alérgenos induzindo uma reação de pápula ou alargamento. Os estudos mostram que indivíduos com altos níveis de IgE totais não desenvolvem uma reação na pele contra o alérgeno (Yazdanbakhsh et al., 2002).

Os efeitos protetores das helmintoses nas reações alérgicas está associada a altos níveis de IgE no soro (Godfrey, 1975; Merrett et al., 1976; Lynch et al., 1993). Além disso, foi demonstrado que a inibição da sensibilização de fragmentos de pulmões humanos pode ser feita através da saturação dos sítios de ligação de IgE (Kamradt et al., 2005) e a evidência da presença em maior quantidade de IgE nos tecidos do trato respiratório de indivíduos alérgicos do que de IgE circulante no soro (Luger et al., 2010). O tratamento com drogas anti-helmínticas também demonstram a importância da IgE policlonal no desenvolvimento de doenças alérgicas. Estudos demonstram que após o tratamento com esses medicamentos, ocorre o aumento do teste cutâneo de hipersensibilidade imediata e dos sintomas das doenças alérgicas como o sibilos, o que está diretamente relacionado com a diminuição da IgE total (Lynch et al., 1993; Lynch et al., 1999; Van den Biggelaar et al., 2004).

Além do receptor Fc γ RI, há um segundo receptor denominado de Fc γ RII ou CD23 que também é encontrado em diferentes tipos celulares inclusive nas células apresentadoras de antígeno. O receptor CD23 quando clivado por uma metaloproteinase endógena de membrana é liberado nas formas triméricas e monoméricas solúveis. A forma trimérica atua como um fator de crescimento para as células B aumentando a síntese de IgE quando ligada simultaneamente a IgE de membrana e a proteína de membrana CD21. O principal alérgeno do ácaro da poeira doméstica Der p1 quando ligado a IgE, também tem a capacidade de clivar a proteína de membrana CD23 e CD25 (receptor de IL-12) e desta forma promover a síntese de IgE alérgeno específica desencadeando uma resposta alérgica (via reguladora positiva - CD 23 solúvel). A IgE policlonal por sua vez, se liga a CD 23 de membrana impedindo sua clivagem e conseqüentemente evitando a produção de IgE (via reguladora negativa) (Cooper et al., 2012).

Diante da complexidade imunológica envolvida na resposta ao hospedeiro helminto e das relações alérgicas e como elas podem se relacionar, muitos pontos

como o papel da IgE e a sua interação com outros fatores ambientais e genéticos devem ser esclarecidos. Além disso, como o tratamento desencadeia transformações nos níveis de produção de IgE é importante esclarecer como este pode afetar o desenvolvimento de doenças alérgicas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Caracterização da população

A população escolhida para estudo foi constituída por indivíduos residentes nos distritos de Caju e São Pedro do Jequitinhonha, que fazem parte da região rural do município de Jequitinhonha localizado a 685 km da capital do estado de Minas Gerais, Belo Horizonte. O município de Jequitinhonha possui uma área de 3.514 Km e uma população de 24.131 habitantes, sendo 17.068 na zona urbana e 7.063 na zona rural, a densidade demográfica é de 6,87 hab/km² (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010) e o índice de desenvolvimento humano é de 0,668 (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento, 2000). O mesmo está situado no nordeste do estado pertencente à mesorregião do Jequitinhonha, microrregião de Almenara (Figura 4) e as principais atividades econômicas são a pecuária de corte e agricultura de subsistência. O povoado de Caju desenvolveu-se em torno de grandes propriedades de criação de gado, e hoje, a principal fonte de renda é a agricultura de subsistência. O município possui aproximadamente 620 habitantes e está localizado a 101 Km da sede do município de Jequitinhonha. O distrito de São Pedro do Jequitinhonha localiza-se às margens do rio Jequitinhonha que por sua vez situa-se a 43 Km da sede do município. Esta localidade possui 2.265 habitantes e suas principais atividades econômicas são a agricultura de subsistência e a pecuária extensiva. Essas regiões apresentam em comum, baixas condição sanitária e socioeconômica e os indivíduos estão constantemente expostos às condições de risco em se infectarem por helmintos (Rezende, 2009). As amostras de sangue e fezes foram coletadas em dois tempos para as duas localidades, sendo os anos de 2004 e 2006 para o distrito de Caju e 2007 e 2010 para o distrito de São Pedro do Jequitinhonha.



Figura 3: Mesorregião Jequitinhonha composta por cinco microrregiões: Diamantina, Capelinha, Araçuaí, Pedra Azul e Almenara. Em destaque a mesorregião do Jequitinhonha e as cinco microrregiões que o compõem. A área de estudo do presente trabalho está localizada na microrregião de Almenara.

Participaram do estudo indivíduos que preenchiam os seguintes critérios de inclusão:

- 1- Residir na localidade;
- 2- Concordar em participar do estudo;
- 3- Ter realizado o exame parasitológico e a coleta de sangue nos dois tempos amostrais;
- 4- Ter respondido os questionários.

Os critérios de exclusão foram:

- 1- Mudar de localidade durante o tempo amostral;
- 2- Estar grávida;
- 3- Apresentar anemia;
- 4- Óbito;
- 5- Não ter realizado o exame parasitológico ou a coleta de sangue em algum dos tempos amostrais;
- 6- Não ter respondido os questionários;
- 7- Alcoolismo.

Considerando os critérios expostos acima, a população do estudo foi composta de 413 participantes em Caju (População 1) e 314 no distrito de São Pedro do Jequitinhonha (População 2). Em relação ao sexo, 47% dos participantes eram homens e 53% de mulheres na População 1 e na População 2, 45% eram homens e 55% eram mulheres. A frequência das faixas etária no início do estudo

na população 1 era caracterizada por 13, 8% de crianças de 0 a 6 anos, 25,4% de crianças entre 7 e 14 anos, na faixa etária de 15 a 29 anos a porcentagem era de 19, 9%, 21,8% entre 30 e 49 anos e 19,1% da população estudada estava acima dos 50 anos. Já na população 2 as porcentagens dos indivíduos para as faixas etárias de 0 a 6 anos, 7 a 14 anos, 15 a 29 anos, 30 a 49 anos e acima de 50 anos foram de 16,9%, 22,9%, 16,6%, 21,3% e 22,3% respectivamente. Para melhor visualização dos grupos estudados, os dados foram apresentados nos gráficos abaixo (Figura 4).

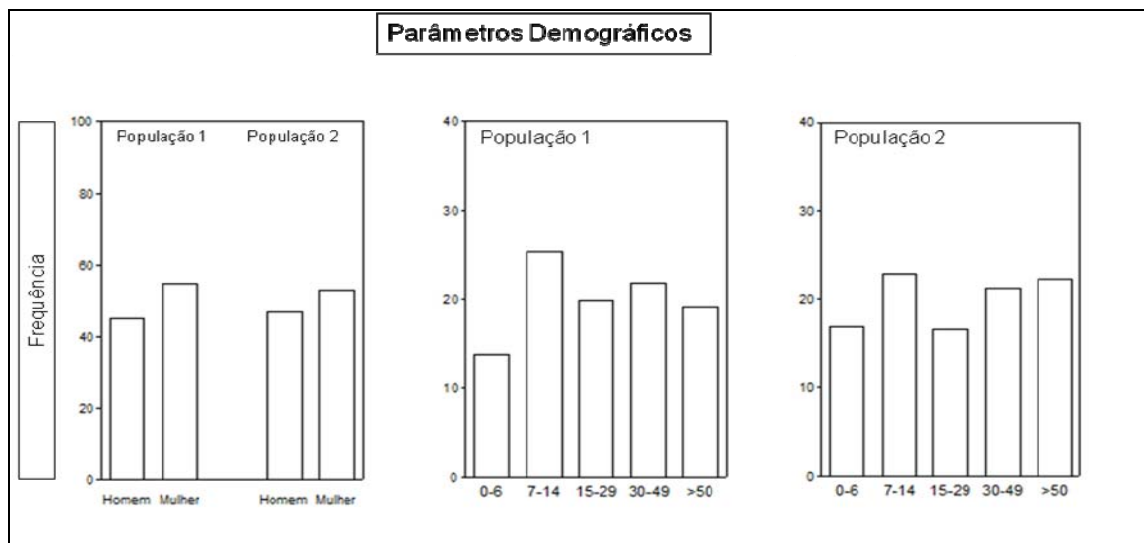


Figura 4: Parâmetros demográficos dos participantes do estudo em relação ao gênero e idade. (A) frequência de homens e mulheres nas populações 1 e 2 (B) frequência das faixas etárias: 0-6, 7-14, 15-29, 30-49 e acima de 50 anos nas populações 1 e 2.

Durante a realização do estudo foram oferecidos assistência médica e tratamento aos indivíduos da comunidade participantes ou não, que apresentaram outras doenças. O trabalho de levantamento parasitológico, supervisão do tratamento e do trabalho de campo foi realizado pela equipe da Dra. Andrea Gazzinelli, da Escola de Enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais.

O termo de consentimento livre esclarecido foi obtido de todos os voluntários, incluindo o consentimento dos pais ou guardião para as crianças e adolescentes participantes. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (n°268/08).

5.2 Pesquisa parasitológica

A pesquisa parasitológica foi realizada utilizando-se a técnica Kato-Katz. Os participantes do estudo receberam três recipientes para coleta de fezes, etiquetados com o nome e números a cada participante e domicílio, designado pela pesquisa, e foram instruídos a coletar as amostras em três dias diferentes. De cada amostra coletada foram preparadas duas lâminas, totalizando seis lâminas por participante, que foram avaliadas por microscopia.

A carga parasitária de cada indivíduo foi determinada pela média do número de ovos de cada espécie de helminto avaliada por grama de fezes (OPG). A média foi determinada pelo número de ovos observados nas lâminas avaliadas, multiplicado por 24 e dividido pelo número de lâminas examinadas. As espécies avaliadas foram: *S. mansoni*, *T. trichura*, *A. duodenale*, *A. lumbricoides*, *E. vermicularis* e *Taenia sp.*

Os resultados dos exames foram entregues a cada participante e aqueles que apresentaram o exame positivo, para qualquer um dos parasitas intestinais avaliados, foram devidamente tratados. As crianças com peso acima de 12 quilos (kg), adolescentes e adultos infectados pelo *S. mansoni* foram tratados com Praziquantel (50mg/Kg/peso) e aqueles com as demais helmintoses foram tratados com Albendazol (400 mg) em dose única. Crianças com peso abaixo de 12 kg foram tratadas com Oxaminiquina (dose 20mg/kg/peso) quando infectadas pelo *S. mansoni*. Os tratamentos seguiram as recomendações do Ministério da Saúde e foram supervisionados pelos pesquisadores e profissionais da saúde das localidades.

5.3 Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas, no mesmo momento da entrega da primeira entrega das fezes, pelos profissionais e estudantes de enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sendo coletados dois tubos de 5mL de cada participante. As amostras foram colhidas em tubos sem anticoagulantes, para a obtenção de soro e com o anticoagulante EDTA (Vacuntainer, BD, EUA) para análises hematológicas (hemograma). O material coletado foi refrigerado e enviado da área de campo em caixas de isopor para o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas René Rachou. O soro dos pacientes

foi coletado e aliqotado em microtubos após a centrifugação por 10 minutos a 2.500 rpm. Essas amostras foram então acondicionadas em freezer a -70°C até a utilização.

5.4 Hemograma

Os hemogramas foram realizados no Laboratório Paula Castro - Medicina Laboratorial. A diferencial de leucócitos também foi realizada através da contagem celular em esfregaço sanguíneo através da microscopia óptica utilizando objetiva de imersão 100x. O método panótico rápido foi utilizado para a coloração das células e realizada a contagem de cem leucócitos para determinar os valores relativos das populações celulares de linfócitos, monócitos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos).

5.5 Avaliação da reatividade de Imunoglobulina E anti-antígenos Der p1 e *Ascaris*

A reatividade de imunoglobulina E (IgE) anti antígenos Der p1 e *Ascaris*, foram determinados no soro dos pacientes através do ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto. Os antígenos utilizados separadamente para a sensibilização das placas foram o do *D. pteronyssinus* (Der p1) e do *A. lumbricoides* ambos do mesmo fabricante (Biocosmo, EUA), nas concentrações de 10µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. Essas concentrações foram definidas pelo descrito na literatura e através de uma curva de concentração ideal.

Inicialmente, os antígenos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato a 0,05M (pH 9,6) e adicionados 100µL/poço da solução nos 96 poços da microplaca (Maxisorb; Nunc, Roskild, Dinamarca). As placas foram tampadas e armazenadas a 4°C durante 16 horas. Em seguida, as placas foram lavadas por cinco vezes com 200µL/poço de tampão fosfato a 0,15M acrescido do detergente tween 20 (PBS-T) (Biorad, EUA), na concentração de 0,05% e pH entre 7,2 e 7,4. Para evitar ligações inespecíficas as placas foram incubadas com 200µL/poço da solução de bloqueio, composta de PBS-T e albumina bovina a 3% por 1 hora em estufa a 37°C. Depois da incubação as placas foram vertidas e foram adicionados 100µL/poço do soro dos participantes previamente diluídos 1/50 em solução de bloqueio. As placas foram então tampadas e incubadas 2 horas a 37°C.

Em seguida as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com a solução PBS-T e incubadas com 100µL/poço de anticorpo policlonal anti-IgE peroxidase (KPL, Maryland, EUA) na diluição de 1:1000, por 1 hora a 37°C e posteriormente lavadas por 5 vezes com PBS-T. Finalmente, foi adicionado 100µL/poço da solução reveladora que consistia de dihidroclorato O- fenilenodiamina (OPD) na 0,7mg/mL (Sigma, EUA) contendo 0,03% de água oxigena. As placas permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz e a reação foi interrompida com a adição de 50µL/poço de solução de ácido sulfúrico na concentração de 2M. O ensaio colorimétrico foi avaliado em leitor de microplacas Spectramax (Molecular devices, Califórnia, EUA) no comprimento de onda de 490nm.

As análises para cada indivíduo foram feitas em duplicata. Durante as reações como controle negativo, foi utilizado o soro proveniente de cordão umbilical de indivíduo de área não endêmica. Como controle positivo do ELISA com antígeno Der p1 foi utilizado o soro de indivíduo sabidamente alérgico não residente da área endêmica. Para o controle positivo do ELISA do antígeno *A. lumbricoides* foi escolhido um participante do estudo com alta carga parasitária para esta helmintose. Os valores utilizados nas análises estatísticas correspondem à média das duplicatas e o limite (*cutoff*) para a definição da positividade para os antígenos testados foi a média dos valores obtidos.

5.6 Entrevistas

As entrevistas foram realizadas pelos alunos de graduação e pós-graduação do curso de enfermagem da Universidade Federal de Minas Gerais e do Centro de Pesquisas René Rachou nos anos de 2008 no distrito de São Pedro do Jequitinhonha e em 2011 no distrito de Caju. As entrevistas foram realizadas em ambiente domiciliar, sendo que as crianças abaixo de 13 anos de idade tiveram seus questionários respondidos pelos adultos responsáveis. Os dados foram coletados utilizando um computador portátil PDA - *Personal Digital Assistant*- modelo Dell- Axim X 50 (Dell Inc, Texas, EUA). Após a coleta dos dados na área de campo, os formulários gerados eram analisados por dois pesquisadores a fim de observar erros de preenchimento ou incongruência entre as respostas obtidas, em um processo denominado dupla entrada e caso fosse necessário, os questionários eram reaplicados.

5.7 Questionários para investigação das doenças alérgicas e dos fatores associados

A identificação de casos de asma, rinite alérgica e eczema foi feita através da aplicação do questionário utilizado no estudo internacional de asma e alergias na infância (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood – ISAAC*) (Anexo 1). Esse questionário possui três módulos sendo cada um deles composto de até oito questões sobre doenças alérgicas (asma, rinite e eczema) de fácil compreensão que se referem aos sintomas dessas três doenças, à sua intensidade e ao diagnóstico médico, sendo a maioria das questões referentes ao último ano para evitar erros de memória. Paralelamente foi aplicado um questionário para a predisposição a atopia e doenças alérgicas. Esse questionário foi confeccionado utilizando-se do questionário ISAAC fase II, sendo adaptado para as condições ambientais e sociais da população.

5.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram feitas usando o software Minitab® 15.1.1.0 (P.A., EUA), Microsoft Office Excel 2010 SP1 (Microsoft Corporation, Washington, EUA) e Graph Pad Prism 5.0.3 (San Diego, CA, EUA). Foram realizados testes não-paramétrico de Mann-Whitney para comparar os dados sobre a porcentagem de eosinófilos, níveis de absorbância de IgE anti-*Ascaris* e anti Derp1 nos anos estudados em cada localidade. As correlações foram definidas através do método de correlação de Pearson.

Envolvendo a ocorrência de alergia e infecção helmíntica, foi usado o teste χ^2 para tabelas 2x2.

