



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**Programa de Pós-Graduação em Imunologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Avaliação da resposta imune de indivíduos  
asmáticos residentes em área endêmica em**

*Schistosoma mansoni*

**JOANEMILE PACHECO DE FIGUEIREDO**

**Salvador – Bahia**

**2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia**

**Avaliação da resposta imune de indivíduos asmáticos residentes em área  
endêmica em *Schistosoma mansoni***

**JOANEMILE PACHECO DE FIGUEIREDO**

Professora Orientadora: Maria Ilma Andrade Santos Araujo

Professor Co-Orientador: Manoel Medeiros Júnior

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em  
Imunologia, como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Imunologia.

Salvador – Bahia

2004

AValiação DA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS ASMÁTICOS RESIDENTES EM  
ÁREA ENDÊMICA EM *Schistosoma mansoni*

**JOANEMILE PACHECO DE FIGUEIREDO**

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares

**MARIA ILMA ANDRADE SANTOS ARAUJO**

Pós doutorado; Cornell University, Estados Unidos.

Professora Adjunta da Fundação para o Desenvolvimento das Ciências e Pesquisadora do Serviço de Imunologia do Hospital Professor Edgard Santos - Universidade Federal da Bahia.

**JOSÉ CARLOS BINA DE ARAUJO**

Doutorado em Medicina Interna, Universidade Federal da Bahia.

Professor Adjunto do Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina - Universidade Federal da Bahia.

**RÉGIS DE ALBUQUERQUE CAMPOS**

Doutorado em Patologia, Universidade de São Paulo.

Pesquisador do Serviço de Imunologia e do Centro de Enfermidades Respiratórias do Hospital Professor Edgard Santos - Universidade Federal da Bahia.

Membro Suplente

**MOACIR PARANHOS SILVA**

Doutorado em Biologia Celular e Molecular, FIOCRUZ.

Professor Adjunto do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Bahia.

## **DEDICATÓRIA**

*A minha mãe Marly pelo otimismo e amor devotado a mim e aos meus irmãos.*

*A meu irmão Rodrigo, fonte de carinho e alegria.*

*A meu marido Julio pelo amor e compreensão, cujo apoio constante possibilita minha realização profissional.*

## AGRADECIMENTOS

A meu mestre e amigo Prof. Manoel Medeiros Junior pela confiança e orientação segura desde os meus primeiros passos em medicina.

Ao Prof. Edgar Marcelino Carvalho pelos ensinamentos e por ter me dado a oportunidade de ingressar no Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, minha eterna gratidão.

Ao Prof. Álvaro Cruz pela atenção e incentivo ao meu desenvolvimento profissional.

À Profa. Maria Clara Barretto de Freitas Melro pelos primeiros ensinamentos em medicina e estímulo inicial à pesquisa.

A Ricardo Riccio Oliveira pela valiosa ajuda em todas as etapas deste trabalho, paciência e amizade.

A Sueli Oliveira Lima de Sá pelo apoio e correção ortográfica.

Aos colegas do Ambulatório de Alergia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, em especial, a Cecília Almeida pela amizade e valiosa colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários do Curso de Pós Graduação em Imunologia pelo convívio enriquecedor.

Aos colegas e funcionários do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos pelo entusiasmo em colaborar, tornando o ambiente de trabalho sempre muito agradável.

À Secretaria de Saúde do município do Conde e aos pacientes envolvidos neste trabalho.

Ao Laboratório IPI-ASAC por ter gentilmente cedido os extratos alergênicos utilizados neste trabalho.

A minha família, pelo amor e apoio incondicionais.

A nosso Deus.

### **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A Maria Ilma Andrade Santos Araújo, exemplo de pesquisadora e ser humano, minha admiração e eterna gratidão pela oportunidade de crescimento profissional e de novas experiências de trabalho e de vida.

## **FONTES FINANCIADORAS**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

National Institute of Health (NIH) Research Grant # D43 TW06216.

Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), iii.



*“Da minha aldeia vejo quanto da terra se pode ver no Universo...  
Por isso minha aldeia é tão grande como outra terra qualquer  
Pois sou do tamanho do que vejo  
E não do tamanho da minha altura..”*

(Fernando Pessoa)

## ÍNDICE

Lista de siglas e abreviaturas .....	13
Lista de figuras .....	15
Lista de tabelas .....	17
Resumo .....	18
Abstract.....	19
1 Introdução .....	20
2 Revisão da literatura .....	22
2.1 Resposta imune na infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> .....	22
2.2 Resposta imune nas alergias .....	24
2.3 Associação entre alergia e helmintíase .....	26
<b>2.3.1 Mecanismos envolvidos na modulação da resposta alérgica em indivíduos infectados por helmintos.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3.2 Papel da IL-10 na modulação da resposta imune.....</b>	<b>29</b>
3 Justificativa.....	32
4 Objetivos.....	33
4.1 Objetivo geral .....	33
4.2 Objetivos específicos.....	33
5 Material e métodos .....	34
5.1 Seleção de indivíduos asmáticos de área endêmica e não endêmica em helmintíases..	34
<b>5.1.1 Critérios de inclusão .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1.2 Critérios de exclusão .....</b>	<b>35</b>
5.2 Desenho do estudo.....	38
5.3 Avaliação complementar .....	39

<b>5.3.1 Exame parasitológico de fezes .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3.2 Testes alérgicos .....</b>	<b>39</b>
<b>5.3.3 Dosagem de IgE específica para <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> .....</b>	<b>40</b>
<b>5.3.4 Prova de função pulmonar .....</b>	<b>40</b>
5.4 Avaliação da resposta imune .....	41
<b>5.4.1 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico .....</b>	<b>41</b>
<b>5.4.2 Avaliação da produção de citocinas .....</b>	<b>42</b>
<b>5.4.3 Avaliação da expressão de IL-4 por PCR.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4.4 Avaliação da expressão de IL-10 intracelular.....</b>	<b>43</b>
5.5 Avaliação da fauna acarina.....	44
<b>5.5.1 Identificação da fauna acarina .....</b>	<b>44</b>
<b>5.5.2 Quantificação de antígeno Der p 1 .....</b>	<b>45</b>
5.6 Análise dos dados .....	46
<b>5.6.1 Estatística descritiva.....</b>	<b>46</b>
<b>5.6.2 Estatística inferencial .....</b>	<b>47</b>
6 Considerações éticas.....	48
7 Resultados.....	49
7.1 Prevalência de parasitose intestinal .....	49
7.2 Prevalência de atopia .....	50
7.3 Determinação da fauna acarina e dos níveis de Derp 1 em amostras de poeira domiciliar de indivíduos residentes em área endêmica em helmintíases.....	52
7.4 Produção de citocinas em sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados por <i>S. mansoni</i> e em grupo controle.....	53
7.5 Papel da IL-10 na modulação da produção de IL-5.....	56
7.6 Fonte celular produtora de IL-10.....	57

<b>7.6.1 Definição das populações celulares pela morfologia .....</b>	<b>57</b>
<b>7.6.2 Compensação utilizando isotipos controles.....</b>	<b>59</b>
<b>7.6.3 Ajustes das populações celulares marcadas com os diferentes fluorocromos.....</b>	<b>60</b>
<b>7.6.4 Avaliação da expressão de IL-10 intracelular.....</b>	<b>61</b>
7.7 Produção de IL-10 após tratamento com anti-helmíntico dos pacientes infectados.....	63
8 Discussão.....	65
9 Sumário.....	74
10 Conclusão .....	75
11 Perspectivas futuras .....	76
12. Referências bibliográficas .....	77
13 Anexos.....	94

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CD	Molécula de superfície celular (clusters of differentiation)
CD14	Marcador de superfície de monócitos/macrófagos
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico (PBMC, peripheral blood mononuclear cells)
Der p 1	Alérgeno 1 de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	Citometria de fluxo (flow cytometer cell sorter)
FEV1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase
HLA-DR	Antígeno de histocompatibilidade leucocitária classe 2
ICOS	Molécula co-estimulatória da família de CD28
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG4	Imunoglobulina G4
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
ISAAC	International study of asthma and allergies in childhood

PBS	Tampão salina fosfato
rhIL-10	IL-10 recombinante humana
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa
SPT	Teste cutâneo de leitura imediata (skin prick test)
TCD4 <sup>+</sup>	Células T auxiliares
TCD8 <sup>+</sup>	Células T citotóxicas
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e transformação beta
Th1	Linfócito T auxiliador 1
Th2	Linfócito T auxiliador 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Prevalência de parasitoses intestinais em indivíduos residentes no município do Conde-Bahia. .... 49
- Figura 2.** Carga parasitária de indivíduos residentes no município do Conde-Bahia, avaliada pelo método de Kato-Katz..... 50
- Figura 3.** Prevalência de doenças alérgicas na população do Conde-Bahia, avaliada pelo questionário baseado no ISAAC..... 50
- Figura 4.** Frequência de ácaros em amostras de poeira domiciliar de indivíduos asmáticos no município do Conde-Bahia. .... 52
- Figura 5.** Produção de IL-5 por CMSP de asmáticos estimulados, *in vitro*, com 25 µg/ml de Der p 1. A dosagem de IL-5 em sobrenadante de culturas foi realizada através da técnica de ELISA, como descrito em materiais e métodos. ( $p < 0,0001$ , teste de Mann-Whitney). .... 53
- Figura 6.** Razão das densitometrias de IL-4/HPRT em CMSP de asmáticos. A expressão de IL-4 foi avaliada através de RT-PCR em CMSP estimuladas, *in vitro* com Der p 1, de asmáticos infectados e não infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni* ( $n=5$ /grupo;  $p < 0,05$ , teste de Mann-Whitney). .... 54
- Figura 7.** Produção de IL-10 por CMSP de asmáticos induzida pelo antígeno Der p 1. Os níveis de IL-10 em sobrenadantes de culturas de CMSP estimuladas, *in vitro*, com Der p 1, foram avaliados através de ELISA em 33 asmáticos infectados por *S. mansoni* e outros helmintos e em 10 asmáticos não infectados. ( $p=0,0018$ , teste de Mann Whitney). .... 55
- Figura 8.** Associação entre a produção de IL-10 específica para Der p 1 e carga parasitária de *S. mansoni* em asmáticos. ( $\beta=0,3212$ ;  $p < 0,05$ , regressão linear simples). .... 56
- Figura 9.** Produção de IL-5 induzida por antígeno Der p 1 por CMSP de asmáticos não infectados na ausência ou presença de rhIL-10 ( $p < 0,05$ , teste Wilcoxon). .... 57

- Figura 10.** Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulidade (SSC) celular, identificando as populações de linfócitos, região 1 (R1) e monócitos, região 2 (R2). ..... 58
- Figura 11.** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico, selecionadas na janela de linfócitos, após marcação com isotipos controles. O diagrama representa um experimento. .... 59
- Figura 12.** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico demonstrando a frequência de células marcadas com anticorpos conjugados com PE (coordenada y) e FITC (coordenada x) como descrito em material e métodos. O diagrama representa um experimento. .... 60
- Figura 13.** Frequência de células produtoras de IL-10 em culturas não estimuladas ou estimuladas com Der p 1 de asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni*, grupo 1 (n=8), analisados por citometria de fluxo (teste t Student). ..... 61
- Figura 14.** Frequência de células expressando IL-10 em culturas não estimuladas ou estimuladas com Der p 1 de asmáticos não infectados, Grupo 2 (n=8) analisados por citometria de fluxo. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (teste t de Student). ..... 62
- Figura 15.** Frequência de células expressando IL-10 em resposta ao antígeno Der p 1 de asmáticos infectados com helmintos, incluindo *S. mansoni* (Grupo 1, n=8) e asmáticos não infectados (Grupo 2, n=8), analisados por citometria de fluxo. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (teste t de Student). ..... 63
- Figura 16.** Níveis de IL-10 induzidos por antígeno Der p 1 em sobrenadantes de culturas de CMSP, dosadas pela técnica de ELISA, em asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni* antes e 3 meses após o tratamento com Oxamniquine e Albendazol (n=14;  $p < 0,05$ , teste Wilcoxon). ..... 64



**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1.** Características demográficas dos indivíduos asmáticos infectados ou não infectados com *S. mansoni* e outros helmintos..... 51
- Tabela 2.** Sintomas de asma em indivíduos infectados por helmintos incluindo *S. mansoni* antes e três meses após o tratamento com anti-helmínticos. .... 64

## RESUMO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS ASMÁTICOS RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA EM *Schistosoma mansoni*. JOANEMILE PACHECO DE FIGUEIREDO.** A prevalência de infecção por helmintos é negativamente associada à prevalência de alergia, e alguns trabalhos têm demonstrado uma inversa associação entre infecções por helmintos e gravidade de asma. Neste trabalho, foi avaliada a resposta imune específica para alérgeno 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) em asmáticos infectados com helmintos de uma área endêmica no município do Conde-Bahia (Grupo 1), comparando-se com a resposta em asmáticos não infectados de uma área não endêmica, Salvador-Bahia (Grupo 2). Os indivíduos foram selecionados utilizando-se questionário ISAAC modificado e exames parasitológicos de fezes por meio da técnica de Kato-Katz. Foram realizados testes cutâneos de leitura imediata com aeroalérgenos, dosagem de IgE específica para Der p 1, coleta de amostras de poeira domiciliar para estudo da fauna acarina, além da avaliação da resposta imunológica pela produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico estimuladas, *in vitro*, com Der p 1. A dosagem de citocinas no sobrenadante das culturas foi realizada pelo método de ELISA, a expressão de IL-4 pela técnica de RT-PCR e a fonte produtora de IL-10 foi avaliada utilizando-se citometria de fluxo. Foi observada menor positividade aos testes cutâneos de leitura imediata com aeroalérgenos nos asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni* (grupo 1), quando comparados com asmáticos não infectados. Embora a positividade aos testes cutâneos tenha sido baixa no grupo de asmáticos infectados, em 40,6% dos indivíduos foi observada IgE específica para o Der p 1 acima de 0,70 KU/L (classe II). Com relação à produção de citocinas, observou-se que células de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* produziram baixos níveis de IL-5 em culturas estimuladas com Der p 1, quando comparados à produção desta citocina por células de indivíduos não infectados ( $p < 0,0001$ ). Da mesma forma, a razão da densitometria de IL-4/HPRT no grupo de infectados foi mais baixa do que no grupo de não infectados ( $p < 0,05$ ). Em contraste, os níveis de IL-10 foram altos em cultura de células de asmáticos infectados por *S. mansoni* e baixos ou indetectáveis no grupo controle ( $p = 0,0018$ ). Observou-se uma associação positiva entre carga parasitária de *S. mansoni* e níveis de IL-10 em culturas estimuladas com Der p 1 ( $\beta = 0,3212$ ,  $p = 0,012$ ). A adição de IL-10 recombinante humana (rhIL-10) às culturas de asmáticos não infectados resultou em diminuição na produção de IL-5 ( $p < 0,05$ ). Os indivíduos do grupo 1 foram tratados com anti-helmínticos e houve redução da produção de IL-10 específica para Der p 1 ( $p < 0,05$ ), associada à piora dos sintomas de asma após o tratamento. Por fim, os dados mostraram que, em asmáticos infectados com *S. mansoni*, a IL-10 foi produzida principalmente por células T CD8<sup>+</sup> e monócitos e, no grupo de não infectados, esta citocina foi produzida basicamente por monócitos. Este estudo sugere que a IL-10 é uma citocina supressora da resposta imune inflamatória do tipo Th2 em asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni* e que as células T CD8<sup>+</sup> constituem uma importante fonte produtora desta citocina nos indivíduos infectados.

**Palavras-chave:** Asma. *Schistosoma mansoni*. Alergia. IL-10. Células Th2.

**ABSTRACT**

EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE OF ASTHMATIC INDIVIDUALS LIVING IN AN ENDEMIC AREA OF *Schistosoma mansoni*. **JOANEMILE PACHECO DE FIGUEIREDO**. The prevalence of parasite infection is negatively associated with the prevalence of allergy. An inverse association has also been shown between helminth infection and clinical score of asthma. In this study the *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1)-specific immune response was evaluated in asthmatics infected with helminths, including *S. mansoni*, living in a polyhelminthic endemic area of Conde, Bahia (Group 1), and in asthmatics without helminthic infections living outside the endemic area (Group 2). Individuals were screened for asthma through a directed questionnaire based on ISAAC and stool samples were examined by the Kato-Katz method. Skin prick test (SPT) was performed using dust mite allergens. Der p 1-specific IgE production, identification of mite species in samples from patient homes, and analysis of the immune response were also evaluated. The immune response was evaluated through the measurement of Th2 cytokines in PBMC culture of asthmatics infected with *S. mansoni* in response to Der p 1, and it was compared to those of uninfected asthmatic individuals. The cytokines profile was evaluated using ELISA and IL-4 expression through RT-PCR. The sources of IL-10 in PBMC culture of asthmatics were evaluated using flow cytometry. Positive SPT to aeroallergens was observed in 12% of asthmatics from the endemic area and positive response to *D. pteronyssinus* was observed in all asthmatic controls without helminth infections. Although the low prevalence of positive SPT was observed in individuals chronically infected with *S. mansoni*, *D. pteronyssinus*-specific IgE antibodies above the reference values (0.70 KU/L) were detected in 40.6% asthmatic individuals infected with helminths. PBMCs of asthmatic individuals infected with *S. mansoni* produced lower levels of IL-5 than asthmatics free of infections ( $p < 0.0001$ ). The ratio of IL-4/HPRT densitometries by RT-PCR in PBMC was lower in the infected group compared to what was observed in the uninfected group ( $p < 0.05$ ). In contrast, IL-10 was more readily produced by Der p 1-stimulated PBMC from asthmatic infected individuals, and was not detected or was detected only at low levels in the helminth-free asthmatics ( $p < 0.001$ ). There was a positive association between *S. mansoni* egg count and Der p 1 Ag-driven IL-10 production. Addition of rhIL-10 to the cell cultures of asthmatic individuals free of infections lead to a down regulation of Der p-induced IL-5 production ( $p < 0.05$ ). Additionally, anti-helminthic treatment in infected asthmatics resulted in down-modulation of Der p 1 specific IL-10 production. The decrease in the levels of IL-10 post-treatment was followed by more severe symptoms of asthma ( $p < 0.05$ ). The data show that in asthmatic individuals infected with *S. mansoni*, IL-10 is predominantly produced by CD8<sup>+</sup> T cells and monocytes. In the group of asthmatics free of infections this cytokine was produced basically by monocytes. This study suggests that IL-10 is the key cytokine inhibiting the inflammatory Th2 immune response in asthmatics infected with helminths including *S. mansoni*, and that CD8<sup>+</sup> T cells are the main source of IL-10 in these individuals.

**Keywords:** Asthma. *Schistosoma mansoni*. Allergy. IL-10. Th2 cells.

## 1 INTRODUÇÃO

A influência da infecção por helmintos no desenvolvimento de alergia vem sendo objeto de alguns estudos realizados, principalmente na Venezuela, em populações infectadas pelo *Ascaris lumbricoides*, tendo sido demonstrada uma diminuição na positividade aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata (HAGEL et al., 1993; LYNCH et al., 1993; LYNCH et al., 1997).

Estudos realizados pelo Serviço de Imunologia, Hospital Professor Edgard Santos – Universidade Federal da Bahia (HUPES-UFBA), demonstraram que, em indivíduos residentes na área endêmica em *Schistosoma mansoni*, Caatinga do Moura-BA, infectados com alta carga, havia menor percentual de positividade aos testes cutâneos de alergia, quando comparados com indivíduos não infectados ou infectados com baixa carga (ARAUJO et al., 2000). A gravidade da asma foi avaliada em asmáticos residentes nesta região, comparando-se com asmáticos não infectados residentes em uma área rural próxima e uma área urbana com as mesmas condições sócio-econômicas. Os autores demonstraram menor frequência de sintomas de asma e achados anormais no exame físico, além de menor necessidade do uso de drogas anti-asmáticas no grupo de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* em relação aos outros dois grupos (MEDEIROS et al., 2003). Além disso, foi demonstrado também que os indivíduos das três diferentes regiões estavam igualmente expostos a alérgenos da poeira doméstica (MEDEIROS et al., 2003). Diante destes resultados, no presente estudo, foram avaliados mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune em asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni*.

Sabe-se que as citocinas do tipo Th2, a exemplo da IL-4 e IL-5, são envolvidas na patogênese da asma, e que a IL-10 é uma citocina capaz de inibir a resposta inflamatória alérgica (ROYER et al., 2001). Portanto, os objetivos principais deste estudo foram avaliar o perfil de citocinas específicas para aeroalérgenos produzidas por células mononucleares de

indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* e avaliar o papel da IL-10 na modulação da resposta imune destes indivíduos. Para a realização deste estudo, foram selecionados indivíduos residentes em uma área endêmica em helmintos, incluindo *S. mansoni*. Nessa área, as condições sanitárias são precárias e os indivíduos relatavam dificuldade de acesso a serviços médicos, não havendo relatos de tratamento prévio dessas infecções. Asmáticos não infectados por helmintos, provenientes do Ambulatório de Alergia do HUPES-UFBA, Salvador-Bahia, participaram como grupo controle neste estudo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Resposta imune na infecção por *Schistosoma mansoni*

As infecções crônicas por helmintos são altamente prevalentes em países em desenvolvimento, porém um pequeno percentual de indivíduos infectados por helmintos desenvolve doença, os sintomas são geralmente leves e, no caso particular da infecção por *S. mansoni*, menos de 5% dos infectados evoluem para forma hepato-esplênica da esquistossomose (BINA & PRATA, 2003). Com o tratamento em larga escala da população, as formas graves da esquistossomose vêm tornando-se mais raras, embora a prevalência tenha se mantido elevada nas áreas endêmicas (BINA, 1997; BOISIER et al., 1998; BUTTERWORTH, 1998). Classicamente, as formas clínicas da esquistossomose são divididas em forma aguda e formas crônicas - intestinal, hepato-intestinal e hepato-esplênica (BINA, 1997). Enquanto que a forma crônica é assintomática na maioria dos indivíduos infectados, a forma aguda tem sido descrita como uma síndrome toxêmica que ocorre seis a oito semanas após a primeira exposição ao *S. mansoni*, associada a passagem dos esquistossômulos pelos pulmões (LAMBERTUCCI, 1993; RABELLO et al., 1997; DE JESUS et al., 2002). Esta forma da esquistossomose constitui-se um importante problema em indivíduos não imunes, residentes em regiões urbanas que são expostos pela primeira vez à infecção, enquanto que indivíduos residentes em áreas endêmicas não apresentam a forma aguda da doença, sugerindo a existência de uma modulação da resposta imune que previne o aparecimento destas manifestações nos indivíduos previamente infectados (LAMBERTUCCI, 1993; RABELLO, 1995; WYNN et al., 1998). Clinicamente, os indivíduos com a forma aguda apresentam sintomas inespecíficos, como febre, astenia, mal estar, cefaléia, calafrios, mialgia, distúrbios cardio-respiratórios e gastro-intestinais, além de anormalidades laboratoriais, como uma intensa eosinofilia. Este quadro está relacionado com uma marcante

resposta pró-inflamatória com a produção elevada das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, além de IFN- $\gamma$ , e baixos níveis de IL-4 e IL-5 (WYNN et al., 1998; MONTENEGRO et al., 1999; de JESUS et al., 2002).

Em contraste, a resposta imune na esquistossomose crônica, tanto em humanos como em modelo experimental, é caracterizada por baixa produção de IFN- $\gamma$  e por altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, indicando predominância da resposta imune do tipo Th2 (GAZZINELLI et al., 1992; WILLIAMS et al., 1994; SABIN et al., 1996; FINKELMAN et al., 1997; MWATHA et al., 1998). Como consequência da resposta Th2, existe aumento da produção de IgE, do número de eosinófilos e mastócitos. Os antígenos parasitários funcionam como potentes alérgenos (KENNEDY et al., 1986; FRASER et al., 1993) e isso poderia explicar os níveis elevados de IgE policlonal e IgG4 encontrados nos indivíduos infectados em área endêmica (OTTESEN et al., 1981; JARRETT et al., 1982; HUSSAIN et al., 1992). A supressão da resposta do tipo Th1 que ocorre na fase aguda da infecção pelo *S. mansoni* em modelo experimental decorre da presença da IL-10, induzida pelos antígenos dos ovos do parasita (GRZYCH et al., 1991). O papel da IL-10 na modulação da resposta Th1 específica para antígenos de verme adulto do *S. mansoni* foi demonstrada em experimento no qual a neutralização da IL-10 pelo uso de anticorpo monoclonal contra esta citocina em culturas de células de sangue periférico, resultou em restauração da produção de IFN- $\gamma$  (SABIN et al., 1996).

Enquanto a resistência à reinfecção pelo *S. mansoni* parece depender tanto da presença de IgE (RIHET et al., 1992) quanto de IFN- $\gamma$  (MWATHA et al., 1998), a patogênese da esquistossomose parece estar relacionada com a presença de IL-4, TGF- $\beta$  e, principalmente, IL-13 (WYNN et al., 1995; FINKELMAN et al., 1999).

A intensa resposta imune do tipo Th2 na fase crônica da infecção pelo *S. mansoni* pode resultar em alteração da resposta a vacinações. SABIN et al. (1996), demonstraram que indivíduos infectados pelo *S. mansoni* quando vacinados com o toxóide tetânico respondem com produção de IL-4 e pouca produção de IFN- $\gamma$ , enquanto indivíduos não infectados pelo *Schistosoma* respondem basicamente com síntese de IFN- $\gamma$ . Além de interferir na resposta imune para antígenos não relacionados, a infecção pelo *Schistosoma* pode interferir na alergia.

## 2.2 Resposta imune nas alergias

A atopia, caracterizada também por aumento dos níveis de IgE, do número de eosinófilos e mastócitos é a base de doenças alérgicas como a asma, rino-conjuntivite e o eczema atópico (YAZDANBAKHSI et al., 2002). A asma alérgica é uma inflamação crônica das vias aéreas brônquicas, caracterizada por episódios de obstrução reversível e intermitente das vias aéreas. A resposta inflamatória na asma causa hiperreatividade brônquica a uma variedade de estímulos, ocorrendo na submucosa das vias aéreas uma infiltração de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares (YSSEL et al., 2001). O desencadeamento da doença está associado com a interação de aeroalérgenos com IgE ligada a seus receptores de alta afinidade em superfícies de mastócitos e basófilos, resultando na liberação de mediadores solúveis como a histamina e leucotrienos (PLATTS-MILLS et al., 1996).