A regressão logística foi utilizada para detectar associação entre infecção helmíntica e alergia (asma, rinite e eczema), no qual o modelo era composto pela variável idade. Também foi utilizada a regressão logística para dados binários para verificar a associação entre atopia e os fatores de risco. O nível de significância das análises foi definido em $p < 0,05$.

5.9 Grupos amostrais

A população foi dividida em diferentes subgrupos de acordo com os resultados parasitológicos obtidos antes e após o tratamento. Indivíduos infectados apenas com a espécie *S. mansoni* foram colocados no grupo SCH, indivíduos que apresentaram infecção por ancilostomídeos formaram o grupo ANC. Os indivíduos infectados pelas duas espécies de helmintos pertenceram ao grupo ANC+SCH. Os indivíduos que não apresentaram nenhuma das infecções investigadas antes do tratamento ou que após o tratamento tinham exames de fezes negativos foram agrupados e nomeados como NEG. O número de indivíduos em cada um dos grupos na população 1 antes do tratamento foram: negativos (NEG) 115, 189 infectados por *S. mansoni* (SCH), 27 infectados por ancilostomídeos (ANC) e 82 co-infectados (ANC+SCH) para cada uma das localidades antes do tratamento. Na população 2 os números dos grupos amostrais foram os seguintes: negativos (NEG) 164, 129 infectados por *S. mansoni* (SCH), 9 infectados por ancilostomídeos (ANC) e 12 co-infectados (ANC+SCH) 12.

Para a análise do impacto do tratamento das infecções helmínticas na resposta ao antígeno bruto Der p1 foi determinada a condição dos indivíduos após o tratamento sendo formados os subgrupos tratados negativos e positivos (TRATADO-NEG e TRATADO-POS). Essa determinação foi baseada na condição antes do tratamento (antes-NEG, antes-SCH, antes-ANC e antes-ANC+SCH) e no após tratamento (após-NEG, após-SCH, após-ANC e após-ANC+SCH). O número de indivíduos agrupados na população 1 para cada condição foram os seguintes: 50 indivíduos que eram negativos (antes-NEG) e permaneceram negativos (após-NEG), 13 indivíduos que eram negativos (antes-NEG) e foram infectados por *S. mansoni* (após-SCH), 11 que eram infectados por ancilostomídeos (antes-ANC) e foram curados (após-NEG), 66 que estavam infectados por *S. mansoni* (antes-SCH) e foram curados (após-NEG), 45 infectados por *S. mansoni* (antes-SCH) que foram reinfectados (após-SCH), 28 indivíduos apresentando co-infecção (antes-ANC+SCH) que foram curados (após-NEG) e 19 co-infectados (antes-ANC+SCH) que foram reinfectados pelas mesmas espécies (após-ANC+SCH), totalizando 232 indivíduos.

Na população 2 os mesmos subgrupos foram formados e obteve-se os seguintes números amostrais: 62 indivíduos antes-NEG e após-NEG; 16 indivíduos antes-NEG e após-SCH; 6 indivíduos antes-ANC e após-NEG; 61 indivíduos antes-SCH e após-NEG; 17 indivíduos antes-SCH e após-SCH e 5 indivíduos antes-ANC+SCH e após-NEG, totalizando 167 indivíduos.

6 RESULTADOS

6.1 Ocorrência de infecções por ancilostomídeos e *S. mansoni* antes e após o tratamento

Nossos dados demonstraram que a ocorrência de infecções por ancilostomídeos (ANC) bem como as co-infecções por ancilostomídeos e *S. mansoni* (ANC+SCH) foi maior na População 1 quando comparada com a População 2 (Figura 5A). A População 1 também apresentou maior intensidade de infecção quando comparada com a População 2 (Figura 5B). O mesmo padrão foi observado nas diferentes faixas etárias das populações (Figura 5C). Além disso, a População 1 possuía uma maior frequência de indivíduos com alta intensidade de ovos por grama de fezes de *S. mansoni* (Sm100 opg) (Figura 5D). As cores das barras correspondem aos resultados observados no método de Kato-Katz. Os indivíduos com exame negativo (NEG) estão representados pela barra branca, positivos para infecção por ancilostomídeos (ANC) estão representados pelas barras cinza claro, positivos para infecção por *S. mansoni* (SCH) estão representados pelas barras cinza escuro. A intensidade de infecção está expressa por ovos por grama de fezes (OPG). A distribuição dos ovos por grama de fezes entre as diferentes faixas etárias foi determinada por ≥ 400 opg para *S. mansoni* e ≥ 2000 opg para ancilostomídeos. Cada grupo da população 1 foi comparada com seus respectivos grupos da população 2. As análises estatísticas foram feitas através dos métodos de Fisher e Mann-Whitney. Em ambos, foi considerada significativos os valores de $p < 0,05$ e foram evidenciado pelo asterisco (*).

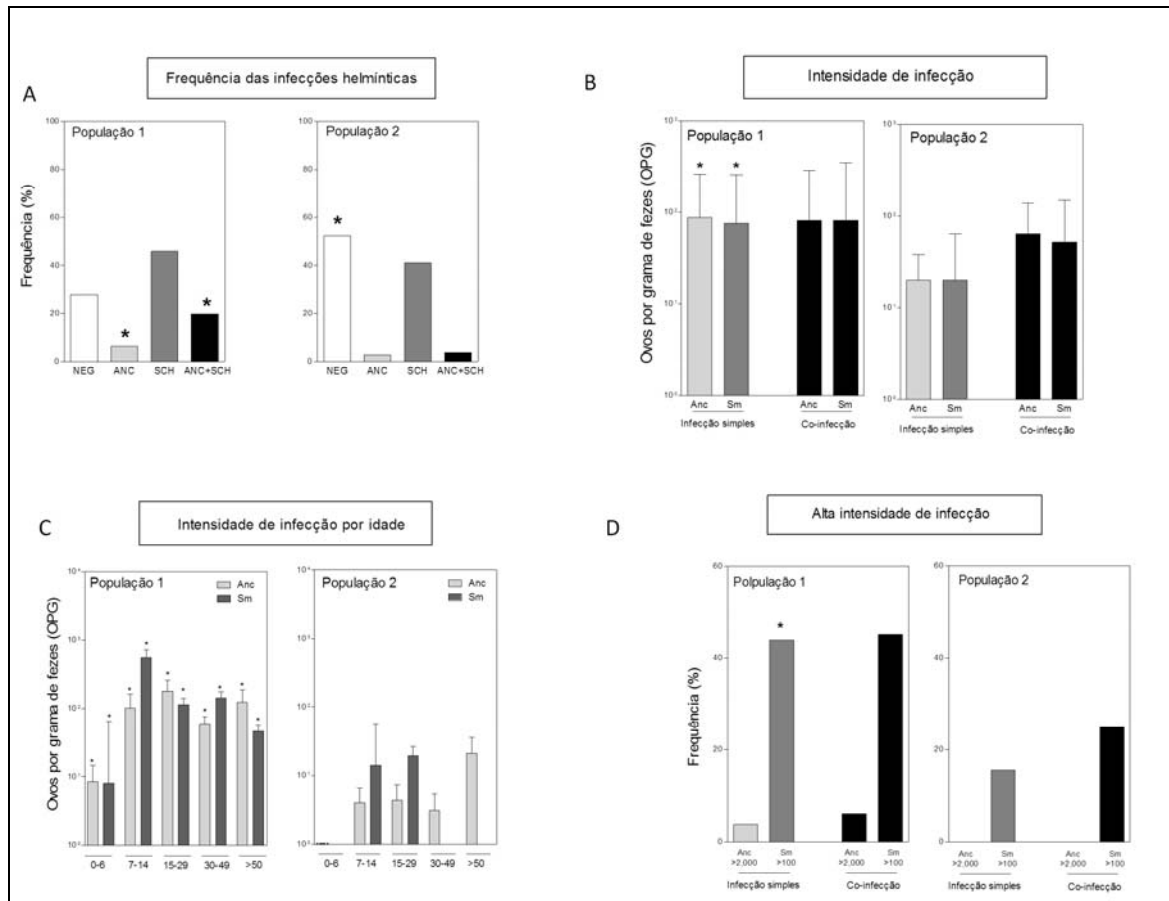


Figura 5: Ocorrência de infecções helmínticas e intensidade de infecção relacionada com a idade e a carga parasitária nas duas localidades. A frequência das infecções helmínticas (A), a intensidade da infecção expressa por ovos por grama de fezes (B), sua distribuição entre as diferentes faixas etárias (C) e a frequência de indivíduos altamente infectados (D).

6.2 Análise dos níveis do anticorpo anti-Der p1 em indivíduos residentes em áreas com distintas prevalências de infecções por Ancilostomídeos e *S. mansoni*

Para determinar a efetividade do método de ELISA na medição dos níveis de anticorpos IgE anti- Der p1, estabeleceu-se primeiramente o *cut-off* dos valores de densidade óptica obtidas nos ensaios (Figura 6A). Para isso, a média dos valores obtidos por densidade óptica de IgE anti- Der p1 antes e depois do tratamento das duas populações foram avaliadas para separar os indivíduos em baixos e altos produtores de IgE anti- Der p1. O valor usado como *cut-off* foi a leitura de densidade óptica de 0,420nm. Cinco fatores de risco incluindo anti-Der p1, contagem de eosinófilos periféricos ($\text{EOS} > 600/\text{mm}^3$), episódios prévios de asma, rinite e eczema (As/Ri/Ec), contato com animais, fumo e associação desses fatores foram usados para determinar a propensão de doenças alérgicas de acordo

com o questionário ISAAC (ANEXOS B, C e D). Cada grupo da população 1 foi comparado com seus respectivos na população 2. Embora a menor frequência de indivíduos com eosinofilia ($\text{EOS} > 600/\text{mm}^3$) na população 2, observou-se uma frequência de indivíduos que relataram contato com animal e mais de 50% de altos produtores de IgE anti- Der p1 (Figura 6B). As análises estatísticas foram feitas pelos métodos de Fisher e Mann-Whitney. Em ambos os casos a significância foi considerada com $p < 0,05$ e foram evidenciados pelo asterisco (*). Embora não houve diferença estatística da frequência de altos produtores de anti-Der p1, foi ligeiramente maior na população 2 (#).

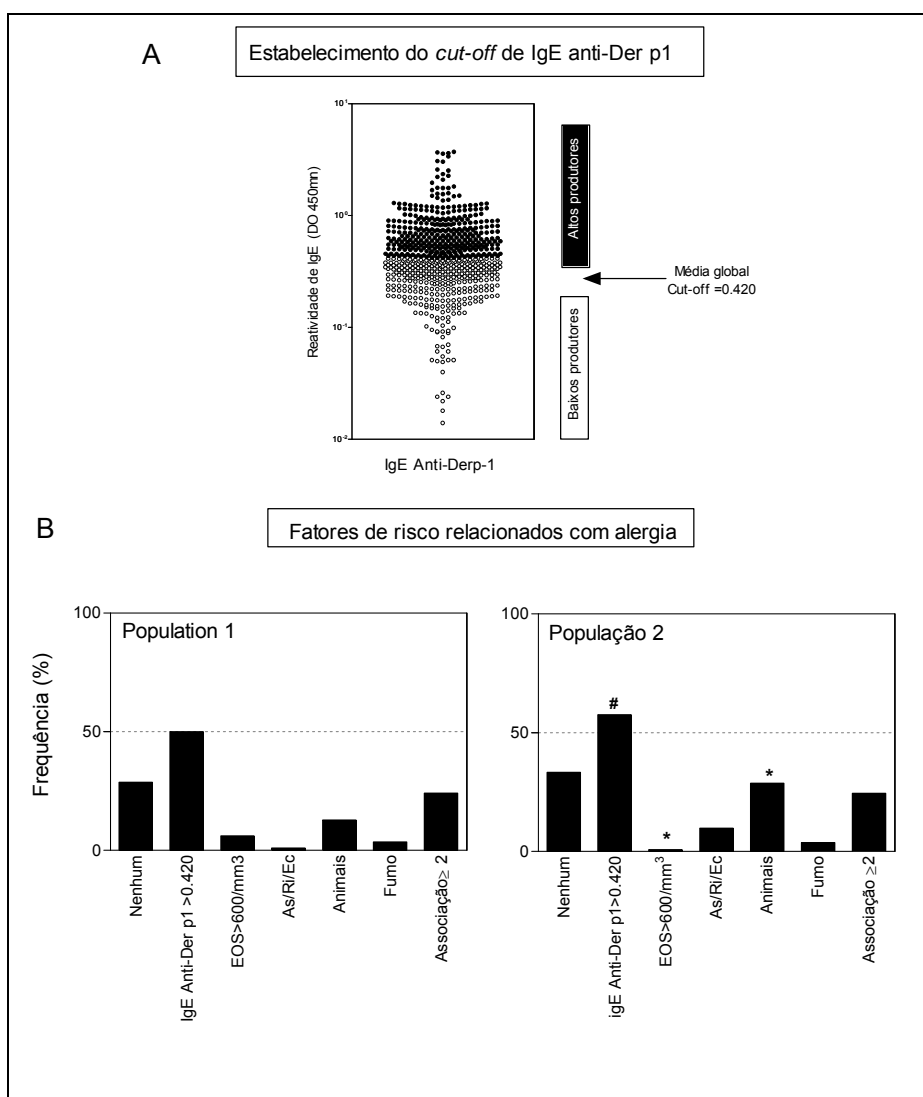


Figura 6: Análises dos fatores de risco em duas áreas endêmicas para infecção por helmintos. Média global dos valores de reatividade de IgE anti-Der p1 que foi usado como *cut-off* para segregar baixos e altos produtores (A). Fatores de risco para alergia (B).

6.3 Efeito do tratamento na frequência de altos produtores de IgE anti- Der p1

Embora o tratamento combinado de albendazol e praziquantel não tenha sido eficiente para erradicar as infecções helmínticas nas populações estudadas, a frequência de indivíduos negativos aumentou nas duas localidades (Figura 7A). Por outro lado, a terapia com medicamentos antihelmínticos reduziu a intensidade de infecção de *S.mansoni* (SCH) nos indivíduos com infecção única na população 1 mas não reduziu a intensidade de infecção dos indivíduos que continuaram infectados por ancilostomídeos (ANC) ou co-infectados (ANC+SCH). Nenhuma diferença foi observada na intensidade de infecção na população 2 (Figura 7B).

Na intenção de identificar o efeito das drogas antihelmínticas Albendazol e Praziquantel nos níveis das respostas do anticorpo IgEanti-Der p1, caracterizou-se a população estudada em dois subgrupos, nomeados de tratados NEG e tratados POS uma vez que os indivíduos foram curados ou permaneceram infectados ou reinfectados após 2 anos do tratamento. Os reinfectados e os participantes infectados foram tratados até que fossem curados. Os dados depois de repetidos tratamentos não foram utilizados nesse estudo.

Os dados demonstraram que a frequência de altos produtores de IgE anti-Der p1 aumentou somente no subgrupo de indivíduos tratados- NEG na população 1 com nenhuma mudança no subgrupo de indivíduos tratados-POS da população 1 e em nenhum dos subgrupos da população 2 (Figura 8A).

Análise detalhada dos subgrupos tratados-NEG e tratados-POS baseada na condição pré-tratamento (antes-NEG, antes-ANC, antes-SCH e antes-ANC+SCH) e a condição pós-tratamento (após-NEG, após-ANC, após-SCH e após-ANC+SCH), demonstrou que, independente da condição pré-tratamento, a frequência de altos produtores de IgE anti- Der p1 foi distribuída entre os participantes tratados-NEG da população 1 (Figura 8B). O grupo de negativos está representado pelas barras brancas (NEG), as barras cinza claro correspondem ao grupo de indivíduos infectados por ancilostomídeos (ANC), as barras cinza escuro corresponde ao grupo de indivíduos infectados com *S. mansoni* (SCH) e as barras em negro ao grupo de indivíduos co-infectados (ANC+SCH).

As análises estatísticas foram feitas pelos métodos de Fisher e Mann-Whitney. Cada grupo das populações foi comparado antes e após o tratamento com seus respectivos grupos. A diferença estatística foi considerada com $p < 0,05$ e foram evidenciadas pelo asterisco (*).