A interação de alérgenos do ambiente com as células apresentadoras de antígeno e subsequente ativação de células T leva à produção de citocinas como a IL-4, IL-5 e IL-13 que estimulam a síntese de IgE e o aumento do número de eosinófilos e mastócitos. (HOLT et al., 1999).

Muitas células presentes na mucosa brônquica, incluindo células T, eosinófilos, mastócitos, macrófagos, células epiteliais, fibroblastos e também células do músculo liso, são



envolvidas no processo inflamatório da asma. Porém, são os basófilos, mastócitos e eosinófilos ativados, as células de maior importância na inflamação alérgica devido à liberação de proteínas catiônicas granulares de alta carga, como a proteína básica principal do eosinófilo, proteína catiônica eosinofílica e mediadores pró-inflamatórios que, juntamente com radicais de oxigênio livre e citocinas, resultam em aumento da permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, contração da musculatura lisa, dano epitelial e hiperreatividade brônquica (GLEICH et al., 1993). As alterações na integridade do epitélio brônquico resultantes são constituintes do remodelamento e inflamação que interferem na arquitetura das vias aéreas, levando à persistência da doença observada em alguns pacientes (KUMAR, 2001; COHN et al, 2004).

Embora a asma seja uma doença complexa e multifatorial, é bem conhecido o papel fundamental das células Th2 na imunopatogenia da mesma (WILLS-KARP, 1999). São estas as células que secretam a IL-4 e IL-13 que induzem e mantêm a produção de IgE por células B e IL-5 que induz o recrutamento, diferenciação e infiltração de eosinófilos na mucosa brônquica (FOSTER et al., 1996). Além das ações acima referidas, a IL-4, que é também produzida por mastócitos ativados, é um fator de diferenciação para células Th2, perpetuando o processo inflamatório (YSSEL et al., 2001). Além das células TCD4<sup>+</sup> do tipo Th2, subpopulações de células Th1 ativadas que produzem IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  contribuem para a reação inflamatória associada ao dano tecidual na asma (ABBAS et al., 1996).

Estes dados, juntamente com estudo recente que demonstrou que a administração de células Th1 produtoras de IFN- $\gamma$  em modelos murinos de inflamação alérgica causa intensa inflamação neutrofílica das vias aéreas, reforça a idéia de que a regulação do sistema imune nas doenças inflamatórias não resulta de um simples desequilíbrio entre as presenças de subpopulações de células Th1 e Th2 (HANSEN et al., 1999; RANDOLPH et al., 1999).

Embora doenças alérgicas e infecções por helmintos estejam associadas à estimulação da produção de células do tipo Th2, existem evidências de que a hipersensibilidade imediata e a

inflamação alérgica podem ser moduladas pela presença da parasitose (LYNCH et al., 1993; ARAUJO et al., 2000; NYAN et al., 2001; COOPER et al., 2003).

### 2.3 Associação entre alergia e helmintíase

Nas últimas três décadas, vem sendo observado aumento na prevalência de doenças alérgicas em países industrializados em relação aos países em desenvolvimento (SEARS, 1997; WHO, 1998), onde baixas condições sanitárias propiciam uma maior prevalência de parasitoses intestinais e doenças próprias da infância. Existem na literatura dados que sugerem que a baixa exposição de crianças a patógenos indutores da resposta do tipo Th1, a exemplo de infecções virais e bacterianas, favoreceria o desenvolvimento de doenças alérgicas; é a chamada “hipótese da higiene” (STRACHAN, 1989). Há ainda diferença entre as prevalências de doenças alérgicas entre áreas urbanas e rurais em um mesmo país, como demonstrado por Yemaneberhan et al. (1997), em estudo realizado na Etiópia.

Uma outra hipótese para explicar a baixa prevalência de atopia em países em desenvolvimento e em áreas rurais seria a alta frequência de infecções parasitárias nestas regiões. Trabalhos realizados na Venezuela, evidenciaram baixa positividade aos testes cutâneos de alergia em população exposta à infecção por *Ascaris lumbricoides* (HAGEL et al., 1993), havendo aumento da reatividade aos testes após o tratamento com anti-helmíntico (LYNCH et al., 1993). Classificando a população infectada por geohelmintos, de acordo com a carga parasitária, Lynch et al. (1987), demonstraram que a baixa carga parasitária estava associada à alta reatividade cutânea a aeroalérgenos, enquanto que indivíduos com alta carga parasitária apresentavam menor reatividade cutânea a despeito de elevados níveis de IgE específico para ácaros. Outros autores em trabalhos mais recentes vêm demonstrando semelhantes resultados. Em estudo realizado no Gabão (África), apenas 11% das crianças em idade escolar reagiram ao

antígeno de ácaro no teste cutâneo de leitura imediata, embora 32% apresentassem IgE específica para ácaros da poeira domiciliar (BIGGELAAR et al., 2000). Cooper et al. (2003), avaliando 2865 crianças em idade escolar residentes em área endêmica em infecção por geohelmintos no Equador, demonstraram baixa positividade ao teste cutâneo de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos.

Diminuição da prevalência da reatividade cutânea para aeroalérgenos foi também observada em indivíduos residentes em área endêmica em esquistossomose no Brasil (ARAÚJO et al., 2000). Um estudo anterior realizado neste país demonstrou tendência a menor prevalência de asma em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (CATAPANI et al., 1997).

Com relação à gravidade das doenças alérgicas, existem trabalhos sugerindo que a asma é mais leve em indivíduos infectados por geohelmintos (NYAN et al., 2001; SCRIVENER et al., 2001; WALRAVEN et al., 2001). Em estudo realizado com populações de três diferentes áreas no Estado da Bahia, uma delas endêmica em infecção por *S. mansoni*, com o objetivo de avaliar o papel da infecção na gravidade de asma, foi demonstrada menor gravidade em indivíduos residentes na área endêmica em *S. mansoni* quando comparados a asmáticos residentes em área rural próxima e em uma favela de Salvador-Bahia, não endêmicas em esquistossomose (MEDEIROS et al., 2003). Todas as áreas no referido estudo eram constituídas por populações de baixo nível socio-econômico e os indivíduos estavam igualmente expostos a altos níveis de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar, bem como a infecções por geohelmintos e protozoários, o que sugere que a infecção pelo *S. mansoni* modula a expressão clínica da asma (MEDEIROS et al., 2003). Corroborando com estes dados, em estudo realizado na área endêmica no município do Conde-Bahia, Almeida (2004), demonstrou que indivíduos infectados pelo *S. mansoni* apresentavam formas leves da asma e que após o tratamento com anti-helmínticos houve piora nas manifestações clínicas da doença.

### **2.3.1 Mecanismos envolvidos na modulação da resposta alérgica em indivíduos infectados por helmintos**

Para que ocorram sintomas clínicos de alergia é necessário a presença de mediadores inflamatórios, a exemplo da histamina e leucotrienos, resultantes da degranulação dos mastócitos e basófilos. Este processo é iniciado pela interação do alérgeno com pelo menos duas frações Fab de anticorpos da classe IgE, ligados em receptores de alta afinidade na superfície de mastócitos e basófilos (HOLT et al., 1999). Infecções helmínticas estão geralmente associadas à elevada produção de IgE policlonal e do anticorpo bloqueador IgG4, o que levantou algumas hipóteses para explicar a menor frequência de positividade aos testes alérgicos em populações infectadas por helmintos. Estas hipóteses incluem: competição entre IgE policlonal induzida por helmintos e IgE específica para aeroalérgenos pelos receptores de alta afinidade presentes na superfície de mastócitos (GODFREY, 1975; MERRETT et al., 1976; LYNCH et al., 1987; LYNCH et al., 1993); inibição da síntese de IgE específica para aeroalérgenos pelos altos níveis de IgE policlonal (LYNCH et al., 1987; LYNCH et al., 1993); altas concentrações do anticorpo bloqueador IgG4, que competiria com IgE pela ligação com o alérgeno (HUSSAIN et al., 1992) e altos níveis de citocinas regulatórias, a exemplo da IL-10 e TGF- $\beta$ , produzidos durante a infecção por helmintos, que levaria a modulação da resposta imune para outros antígenos (YAZDANBAKHSI et al., 2001).

A hipótese de que níveis elevados de IgE interferiria na positividade aos testes cutâneos não foi confirmada em trabalhos que mostraram maior percentual de indivíduos produtores de IgE específico para aeroalérgeno entre os respondedores a estes antígenos nos testes cutâneos de leitura imediata (LYNCH et al., 1993; BIGGELAAR et al., 2000; SCRIVENER et al., 2001). Além disso, em estudo realizado por Araujo et al. (2000), não foi observada diferença

significativa nos níveis de IgE total e específica para *D. pteronyssinus* entre indivíduos infectados por *S. mansoni* com baixa ou alta carga parasitária, que responderam diferentemente no teste cutâneo de hipersensibilidade imediata, ou seja, no grupo de indivíduos infectados com alta carga parasitária, houve uma menor positividade aos testes cutâneos.

O aumento da produção de IgG4 vem sendo apontado como um possível mecanismo envolvido na melhora clínica de pacientes atópicos durante imunoterapia específica com alérgenos (EBNER et al., 1997; PLATTS-MILLS et al., 2001). Entretanto, a ausência de reatividade cutânea para alérgenos em indivíduos parasitados por helmintos não foi associada com a elevação nos níveis de IgG4 em estudo recente realizado no Gabão (BIGGELAAR et al., 2002).

Existem dados que demonstram a participação da IL-10 na diferenciação para a IgG4 (JEANNIN et al., 1998), e altos níveis de IL-10 são encontrados em indivíduos cronicamente infectados por helmintos (ARAUJO et al., 1996; GEIGER et al., 2004) e em pacientes que receberam imunoterapia específica para alérgeno (AKDIS et al., 1998), condições que estão associadas com altos níveis de IgG4. A IL-10 pode participar da modulação da resposta a alérgenos por outros mecanismos, como demonstrado por Royer et al. (2001) que observaram inibição da liberação de histamina por mastócitos na presença da IL-10.

### **2.3.2 Papel da IL-10 na modulação da resposta imune**

A produção de IL-10 induzida pelos antígenos de ovos do *S. mansoni* está envolvida na mudança da resposta do tipo Th1, na esquistossomose experimental, para o tipo Th2 (GRZYCH et al., 1991). Na esquistossomose humana, a resposta imune na fase aguda é também do tipo Th1 (GRZYCH et al., 1991; DE JESUS et al., 2002) e é possível que a modulação da resposta para o tipo Th2 seja dependente da produção de IL-10 (SHER et al., 1991).

Infecções por helmintos têm mostrado influência na modulação da resposta imune contra antígenos heterólogos (SABIN et al., 1996). Os mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda não estão bem elucidados. Trabalhos sobre a resposta imune ao PPD (proteína purificada derivada de *Mycobacterium tuberculosis*) e ao toxóide tetânico têm mostrado que, em indivíduos com infecção por helmintos, as respostas são fracas à esses antígenos, quando comparados com indivíduos sadios (SABIN et al., 1996; COOPER et al., 1998; ELIAS et al., 2001). O efeito imunossupressor das infecções por helmintos podem ser transferido ao feto, *in útero*. Neste sentido foi demonstrado que crianças nascidas de mães infectadas com filariose ou com esquistossomose, respondem pobremente à vacinação com o BCG (MALHOTRA et al., 1999).

A IL-10 é a principal citocina regulatória da resposta inflamatória (AKDIS et al., 2001). Foi descrita originalmente em 1989 por Fiorentino e colaboradores, é produzida principalmente por macrófagos e células Th2 CD4<sup>+</sup> e, a despeito do seu papel modulador ser predominantemente enfatizado na resposta do tipo Th1, esta citocina possui também a capacidade de modular a resposta do tipo Th2 (FIORENTINO et al., 1989; DEL PRETE et al., 1993; OH et al., 2002). Estudos em área endêmica em *S. mansoni*, têm demonstrado que indivíduos com esquistossomose crônica produzem citocinas do tipo Th2, incluindo a IL-10, e não produzem IFN- $\gamma$  (ARAUJO et al., 1994; de JESUS et al., 1993) Posteriormente, foi demonstrado que a IL-10 regula a produção de IFN- $\gamma$  e que a neutralização desta citocina com o uso do anticorpo monoclonal anti-IL-10 restaurou a linfoproliferação e a produção de IFN- $\gamma$  em pacientes esquistossomóticos (ARAUJO et al., 1996). Uma vez que a IL-10 pode promover uma diminuição da liberação de histamina e de outros mediadores pelos mastócitos (ROYER et al., 2001), e que a resposta imune a antígenos de *S. mansoni* leva à produção de IL-10, é possível que indivíduos residentes em áreas endêmicas em esquistossomose, devido à estimulação crônica do sistema imunológico e desenvolvimento de mecanismos regulatórios, possuam

menor reatividade cutânea aos testes alérgicos e menos sintomas de asma. Essa hipótese é reforçada por estudos de Biggelaar et al. (2000), que mostraram redução da reatividade cutânea aos testes alérgicos com *D. pteronyssinus* em crianças africanas infectadas com *Schistosoma haematobium* e aumento de IL-10 em sobrenadante de cultura de células destes pacientes estimulados com antígenos de *Schistosoma*.

A indução de uma potente rede regulatória anti-inflamatória causada pela persistência do estímulo imunológico na infecção crônica por helmintos parece ser a melhor explicação para a inversa associação entre infecções por helmintos e alergia (YAZDANBAKHSI et al., 2001; COOPER, 2002; YAZDANBAKHSI et al., 2002). Os mecanismos da modulação da resposta alérgica incluiriam a produção de níveis elevados de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 por células Th2 estimuladas por antígenos parasitários (BIGGELAAR et al., 2000), ou a indução de células T regulatórias, a exemplo de células T "helper" 3 (Th3) ou T regulatória tipo 1 (Tr1), que poderiam inibir diretamente a resposta a alérgenos ambientais ou produzirem as citocinas modulatórias IL-10 e/ou TGF- $\beta$  (WILLS-KARP et al., 2001). Estas células podem ser geradas por repetidas estimulações antigênicas na presença de IL-10 (GROUX et al., 1997) e as citocinas produzidas são diferentes do padrão Th1 e Th2, havendo predomínio da produção de IL-10 e TGF- $\beta$  nas células Th3 e de IL-10 nas células Tr1 (GROUX et al., 1997; LEVINGS et al., 2000).

Deste modo, a hipótese que foi testada, no presente estudo, é de que a infecção por *S. mansoni* induz mecanismos regulatórios da resposta imune, através da produção de IL-10, resultando na menor frequência de positividade aos testes alérgicos e menor gravidade de asma.

### 3 JUSTIFICATIVA

A inibição da resposta ao teste cutâneo de alergia e a redução da gravidade da asma que ocorrem em indivíduos infectados por helmintos, têm sido demonstrado em alguns estudos já publicados, entretanto, os mecanismos desta modulação ainda não estão bem esclarecidos. As respostas imunes na helmintíase e na alergia são bem caracterizadas como sendo do tipo Th2, mas, quando estas duas patologias estão presentes em um mesmo indivíduo, é possível que exista uma alteração destas respostas. A infecção por helmintos poderá induzir mecanismos regulatórios, a exemplo da produção de IL-10, capazes de modular a resposta alérgica. Portanto, neste estudo, foram avaliados a resposta imune de indivíduos asmáticos infectados ou não por helmintos, incluindo *S. mansoni* e o efeito da IL-10 na modulação desta resposta.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Caracterizar a resposta imunológica para aeroalérgeno em indivíduos asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni*, comparando-se com a resposta imunológica de indivíduos asmáticos não infectados por helmintos.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a produção de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), do tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) e da citocina regulatória IL-10, em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico estimuladas com antígeno de *Dermatophagoides pteronyssinus*;
2. Determinar o papel da IL-10 na resposta imune específica para antígeno de *D. pteronyssinus*;
3. Analisar a produção de IL-10 após o tratamento anti-helmíntico no grupo de asmáticos infectados;
4. Estabelecer a fonte produtora de IL-10 após estimulação das células com antígeno de *D. pteronyssinus*;
5. Avaliar a resposta ao teste cutâneo de leitura imediata a aeroalérgenos;
6. Avaliar a produção de IgE específica para *D. pteronyssinus*;
7. Determinar a fauna acarina e os níveis do alérgeno 1 do ácaro *D. pteronyssinus* (Der p1) em amostras de poeira domiciliar dos indivíduos residentes na área endêmica em helmintíases.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Seleção de indivíduos asmáticos de área endêmica e não endêmica em helmintíases

Este estudo foi desenvolvido no município do Conde, Bahia, localizado ao norte, a 300 km de Salvador. A área de trabalho compreendem cinco comunidades, totalizando cerca de 1500 habitantes. As condições sanitárias da região são precárias, estando os moradores sob alto risco de infecções parasitárias. A principal fonte de renda da população é a pesca e a água dos rios é também utilizada para banho, lavagem de roupas e utensílios, além do lazer. O acesso da população a serviços de saúde, até o início deste estudo, era difícil e não havia relatos de tratamentos prévios com anti-helmínticos.

Um questionário dirigido (ANEXO I), baseado no International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) (MEDEIROS et al., 2003) que avalia a existência de história pessoal de asma brônquica e rinite alérgica nos últimos 12 meses, além de história familiar de atopia, patologias concomitantes, condições de habitação e poluentes intra-domiciliares, foi aplicado em 1064 habitantes daquelas vilas. Trinta e três indivíduos dos que responderam positivamente ao quesito relativo à história pessoal de asma brônquica nos últimos 12 meses, preencheram os critérios de inclusão referidos abaixo. Os pacientes foram admitidos no estudo por ordem de atendimento ao recrutamento (Grupo 1). O tamanho amostral foi escolhido por conveniência. Foram selecionados para compor o grupo controle (Grupo 2) dez indivíduos com asma brônquica e idade entre 6 e 40 anos, provenientes do Ambulatório de Alergia do Hospital Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, sem evidências de infecção por helmintos em três amostras de fezes e com baixas condições sócio-econômicas.

### 5.1.1 Critérios de inclusão

1. Indivíduos com história de asma brônquica nos últimos 12 meses, a partir da aplicação do questionário ISAAC modificado (ANEXO I);
2. Idade entre 6 e 40 anos;
3. Indivíduos com asma leve, de acordo com os critérios de classificação de gravidade da asma (CONSENSO, 2002);
4. Para compor o Grupo 1, presença de infecção pelo *S. mansoni*, demonstrada por meio de exame parasitológico positivo em, pelo menos, uma das três amostras de fezes analisadas e para seleção do Grupo 2, ausência de infecção por helmintos nas três amostras de fezes examinadas.

### 5.1.2 Critérios de exclusão

Não foram admitidos no estudo:

1. Indivíduos com idade inferior a 6 anos e superior a 40 anos; Crianças menores de seis anos não entraram no estudo pela dificuldade na realização do teste cutâneo e espirometria e adultos acima de 40 anos não participaram devido ao risco aumentado de apresentarem doença pulmonar crônica de outras etiologias que não fosse alérgica.
2. Indivíduos que tinham feito uso de uma das seguintes drogas:
  - a. Anti-histamínicos nas últimas 72 horas da inclusão, à exceção de Cetotifeno e de Astemizol, que deveriam ser interrompidos 30 dias antes da inclusão no estudo, pela possibilidade de interferência com os testes cutâneos;

- b. Corticosteróides e anti-leucotrienos nos últimos 30 dias da inclusão, pela possibilidade de interferir na avaliação da resposta imune;
- c. Beta-bloqueadores ou inibidores da enzima da angiotensina convertase, nos últimos sete dias da inclusão, pela possibilidade de potencializar reações alérgicas durante a execução dos testes alérgicos;

3. Indivíduos com forma hepato-esplênica da esquistossomose, identificados pelo exame clínico;

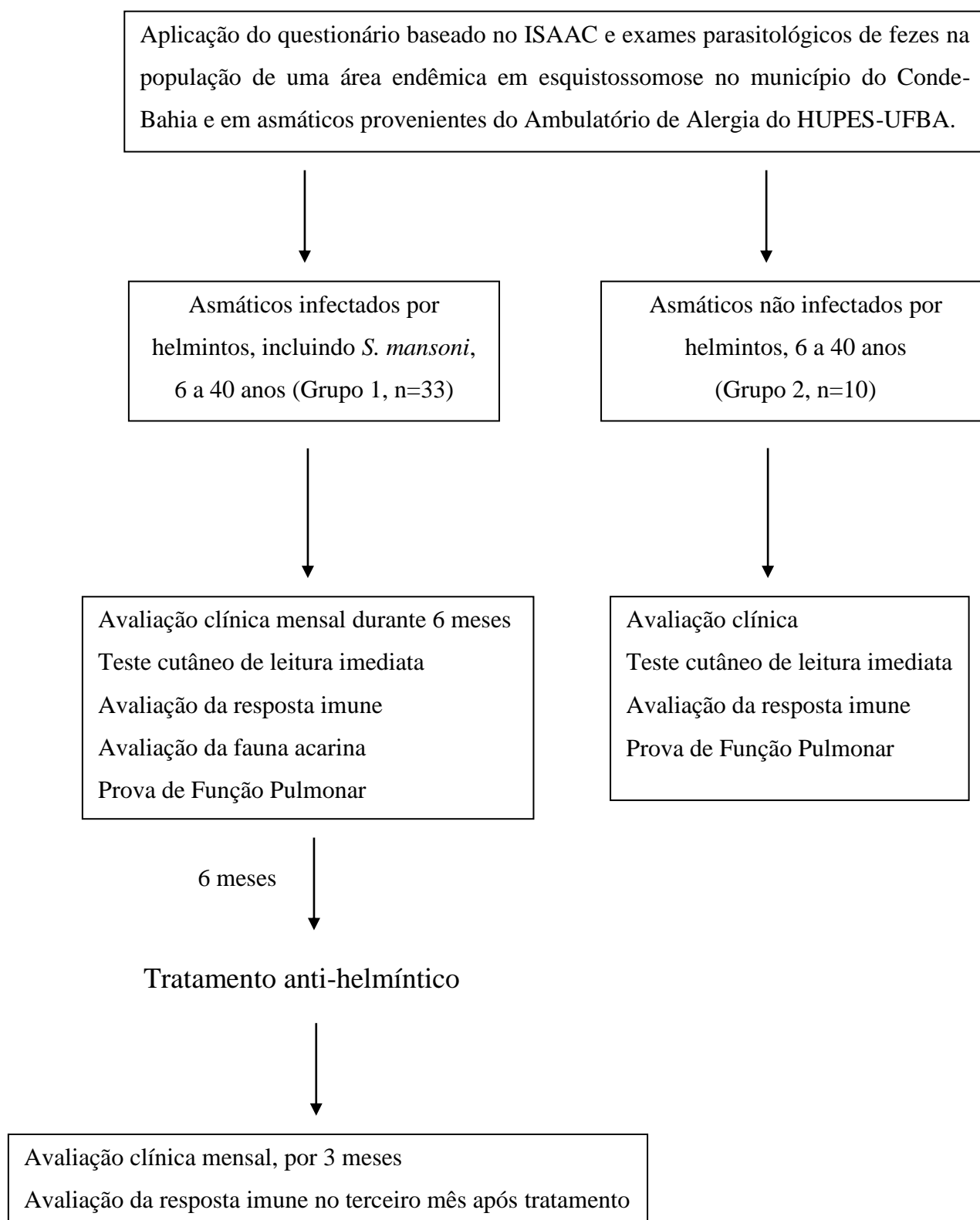
4. Indivíduos portadores de dermatoses nas áreas selecionadas para testes cutâneos, gestantes e aqueles que apresentaram alguma condição que não permitisse estrita colaboração, por ocasião da realização dos exames.

Na inclusão no estudo, os indivíduos do Grupo 1 foram submetidos a: avaliação clínica por dois médicos distintos, que foi repetida mensalmente, durante seis meses; teste cutâneo de leitura imediata para aeroalérgenos; coleta de amostras de sangue para avaliação da resposta imune, através da dosagem de citocinas IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e expressão de IL-4 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e fonte celular produtora de IL-10, além da dosagem de IgE sérica específica para *D. pteronyssinus*; prova de função pulmonar e coleta de amostra de poeira domiciliar. Após seis meses, foram tratados com Albendazol 400 mg, dose única e Oxamniquine (25 a 30mg/kg), dose única, e reavaliados através de exames clínicos mensais por mais três meses. No terceiro mês após o tratamento anti-helmíntico, foram submetidos a nova coleta de sangue para dosagem de IL-10 em sobrenadantes de cultura de CMSP.

Os indivíduos asmáticos não infectados por helmintos selecionados (Grupo 2) foram submetidos a avaliação clínica inicial, a testes cutâneos de leitura imediata para aeroalérgenos, prova de função pulmonar e coleta de amostras de sangue para avaliação da resposta imune através da dosagem de citocinas em sobrenadantes de CMSP e fonte celular produtora de IL-10.



## 5.2 Desenho do estudo



### 5.3 Avaliação complementar

#### 5.3.1 Exame parasitológico de fezes

Os indivíduos selecionados para inclusão no estudo foram submetidos a exames parasitológico de fezes (três amostras), por meio da técnica da sedimentação espontânea de Hoffmann-Pons-Janer para a determinação de infecção parasitária por helmintos e protozoários intestinais, e pela técnica de Kato-Katz para avaliação da carga parasitária de helmintos (KATZ et al., 1970).

#### 5.3.2 Testes alérgicos

Todos os indivíduos incluídos no estudo foram submetidos a testes cutâneos de leitura imediata pela técnica de puntura (DREBORG, 1993), aplicados na área da face anterior do antebraço. Foram testados os alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*, *Periplaneta americana*, *Blatella germanica* e fungos anemófilos (mistura), além de duas soluções controle, uma positiva, contendo solução milesimal de histamina e outra negativa, contendo apenas a solução diluidora dos extratos e do controle positivo, constituído por uma solução salina fisiológica, contendo glicerina a 40% (IPI-ASAC, Espanha).