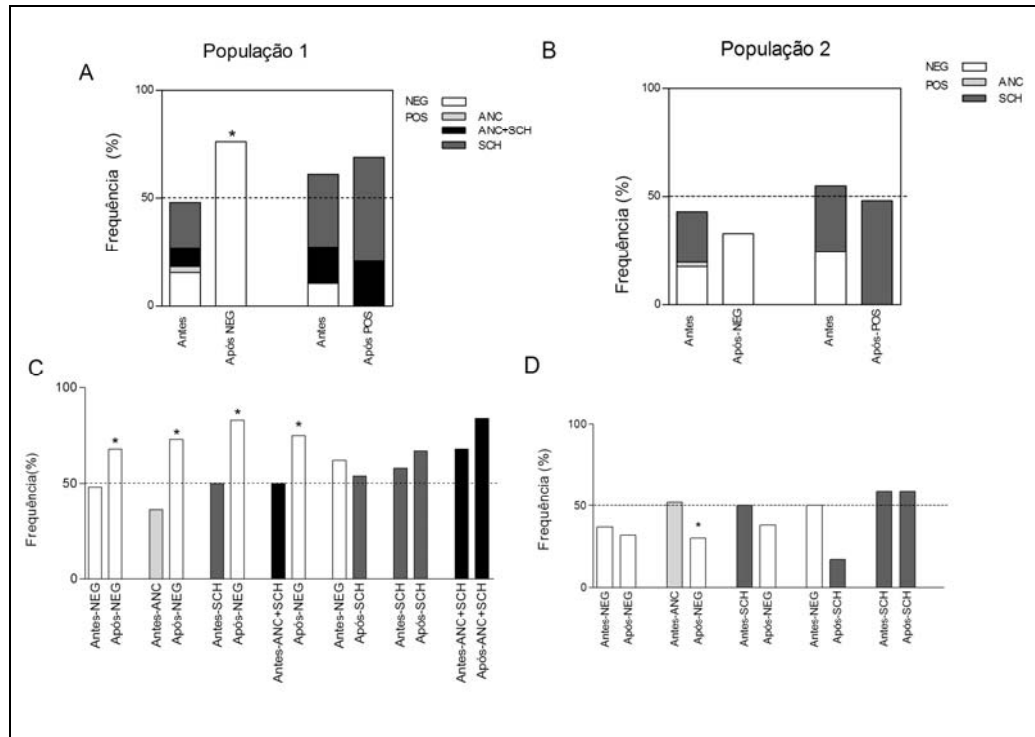


Figura 7: Impacto do tratamento na produção de IgE anti-Der p1 em duas áreas endêmicas para infecções por helmintos. A frequência de altos produtores de IgE anti-Der p1 e a condição antes e após o tratamento na população 1(A) e na população 2 (B) e de acordo com cada infecção separadamente (C e D).

6.4 Análise do índice de IgE anti-Der p1 e sua relação com a infecção helmíntica e co- infecção e a intensidade da infecção

Com o objetivo de investigar se as mudanças no valor de IgE anti-Der p1 observada no subgrupo tratados-NEG da população 1 estariam relacionadas com a condição do indivíduo antes do tratamento. Nossos dados demonstraram que o índice de IgE anti-Der p1 foi significativamente maior no subgrupo de indivíduos co-infectados antes do tratamento (Antes-ANC+SCH) (Figura 9 A). Análises adicionais demonstraram que o aumento no índice de IgE anti-Der p1 não estava associado com a contagem de ovos por grama de fezes de ancilostomídeos e *S. mansoni* (Figura 9B).

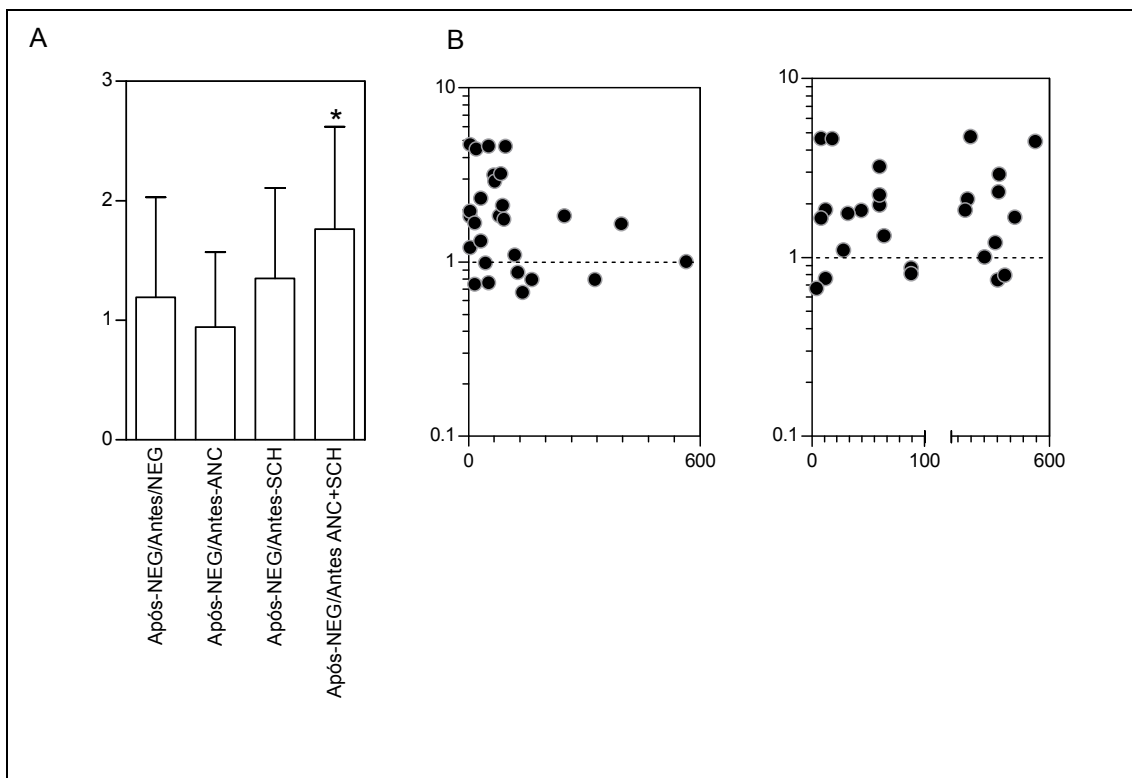


Figura 8: Index de IgE anti-Der p1. Os grupos foram comparados entre eles (A). O index de IgE anti-Der p1 do subgrupo de indivíduos co-infectados (Antes ANC+SCH/ após NEG) foi correlacionada com a intensidade de infecção.

6.5 Correlação dos níveis de reatividade de IgE anti-*Ascaris* versus reatividade de IgE anti-Der p1

A determinação da correlação dos níveis de reatividade de IgE anti-Der p1 e IgE anti-*Ascaris*, foi realizada através da regressão linear com os valores de densidade óptica obtidos para cada um dos antígenos. Para a análise foram utilizados os valores de IgE anti-Der p1 e IgE anti-*Ascaris* de cada um dos participantes deste estudo e a correlação foi feita entre esses valores individualmente. Além disso, os valores observados nas duas populações antes e após o tratamento foram inseridos conjuntamente.

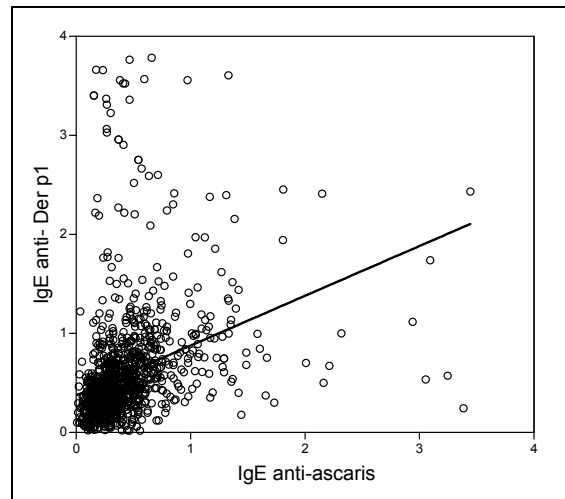


Figura 9: Correlação dos níveis de IgE anti- Der p1 e anti-Ascaris. $p < 0,0001$ e $r^2 = 0,1047$, intervalo de confiança de 95%.

O gráfico acima mostra o resultado dessa correlação. No eixo X estão dispostos os valores de reatividade da IgE anti- Der p1 e no eixo Y os valores de reatividade de IgE anti-*Ascaris*. Através da análise foi possível observar uma correlação positiva entre os parâmetros abordados ($p < 0,0001$ e $r^2 = 0,1047$, intervalo de confiança de 95%). Desta forma, pode-se afirmar que indivíduos que apresentaram altos níveis de IgE anti- Der p1 (altos produtores) também apresentaram altos níveis de IgE anti- *Ascaris* e os indivíduos com baixos valores de IgE- anti-Der p1 (baixos produtores) apresentaram baixos níveis de IgE anti- *Ascaris*.

7 DISCUSSÃO

Embora alguns autores tenham avaliado as mudanças nos níveis de IgE anti-Der p1 após o tratamento de indivíduos com drogas anti-helmínticas (Lynch et al., 1993; Van den Biggelaar et al., 2004), no presente estudo realizou-se comparações entre a produção de IgE anti-Der p1 antes e após o tratamento em várias faixas etárias e nos dois sexos e sua relação com os níveis de IgE anti-*Ascaris*. As populações avaliadas possuíam parâmetros similares de idade, sexo e doenças alérgicas. Os fatores de risco estavam igualmente distribuídos. Além disso, o tratamento contra o *S. mansoni* e ancilostomídeos foi efetivo nas duas localidades, evidenciado pelas amostras de fezes negativas. Observou-se também que a reinfeção ocorre nessas localidades.

Estudos sobre as espécies de *Schistosoma* e os principais nematódeos intestinais como *Trichuris trichura* e *Ascaris lumbricoides* demonstram que a intensidade e a prevalência da infecção são marcadas pela idade do hospedeiro (Kabatereine, et al., 1999; Speziali et al., 2004; Galvani, 2005; Vereecken et al., 2007; Pereira et al., 2010). O pico de infecção em populações residentes em áreas endêmicas para helmintos ocorre geralmente na puberdade (10-14 anos) e a susceptibilidade para a reinfeção após o tratamento é maior em crianças que em adultos (Galvani, 2005; Vereecken et al., 2007). A resistência idade dependente contra infecções pode ser explicada através das mudanças nas respostas imunológicas e fisiológicas do hospedeiro que são construídas através de anos de infecção (Vereecken et al., 2007; Pereira et al., 2010). A prevalência e a intensidade das infecções helmínticas tendem a diminuir à medida que há o aumento da IgE que por sua vez, está relacionado com o aumento da idade (Pereira et al., 2010).

Os ácaros são importantes fontes alergênicas nas regiões tropicais em que a temperatura e a umidade permitem o crescimento de pelo menos seis espécies dentre elas a *Dermatophagoides pteronyssius*. Eles têm sido considerados como a causa do aumento da prevalência da sensibilização por alérgenos inalados e como determinantes do desenvolvimento de doenças alérgicas principalmente asma (Sánchez-Borges et al., 2003). Muitos mecanismos da imunidade aos helmintos são utilizados também pela resposta imune a alérgenos tais como os alérgenos do

ácaro *D. pteronyssius* que induzem a síntese de IgE específica, estimulam a formação de uma forte resposta Tipo 2 incluindo eosinofilia que contribui para a patogênese da asma e outras doenças alérgicas. Uma vez que a maioria dos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos está localizada nas regiões tropicais, a população está naturalmente exposta tanto aos helmintos quanto a diferentes espécies de ácaros (Acevedo & Caraballo, 2011).

Nesse estudo, foi observado que os níveis de anti-Der p1 aumentaram na população com a maior taxa de infecção (população 1). Os vermes são conhecidos por estimularem o desenvolvimento de uma resposta imune reguladora no hospedeiro e por isso, estão frequentemente associados à diminuição de eventos alérgicos. Van den Biggelaar e colaboradores (2004) demonstraram que a associação entre a infecção por *S. mansoni* e a produção de IL-10 evidenciada em amostras de soro dos pacientes, combinada ou não com o aumento de TGF- β , que foi secretada por células apresentadoras de antígeno e linfócitos T reguladores. A IL-10 pode interferir diretamente nos mecanismos efetores da alergia inibindo a desgranulação de mastócitos ou o desenvolvimento de uma resposta imune Tipo 2 (Yazdanbaksh et al., 2002; Araújo et al., 2004). Esse mecanismo foi corroborado pelos modelos animais demonstrando que as respostas imunes alérgicas são suprimidas pelas infecções por helmintos e este evento esteve relacionado com o aumento da produção de IL-10 e a regulação dos linfócitos CD4⁺Foxp3⁺CD45⁺ (Pacífico et al., 2009).

Além disso, foi demonstrado previamente que células periféricas mononucleares (PBMC) de pacientes provenientes de áreas endêmicas, produzem baixos níveis de IL-5 e IL-4 quando expostos aos antígenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1) do que os indivíduos que não possuíam infecções helmínticas, resultando em baixos níveis de IgE anti-Der p1 (Fitzsimmons et al., 2004). Por outro lado, a exposição de antígenos dos vermes estimulados pela terapia com medicamentos anti-helmínticos, promove a produção das interleucinas IL-5 e IL-4 (Viana et al., 1995; Dutra et al., 2002; Greiger et al., 2004; Silveira-Lemos et al., 2013). Simultaneamente, a produção de IL-10 é suprimida, podendo levar à produção de IgE, incluindo a IgE específica anti-Der p1 (Evengard et al., 1988; Trujillo-Vargas et al., 2007).

Os estudos *in vitro* demonstraram que o Praziquantel pode alterar o tegumento do verme, liberando ou expondo antígenos internos do verme que podem também estimular a produção de IL-6, TNF- α e eotaxina culminando na mudança de isotipos por semanas e até meses (Kimani et al., 1991; Yazdanbakhsh et al., 2002; Joseph et al., 2004; Reimert et al., 2006; Keiser & Utzinger, 2008). Os dados encontrados nesse estudo demonstram que os níveis de reatividade de IgE anti- Der p 1 aumenta após o tratamento com drogas anti-helmínticas. Esse evento pode estar relacionado com diminuição de IL-10 resultando no aumento da produção de IL-4.

A eosinofilia após o tratamento da esquistossomose está relacionada diretamente com os níveis de IL-5, IL-6, IL-10, TNF- α e eotaxina. As alterações ocasionadas por esse perfil de citocinas acarreta mudanças nas classes e níveis de anticorpos podendo esse cenário perdurar por semanas (Evengard et al., 1988, Kimani et al., 1991, Joseph et al., 2004, Reimert et al., 2006) e meses seguintes ao tratamento (Fitzsimmons et al., 2004). Os dados obtidos sobre a porcentagem de eosinófilos na População 1 corroboram aos dos demais autores sendo que foi observado um aumento da porcentagem de eosinófilos nos indivíduos curados. A explicação para esse evento pode ser atribuída ao grau de infecção (ovos por grama de fezes).

Após o tratamento com drogas anti-helmínticas há inicialmente uma diminuição de eosinófilos nas primeiras vinte e quatro horas. Essa diminuição foi observada no tratamento para infecções não só causadas por *S. mansoni*, mas também pelas espécies *Wuchereria bancrofti* e *Onchocerca volvulus*. A destruição e posterior liberação de antígenos dos helmintos nos tecidos estimula a migração de eosinófilos da circulação sanguínea para os tecidos infectados (Kimani et al., 1991; Fitzsimmons et al., 2004.). Após as vinte e quatro horas iniciais observam-se níveis mais elevados de IL-5 precedendo a eosinofilia. Isso demonstra a importância da IL-5 na produção, maturação e liberação dos eosinófilos da medula óssea. A produção dessa citocina é dependente da intensidade de liberação de antígenos após o tratamento. Desta forma, em indivíduos com uma carga parasitária menor (População 2) há uma menor liberação de antígenos, conseqüentemente menor produção de IL-5 por células do sistema imune e assim menor estímulo para a proliferação de eosinófilos (Reimert et al., 2006).

A respeito dos geohelmintos, têm sido demonstrado que o tratamento com Albendazol está fortemente associado ao chiado recorrente (Reimert et al., 2006). Além disso, foi observado que o tratamento com Albendazol durante a gravidez aumentam o eczema infantil (Mpairwe et al., 2011), bem como a produção de IgE anti-Der p1 (Acevedo et al., 2011; Cooper et al., 2008). Nesse estudo observou-se que a resposta pós-tratamento dos indivíduos com alta intensidade de infecção por geohelmintos também possuíam altos níveis de IgE anti-Der p1. Porém, o oposto foi observado na população de indivíduos com baixa intensidade de infecção.

Rujeni et al (2012), observaram correlação negativa entre os níveis de IgE anti- Der p1 e a intensidade de infecção por *S. mansoni* em áreas de alta transmissão. Os autores não observaram relação entre essas duas variáveis em áreas de baixa transmissão. O presente estudo demonstrou que indivíduos co-infectados possuíam maiores níveis de IgE anti-Der p1 após o tratamento do que os outros grupos de indivíduos avaliados. Embora o aumento do índice de IgE anti-Der p1 de indivíduos co- infectados/curados tenha sido observado, não foi evidenciada uma relação entre a intensidade de infecção com os níveis de IgE anti-Der p1. Esse evento pode ser explicado pela liberação de antígenos de diferentes espécies de helmintos após o tratamento em indivíduos co-infectados aumentando a produção de IgE, provavelmente pela estimulação da produção de IL-4 (Anthony et al., 2007).