As leituras dos testes foram realizadas após 20 minutos e a área de resposta ao teste, representada pela formação de uma pápula, foi demarcada com uma caneta hidrográfica e um simples ponto foi feito em locais onde não houve reação. O resultado foi copiado em fita transparente e colado na ficha de registro de teste de cada um dos indivíduos (ANEXO II). As

reações cutâneas foram consideradas positivas quando a média do diâmetro da pápula obtida foi maior ou igual a 3mm (DREBORG, 1993). Os testes cutâneos de leitura imediata foram considerados positivos quando pelo menos um dos cinco antígenos testados induziram uma resposta cutânea positiva.

### **5.3.3 Dosagem de IgE específica para *Dermatophagoides pteronyssinus***

A presença de IgE específica para *D. pteronyssinus* foi determinada em 32 dos 33 indivíduos infectados por *S. mansoni* (Grupo 1), por meio da técnica de fluoroimunoensaio, realizado em laboratório privado. Os níveis de IgE específica foram determinados em classes, de acordo com a comparação entre a absorbância da amostra em estudo e as do soro de referência: Classe 0, menor que 0,35 kU/l; Classe 1, de 0,35 a 0,70 kU/l; Classe 2, de 0,71 a 3,5kU/l; Classe 3, de 3,51 a 17,5 kU/l; Classe 4, de 17,51 a 50,0 kU/l; Classe 5, de 50,1 a 100,0 kU/l e Classe 6, acima de 100,0 kU/l. Foram considerados positivos, os resultados acima de 0,71 kU/l (classe 2).

### **5.3.4 Prova de função pulmonar**

Os participantes do estudo foram submetidos na inclusão do estudo a avaliação da função pulmonar, constituída de um teste inicial e repetido 15 minutos após a indução de broncodilatação com 400 µg de Salbutamol micronizado por via inalatória. Utilizou-se um espirômetro computadorizado (Vitalograph, USA), no qual os valores basais preditivos da população brasileira estavam previamente ajustados (PEREIRA, 1992). Os valores pré e pós-broncodilatador do FEV1 (volume expiratório forçado no primeiro segundo) foram comparados



para avaliar a resposta ao fármaco, determinando-se a intensidade do broncoespasmo e, conseqüentemente, possibilitando classificar a gravidade da asma em leve, moderada ou grave.

#### 5.4 Avaliação da resposta imune

##### 5.4.1 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas por meio do gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas para concentração de  $3 \times 10^6$  células/ml em RPMI 1640, contendo 10% de soro AB<sup>+</sup> humano normal inativado, penicilina 100U/ml, estreptomicina 100 µl/ml, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES (Life Technologies GIBCO BRL, USA).

As células ( $3 \times 10^6$  células/ml) foram estimuladas com 25 µg do antígeno 1 de *D. pteronyssinus* (Der p 1, IPI-ASAC, Espanha) na presença ou ausência de IL-10 recombinante humano (rhIL-10) ou anticorpo anti-IL-10 na concentração de 50 ng/ml, ou com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) na diluição final de 1:100. As células foram cultivadas em placas de 24 poços, por 72h à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados e mantidos a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Adicionalmente, as células obtidas após o cultivo e coleta do sobrenadante, foram utilizadas para avaliação da expressão de IL-4 por PCR.

#### **5.4.2 Avaliação da produção de citocinas**

Os níveis de IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de culturas de CMSP foram determinados pela técnica de ELISA sanduíche utilizando-se reagentes comercialmente disponíveis (R&D Systems, USA). Uma curva padrão foi usada para expressar os resultados em pg/ml.

#### **5.4.3 Avaliação da expressão de IL-4 por PCR**

A técnica de RT-PCR foi utilizada para avaliar a expressão de IL-4 em células mononucleares do sangue periférico. Em resumo, após coleta do sobrenadante das culturas de 72 horas, as células foram lisadas em RNazol e o RNA foi preparado de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen CO, USA). O cDNA foi obtido a partir de 1  $\mu$ g de RNA, usando-se um kit de síntese de fita simples de cDNA (Invitrogen CO, USA). O PCR específico para IL-4 foi realizado utilizando-se “primers” de oligonucleotídeos específicos para citocinas (35 ciclos: 1min a 94 °C, 2 min a 55 °C, 3 min a 72 °C). Os produtos do PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Tampão TBE 0,5 %, 120V). Os géis corados com EtBr (Brometo de Etídio) foram revelados digitalmente (UVP Labworks Laboratory Imaging and Analysis System, UVP Inc.,USA).

#### 5.4.4 Avaliação da expressão de IL-10 intracelular

A expressão de IL-10 intracelular em CMSP foi analisada como descrito por Sornase et al. (1996). Em resumo, suspensões com  $3 \times 10^5$  células foram incubadas em placas de 96 poços por 16 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> na presença ou ausência do antígeno Der p 1 (concentração final 25µg/ml). Após a incubação, foram adicionados 20µl/poço de Brefeldina dez vezes diluída em PBS pH 7,2 e realizada nova incubação sob as mesmas condições por 4 horas. As células foram então marcadas com os anticorpos monoclonais anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD14 conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e mantidas a 4°C, protegidas da luz até o dia seguinte. Após a marcação destas moléculas de superfície, as placas foram lavadas com PBS azida sódica, fixadas com 200 µl de formaldeído a 4% em PBS e mantidas a 4°C até o dia seguinte. Após esta etapa, as placas foram centrifugadas e incubadas com 150µl/poço do tampão de permeabilização, por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi feita marcação intracelular, utilizando-se anticorpo monoclonal anti-IL-10, conjugado com PE (ficoeritrina), seguido de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Foram feitas sucessivas lavagens utilizando-se o tampão de permeabilização, seguida de ressuspensão das células em 200 µl de solução de lavagem e transferência para tubos de leitura do FACS, no mesmo dia, em FACSCALIBUR (Becton Dickinson, USA). Para marcação de células que expressavam a citocina IL-10 foram adquiridos 40.000 eventos.

## 5.5 Avaliação da fauna acarina

### 5.5.1 Identificação da fauna acarina

A identificação das espécies acarinas foram realizadas em amostras de poeira, aspiradas de colchões dos indivíduos asmáticos infectados com *S. mansoni*. Essas amostras foram obtidas através da aspiração de uma área de 1 m<sup>2</sup>, adjacente ao lado habitualmente dedicado ao repouso da cabeça, com o auxílio de um aspirador de pó com potência de 1.200 W (Karscher ®, Brasil), contendo, na parte terminal, um adaptador para o filtro cilíndrico de papel, onde era retida a poeira fina. O material aspirado foi colocado em um saco plástico lacrado, etiquetado e estocado em freezer a -20° C, até a análise laboratorial.

Para a avaliação das espécies acarinas, as amostras de poeira foram peneiradas através de uma malha especial (*Standard Sieve Series A.S.T.M.*, EUA) com poros de 0,3 mm, em placa de Petri, sendo em seguida divididas em alíquotas e colocadas em tubos de ensaio para análise. A identificação das espécies de ácaros foi realizada pelo método de suspensão, adaptado por Fernández-Caldas (1997), no qual 10 mg da poeira fina é colocada em uma placa de Petri, contendo 5 ml de solução salina saturada. Depois de 5 minutos de incubação e leve agitação, todos os ácaros presentes em cada amostra foram coletados com uma agulha fina, com o auxílio de um estereoscópio e depositados em uma lâmina contendo duas gotas do meio Hoyer (5 ml de água destilada, 3g de goma arábica, 20 g de cloral hidratado e 2 ml de glicerina). A seguir, a lâmina foi coberta com lamínula e realizado a identificação das espécies com auxílio de um microscópio óptico. A identificação das espécies acarinas seguiu o critério descrito por Serravalle & Medeiros (1999), empregando-se uma chave de identificação e descrição morfológica das espécies acarinas.

### 5.5.2 Quantificação de antígeno Der p 1

O alérgeno 1 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) foi dosado através de ELISA, como descrito por Luczynska e colaboradores (1989) (LUCZYNSKA, et al. 1989). Em resumo, placas de ELISA foram sensibilizadas com 1 µg/poço de anticorpo monoclonal de camundongo anti-Der p 1 (clone 5118) em 0,06 M de PBS, pH 9,6, 4°C, durante uma noite. As placas foram lavadas com PBS pH 7,2, contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T, acrescido de 1% de albumina bovina (PBS-T-BSA), por 1 hora, à temperatura ambiente (TA). As placas foram incubadas com extratos do ácaro (diluídos a 1:5 e não diluídos) por 1 hora à TA. Após lavagem com PBS-T, foi adicionado anticorpo monoclonal biotilado de camundongo específico para Der p 1 (clone 4Cl), diluído a 1:1000. Após 1 hora de incubação à TA, foi acrescentado conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.,USA) diluído a 1:1000, seguido de nova incubação por 30 minutos à TA. Após esta etapa, foi adicionado o substrato da enzima (0,01 M de ABTS e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e a reação foi lida em 405 nm em leitor de ELISA (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, USA). Padrões de referência contendo níveis conhecidos de Der p 1 foram incluídos em cada placa para determinar as curvas padrões. A concentração de Der p 1 nas amostras de poeira foi expressa em µg/ml.

## 5.6 Análise dos dados

### 5.6.1 Estatística descritiva

Os dados foram analisados através do software Statistical Package for Social Science (SPSS®) versão 9. Os dados referentes à amostra da população estudada foram apresentados através de médias aritméticas e seus respectivos desvios padrões, ou através de porcentagens.

As frequências de positividade aos testes cutâneos nos dois grupos estudados e a frequência das espécies de ácaros presentes nas amostras de poeira e parasitas intestinais no Grupo 1, foram expressos em percentuais.

Testes não paramétricos foram utilizados para avaliar as diferenças nos níveis de citocinas. Tal escolha deveu-se ao pequeno tamanho da amostra. Foram usados o teste de Mann Whitney na comparação de níveis de citocinas entre os grupos e o teste Wilcoxon matched-pairs signed-ranks para comparar os níveis de IL-5 em cultura de CMSP na presença ou ausência de rhIL-10 e os níveis de IL-10 antes e após tratamento com anti-helmínticos.

Os resultados da expressão de IL-10 intracelular foram analisados em percentagem de positividade do total de células. A proporção de células positivas para os diferentes marcadores foi expressa em percentagem e a comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste t de Student, sendo considerado significativo um valor de  $p < 0,05$ . Os valores foram expressos em média e erro padrão médio (SEM).

A associação entre carga parasitária de *S. mansoni* e os níveis de IL-10 foi avaliada por regressão linear simples.

Todos os testes estatísticos de hipóteses foram bi-caudais, sendo considerados estatisticamente significantes valores de p inferiores ao nível de significância pré-estabelecidos em 5%.

### 5.6.2 Estatística inferencial

Principal hipótese a ser avaliada:

**H1:** A resposta imune específica para o *D. pteronissynus* entre indivíduos asmáticos parasitados por helmintos, incluindo o *S. mansoni*, difere daquela desenvolvida por asmáticos não infectados.

**H $\phi$ :** A resposta imune específica para o *D. pteronissynus* entre indivíduos asmáticos parasitados por helmintos, incluindo o *S. mansoni*, não difere daquela desenvolvida por asmáticos não infectados.

É importante notar que essa é a hipótese principal do estudo. Foram avaliadas outras diferenças entre grupos, envolvendo outras variáveis, dentro de um contexto predominantemente exploratório.

## 6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos e os seus participantes foram todos voluntários que, após esclarecimentos sobre o objetivo desta pesquisa, assinaram termo de consentimento informado (ANEXO III). No caso de menores de idade, o consentimento foi assinado por um dos responsáveis.

Os voluntários que participaram deste estudo doaram 20ml de sangue para avaliação imunológica, realizaram prova de função pulmonar e testes cutâneos por punção para diagnóstico de alergia a aeroalérgenos, colheram amostras de fezes para realização de exames parasitológicos e permitiram coleta de amostra de poeira em suas residências.

A coleta de sangue e testes cutâneos foram realizados por profissionais da área de saúde habilitados para tal. Os materiais utilizados na coleta de sangue e teste cutâneo foram descartáveis. A coleta de sangue não oferece riscos, a não ser a possibilidade de sangramento e formação de hematoma, o que é raro e pode ser contornado com compressão do local. O teste cutâneo também não oferece riscos a não ser o aumento dos sintomas alérgicos, que são raros e de intensidade leve, podendo ser rapidamente controlados com o uso de medicamentos fornecidos gratuitamente.

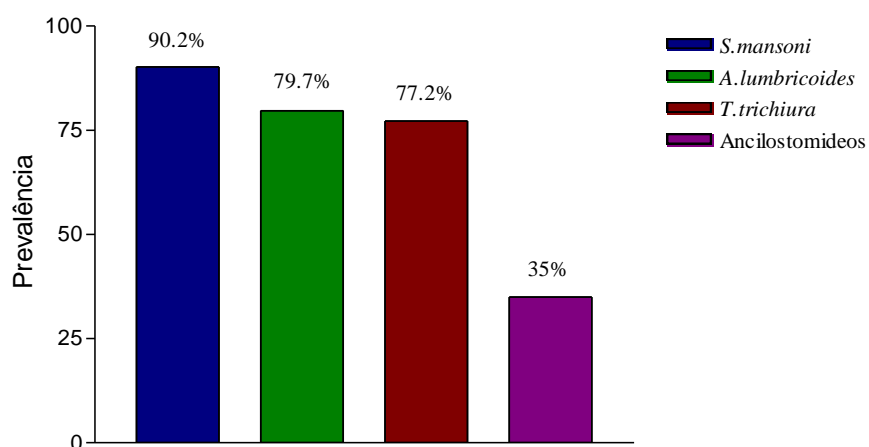
Todos os indivíduos portadores de parasitoses intestinais foram tratados, gratuitamente. Aqueles que apresentavam sintomas ou queixas de alergia foram orientados sobre medidas de controle ambiental intradomiciliar, bem como receberam prescrição medicamentosa, quando indicado.



## 7 RESULTADOS

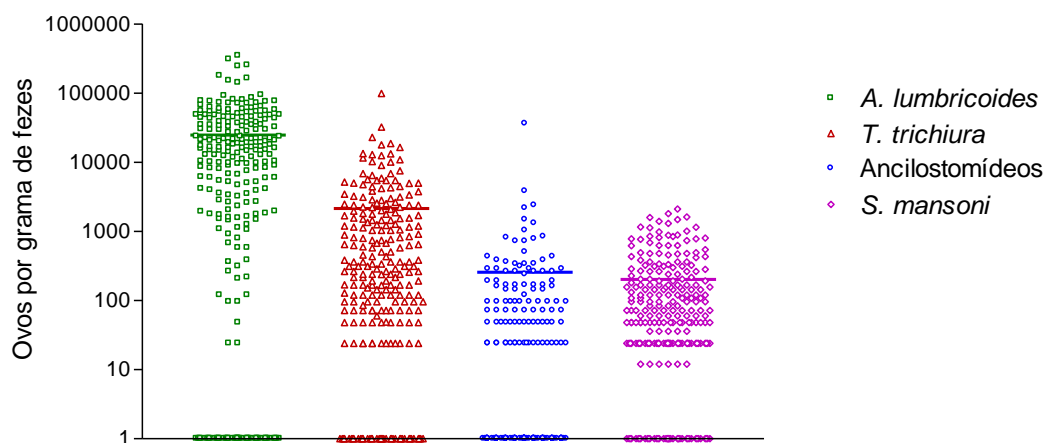
### 7.1 Prevalência de parasitose intestinal

No total, foram avaliados 1064 indivíduos quanto à presença de asma, rinite e parasitose intestinal no Município do Conde. A prevalência de infecção por *S. mansoni* nesta população foi de 90,2% (Figura 1). As prevalências de infecções por outros helmintos como *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos foram de 79,7%, 77,2% e 35% respectivamente. Protozoários intestinais como *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica* foram encontrados em torno de 50% da população.



**Figura 1.** Prevalência de parasitoses intestinais em indivíduos residentes no município do Conde-Bahia.

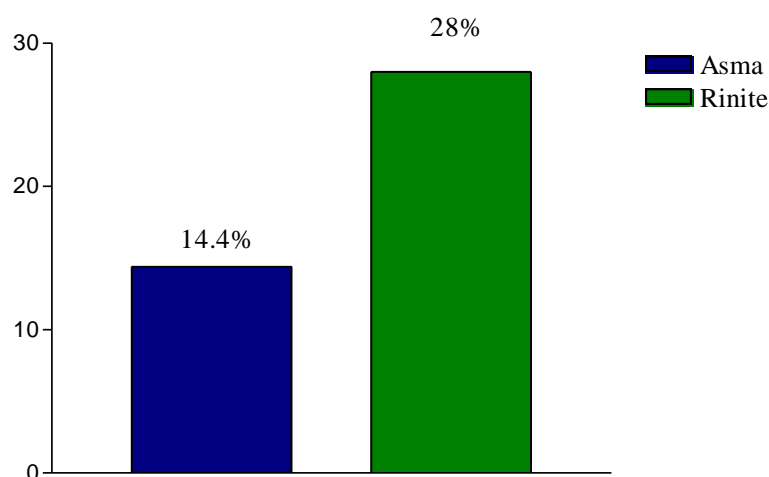
A figura 2 mostra a carga parasitária da população avaliada. O grau de infecção por *A. lumbricoides* foi bastante variável e 30% dos indivíduos tinham mais que 1000 ovos por grama de fezes, enquanto que 40% dos indivíduos estudados estavam altamente infectados por *S. mansoni* (mais que 400 ovos por grama de fezes).



**Figura 2.** Carga parasitária de indivíduos residentes no município do Conde-Bahia, avaliada pelo método de Kato-Katz.

## 7.2 Prevalência de atopia

A prevalência de asma e de rinite entre os indivíduos entrevistados foi de 14,4% e 28%, respectivamente, baseada nos dados obtidos no questionário para avaliação da atopia (ANEXO I) (Figura 3).



**Figura 3.** Prevalência de doenças alérgicas na população do Conde-Bahia, avaliada pelo questionário baseado no ISAAC.

Os asmáticos dos dois grupos apresentavam parâmetros de gravidade da asma classificada como leve, de acordo com a frequência e intensidade dos sintomas e com a função pulmonar (CONSENSO, 2002). No Grupo 1, o VEF 1 (Volume expiratório forçado no primeiro segundo) foi  $91 \pm 14,1$  L/min (média  $\pm$  DP), enquanto no grupo de asmáticos não infectados (Grupo 2), a média  $\pm$  DP foi de  $88,06 \pm 18,91$  L/min ( $p > 0,05$ ).

A tabela 1 mostra as características dos indivíduos asmáticos incluídos no estudo. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à idade e gênero entre os dois grupos de asmáticos.

**Tabela 1.** Características demográficas dos indivíduos asmáticos infectados ou não infectados com *S. mansoni* e outros helmintos.

	Infectados (n=33)	Não infectados (n=10)	Valor de p
Idade, mediana (faixa etária), anos	10 (6-34)	15,5 (6-39)	0,21
Gênero, % masculino	33,3	30	1,00
Testes cutâneos, % positivos	12,1	100	<0,0001
<i>S. mansoni</i> (ovos/g de fezes)	$100 \pm 123,8$	0	
<i>A lumbricoides</i> (ovos/g de fezes)	$13.942 \pm 22.130$	0	
IgE específico para Der p1 (kIU/L)		NR	
Positivo (classe 2)-Total/n (%)	13/32 (40,6)		
Média $\pm$ Desvio padrão	$3,38 \pm 6,58$		
Mediana	0,58		

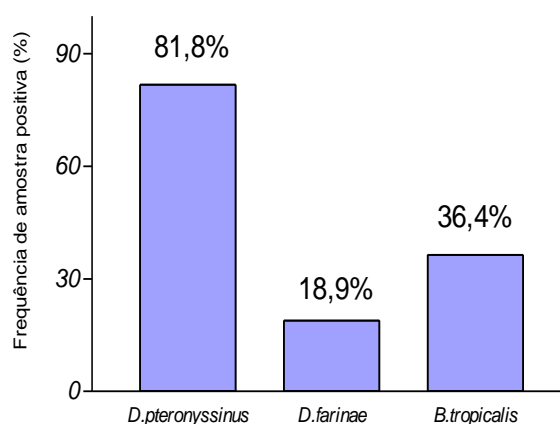
NR= não realizado

A positividade dos testes cutâneos de leitura imediata para aeroalérgenos testados foi observada em 4 de 33 (12,1%) dos indivíduos asmáticos de área endêmica em esquistossomose, enquanto que teste cutâneo positivo para aeroalérgenos foi observado em todos os asmáticos não infectados por helmintos.

IgE específica para Der p 1 foi mensurada no soro de 32 indivíduos asmáticos infectados (Grupo 1) tendo sido observados níveis maiores que 0,70 kU/L (classe 2) em 13 dos indivíduos avaliados (40,6%).

### 7.3 Determinação da fauna acarina e dos níveis de Derp 1 em amostras de poeira domiciliar de indivíduos residentes em área endêmica em helmintíases

Amostras de poeira domiciliar foram coletadas de 22 dos 33 indivíduos do Grupo 1, tendo sido observado maior frequência do ácaro *D. pteronyssinus*, encontrado em 18 de 22 (81,8%) amostras de poeira. O ácaro *B. tropicalis* foi encontrado em oito amostras (36,4%) e *D. farinae* em quatro (18,9%) das amostras estudadas (Figura 4).

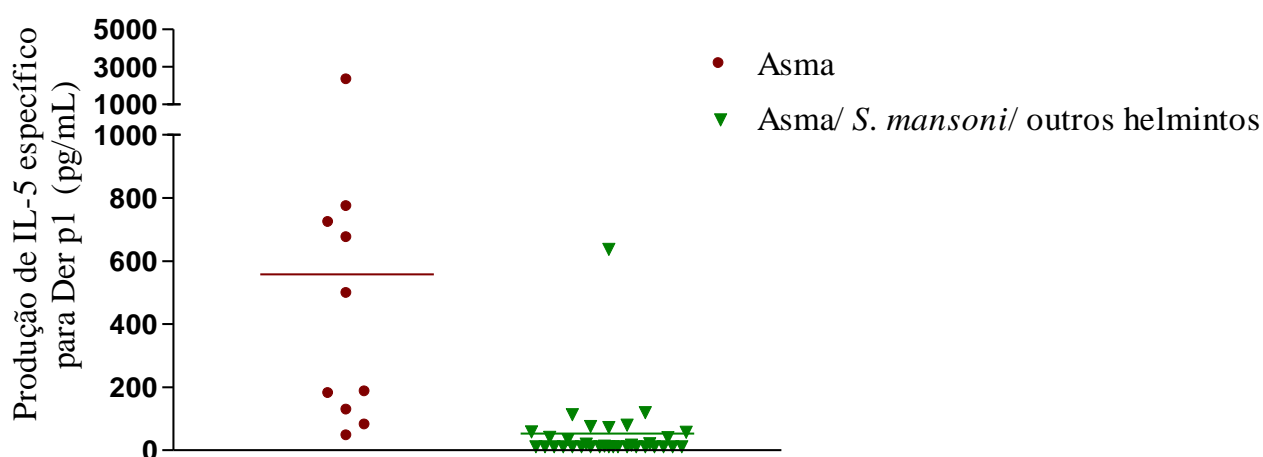


**Figura 4.** Frequência de ácaros em amostras de poeira domiciliar de indivíduos asmáticos no município do Conde-Bahia.

Com relação à quantificação do alérgeno 1 de *D. pteronyssinus* (Der p 1), observou-se que 11 de 12 (91,7%) das amostras avaliadas estavam acima dos níveis sensibilizantes do Der p 1, ou seja, maiores que 2 µg/g de poeira (KUEHR et al., 1994; PLATTS-MILLS et al., 1997).

#### 7.4 Produção de citocinas em sobrenadante de culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados por *S. mansoni* e em grupo controle

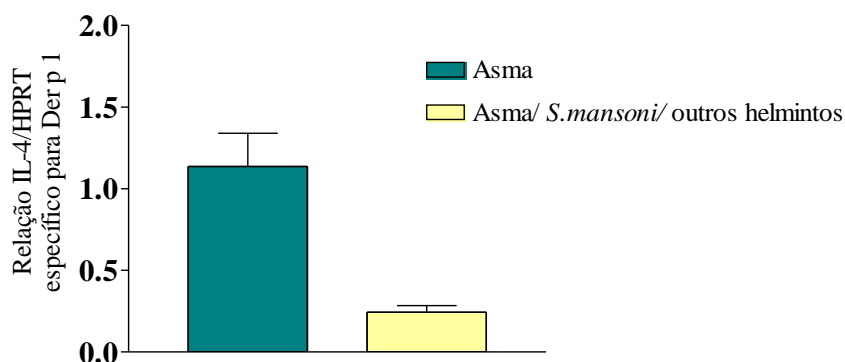
A Figura 5 mostra a produção de IL-5 por células mononucleares estimuladas, *in vitro*, pelo antígeno Der p 1. Asmáticos sem helmintíases (n=10), produziram altos níveis de IL-5 (15,6-2301 pg/ml, mediana=341pg/ml) quando comparados com indivíduos asmáticos infectados por *S. mansoni* e outros helmintos (15,6-641 pg/ml, mediana=15,6 pg/ml,  $p < 0,0001$ , teste de Mann-Whitney). Dos 33 indivíduos asmáticos infectados com *S. mansoni* apenas em um foi observada alta produção de IL-5 (641 pg/ml); nos demais, foi baixa a produção desta citocina (média  $\pm$  SEM =  $34,5 \pm 31,1$  pg/ml).



**Figura 5.** Produção de IL-5 por CMSP de asmáticos estimulados, *in vitro*, com 25  $\mu$ g/ml de Der p 1. A dosagem de IL-5 em sobrenadante de culturas foi realizada através da técnica de ELISA, como descrito em materiais e métodos. ( $p < 0,0001$ , teste de Mann-Whitney).