Estudos epidemiológicos demonstraram uma relação positiva entre infecções causadas por *A. lumbricoides* e fenótipos alérgicos incluindo sensibilização por antígenos de ácaros (Dold et al., 1998; Hagel et al., 2007; Alcântara-Neves et al., 2010). Os anticorpos IgE específicos persistem por muito tempo no organismo, permitindo a identificação de contatos prévios com as espécies do gênero *Ascaris*, mesmo em adolescentes e adultos negativos nos exames de fezes (Caraballo & Acevedo, 2011). Além disso, as populações de áreas endêmicas estão em constante contato com os antígenos helmínticos e estes em pequenas doses estão associados ao aumento da IgE total e específica (Dold et al., 1988).

As infecções por geohelmintos são determinantes importantes para a produção de IgE policlonal e os tratamentos anti-helmínticos são capazes de reduzir os níveis de IgE num período de 12 meses mas, independente do

tratamento, infecções ativas ou crônicas e a exposição contínua aos antígenos de *A. lumbricoides* são fatores consideráveis para a elevação de IgE após o tratamento (Cooper et al., 2008).

No Brasil diversos estudos demonstraram a relação entre a reatividade de IgE anti-*Ascaris* e desenvolvimento de atopia e doenças alérgicas. Pacientes com alergia respiratória e com altos níveis de IgE total no soro, os quais já apresentaram ou apresentam infecções parasitárias, também possuíam altos níveis de IgE anti-*Ascaris* (Sarinho et al., 2010). Alcântara-Neves et al (2010) observaram que o chiado, sintoma clínico para a asma, estava associado com infecções na primeira infância e mostraram que a presença de anticorpos contra *A. lumbricoides* e não a infecção ativa causada por esses parasitas estava associada ao chiado e a atopia. A relação direta entre os níveis de anticorpos anti-*Ascaris* e anti-Der p1 pode ser explicada pela reatividade cruzada entre os ácaros de poeira doméstica e os antígenos dos helmintos em especial do *A. lumbricoides*.

Diante dessa complexidade imunológica existe uma proposição de que as infecções helmínticas servem como uma exposição primária e desta forma, estimulam a sensibilização em indivíduos geneticamente predispostos a atopia. No entanto, os helmintos também podem conferir proteção contra a atopia uma vez que as infecções crônicas fazem com que haja uma exposição repetitiva dos antígenos e assim permitirem uma sensibilização branda do indivíduo podendo levar a uma tolerância semelhante à observada na imunoterapia a alérgenos. Além disso, as doenças alérgicas podem ser um fator de risco para os indivíduos infectados por helmintos porque quando a IgE é muito elevada devido a reação cruzada dos antígenos podendo levar a um aumento da carga parasitária nos pacientes. E finalmente, elevados níveis de IgE nas doenças alérgicas podem conferir proteção quando ela leva a expulsão imediata do parasita (Valmonte et al., 2012).

Uma pequena proporção de indivíduos atópicos desenvolve os sintomas clínicos da alergia. A manifestação clínica dos sintomas alérgicos em indivíduos atópicos é influenciada por fatores ambientais como poluição do ar, dieta e exposição aos patógenos, levando a uma distribuição heterogênea das doenças atópicas mundialmente (Rujeni et al., 2012). A relação entre doenças alérgicas e o contato com animais é dúbia. Na década de 90, os estudos demonstravam que o

contato com animais era um fator para a ocorrência de asma em crianças acima de 6 anos de idade. Outros estudos demonstraram que o contato com gatos, cachorros e roedores é um fator protetor para asma (Carlen et al., 2012). Mungan et al (2003) mostraram que os indivíduos que possuíam animais em casa eram muito mais reativos ao teste de hipersensibilização cutânea que aqueles que tinham animais na infância ou que não possuíam nenhum animal.

É importante ressaltar que a interpretação dos dados deve ser feita com cautela, considerando as particularidades do desenvolvimento experimental e coletas de dados do presente estudo. Na verdade, a coleta das amostras na população 1 foi realizada dois anos após o tratamento, enquanto que na população 2 isto foi feito três anos após o tratamento. Além disso, a coleta das amostras pós-tratamento foram feitas anos e não semanas após o tratamento e dessa forma os níveis de infecção não refletiriam a eficácia do tratamento, mas sim diferentes taxas de reinfecção nessas duas áreas com diferentes taxas de transmissão. Além disso, os questionários foram feitos sete e dois anos após o início do estudo nas populações 1 e 2, respectivamente.


8 CONCLUSÃO

A determinação de quando e como as infecções helmínticas conferem proteção ou são risco para as doenças alérgicas e o efeito do tratamento anti-helmíntico nas respostas alérgicas ainda merece ser discutida. Embora nesse estudo tenha-se encontrado associação entre intensidade de infecção helmíntica e o fatores de risco para alergia, foi demonstrado que o tratamento efetivo com drogas anti-helmínticas dos indivíduos de áreas endêmicas com alta prevalência de infecção aumenta os níveis de IgE anti-Der p1, que é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas.

Nessa mesma linha, altos níveis de IgE específica para o geohelminto *Ascaris lumbricoides*, também é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas já que há uma associação entre o aumento da IgE anti-*Ascaris* e IgE anti-Der p1.

9 ANEXOS

9.1 Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa- COEP/ UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

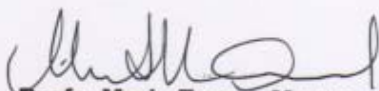
Parecer nº. ETIC 268/08

Interessado(a): **Profa. Andréa Gazzinelli Corrêa de Oliveira**
Depto. Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública
Escola de Enfermagem - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de julho de 2008, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Relação entre infecção pelo Schistosoma mansoni e doenças alérgicas em população residente em área rural endêmica"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Av. Pres. Antonio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar – Sala 2005 – Cep: 31270-901 – BH-MG
Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@ppq.ufmg.br

9.2 Anexo B - Questionário ISAAC adaptado

QUESTIONÁRIO 01: ASMA	
1. Alguma vez na vida você (ou a criança) teve sibilos (chiado no peito)?	(1) Sim (0) Não
SE A RESPOSTA FOI NÃO, PASSE PARA A QUESTÃO 06 OBS: Ao ir para a resposta de número 6, todas as questões anteriores aparecerão em branco	
2. Nos últimos doze meses você (ou a criança) teve sibilos (chiado no peito)?	(1) Sim (0) Não
SE A RESPOSTA FOI NÃO, PASSE PARA A QUESTÃO 06 OBS: Ao ir para a resposta de número 6, todas as questões anteriores aparecerão em branco	
3. Nos últimos doze meses quantas crises de sibilo (chiado no peito) você (ou a criança) teve?	(0) Nenhuma crise (1) 1 a 3 crises (2) 4 a 12 crises (3) Mais de 12 crises
4. Nos últimos doze meses com que frequência você (ou a criança) teve o seu sono perturbado por chiado no peito?	(0) Nunca acordou com chiado (1) Menos de 01 noite por semana (2) Uma ou mais noites por semana
5. Nos últimos doze meses, seu chiado (ou da criança) foi tão forte a ponto de impedir que você (ou a criança) conseguisse dizer mais de duas palavras entre cada respiração?	(1) Sim (0) Não
6. Alguma vez na vida você (ou a criança) já teve asma ou bronquite?	(1) Sim (0) Não
7. Nos últimos doze meses você (ou a criança) teve chiado no peito após exercícios físicos?	(1) Sim (0) Não
8. Nos últimos doze meses você (ou a criança) teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?	(1) Sim (0) Não

QUESTIONÁRIO 02: RINITE ALÉRGICA																									
Todas as perguntas referem-se problemas que ocorreram quando você (ou a criança) não estava gripado ou resfriado.																									
1. Alguma vez na vida você (ou a criança) teve problemas de espirros ou coriza (corrimento nasal) quando não estava resfriado ou gripado?	(1) Sim (0) Não																								
SE A RESPOSTA FOI NÃO, PASSE PARA A QUESTÃO 06 OBS: Ao ir para a resposta de número 6, todas as questões anteriores aparecerão em branco																									
2. Nos últimos doze meses você (ou a criança) teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal quando não estava gripado ou resfriado?	(1) Sim (0) Não																								
SE A RESPOSTA FOI NÃO, PASSE PARA A QUESTÃO 06 OBS: Ao ir para a resposta de número 6, todas as questões anteriores aparecerão em branco																									
3. Nos últimos doze meses, esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?	(1) Sim (0) Não																								
4. Em qual dos últimos doze meses esse problema nasal ocorreu?																									
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="padding-right: 20px;">Janeiro</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="padding-right: 20px;">Maio</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td style="padding-right: 20px;">Setembro</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Fevereiro</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>Junho</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>Outubro</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Março</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>Julho</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>Novembro</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Abril</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>Agosto</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>Dezembro</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		Janeiro	<input type="checkbox"/>	Maio	<input type="checkbox"/>	Setembro	<input type="checkbox"/>	Fevereiro	<input type="checkbox"/>	Junho	<input type="checkbox"/>	Outubro	<input type="checkbox"/>	Março	<input type="checkbox"/>	Julho	<input type="checkbox"/>	Novembro	<input type="checkbox"/>	Abril	<input type="checkbox"/>	Agosto	<input type="checkbox"/>	Dezembro	<input type="checkbox"/>
Janeiro	<input type="checkbox"/>	Maio	<input type="checkbox"/>	Setembro	<input type="checkbox"/>																				
Fevereiro	<input type="checkbox"/>	Junho	<input type="checkbox"/>	Outubro	<input type="checkbox"/>																				
Março	<input type="checkbox"/>	Julho	<input type="checkbox"/>	Novembro	<input type="checkbox"/>																				
Abril	<input type="checkbox"/>	Agosto	<input type="checkbox"/>	Dezembro	<input type="checkbox"/>																				
5. Nos últimos doze meses quantas vezes suas atividades diárias (ou da criança) foram atrapalhadas por esse problema nasal?	(0) Nenhuma (1) Um pouco (2) Moderado (3) Muito																								
6. Alguma vez na vida você (ou a criança) já teve rinite?	(1) Sim (0) Não																								

QUESTIONÁRIO 03: ECZEMA ATÓPICO	
1. Alguma vez na vida você (ou a criança) teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos seis meses?	(1) Sim (0) Não
SE A RESPOSTA FOI NÃO, PASSE PARA A QUESTÃO 06 OBS: Ao ir para a resposta de número 6, todas as questões anteriores aparecerão em branco	
2. Nos últimos 12 meses você (ou a criança) teve essas manchas na pele (eczema)?	(1) Sim (0) Não
SE A RESPOSTA FOI NÃO, PASSE PARA A QUESTÃO 06 OBS: Ao ir para a resposta de número 6, todas as questões anteriores aparecerão em branco	
3) Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?	(1) Sim (0) Não
4) Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) desapareceram completamente nos últimos 12 meses?	(1) Sim (0) Não
5) Nos últimos 12 meses, quantas vezes, aproximadamente, você (ou a criança) ficou acordado à noite por causa de coceira na pele?	(0) Nunca nos últimos 12 meses (1) Menos de 1 noite por semana (2) Uma ou mais noites por semana.
6) Alguma vez você teve eczema?	(1) Sim (0) Não
A sua mãe ou o seu pai já teve alguma dessas doenças:	
Pai	
Asma (0) Não (1) Sim (2) Não sabe	Rinite Alérgica (0) Não (1) Sim (2) Não sabe
Mãe	
(0) Não (1) Sim (2) Não sabe	(0) Não (1) Sim (2) Não sabe
Você já teve alguma dessas doenças na infância?	
Sarampo: (0) Não (1) Sim (2) Não sabe	Coqueluche: (0) Não (1) Sim (2) Não sabe
Tuberculose: (0) Não (1) Sim (2) Não sabe	Catapora: (0) Não (1) Sim (2) Não sabe
Pneumonia: (0) Não (1) Sim (2) Não sabe	Verminose: (0) Não (1) Sim (2) Não sabe

9.3 Anexo C - Questionário fatores de risco

1. Você dividiu quarto com alguém durante a infância?	(0) Não (1) Sim (2) Não sabe
2. ATUALMENTE, você tem animais de estimação?	(0) Não (1) Sim
3. Se SIM, estes animais ficam no interior da casa?	(0) Não (1) Sim (99) NA
4. Se SIM, quais destes?	<input type="checkbox"/> Cães <input type="checkbox"/> Gatos <input type="checkbox"/> Pássaros <input type="checkbox"/> Galinhas Outros:
5. Durante a INFÂNCIA, você teve contato pelo menos uma vez por semana c/ algum desses animais FORA DA CASA?	(<input type="checkbox"/> Cães <input type="checkbox"/> Gatos <input type="checkbox"/> Cavalos <input type="checkbox"/> Cabras <input type="checkbox"/> Gado <input type="checkbox"/> Porco <input type="checkbox"/> Galinhas Outros:
6. Você tem feito uso de cigarro atualmente?	(0) Não (1) Sim
7. Se Sim, quantos cigarros por dia?	(1) Menos de 10 cigarros (2) De 10-20 cigarros (3) Mais de 20 cigarros (99) Não se aplica
8. Se Sim, com quantos anos você começou a fumar?	anos
9. Você já fumou alguma vez na vida?	(0) Não (1) Sim (99) NA
10. Se Sim, quantos anos você tinha quando começou a fumar?	anos
11. Se Sim, quantos anos você tinha quando parou de fumar?	anos
12. Alguma outra pessoa que reside na sua casa fuma?	(0) Não (1) Sim
13. Quantos cigarros/dia são fumados por todos que moram na sua casa?	(1) Menos de 10 cigarros (2) De 10-20 cigarros (3) Mais de 20 cigarros (99) Não se aplica

9.4 Anexo D - Tabela dos fatores de risco.

Fatores de risco para a atopia da população 2- Questionário ano base 2008

Variável	Atópico	Não Atópico	OR (95% CI)	P
Pai asmático				
Sim	0	7	0,00	0,999
Não	12	191	-	
Pai com rinite				
Sim	0	10	0,00	0,999
Não	12	184	-	
Mãe asmática				
Sim	0	17	0,00	0,999
Não	12	188	-	
Mãe com rinite				
Sim	0	20	0,00	0,999
Não	10	179	-	
Mãe com eczema				
Sim	0	5	0,00	0,999
Não	9	185	-	
Infecções na infância				
Sarampo				
Sim	9	140	0,83	0,773
Não	4	52	(0,24; 2,81)	
Coqueluche				
Sim	3	83	1,79	0,408
Não	7	108	(0,14; 2,23)	
Pneumonia				
Sim	0	29	0,00	0,998
Não	13	183	-	
Catapora				
Sim	10	169	2,13	0,478
Não	1	36	(0,27; 17,11)	
Verminose				
Sim	10	176	0,68	0,634
Não	2	24	(0,14; 3,29)	
Dividiu o quarto com alguém na infância				
Sim	12	191	0,72	0,683
Não	2	23	(0,15; 3,45)	
Contato com animais na infância				
Animais no interior da casa na infância				
Sim	12	176	1,33	0,716
Não	2	39	(0,28; 6,22)	
Cachorro				
Sim	10	145	1,06	0,934
Não	2	31	(0,23; 5,07)	
Gato				
Sim	7	125	0,57	0,358
Não	5	51	(0,17; 1,88)	

Contato com animais atualmente				
Animais de estimação atualmente				
Sim	13	170	3,45	0,240
Não	1	45	(0,48; 27,11)	
Cachorro				
Sim	8	91	0,58	0,368
Não	5	33	(0,18; 1,91)	
Gato				
Sim	7	54	1,52	0,480
Não	6	70	(0,48; 4,78)	
Galinha				
Sim	4	35	1,14	0,847
Não	9	89	(0,34; 3,95)	
Pássaro				
Sim	2	29	0,60	0,516
Não	11	95	(0,12; 2,84)	
Contato com animais fora de casa na infância				
Cachorro				
Sim	8	125	0,96	0,942
Não	6	90	(0,32; 2,88)	
Gato				
Sim	5	102	0,62	0,398
Não	9	113	(0,20; 1,91)	
Cavalo				
Sim	9	118	1,47	0,495
Não	5	97	(0,48; 4,50)	
Cabra				
Sim	1	13	1,19	0,868
Não	13	202	(0,14; 9,78)	
Gado				
Sim	6	90	1,04	0,942
Não	8	125	(0,35; 3,10)	
Porco				
Sim	9	125	1,30	0,652
Não	5	90	(0,42; 4,01)	
Galinha				
Sim	8	138	0,75	0,596
Não	6	77	(0,25; 2,24)	
Tabagismo				
Quantidade de cigarros por dia				
< 10	2	25	0,44	0,440
>10	2	11	(0,05; 3,55)	
Outros fumantes na casa				
Sim	8	45	5,00	0,004
Não	6	170	(1,75; 15,00)	
Cigarros fumados no total na casa				
<10	7	52	1,54	0,603
>10	2	23	(0,28; 7,93)	