Pelo fato do método ELISA não ser um teste sensível para avaliação da produção de IL-4, a transcrição de IL-4 foi estudada usando a técnica de RT-PCR em células estimuladas *in vitro* com Der p 1 de cinco pacientes de cada grupo do estudo (Figura 6). A razão das densitometrias de IL-4/HPRT foi mais elevada ( $p < 0,05$ , teste de Mann-Whitney) no grupo de

asmáticos não infectados por helmintos (0,63-1,80, mediana=1,12 pg/ml; média  $\pm$  SEM = 1,14  $\pm$  0,20 pg/ml), quando comparadas aos asmáticos infectados com *S. mansoni* e outros helmintos (0,14-0,33, mediana=0,30 pg/ml; média  $\pm$  SEM = 0,24  $\pm$  0,04 pg/ml).

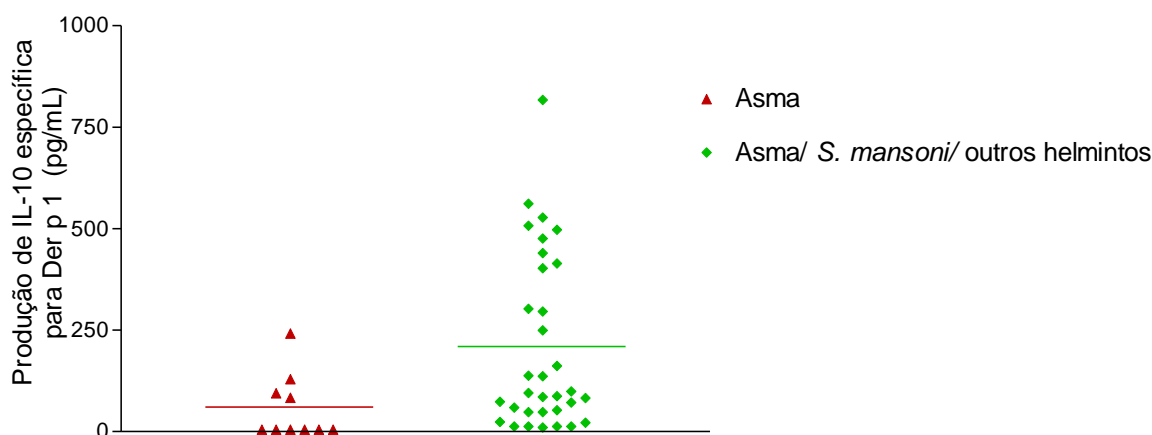


**Figura 6.** Razão das densitometrias de IL-4/HPRT em CMSP de asmáticos. A expressão de IL-4 foi avaliada através de RT-PCR em CMSP estimuladas, *in vitro* com Der p 1, de asmáticos infectados e não infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni* (n=5/grupo;  $p < 0,05$ , teste de Mann-Whitney).

IL-13 e IFN- $\gamma$  também foram dosados em sobrenadantes de culturas de CMSP estimuladas com antígeno de Der p 1. Não houve diferença significativa nos níveis de IL-13 entre os grupos de asmáticos infectados com *S. mansoni* e outros helmintos (105,7  $\pm$  42,5 pg/ml) e asmáticos não infectados (93,2  $\pm$  39 pg/ml,  $p > 0,05$ , teste de Mann-Whitney), e os níveis de IFN- $\gamma$  estavam abaixo do limite de detecção em sobrenadantes de cultura dos dois grupos de indivíduos estudados (dados não mostrados).

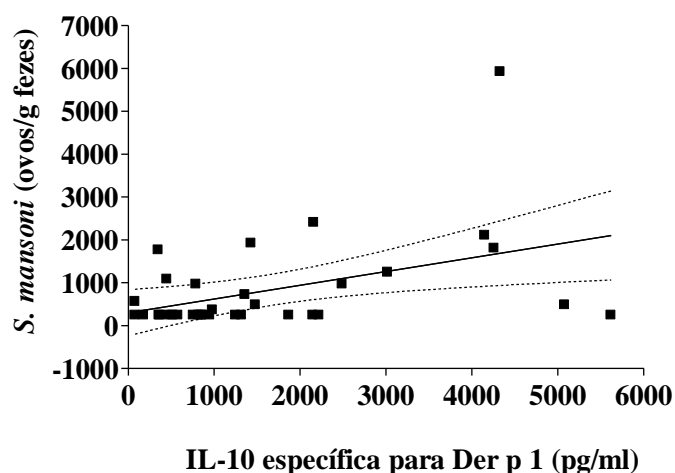
Os níveis de IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- $\gamma$  foram abaixo dos limites de detecção em culturas de células não estimuladas. Estas citocinas foram detectadas em altos níveis em sobrenadantes de CMSP estimuladas com PHA nos dois grupos estudados (dados não mostrados).

A figura 7 mostra os níveis de IL-10 produzidos por CMSP estimuladas com antígeno Der p 1. Em contraste com os resultados obtidos de IL-4 e IL-5, os níveis de IL-10 produzidos foram elevados nos indivíduos asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni* (8-562 pg/ml, mediana=98 pg/ml) e não foram detectados ou foram detectados em níveis baixos (8-97 pg/ml, mediana=8 pg/ml) em asmáticos não infectados ( $p=0,0018$ , teste de Mann Whitney).



**Figura 7.** Produção de IL-10 por CMSP de asmáticos induzida pelo antígeno Der p 1. Os níveis de IL-10 em sobrenadantes de culturas de CMSP estimuladas, *in vitro*, com Der p 1, foram avaliados através de ELISA em 33 asmáticos infectados por *S. mansoni* e outros helmintos e em 10 asmáticos não infectados. ( $p=0,0018$ , teste de Mann Whitney).

Adicionalmente, foi avaliada a possível associação entre carga parasitária e níveis de IL-10 nos indivíduos asmáticos infectados por *S. mansoni* e outros helmintos (Figura 8), tendo sido observado associação positiva entre números de ovos de *S. mansoni* por grama e fezes e produção de IL-10 específica para Der p 1 ( $\beta = 0,3212$ ,  $p<0,05$ , regressão linear simples).

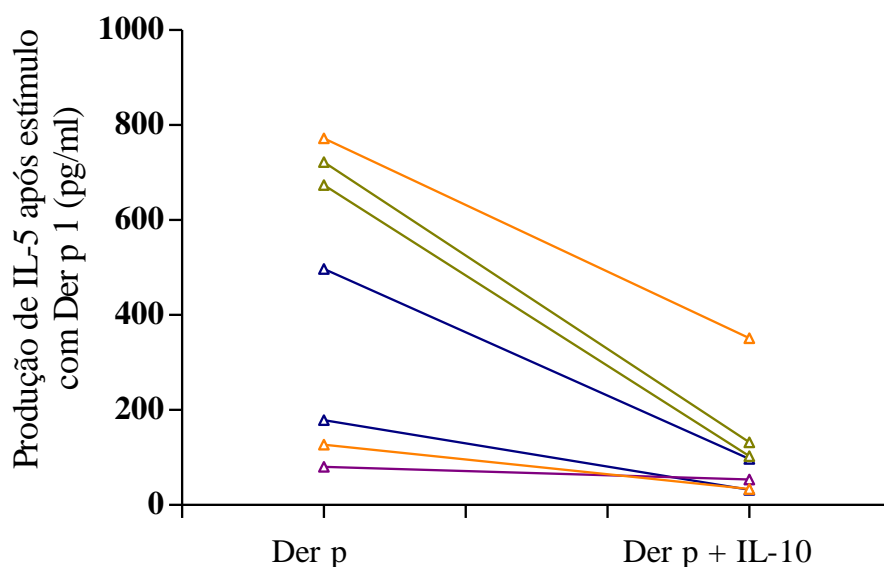


**Figura 8.** Associação entre a produção de IL-10 específica para Der p 1 e carga parasitária de *S. mansoni* em asmáticos. ( $\beta=0,3212$ ;  $p<0,05$ , regressão linear simples).

#### 7.5 Papel da IL-10 na modulação da produção de IL-5

A influência da adição de IL-10 recombinante humana (rhIL-10) em cultura de CMSP estimuladas com Der p 1 sobre a produção de IL-5, foi avaliada em asmáticos não infectados que produziam esta citocina. A adição de IL-10 na concentração de 50 ng/ml, resultou em significativa redução da produção de IL-5 em seis dos sete indivíduos avaliados (Figura 9). Os níveis de IL-5 em cultura estimulada por antígeno Der p 1 foram maiores (80-772 pg/ml, mediana=497 pg/ml) do que em culturas estimuladas com antígeno Der p 1 na presença de IL-10 exógena (32-351 pg/ml, mediana=97 pg/ml;  $p<0,05$ , teste Wilcoxon). A neutralização da IL-10 pela adição do anticorpo monoclonal anti-IL-10 às culturas de CMSP de asmáticos infectados estimuladas com Der p 1, não modificou a produção de IL-5 específica para este antígeno (dado não mostrado).





**Figura 9.** Produção de IL-5 induzida por antígeno Der p 1 por CMSP de asmáticos não infectados na ausência ou presença de rhIL-10 ( $p < 0,05$ , teste Wilcoxon).

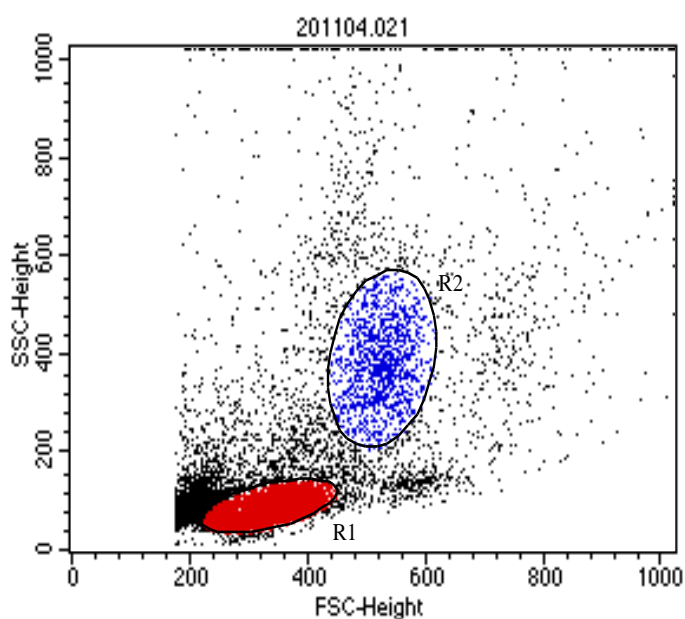
#### 7.6 Fonte celular produtora de IL-10

A fonte produtora de IL-10 foi avaliada por citometria de fluxo em células de asmáticos infectados ou não por helmintos incluindo o *S. mansoni*. As padronizações e os resultados estão descritos abaixo.

##### 7.6.1 Definição das populações celulares pela morfologia

As células mononucleares foram analisadas de acordo com a frequência da expressão de IL-10 e marcadores de superfície celular usando o programam Cell Quest. As populações celulares foram definidas por fluorescência inespecífica com “foward scatter” (FSC) e o “side scatter” (SSC) como parâmetros de tamanho e granulosidade celular, respectivamente. De acordo com as características celulares, procedeu-se a seleção das populações de linfócitos e

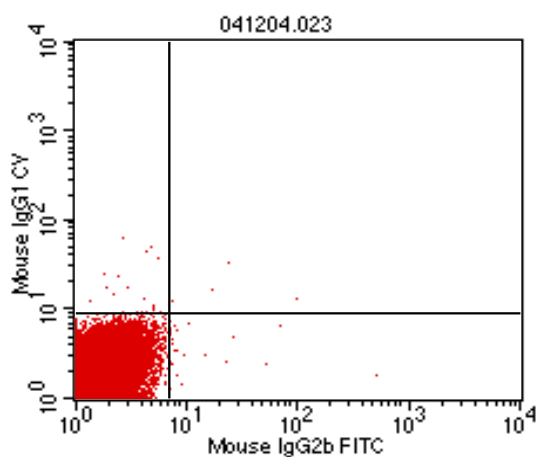
monócitos por janelas nestas respectivas populações. Foram delimitadas duas regiões específicas no gráfico: região 1 (R1), correspondente a janela na área de linfócitos e região 2 (R2), na área de monócitos (Figura 10). Portanto, para a análise das características fenotípicas e expressão de IL-10 intracelular em linfócitos foi utilizada a região R1, enquanto que para monócitos, a região R2.



**Figura 10.** Imagem densitométrica de fluorescência não específica por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) celular, identificando as populações de linfócitos, região 1 (R1) e monócitos, região 2 (R2).