Fatores de risco para a atopia da população 1- Questionário ano base 2011

Variável	Atópicos	Não atópicos	OR (95% CI)	P
Pai asmático				
Sim	4	14	1,61	0,425
Não	25	142	(0,49; 5,25)	
Pai com rinite				
Sim	0	15	0,00	0,998
Não	27	134	*	
Pai com eczema				
Sim	0	2	0,00	0,999
Não	27	145	*	
Mãe asmática				
Sim	3	13	1,18	0,808
Não	30	153	(0,32; 4,37)	
Mãe com rinite				
Sim	6	25	1,14	0,805
Não	28	132	(0,43; 3,03)	
Mãe com eczema				
Sim	0	2	0,00	0,999
Não	33	154	*	
Infecções na infância				
Sarampo				
Sim	11	91	0,48	0,066
Não	21	83	(0,22; 1,05)	
Coqueluche				
Sim	5	37	0,65	0,410
Não	28	135	(0,23; 1,82)	
Pneumonia				
Sim	9	16	3,57	0,006
Não	26	168	(1,40; 8,80)	
Catapora				
Sim	29	151	1,11 (0,40;	0,837
Não	5	29	3,10)	
Vermínose				
Sim	34	178	0,95	0,954
Não	2	10	(0,20; 4,53)	
Dividiu o quarto com alguém na infância				
Sim	28	134	1,10	0,874
Não	4	21	(0,35; 3,45)	
Contato com animais na infância				
Animais no interior da casa na infância				
Sim	28	129	1,47	0,506
Não	4	27	(0,48; 4,56)	
Cachorro				
Sim	26	128	0,95	0,915
Não	6	28	(0,36; 2,54)	
Gato				
Sim	18	81	1,19	0,655
Não	14	75	(0,55; 2,57)	

Contato com animais atualmente

Animais de estimação atualmente				
Sim	25	125	0,88	0,797
Não	7	31	(0,35; 2,23)	
Cachorro				
Sim	21	69	2,38	0,030
Não	11	87	(1,08; 5,21)	
Gato				
Sim	10	58	0,77	0,526
Não	22	98	(0,34; 1,74)	
Galinha				
Sim	9	41	1,10	0,830
Não	23	115	(0,47; 2,57)	
Pássaro				
Sim	1	5	0,97	0,981
Não	31	151	(0,11; 8,57)	

Contato com animais fora de casa na infância

Cachorro				
Sim	24	112	1,18 (0,48; 2,81)	0,712
Não	8	44		
Gato				
Sim	12	69	0,76 (0,34; 1,66)	0,485
Não	20	87		
Cavalo				
Sim	7	44	0,71 (0,29; 1,78)	0,465
Não	25	112		
Cabra			*	*
Sim	0	0		
Não	32	156		
Gado				
Sim	4	25	0,75 (0,24; 2,31)	0,616
Não	28	131		
Porco				
Sim	6	43	0,61 (0,23; 1,57)	0,304
Não	26	113		
Galinha				
Sim	13	99	0,39	0,019
Não	19	57	(0,18; 0,86)	

Tabagismo

Quantidade de cigarros por dia				
< 10	3	15	0,95	0,951
>10	4	19	(0,18; 4,93)	
Outros fumantes na casa				
Sim	14	48	1,75	0,158
Não	18	108	(0,80; 3,82)	
Cigarros fumados no total na casa				
< 10	2	9	0,74	0,713
>10	16	53	(0,15; 3,75)	



Effective anthelmintic therapy of residents living in endemic area of high prevalence for hookworm and *Schistosoma mansoni* infections enhances the levels of allergy risk factor anti-Der p1 IgE

Sabrina S. Campolina^{a,*}, Marcio S.S. Araujo^b, Tércia M.R.L. Rezende^c, Leonardo Matoso^a, Humberto F.O. Quites^c, Andréa Teixeira-Carvalho^b, Olindo A. Martins-Filho^b, Andrea Gazzinelli^{c,d}, Rodrigo Correa-Oliveira^{a,d}

^aLaboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^bLaboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^cFaculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^dInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais—INCT-DT, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

article info

Article history:

Received 22 September 2013

Received in revised form 19 November 2013

Accepted 20 November 2013

Keywords:

Schistosomiasis
Allergic disorders
Anti-Der p1 IgE
Allergy risk factors

abstract

In this work were investigated the relationship between hookworm/*Schistosoma mansoni* infections and allergy related risk factors in two endemic areas with distinct prevalence of infections and co-infection. The intensity of infections, eosinophilia, allergy risk factors, infection status and anti-Der p1 IgE levels before and 2 years (population 1) and 3 years (population 2) after anthelmintic treatment, were evaluated. It was observed that the population with lower prevalence and intensity of infection (population 2) had lower eosinophils counts ($>600/\text{mm}^3$) and higher animal contact than the population with higher parasites intensity (population 1). After anthelmintic treatment the intensity of *S. mansoni* single infection decreased, but no changes were observed in hookworm and co-infected individuals. The anthelmintic treatment also enhanced anti-Der p1 IgE optical density in ELISA on the subgroups that became negative for helminth infection regardless of their previous infection condition in population 1. Facing that, we evaluated the anti-Der p1 IgE reactivity index, and the ratio (after/before treatment) was significantly higher in patients co-infected before treatment. On the other hand, no association between anti-Der p1 IgE reactivity index and the intensity of infections were observed. In conclusion, effective anthelmintic therapy of subjects from endemic areas with high prevalence of hookworm and *S. mansoni* infections enhances anti-Der p1 IgE levels.

© 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The relationship between environmental factors and allergic disorders was first published by Strachan [1]. The author proposed the Hygiene Hypothesis, attributing the progressive growth of numbers of allergic individuals in the last decades to the reduction of infectious agents exposure during childhood. Immunologically, infections can modify the immune responses and consequently inhibit an exacerbated inflammatory condition. This phenomenon can be explained by the perturbation of the immune responses caused mostly by pathogens in which helminths play an important role [2,3]. The effects of helminth infections upon the immune responses to other health

conditions are an area of great interest, mainly because helminth infections are able to induce immune regulation through stimulation of regulatory T cells and IL-10 production [4,5]. Previous studies [6,7] have shown that *Schistosoma mansoni* infection induces IL-10 production which leads to a decrease in allergic symptoms.

In this context, additional studies of the effect of helminth infections on allergic disorders are needed to better determine whether these infections reduce allergic symptoms and if this is dependent on the exposure conditions and sensitization. Moreover, it is important to determine whether treatment of individuals from endemic areas with anthelmintic drugs increase allergic occurrence. Under this scope, our study aimed to investigate the relationship between prevalence and intensity of *S. mansoni* (SCH) and hookworm (HW) infection and IgE responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen (Der p1) before and after treatment as well as risk factors to allergy such as eosinophil count, allergy episodes, animal contact and smoking in two populations of medium and high *S. mansoni* transmission.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

* Corresponding author. Tel.: +55 3133497860.

E-mail address: campolina@cpqrr.fiocruz.br (S.S. Campolina).

2211-2839/\$ - see front matter © 2013 The Authors. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rinim.2013.11.001>

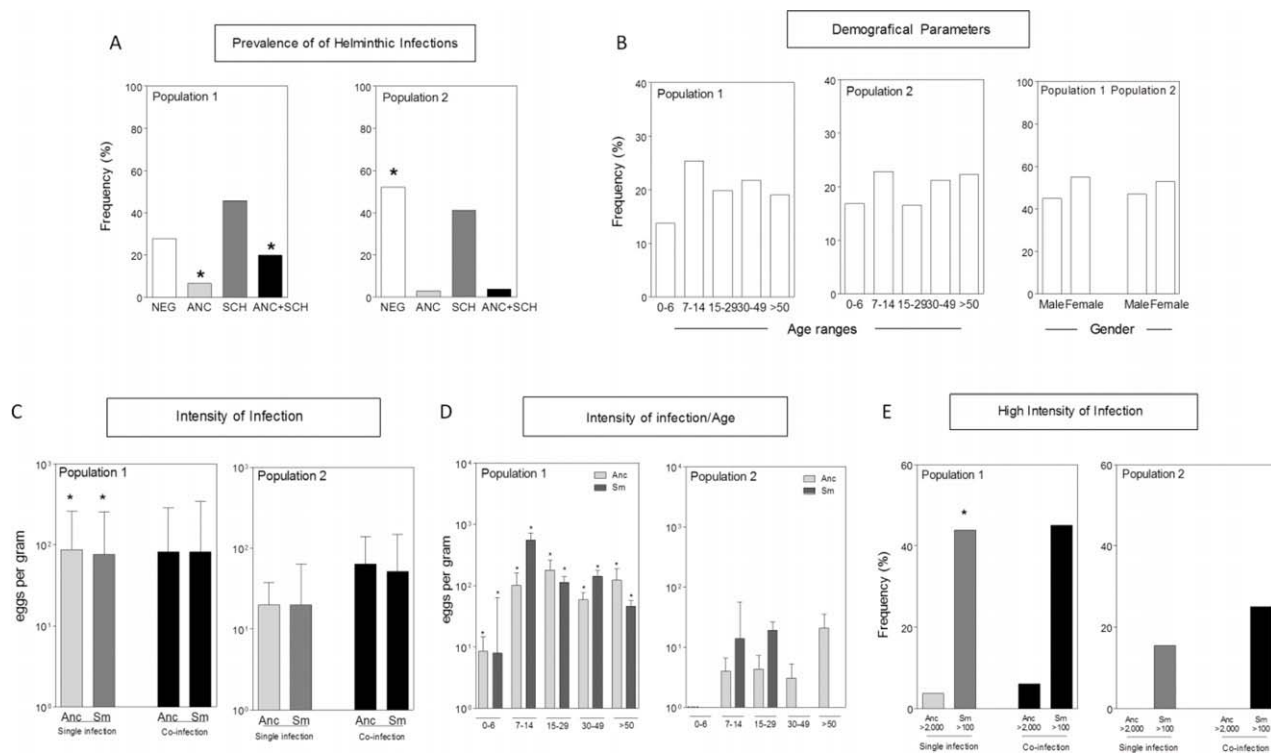


Fig. 1. Prevalence of helminthic infections, demographical parameters and intensity of infection related to age and parasite burden in two municipalities of Minas Gerais state Brazil. The infected individuals were identified by Kato-Katz examinations against hookworm and *S. mansoni* and the prevalence was estimated in populations 1 and 2 following the exams results: negative in the kato-Katz test (NEG/white bar), positive for hookworm in the kato-Katz test (HW/light grey bar), positive for *S. mansoni* (SCH/dark grey bar) in the Kato-Katz test and positive for co-infection with hookworm and *S. mansoni* (HW + SCH/black bar) (A). The frequency of gender and age were also evaluated (B). The intensity of infection was expressed as egg per grams in hookworm (Anc) and *S. mansoni* (Sm) infections (C). Its distributions among different age ranges (D) and the frequency of highly infected individuals was determined by ≥ 2000 epG for hookworm (Anc) and ≥ 400 epG for *S. mansoni* (Sm) (E). The median of each population 1 group was compared with their respective on the population 2. The error bars represent the interquartile range. Statistical analyses were performed by Fisher's exact and Mann-Whitney tests. In both cases significance were considered at $p < 0.05$ and highlighted by *.

2. Population, material and methods

2.1. Study area and population

The study was carried out in Caju (Population-1) with 413 individuals and São Pedro do Jequitinhonha (Population-2) with 314 individuals, 20 km distant from each other and both in the Municipality of Jequitinhonha. These are poor rural endemic areas for *S. mansoni* and hookworm infections. The population in Caju is of 632 inhabitants that live by subsistence agriculture. São Pedro do Jequitinhonha, whose population is 2265 inhabitants, has similar economic condition but is closer to a larger non-rural community and is bordered by Jequitinhonha river. This region is characterized by poor sanitation and social economic conditions and the residents are constantly exposed to the risk of helminth infections [8]. The entire population was screened for infection and due to the fact that prevalence of infection was above 50%, all inhabitants were treated. Follow up treatment was performed at 1 month post-therapy and yearly for a period of 5 years. Informed consent was obtained for all volunteers, including children. For adolescents, consent was obtained from the volunteer and from its parents. The samples used were from two distinct collection times in each locality: before treatment (2004/Caju and 2007/São Pedro do Jequitinhonha) and after treatment (2006/Caju and 2010/São Pedro do Jequitinhonha). All participants were registered and assigned unique household identification (HHID) and personal identification numbers (PID). This study was approved by the National Committee of Ethics in Research of Brazil (CONEP/268/08).

2.2. Parasitological survey and eosinophils count

Parasitological survey was conducted using the Kato-Katz test. All individuals living in the studied villages received three containers with identification numbers for stool sample collection. The recipients were collected on three consecutive days. On the day of sample collection, all volunteers were submitted to a questionnaire to collect additional information on socio-economic status and activities as previously described by our group [8]. For parasite egg detection and quantification, two slides were prepared for each sample, totaling six slides per participant.

Parasite burdens, as determined by eggs per gram of feces (epg), were calculated from the media of absolute egg number multiplied by 24 and divided by the number of slides (6). The *S. mansoni* infected adults were treated with a single dose of Praziquantel (50–60 mg/kg) while children were treated single dose of Oxaminiquine (20 mg/kg). Hookworm infected individuals were treated by single dose of Albendazole (400 mg). All treatments were given under medical supervision and according to Brazilian Ministry of Health regulations.

The complete blood count (CBC) was performed using the automated hematology system Advia 60 (Bayer Health Care, USA). Eosinophilia was defined as eosinophils count over $600/\text{mm}^3$.

2.3. Serum samples and ELISA

Serum was obtained by collection of blood in vacutainer tubes and one additional tube containing EDTA was collected for hematological analysis (Vacutainer, BD, EUA). Tubes were refrigerated and sent to the Laboratório de Imunologia Celular e Molecular from Centro

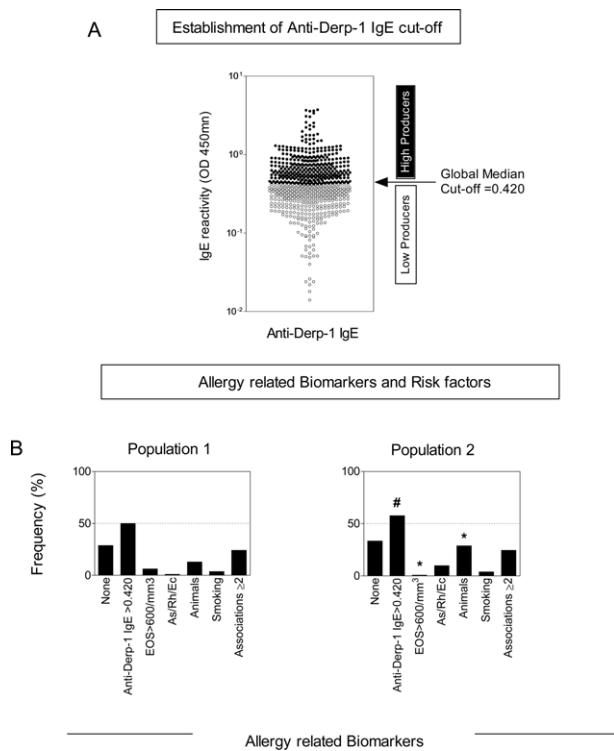


Fig. 2. Analyses of allergy related biomarkers and risk factors in two endemic areas for helminthic infection in Minas Gerais, Brazil. The global median value of to anti-Derp 1 IgE reactivity was used as the cut-off to segregate “Low” and “High producers”. The anti-Derp 1 values correspond to the absorbance before treatment (A). Five allergy related biomarkers and risk factors, including anti-Derp 1, peripheral blood eosinophil count (EOS $>600/\text{mm}^3$), Asthma, Rhinitis and Eczema previous episodes (As/Rh/Ec), animals contact and smoking addiction were used to assess the likelihood of allergic disease, according to ISAAC questionnaire. Individuals presenting more than one allergy risk factor were also related (Association ≥ 2). Each parameter of the population 1 was compared with the equivalent in population 2 (B). Statistical analyses were performed by Fisher’s exact and Mann–Whitney tests. In both cases significance were considered at $p < 0.05$ and highlighted by *. Although there was not an statistical significance on the frequency of higher anti-Derp 1 producers, it was slightly higher on population 2 (#).

de Pesquisas René Rachou, where samples were aliquoted in microtubes and stored at -70°C until use. Serum IgE reactivity against *D. pteronyssinus* crude extract (Derp1, LG 5449, Cosmo Bio Co. Ltd., Japan) antigen was tested using an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Briefly, each well was coated with $100\ \mu\text{L}$ of mite Derp1 antigen at the final concentration of $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ in phosphate buffer saline pH 7.2 (PBS $1\times$). The ELISA plates were incubated for 16 h at 4°C , washed twice with PBS Tween 20 (Biorad, USA) 0.05% and blocked with $200\ \mu\text{L}$ of PBS with 3% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at 37°C . The serum samples were diluted 1:50 in PBS $1\times$ with BSA at 3% and were added to the wells and incubated for 2 h at 37°C . The plates were washed five times and incubated for 1 h at 37°C , washed five times again and incubated with $100\ \mu\text{L}$ of peroxidase labeled monoclonal antibody anti-human IgE (KPL, USA) for 1 h at 37°C . The assays were developed by addition of the substrate (H_2O_2 , Sigma-Aldrich Co., USA) and the chromogen (O-phenylenediamine, Sigma-Aldrich Co., USA). The optical density was determined using an automatic ELISA microplate reader at 492 nm (SpectrMax 340 PC reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) running Softmax Pro software (Molecular Devices). A serum pool obtained from urban area subjects and free of parasitic infection was used as a control sample.

2.4. Questionnaire used to obtain information about respiratory disease

The interviews were held at the subjects’ homes in 2011 (Caju) and 2008 (São Pedro de Jequitinhonha). Children under 13 years old had the questionnaire answered by their tutors. Data were collected by a portable computer PDA—*Personal Digital Assistant*—Dell-Axim X 50 (Dell Inc., Texas, EUA). The frequency of allergic disorders was estimated by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood questionnaire. This questionnaire was created to develop an epidemiological study of asthma and allergy distributions worldwide and is divided in three phases with questions of behavioral and environmental aspects. Questions of the first phase, related to previous symptoms and confirming diagnosis of allergic disease, were used to estimate allergic disorders distribution on these two localities. Furthermore, secondary questions were asked to characterize the occurrence of risk factors such as contact with animals and smoking habit.

2.5. Statistical analysis

For statistical analysis were used Microsoft Excel 2010 SP1 (Microsoft Corporation, Washington, EUA) and Graph Pad Prism 5.0.3 (San Diego, CA, EUA). Chi-square, Mann–Whitney and Tukey’s post-tests were used for multiple comparisons tests to investigate differences between frequencies. In all cases, differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Theory

Long-term anthelmintic treatment can modify the allergen specific immune response in *S. mansoni* and hookworm infected individuals.

4. Results

4.1. Prevalence of hookworm and *S. mansoni* infections pre- and post-treatment

Our data demonstrated that the prevalence of HW infection as well as HW + SCH co-infection were higher in population 1 when compared to population 2 (Fig. 1A). No significant differences were observed on the age ranges as well as gender distribution between the two localities (Fig. 1B). Population 1 also had higher intensity of infection (Fig. 1C) in all age ranges as compared to population 2 (Fig. 1D). Moreover, population 1 also presented greater frequency of individuals displaying high intensity *S. mansoni* infection ($\text{Sm} > 100\ \text{epg}$) (Fig. 1E).

4.2. Analysis of anti-Derp 1 antibody responses of individuals living in endemic areas with distinct prevalences for Hookworm and *S. mansoni* infections

To determine the effectiveness of the ELISA technique to measure the serum levels of Anti-Derp 1 IgE, we first established the optical density cut-off point of the assay. To determine this point, the median of anti-Derp 1 IgE optical density values from both populations together before treatment was evaluated in order to separate the individuals into “Low and High anti-Derp 1 IgE producers” (Fig. 2A). The cut-off used to evaluate the data of reading on O.D. of 0.420.

Although population 2 showed a lower frequency of individuals with eosinophilia (EOS $>600/\text{mm}^3$), it had increased the frequency of individuals reporting animal contact, and $>50\%$ of “High anti-Derp 1 IgE producers” (Fig. 2B).

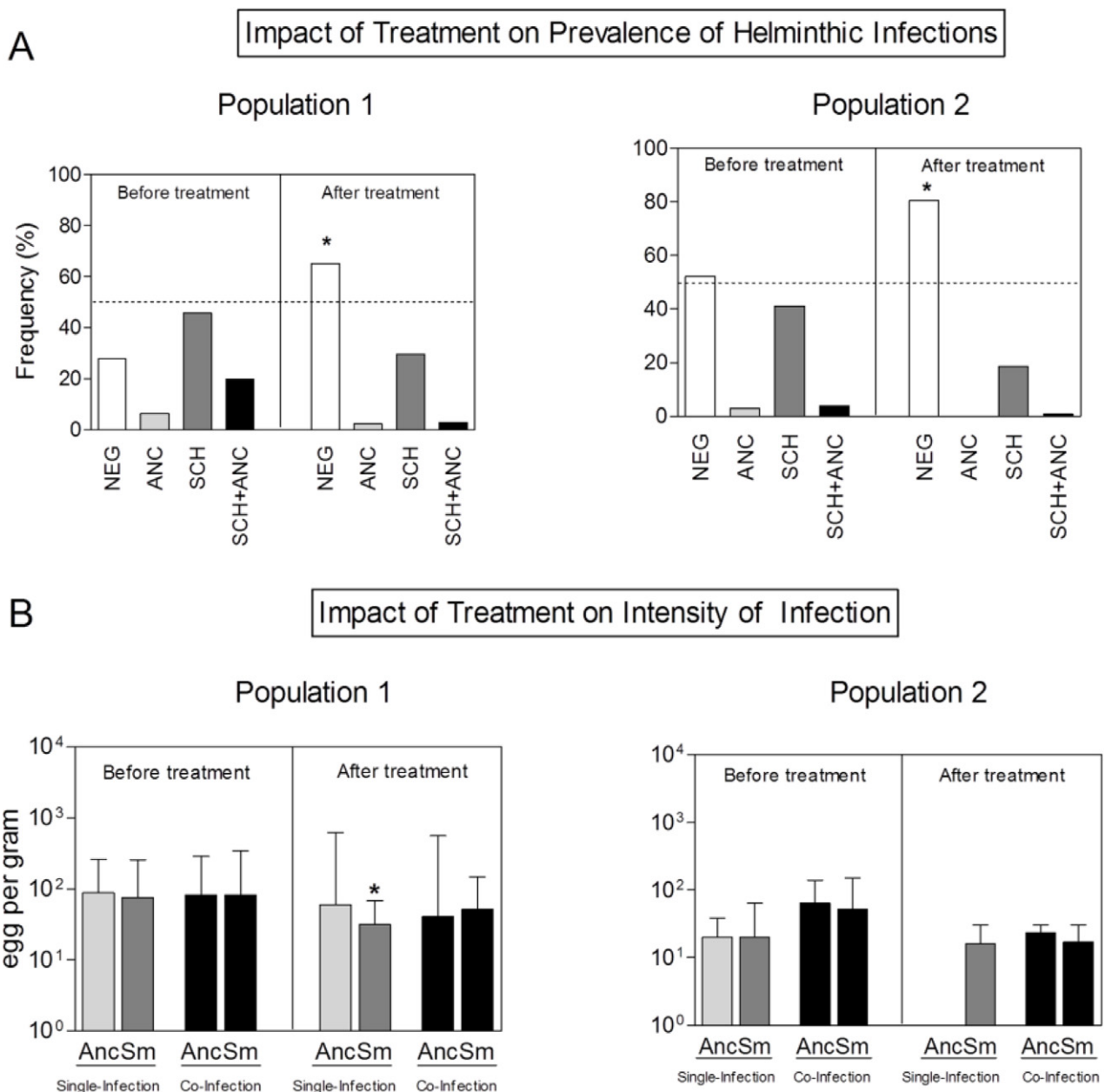


Fig. 3. Impact of treatment on prevalence and intensity of infection in two endemic areas for helminthic infection in Minas Gerais, Brazil. The prevalence of infection before and after treatment was determined for each one of these conditions: individuals with negative kato-Katz test (NEG) were represented by white bar; hookworm positive individuals on the kato-Katz test (HW) were represented by light grey bar; positive individuals for *S. mansoni* on the Kato-Katz test (SCH) were represented by dark grey bar and co-infected individuals determined by the Kato-Katz test (HW + SCH) were represented by black bar (A). The intensity of hookworm (Anc) and *S. mansoni* (Sm) infections was also evaluated before and 2 years after treatment and the absolute number obtained on the Kato-Katz test was also used. The medians of each group of the populations were compared before and after treatment with their respective groups. The error bars represent the interquartile range. Statistical analyses were performed by Fisher's exact and Mann-Whitney tests. In both cases significance were considered at $p < 0.05$ and highlighted by *.

4.3. Effect of treatment on the frequency on High anti-Der p1 IgE responder

Although the albendazole/praziquantel combined treatment was unable to completely eradicate the helminthic infections in both studied populations, the frequency of negative (NEG) individuals in these localities increased (Fig. 3A). It is interesting to note that combined anthelmintic therapy reduced the intensity of *S. mansoni* (SCH) infection in single infected patients in the population 1. However, it did not reduce the intensity of infection in those individuals that remained HW infected or HW + SCH co-infected after treatment (Fig. 3B). No significant differences in the intensity of infection were observed in

the population 2 (Fig. 3B).

With the objective of identifying the effect of albendazole/praziquantel anthelmintic therapy on the levels of anti-Der p1 IgE antibody response, we categorized the studied populations into two subgroups, referred to as "TREATED-NEG" and "TREATED-POS" since these individuals cleared the infection or remained infected (or re-infected) 2 years after treatment. The re-infected and infected participants were treated again until the infection clearance. The posterior data about repeated treatments were not used in this study.

Our data demonstrated that the frequency of "High anti-Der p1 IgE producers" increased selectively in the TREATED-NEG subgroup

Impact of treatment on Anti-Derp-1 IgE

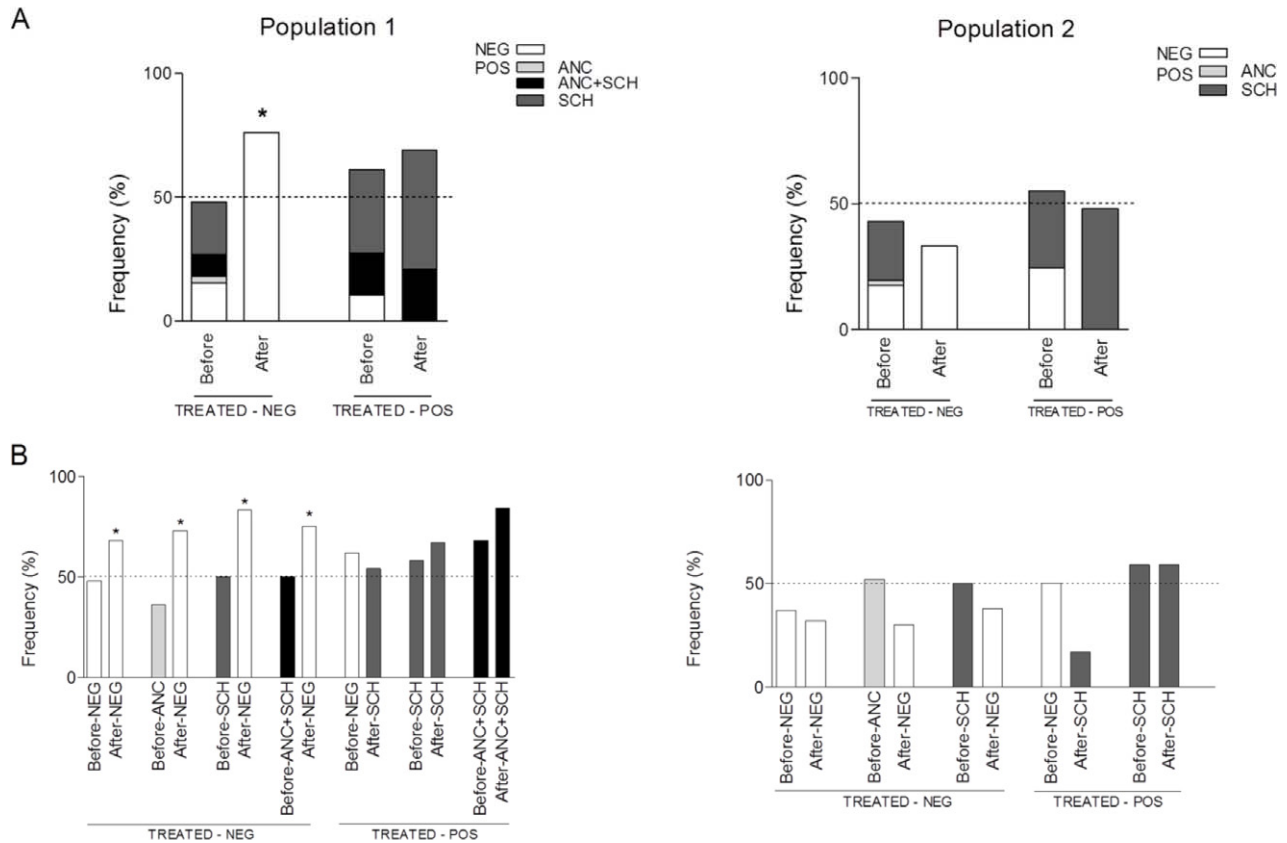


Fig. 4. Impact of treatment on anti-Derp-1 IgE in two endemic areas for helminthic infection in Minas Gerais, Brazil. The frequency of “High anti-Derp-1 IgE producers” and the status before and after treatment (NEG/white; HW/light grey; SCH/dark grey and HW + SCH/black) were considered for population 1(A) and population 2 (B). Statistical analyses were performed by Fisher’s exact and Mann–Whitney tests. Each group of the populations was compared before and after treatment with their respective groups. In both cases significance was considered at $p < 0.05$ and highlighted by *.

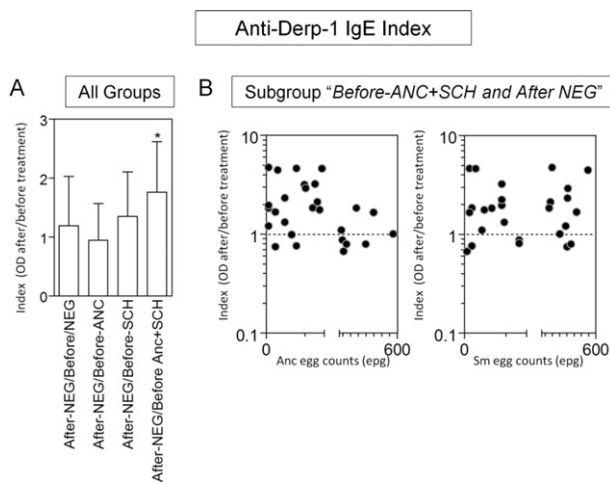


Fig. 5. Anti-Derp-1 IgE Index. The index of anti-Derp-1 IgE was defined as ratio of anti-Derp-1 IgE optical density value before treatment and anti-Derp-1 IgE optical density value after treatment. The subgroups evaluated were those that presented negative results on Kato-Katz exams. The groups were compared between them (A). The anti-Derp-1 IgE index of co-infected subgroup (before HW + SCH and after NEG) was correlated with intensity of infection (B). Statistical analyses were performed by Fisher’s exact and Mann–Whitney tests. In both cases significance was considered at $p < 0.05$ and highlighted by *.

of population 1, with no significant changes in the TREATED-POS subgroup of population 1 or in both subgroups of population 2 (Fig. 4A).

Detailed analysis of TREATED-NEG and TREATED-POS subgroups based on their pre-treatment (before-NEG, before-HW, before-SCH and before-HW + SCH) and post-treatment status (after-NEG, after-HW, after-SCH and after-HW + SCH), further demonstrated that, regardless of their pre-treatment condition, the increased frequency of “High anti-Derp-1 IgE producers” were evenly distributed amongst the TREATED-NEG patients of population 1 (Fig. 4B).

4.4. Analysis of post-treatment anti-Derp-1 IgE Index and its relationship with helminthic infection/co-infection status and infection intensity

In order to further investigate whether the changes in the anti-Derp-1 IgE observed in the TREATED-NEG subgroup of population 1 could be related to the patient pre-treatment condition, we calculated for each patient the anti-Derp-1 IgE Index as the ratio between the optical densities observed after/before treatment. Interestingly, our data demonstrated that the anti-Derp-1 IgE Index was significantly higher in the subgroup of patients with the co-infection status before treatment (before-HW + SCH) (Fig. 5A). Additional analysis demonstrated that the increase on the anti-Derp-1 IgE Index was not associated with either the intensity of Hookworm or the *S. mansoni* egg counts (Fig. 5B).

5. Discussion

Although several authors have evaluated changes in anti-Der p1 responses following anthelmintic treatment [9,10], in this study we performed comparisons of anti-Der p1 IgE response before and after treatment in all age ranges and in both genders. The populations evaluated had similar age and gender parameters and also allergy risk factors were equally distributed. Treatment against *S. mansoni* and hookworm was effective in both localities as indicated by negative individuals' stool egg counts. We also observed that re-infection frequently occurs.

Furthermore, we demonstrated that anti-Der p1 IgE levels increased after treatment on population with higher intensity of infection. Worms are known as master pieces on immune regulation and are commonly associated with allergy downregulation. Van den Biggelaar and colleagues [10], showed an association between *S. mansoni* infection and IL-10 production on patient's serum. IL-10, combined or not with TGF- β , secreted by antigen presenting cells and regulatory T cells may directly interfere with allergic effectors mechanisms by inhibiting mast cell degranulation or Th2 immune response [11,12]. This mechanism was corroborated in animal models demonstrating that allergic immune response was suppressed by helminths and this event was related to increased IL-10 production and regulatory CD4⁺ Foxp3⁺ CD45⁺ T cells [13].

Moreover, it has also been previously shown that PBMC of patients from endemic areas produce lower levels of IL-5 and IL-4 when exposed to *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen (Der p1) than individuals with no helminth infection, resulting in lower levels of anti-Der p1 IgE [14]. On the other hand, worm antigens exposure stimulated by anthelmintic therapy promotes an increase of IL-5 and IL-4 productions [15,16]. At the same time, IL-10 production is suppressed, what may lead to IgE production including IgE anti-Der p1 [17,18]. *In vitro* studies demonstrate that Praziquantel can alter worm tegument; liberating or exposing inner worm antigens can also stimulate IL-6, TNF- α and eotaxin production culminating in antibodies isotypes changes over weeks or months [12,19–22]. Our data also support these findings as we showed that anti-Der p1 IgE levels increase after treatment. We propose that this might be related to decreased IL-10 resulting in increased IL-4 production.

Concerning geohelminths, it has been demonstrated that Albendazole treatment was strongly associated with recurrent wheeze [21]. Moreover, it was observed that Albendazole treatment during pregnancy enhances infantile eczema [23] and also increases in anti-Der p1 IgE [24,25]. In this study we demonstrated that post-treatment response of individuals with high intensity of infection of geohelminths also have high levels of anti-Der p1 IgE but the opposite was observed in the population with individuals with low intensity of infection.

Rujeni and colleagues [26] found a negative correlation between IgE anti-Der p1 and the intensity of *S. mansoni* infection in high transmission areas. The authors also did not observed relationship between these two variables in low transmission areas. In our study, the anti-Der p1 IgE levels ratio analysis after and before treatment demonstrated that co-infected individuals had higher levels of anti-Der p1 IgE after treatment than the other groups of infected individuals evaluated. Although the increased anti-Der p1 IgE index of co-infected/cured individuals was observed, we did not observe a relationship between the intensity of infection and anti-Der p1 IgE. This event might be explained by the presence of different worms' antigens released after treatment of co-infected individuals which exacerbated the IgE productions, probably by stimulating IL-4 production [27].

It is important to underscore that data interpretation should be taken with caution, considering some particularities of experimental design and data collection approaches used in our study. In fact, the population 1 measurements were performed 2 years after treatment

whereas the population 2 was assessed 3 years after treatment. Moreover, the post-treatment samples were taken years rather than weeks after treatment and therefore the infection level does not reflect efficacy of treatment but rather rates of re-infection in two areas with different rates of transmission. In addition, the questionnaires were administered 7 years and 2 years after the beginning of the study in populations 1 and 2, respectively.

6. Conclusions

The determination of whether helminth infections confer protection or are a risk factor to allergic disorders and the effect of anthelmintic treatment on allergic responses is still debatable. Although we could not find an association between helminth intensity of infection and allergy related risk factors it was demonstrated that effective chemotherapy of subjects from endemic areas with high prevalence of infection enhances the levels of anti-Der p1 IgE, and that is a risk factor to development of allergic disorders.

Financial support

This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and by Fundação Oswaldo Cruz/Centro de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ/CPqRR). ATC, OAMF, AG, RCO are grateful for CNPq research fellowship (PQ).

Acknowledgment

We would like to thank the Doctoral students Kellen Rosa and the other students from Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil who helped to collect samples and also the Departamento de Parasitologia from Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil for stool analysis.

References

- [1] Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *Br Med J* 1989;299:1259–60.
- [2] Rook GAW. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology* 2008;126:3–11.
- [3] Wang LJ, Cao Y, Shi HN. Helminth infection and intestinal inflammation. *World J Gastro* 2008;14(33):5125–32.
- [4] Viana IR, Correa-Oliveira R, Cardoso O dos S, Massara CL, Colosimo E, Colley DG, et al. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. *Parasite Immunol* 1995;17(6):297–304.
- [5] Dutra WO, Correa-Oliveira R, Dunne D, Cecchini LF, Fraga L, Roberts M, et al. Polarized Th2 like cells, in the absence of Th0 cells, are responsible for lymphocyte produced IL-4 in high IgE producers schistosomiasis patients. *BMC Immunol* 2002;6:3–8.
- [6] Danilowicz-Luebert E, O'Regan N L, Steinfeldt S, Hartmann S. Modulation of specific and allergy-related immune responses by helminths. *J Biomed Biotechnol* 2011, ID: 821578.
- [7] Araujo MI, Hoppe BS, Medeiros M Jr, Carvalho EM. *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto-immune diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99:27–32.
- [8] Pereira WR, Kloss H, Crawford SB, Velasquez-Melendez JG, Matoso LF, Fujiwara RT, et al. *Schistosoma mansoni* in a rural area of the Jequitinhonha valley, Minas Gerais, Brazil: analysis of exposure risk. *Acta Trop* 2010;113:34–41.
- [9] Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvez N. Effect of anti-helminthic treatment on the allergic reactivity on children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92(3):404–11.
- [10] Van den Biggelaar AHJ, Rodrigues LC, Van ree R, Van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YCM, Souverein JHM, et al. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese school children. *J Infect Dis* 2004;189:892–900.
- [11] Araujo MI, Hoppe BS, Medeiros M Jr, Alcantara L, Almeida MC, Schrieffer A, et al. Impaired T helper response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. *J Infect Dis* 2004;190:1797–803.
- [12] Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites and the hygiene hypothesis. *Science* 2002;296:490–4.

- [13] Pacifico LGG, Marinho FAV, Fonseca CT, Barsante MM, Pinho V, Sales Jr PA, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3 T cells independent of interleukin-10. *Infect Immun* 2009;77(1):98–107.
- [14] Fitzsimmons CM, Joseph S, Jones FM, Reimert CM, Hoffmann KF, Kazibwe F, et al. Chemotherapy for schistosomiasis in Ungandan fishermen: treatment can cause a rapid increase in interleukin-5 levels in plasma but decreased levels of eosinophilia and worm specific immunoglobulin E. *Infect Immun* 2004;72(7):4023–30.
- [15] Silveira-Lemos D, Fernandes Costa-Silva M, Cardoso de Oliveira Silveira A, Azevedo Batista M, Alves Oliveira-Fraga L, Soares Silveira AM, et al. Cytokine pattern of lymphocyte in acute *Schistosomiasis mansoni* patients following treated Praziquantel therapy. *J Parasitol Res* 2013:909134.
- [16] Greiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Correa-Oliveira R. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. *Clin Exp Immunol* 2004;126:334–40.
- [17] Evengard B, Hammarstrom L, Smith CI, Johansson SG, Linder E. Subclass distribution and IgE response after treatment in human schistosomiasis. *Clin Exp Immunol* 1988;73(3):83–388.
- [18] Erb KJ. Helminths, allergic disorders and IgE-mediated immune responses: where do we stand? *Eur J Immunol* 2007;37(5):1170–3.
- [19] Kimani G, Chungu CN, Butterworth AE, Kamau T, Bwayo J, Gachihi G, et al. Eosinophilia and eosinophil helminthotoxicity in patients treated for *Schistosoma mansoni* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85(4):489–92.
- [20] Joseph S, Jones FM, Walter K, Fulford AJ, Kimani G, Mwatha JK, et al. Increases in human T helper 2 cytokine responses *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. *J Infect Dis* 2004;190(4):835–42.
- [21] Reimert CM, Fitzsimmons CM, Joseph S, Mwatha JK, Jones FM, Kimani G, et al. Eosinophil activity in *Schistosoma mansoni* infections in vivo in relation to plasma cytokine profile pre- and posttreatment with praziquantel. *Clin Vac Immunol* 2006;13(5):584–93.
- [22] Keiser J, Utzinger S. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2008;299(13):1937–48.
- [23] Mpairwe H, Webb EL, Muhangi L, Ndiranza J, Akishule D, Nampijja M, et al. Anthelmintic treatment during pregnancy is associated with increased risk of infantile eczema: randomized controlled trial results. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22(3):305–12.
- [24] Acevedo N, Erler A, Briza P, Puccio F, Ferreira F, Caraballo L. Allergenicity of *Ascaris lumbricoides* tropomyosin and IgE sensitization among asthmatic patients in tropical environment. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;154:195–206.
- [25] Cooper PJ, Moncayo AL, Guadalupe I, Benitez S, Vaca M, Chico M, et al. Repeated treatments with albendazole enhance th2 response to *Ascaris lumbricoides*, but not to aeroallergens in children from rural communities in the tropics. *J Infect Dis* 2008;198:1–6.
- [26] Rujeni N, Nausch N, Bourke CD, Midzi N, Mduluzi T, Taylor DW, et al. Atopy is inversely related to Schistosome infection intensity: a comparative study in Zimbabwean with distinct levels of *Schistosoma haematobium* infection. *Int Arch Allergy Immunol* 2012;158:288–98.
- [27] Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadelcker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 2007;7(12):975–87.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aalberse RC. Structural biology of allergens: Molecular mechanisms in allergy and clinical immunology. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000.106: 228- 238.

Al Ghobain MO, Al-Hajjaj MS, Al Moamary MS. Asthma prevalence among 16- to 18-year-old adolescents in Saudi Arabia using the ISAAC questionnaire. *BMC Public Health*. 2012. 26. 12:239.

Acevedo N, Erler A, Briza P, Puccio F, Ferreira F, Caraballo L. Allergenicity of *Ascaris lumbricoides* tropomyosin and IgE sensitization among asthmatic patients in tropical environment. *International Archives of Allergy and Immunology*.2011. 154: 195-206.

Acevedo N, Caraballo L. IgE cross-reactivity between *Ascaris lumbricoides* and mite allergens: possible influences on allergic sensitization and asthma. *Parasite Immunology*. 33: 309- 321, 2011.

Akdis M. Immune tolerance in allergy. *Current Opinions in Immunology*. 2009. 21: 700-707.

Alcântara-Neves NM, Badaró SJ, dos Santos MCA, Pontes- de-Carvalho L, Barreto ML. The presence of serum anti- *Ascaris lumbricoides* IgE antibodies and *Trichuris trichura* infection are risk factors for wheezing and/ or atopy in preschool- aged Brazilian children. *Respiratory Research*. 2010. 11(1): 114.

Alemu A, Atnafu A, Addis Z, Shiferaw Y, Teklu T, Mathewos B, Birhan W, Gebretsadik S, Gelaw B. Soil transmitted helminths and *Schistosoma mansoni* infections among children in zarima town, northwest Etiopia. *BCM Infectious Diseases*. 2011.11:189.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Review Immunology*. 2007. 7(12): 975-987.

Araujo MI, Hppe BS, Medeiros MJr, Carvalho EM. *Schistosoma mansoni* infection modulates the immune response against allergic and auto- immune diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004a. 99: 27-32.

Araujo MI, Hoppe BS, Medeiros M Jr, Alcântara L, Almeida MC, Schriefer A, Oliveira RR, Kruschewsky R, Figueiredo JP, Cruz AA, Carvalho EM. Impaired T helper response to aeroallergen in helminth- infected patients with asthma. Journal of infectious disease. 2004b.190: 1797-1803.

Asher MI, Weiland SK. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee. Clinical and Experimental Allergy. 1998. 5:52-66.

Bach JF. Mechanisms of disease: the effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. The New England Journal of Medicine. 2002. 347: 911-920.

Barbosa MA, Pellegrino J, Coelho PM, Sampaio IB Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1978. 20(3):121-132.

Bashir ME, Andersen P, Fuss IJ, Shi HN, Nagler-Anderson C. An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. J. Immunol. 2002.169: 3284–3292.

Bell RG. IgE, allergies and helminth parasites: A new perspective on an old conundrum. Immunology and Cell Biology. 1996. 74: 337-345.

Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. Soil transmitted helminth infections: *Ascaris*, *Trichuriasis* and hookworm. Lancet. 2006 357: 1521-1532.

Brito LL, Barreto ML, Silva R de C, Assis AM, Reis MG, Parraga IM, Blanton RE. Moderate and low intensity co-infections by intestinal helminths and *Schistosoma mansoni*, dietary iron intake, and anemia in Brazilian children. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006. 75:939–944.

Brooker S. Estimating the global distribution and disease burden of intestinal nematode infections: Adding up the numbers- A review. International Journal of Parasitology. 2010. 40(10): 1137-1144.

Bourke CD, Maizels RM, Mutapi F. Acquired immune heterogeneity and its source in human helminth infection. Parasitology. 2011.138: 139-159.

Bousquet J, Khaltsev N, Cruz AA, Denburg WJ, Fokkens A, Togias T, Zuberbier CE, Baena- Cagnani GW, Canonica C, van Weel I, Agache N, Ait- Khaled C et al. Allergic Rhinitis and its impact on Asthma (ARIA). Allergy. 2008. 63(86): 8- 160.

Buck AA, Anderson RI, MacRae AA. Epidemiology of polyparasitism.IV. Combined effects on the state of health. Tropenmedizin und Parasitenkunde. 1978. 29: 253-268.

Burton OT, Oettgen HC. Beyond immediate hypersensitivity: evolving roles for antibodies in immune homeostasis and allergic disease. Immunological Reviews. 2011. 242(1): 128-143.

Caraballo L, Acevedo N. New allergens of relevance in tropical regions: the impact of *Ascaris lumbricoides* infections. The World Allergy Organization Journal. 2011. 4 (5): 77-84.

Carvalho OD. Intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992. 87(4):307-309.

Carvalho L, Sun J, Collen K, Marshall F, Connie K, Pearce EJ. Review series on helminthes, immune modulation and the hygiene hypothesis: Mechanisms underlying helminth modulations of dendritic cell function. Immunology. 2008. 126: 28-34.

Chamone M, Marques CA, Aruncar GS, Pereira ALA, Pereira LH. Are there interactions between schistomes and intestinal nematodes? Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1990. 84: 557-558.

Cooper PJ, Moncayo AL, Guadalupe I, Benitez S, Vaca M, Chico M, Griffin GE. Repeated treatments with albendazole enhance th2 response to *Ascaris lumbricoides*, but not to aeroallergens in children from rural communities in the tropics. Journal of infectious disease. 2008. 198: 1-6.

Cooper PJ. Interactions between helminth parasites and allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2009. 9: 29-37.

Cooper PJ, Chico ME, Guadalupe I, Sandoval CA, Mitre E, Platts-Mills TAE, Barreto ML, Rodrigues LC, Strachan DP, Griffin GE. Impact of early life exposure to geohelminth infections on the development of vaccine immunity, allergic inflammatory diseases in children living in tropical Ecuador: the ECUAVIDA birth cohort study. BMC Infectious Diseases. 2011. 11: 184- 200.

Cooper AM, Hobson PS, Jutton MR, Kao MW, Drung B, Schmidt B, Fear DJ, Bevil AJ, McDonnell JM, Sutton BJ, Gould HJ. Soluble CD23 controls IgE synthesis and homeostasis in human B cells. Journal of Immunology. 2012.188(7):3199-207.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem Inst OswaldoCruz. 2004. 99:13-19.

Cross JH. Enteric nematodes of humans. Medical Microbiology. 4 ed, Texas, 1996.

Danilowicz-Luebert E, O`Regan NL, Steinfelder S, Hartmann S. Modulation of specific and allergy- related immune responses by helminths. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2011. ID: 821578.

Diawara A, Halpenny CM, Churcher TS, Mwandawiro C, Kihara J, Kaplan RM, Streit TG, Idaghdour Y, Scott ME, Basanez M-G, Prichard RK. Association between Response to Albendazole Treatment and beta-Tubulin Genotype Frequencies in Soil-

transmitted Helminths, PLOS Neglected Tropical Diseases. 2013. 7, ISSN:1935-2735, 2013.

Dold S, Heinrich J, Wichmann HE, Wjst M. Ascaris-specific IgE and allergic sensitization in a cohort of school children in the former East Germany. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998. 102(3): 414-420.

Dutra WO, Correa-Oliveira R, Dunne D, Cecchini LF, Fraga L, Roberts M, Soares-Silveira AM, Webster M, Yssel H, Gollob KJ. Polarized Th2 like cells, in the absence of Th0 cells, are responsible for lymphocyte produced IL-4 in high IgE producers schistosomiasis patients. *BCM Immunology*. 2002. 6: 3-8.

van Eijk AM, Lindblade KA, Odhiambo F, Peterson E, Rosen DH, Karanja D, Ayisi JG, Shi YP, Adazu K, Slutsker L. Geohelminth infections among pregnant women in rural western Kenya, a cross- sectional study. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2009. 3(1): e370.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica*. 2002. 82(2):139-146.

Enk MJ, Amaral GL, Costa e Silva MF, Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Correa-Oliveira R, Gazinnelli G, Coelho PM, Massara CL. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010. 105: 537- 540.

Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, Christ APG, Urban JFJr, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity*. 2007.26: 191-203.

Trujillo-Vargas CM, Werner-Klein M, Wohlleben G, Polte T, Hansen G, Ehlers S, Erb KJ. Helminth-derived products inhibit the development of allergic responses in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2007.175(4): 336-344.

- Evengard B, Hammarstrom L, Smith CI, Johansson SG, Linder E. Subclass distribution and IgE response after treatment in human schistosomiasis. *Clinical & Experimental Immunology*. 1988. 73(3): 383- 388.
- Fallah M, Mirarab A, Jamalian F, Ghaderi A. Evaluation of two years of mass chemotherapy against ascariasis in Hamadan, Islamic Republic of Iran. *Bulletin of the World Health Organization*. 2002. 80(5): 399-402.
- Ferrari TC, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R. Immune response and pathogenesis of neuroschistosomiasis mansoni. *Acta Tropica*. 2008.108 (2-3): 83-88.
- Fitzsimmons CM, Joseph S, Jones FM, Reimert CM, Hoffmann KF, Kazibwe F, Kimani G, Mwatha JK, Ouma JH, Tukahebwa EM, Kariuki HC, Vennervald BJ, Kabateirene NB, Dunne DW. Chemotherapy for schistosomiasis in Ugandan fishermen: treatment can cause a rapid increase in interleukin- 5 levels in plasma but decreased levels of eosinophilia and worm specific immunoglobulin E. *Infection and immunity*. 2004. 72(7): 4023-4030.
- Fonseca EOL, Teixeira MG, Barreto ML, Carmo EH, Costa MCN. Prevalência e fatores associados às geo-helmintíases em crianças residentes em municípios com baixo IDH no Norte e Nordeste brasileiros. *Caderno de Saúde Pública*. 2010.26:143-152.
- Fujita H, Meyer N, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of immune tolerance to allergens. *Chemical and immunology allergy*. 2012.96: 30-38.
- Galvani AP. Age- dependent epidemiological patterns and strain diversity in helminth parasite. *The Journal of Parasitology*. 2005. 91(1): 24-30.
- Godfrey RC. Asthma and IgE levels in rural and urban communities of The Gambia. *Clinical Allergy*. 1975. 5(2):201-207.
- Grant AV, Araújo MI, Ponte EV, Oliveira RR, Cruz AA, Barnes KC, Beaty TH. High heritability but uncertain mode of inheritance for total serum IgE level and

Schistosoma mansoni infection intensity in a schistosomiasis- endemic Brazilian population. Journal of infectious disease. 2008.198: 1-10.

Greiger SM, Massara CL, Bethony J, Soboslay PT, Correa-Oliveira R. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. Clinical Experimental. Immunology. 2004. 126: 334- 340.

Gyorkos TW, Larocque R, Casapia M, Gotuzzo E. Lack of risk of adverse birth outcomes after deworming pregnant women. The Pediatric Infectious Disease Journal. 2006. 25(9):791-4.

Hagel, I, Cabrera M, Hurtado MA, Sanchez P, Puccio F, Di Prisco MC, Palenque M. Infection by *Ascaris lumbricoides* and bronchial hyper reactivity: an outstanding in Venezuelan school children from endemic areas. Acta tropica. 2007.103(3): 231-241.

Harris N, Gause WC. B cell function in the immune response to helminths. Trends in Immunology. 2011. 32(2): 80-88.

Hong ST, Chai JY, Choi MH, Huh S, Rim HJ, Lee SH. A successful experience of soil transmitted helminth control in the Republic of Korea. Korean Journal of Parasitology. 2006. 44(3): 177- 185.

Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S. Hookworm infection. The New England Journal of Medicine. 2004. 351(8):799-807.

Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. Helminth infections: the greater neglected tropical diseases. The Journal of Clinical investigation. 2008. 118(4): 1311-1321.

Joseph S, Jones FM, Walter K, Fulford AJ, Kimani G, Mwatha JK, Kamau T, Kariuki HC, Kazibwe F, Tukahebwa E, Kabatereine NB, Ouma JH, Vennervald BJ, Dunne D W. Increases in human T helper 2 cytokine responses *Schistosoma mansoni* worm and worm tegument antigens are induced by treatment with praziquantel . The Journal of Infectious Disease. 2004.190(4): 835-842.

Kabatereine NB, Vennervald BJ, Ouma JH, Kemijumbi J, Butterworth AE, Dunne DW, Fulford AJ. Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. *Parasitology*. 1999.118 (pt1): 101-105.

Kabesch M, Lauener RP. Why old McDonald had a farm and no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004. 75: 383- 387.

Kamradt T, Goggel R, Erb KJ. Induction, exacerbation and inhibition of allergic and autoimmune diseases by infection. *Trends in Immunology*. 2005. 26: 260–267.

Kaplan JL, Shi HN, Walker A. The role of microbes in developmental immunologic programming. *Pediatric Research*. 2011. 69 (6): 465-472.

Kato K, Miura M. Comparative examinations. *Japanese Journal of Parasitology*. 1954. 3(5).

Keiser J, Utzinger J. Efficacy of current drugs against soil transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*. 2008. 299(16): 1937-1948.

Kimani G, Chungu CN, Butterworth AE, Kamau T, Bwayo J, Gachihi G, Mungai B, Mugambi M. Eosinophilia and eosinophil helminthotoxicity in patients treated for *Schistosoma mansoni* infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991.85 (4): 489-492.

Kitagaki K, Businga TR, Racila D, Elliott DE, Weinstock JV, Kline JN. Intestinal Helminths Protect in a Murine Model of Asthma. *Journal of Immunology*. 2006.177:1628–1635.

Kloetzel K. Some quantitative aspects of diagnosis and epidemiology in Schistosomiasis mansoni. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1963. 12: 334-337.

- Kolárová L, Horák P, Skimisson K. methodological approaches in the identification of areas with a potential risk of infection by bird schistosomes causing cercarial dermatitis. *Journal of Helminthology*. 2010. 84: 327-335.
- Leon-Cabrera S, Flisser A. Are basophils important mediators for helminth induced Th2 immune responses? A debate. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012.
- Li L, Boussiotis VA. Control of regulation of peripheral tolerance in allergic inflammatory disease: Therapeutic consequences. *Chemical Immunology Allergy*. 2008. 94: 178-188.
- Lozoff B, Jimenez E, Smith JB. Double burden of iron deficiency in infancy and low socioeconomic status: a longitudinal analysis of cognitive test scores to age 19 years. *Archives Pediatrics and Adolescent Medicine*. 2006. 160(11):1108-1113.
- Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvez N. Effect of antihelminthic treatment on the allergic reactivity on children in a tropical slum. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1993. 92(3): 404-411.
- Lynch NR, Goldblatt J, Le Souëf PN. Parasite infections and the risk of asthma and atopy. *Thorax*. 1999. 54(8):659-60.
- Luger EO, Wegmann M, Achatz G, Worm M, Renz H, Radbruch A. Allergy for a lifetime? *Alergology International*. 2010.59: 1-8.
- Maizels RM, Pearce EJ, Artis D, Yazdanbakhsh M, Wynn TA. Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *Journal of Experimental Medicine*. 2009. 206: 2059- 2066.
- Malaquias LC, Falcão PL, Silveira AM, Gazzinelli G, Prata A, Coffman RL, Pizzolo V, Souza CP, Colley DG, Correa-Oliveira R. Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. *Scandinavian Journal of Immunology*. 1997.46(4): 393-398.

Mangan NE, van Rooijen N, McKenzie ANJ, Fallon PG. Helminth-modified pulmonary immune response protects mice from allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Journal of Immunology*. 2006.176:138–147.

Mary CL, López-Malpica F, Díaz AM. Analysis of cross-reactivity between group 1 allergens from mites. *Puerto Rico Health Science Journal*.2008. 27(2);163-170.

Merrett TG, Merrett J, Cookson JB. Allergy and parasites: the measurement of total and specific IgE levels in urban and rural communities in Rhodesia. *Clinical Allergy*. 1976. 6(2):131-134.

Miller TA. Hookworm infection in man. *Advances in Parasitology*. 1979. 17:315-384.

Ministério da Saúde. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de Bolso. 8 ed. Brasília DF, 2010.

Mpairwe H, Webb EL, Muhangi L, Ndibazza J, Akishule D, Nampijja M, Ngom-wegi S, Tumusime J, Jones FM, Fitzsimmons C, Dunne DW, Muwanga M, Rodrigues LC, Elliott AM. Anthelmintic treatment during pregnancy is associated with increased risk of infantile eczema: randomised-controlled trial results. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2011. 22(3): 305-312.

Montefort S, Ellul P, Montefort M, Caruana S, Agius Muscat H. Increasing prevalence of asthma, allergic rhinitis but not eczema in 5- to 8-yr-old Maltese children (ISAAC). *Pediatric Allergy and Immunology*. 2009. 20(1):67-7.

Mungan D, Celik G, Bavbek S, Misirligil Z. Pet allergy: how important for Turkey where there is a low pet ownership rate. *Allergy and asthma proceedings*. 2003. 24 (2): 137-142.

Nicolau N, Siddique N, Custovic A. Allergic disease in urban and rural populations: increasing prevalence with increasing urbanization. *Allergy: European Journal of Allergy and clinical Immunology*. 2005. 60(11): 1357-1360.

- Pacífico LGG, Marinho FAV, Fonseca CT, Barsante MM, Pinho V, Sales- Junior PA, Cardoso LS, Araújo MI, Carvalho EM, Cassali GD, Teixeira MM, Oliveira SC. *Schistosoma mansoni* antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3 T cells independent of interleukin-10. *Infection and Immunity*. 2009. 77(1): 98-107.
- Pawankar R, Baena-Cagnani CE, Bousquet J, Canonica GW, Cruz AA, Kaliner MA, Lanier BQ. State of world allergy report 2008: allergy and chronic respiratory diseases. *The World Allergy Organization Journal*. 2008. 1(6):4-17.
- Pereira WR, Kloss H, Crawford SB, Velasquez- Melendez JG, Matoso LF, Fujiwara RT, Cançado GGL, Loverde PT, Correa-Oliveira R, Gazzinelli A. *Schistosoma mansoni* in a rural area of the Jequitinhonha valley, Minas Gerais, Brazil: analysis of exposure risk. 2010. *Acta tropica*. 113: 34-41.
- Perrigoue JG, Marshall FA, Artis D. On the hunt for helminths: innate immune cells in the recognition and the response to helminth parasites. *Cellular Microbiology*. 2008. 10(9): 1757- 1764.
- Powe DG, Bonnin AJ, Jones NS. Entopy: local allergy paradigm. *Clinical and experimental allergy*. 2010. 40: 987-997.
- Rana AK, Misra-Bhattacharya S. Current drug targets for helminthic diseases. *Parasitology Research*. 2013. 112(5): 1819-1831.
- Reimert CM, Fitzsimmons CM, Joseph S, Mwatha JK, Jones FM, Kimani G, Hoffmann KF, Booth M, Kabatereine NB, Dunne DW, Vennervald BJ. Eosinophil activity in *Schistosoma mansoni* infections in vivo in relation to plasma cytokine profile pre- and posttreatment with praziquantel. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2006. 13(5): 584-593.
- Rezende TMRL. Asma e rinite alérgica em área rural endêmica para esquistossomose. Belo Horizonte, 2009.

Rook GAW. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: The broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology*. 2008.126: 3-11.

Ross AG, McManus DP, Farrar J, Hunstman RJ, Gray DJ, Li YS. Neuroschistosomiasis. *Journal of Neurology*. 2012. 259(1): 22-32.

Rujeni N, Nausch N, Bourke CD, Midzi N, Mduluza T, Taylor DW, Mutapi F. Atopy is inversely related to Schistosome infection intensity: A comparative study in Zimbabwean with distinct levels of *Schistosoma haematobium* infection. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2012.158:288-298.

Sánchez-Borges M, Capriles-Hulett A, Caballero-Fonseca F, Fernández-Caldas E. Mite and cockroach sensitization in allergic patients from Caracas, Venezuela. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 2003. 90(6):664-668.

Santos FLN, Cerqueira E JL, Soares NM. Comparison of the thick smear and Kato-Katz techniques for diagnosis of intestinal helminth infections. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005. 38 (2): 196-198.

Sarinho ES, Medeiros D, Silva A, Rizzo JA. Specific IgE anti –*Ascaris* in Brazilian children and adolescents. *World Allergy Organization Journal*. 2010. 3(3): 53-56.

Silva JC, Furtado LFV, Ferro TC, Bezerra KC, Borges EP, Melo ACFL. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* e seus aspectos epidemiológicos no estado do Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*. 2011. 44(1): 100- 102.

Silveira AMS, Gazzinnelli G, Alves-Oliveira LF, Bethony J, Gazzinnelli A, Carvalho-Queiroz C, Alvarez MCB, Lima-Silva, FC, Prata A, Loverde P, Correa-Oliveira R. Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of interleukin- 10, interferon γ and interleukin -13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. *Tropical medicine and Hygiene*. 2004. 98: 514- 519.

- Silveira-Lemos D, Costa-Silva MF, Cardoso ASO, Azevedo MB, Alves LOF, Soares AMS, Barbosa MCA, Martins-Filho OA, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, Teixeira-Carvalho A. Cytokine pattern of lymphocyte in acute Schistosomiasis mansoni patients following treated Praziquantel therapy. *Journal of Parasitological Resistance*. 2013. 909-934.
- Smits HH, Everts B, Hartgers FC. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by regulatory processes. *Current. Allergy. Asthma*. 2010. Rep. 10: 3-12.
- Solé D, Vanna AT, Yamada E, Rizzo MC, Naspitz CK. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) written questionnaire: validation of the asthma component among Brazilian children. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 1998. 8(6):376-382.
- Speziali E, Bethony J, Martins-Filho O, Fraga LA, Lemos DS, Souza LJ, Correa-Oliveira R, Faria AM. Production of interferon-gamma by natural killer cells and aging in chronic human schistosomiasis. *Mediators of Inflammation*. 2004.13(5-6):327-33.
- Strachan DP. Hay fever, hygiene and household size. *British Medical Journal*. 1989. 299: 1259-1260.
- Stephenson LS, Latham MC, Kurz KM, Kinoti SN, Brigham H. Treatment with a single dose of albendazole improves growth of Kenyan schoolchildren with hookworm, *Trichuris trichura* and *Ascaris lumbricoides* infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1989. 41(1):78-87.
- Stoll NR. This wormy world. 1947. *Journal of Parasitology*. 1999. 85(3): 392-396.
- Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, Van ree R. Allergy, parasites and the hygiene hypothesis. 2002. *Science*. 296: 490- 494.
- Uthaisangsook S. Risk factors for development of asthma in Thai adults in Phitsanulok: a university-based study. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 2010. 28(1):23-28.

Van den Biggelaar AHJ, Rodrigues LC, Van ree R, Van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YCM, Souverijn JHM, Missinou MA, Borrmann S, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. Long- term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *Journal of Infectious Disease*. 2004. 189: 892-900.

Valmonte GR, Cauyan GA, Ramos JDA. IgE cross-reactivity between house dust mite allergens and *Ascaris lumbricoides* antigens. *Asia Pacific Allergy*. 2012. 2: 35-44.

Vasconcelos CH, Cardoso PC, Quirino WC, Massara CL, Amaral GL, Cordeiro R, Carvalho S. Evaluation of schistosomiasis mansoni control measures in Sabará, Minas Gerais state, Brazil, 1980-2007. *Caderno de saúde pública*. 2009. 25: 997-1006.

Vereecken K, Naus CWA, Polman K, Scott JT, Diop M, Gryseels B, Kestens L. Associations between specific antibody responses and resistance to reinfection in a Senegalese population recently exposed to *Schistosoma mansoni*. *Tropical Medicine and International Health*. 2007.12(3): 431-444.

Viana IR, Correa-Oliveira R, Cardoso OS, Massara CL, Colosimo E, Colley DG, Gazzinelli G. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. *Parasite Immunology*. 1995.17(6):297-304.

Voehringer D. The role of basophils in helminth infection. *Trends in Parasitology*. 2009. 25(12):551-6.

Wang LJ, Cao Y, Shi HN. Helminth infection and intestinal inflammation. *World Gastroenterology Journal*. 2008. 14(33): 5125- 5132.

Warner JA, Warner JO. Early life events in allergic sensitisation. *British Medical Bulletin*. 2000. 56(4): 883-893.

Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CAM, Lamb JR, Maizels RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2005. 202:1199–1212.

Wohlleben G, Trujillo C, Muller J, Ritze Y, Grunewald S, Tatsch U, Erb KJ. Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. *International Immunology*. 2004. 16: 585–596.

Wong CK, Ho CY, Ko FWS, Chan CHS, Ho ASS, Hui DSC, Lam CWK. Proinflammatory cytokines (IL- 17, IL-6, IL- 18 and IL- 12) and Th cytokines (IFN γ , IL- 4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical Experimental Immunology*. 2011. 125: 177-183.

World Health Organization. *Soil-transmitted helminths*. Geneva, 2011.

Zaccone P, Fehervari Z, Phillips JM, Dunne DW, Cooke A. Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunology*. 2006. 28: 515-523.