### 7.6.2 Compensação utilizando isotipos controles

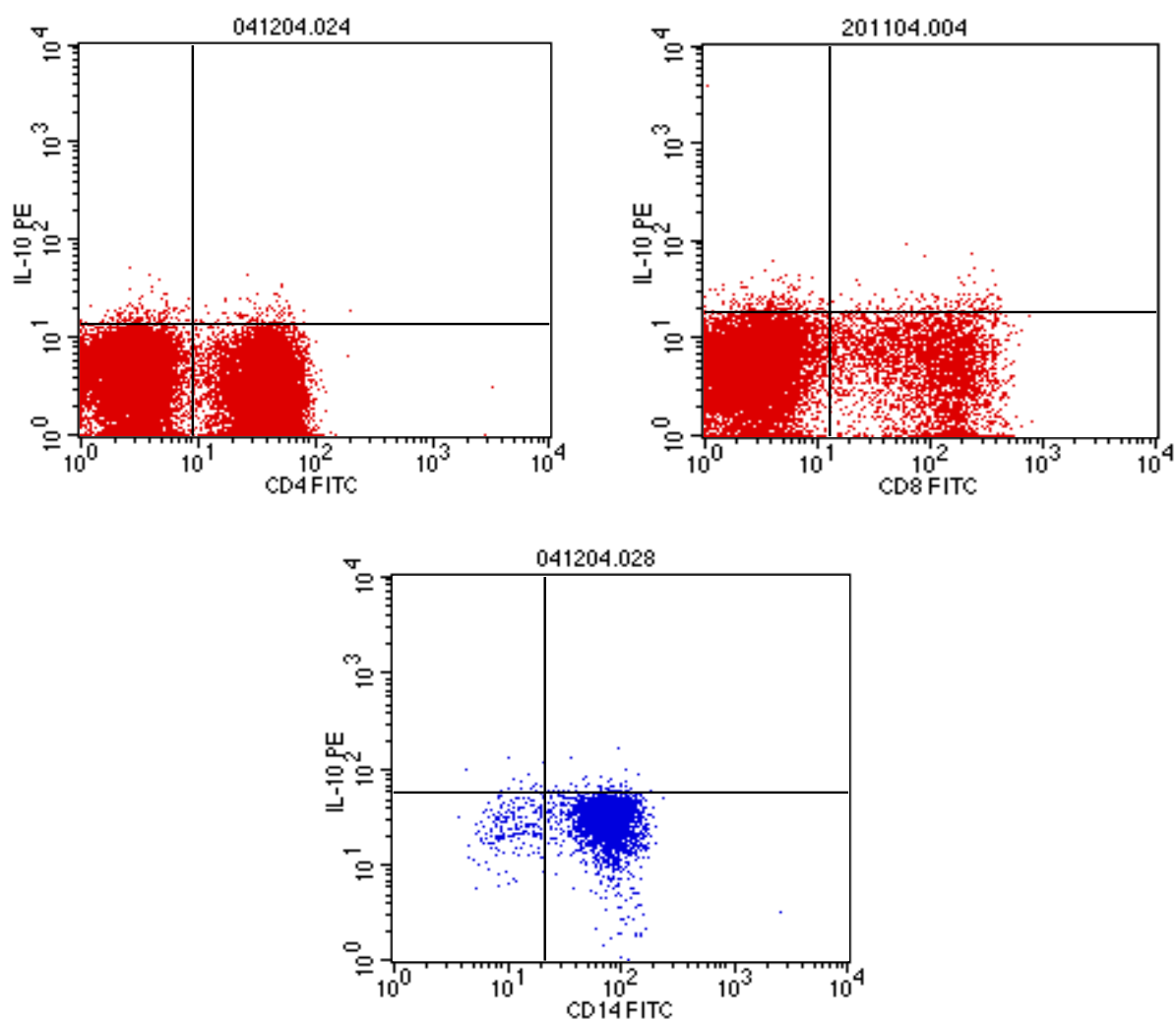
As compensações dos diferentes comprimentos de onda (fluorocromos) foram realizadas utilizando-se células marcadas com isotipos controles. As delimitações dos quadrantes foram realizadas de acordo com os isotipos controles e as populações negativas de cada marcação (Figura 11).



**Figura 11.** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico, selecionadas na janela de linfócitos, após marcação com isotipos controles. O diagrama representa um experimento.

### 7.6.3 Ajustes das populações celulares marcadas com os diferentes fluorocromos

A partir da delimitação das regiões, foi ajustada a expressão de células marcadas com os fluorocromos utilizados (Figura. 12).

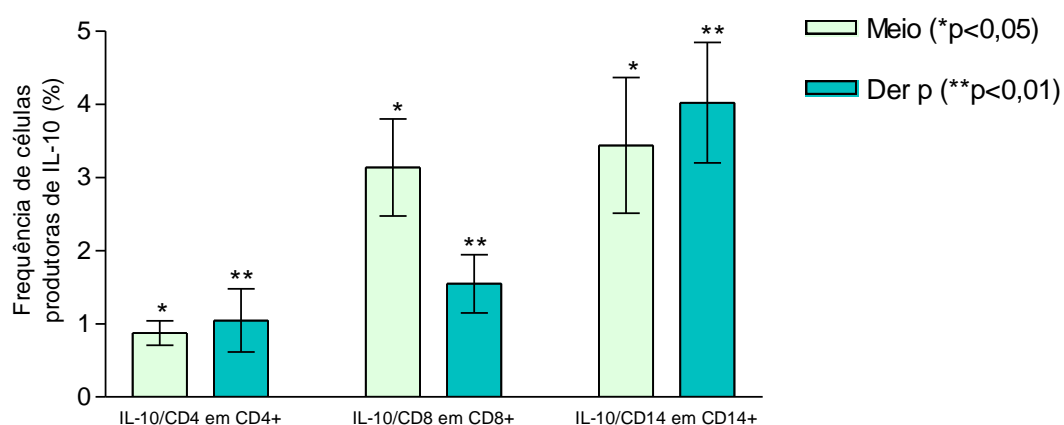


**Figura 12.** Imagem densitométrica de fluorescência específica de células mononucleares do sangue periférico demonstrando a frequência de células marcadas com anticorpos conjugados com PE (coordenada y) e FITC (coordenada x) como descrito em material e métodos. O diagrama representa um experimento.

Com o objetivo de evitar a inclusão de células matadoras naturais (NK) na análise de células que expressam CD8, os quadrantes no histograma foram posicionados de uma forma que selecionasse a população com elevada expressão de CD8 em sua superfície, desde que células NK apresentam baixa expressão desta molécula.

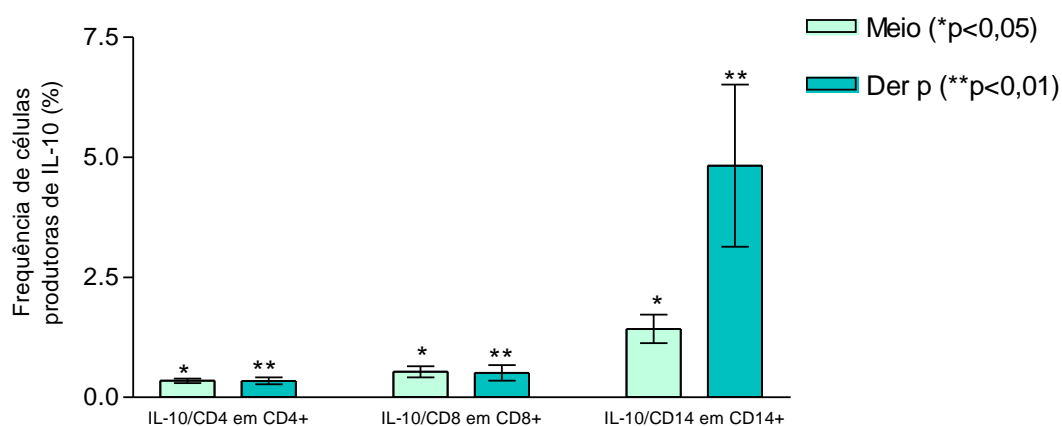
#### 7.6.4 Avaliação da expressão de IL-10 intracelular

No grupo de indivíduos infectados por helmintos incluindo *S. mansoni* (Grupo 1), a principal fonte celular de IL-10 em células de culturas não estimuladas ou estimuladas com Der p 1 foram os monócitos ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, teste t de Student), quando comparados com a expressão desta citocina em células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Além dos monócitos (CD14), as células T CD8<sup>+</sup> constituíram-se importantes fontes produtoras de IL-10 nos indivíduos infectados (Figura 13).



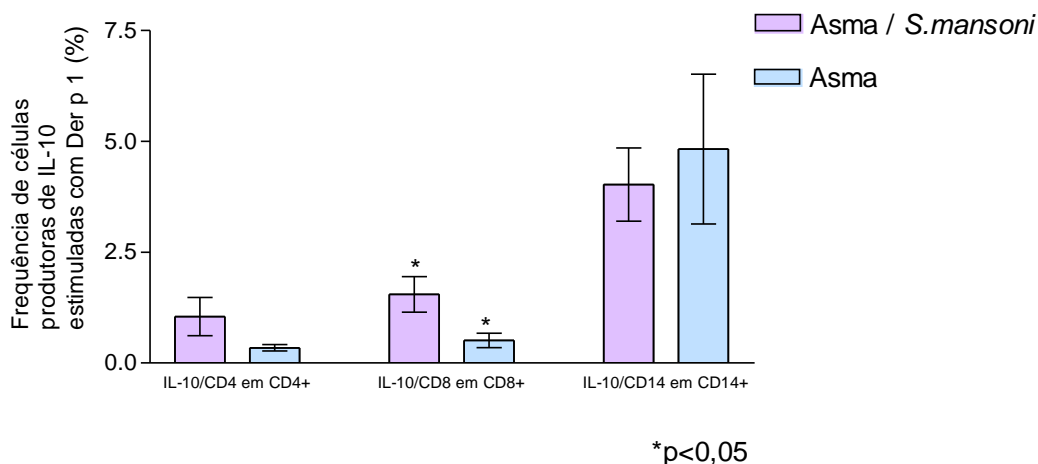
**Figura 13.** Frequência de células produtoras de IL-10 em culturas não estimuladas ou estimuladas com Der p 1 de asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni*, grupo 1 (n=8), analisados por citometria de fluxo (teste t Student).

No grupo de asmáticos não infectados (Figura 14) a expressão de IL-10 em células de culturas não estimuladas e estimuladas com Der p 1 foi observada, principalmente, em monócitos (células CD14).



**Figura 14.** Frequência de células expressando IL-10 em culturas não estimuladas ou estimuladas com Der p 1 de asmáticos não infectados, Grupo 2 (n=8) analisados por citometria de fluxo. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (teste t de Student).

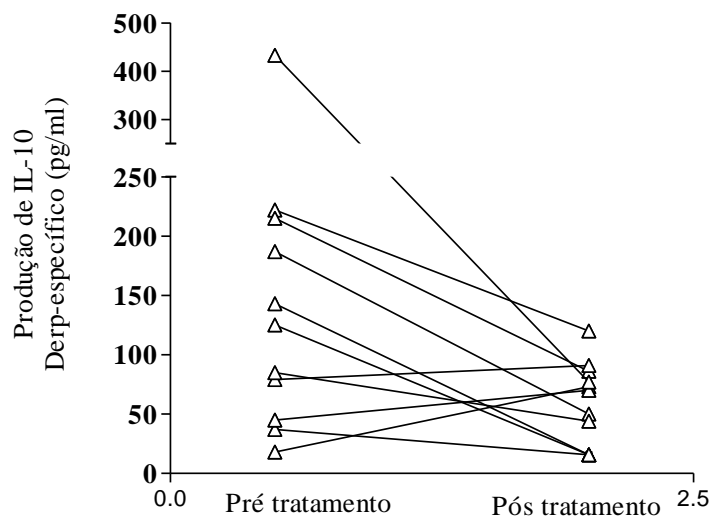
A frequência de células T CD4<sup>+</sup> expressando IL-10 em culturas de células estimuladas com antígeno Der p 1 não diferiu entre o grupo 1 e 2 (p>0,05, Figura 15). Por outro lado, a frequência de células T CD8<sup>+</sup> expressando IL-10 dentre a população total de CD8<sup>+</sup>, em culturas estimuladas foi maior nos indivíduos asmáticos infectados por *S. mansoni* (p<0,05), e a porcentagem de células T CD14<sup>+</sup> expressando IL-10 dentre a população total de CD14<sup>+</sup>, em culturas estimuladas de células estimuladas não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (p>0,05, Figura 15).



**Figura 15.** Frequência de células expressando IL-10 em resposta ao antígeno Der p 1 de asmáticos infectados com helmintos, incluindo *S. mansoni* (Grupo 1, n=8) e asmáticos não infectados (Grupo 2, n=8), analisados por citometria de fluxo. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão (teste t de Student).

#### 7.7 Produção de IL-10 após tratamento com anti-helmíntico dos pacientes infectados

No sentido de avaliar a influência do tratamento com anti-helmínticos na resposta imune de asmáticos infectados por helmintos incluindo *S. mansoni*, foi avaliada a produção de IL-10 antes e após o tratamento das helmintíases (Figura 16). Foi observado que o tratamento resultou na modulação da produção de IL-10 específica para Der p 1. Os níveis de IL-10 reduziram de 82 pg/ml (mediana, 15,6-433 pg/ml) antes do tratamento, para 47 pg/ml (mediana, 15,6-120 pg/ml), três meses após o tratamento ( $p < 0,05$ ), coincidindo com a piora dos sintomas avaliados através de achados anormais ao exame físico (Tabela 2). Enquanto que na avaliação pré-tratamento apenas um (5,3%) de 19 pacientes apresentava sibilos, após o tratamento com anti-helmínticos os sintomas de asma foram observados em 9 (47,4%) deles.



**Figura 16.** Níveis de IL-10 induzidos por antígeno Der p 1 em sobrenadantes de culturas de CMSP, dosadas pela técnica de ELISA, em asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni* antes e 3 meses após o tratamento com Oxamniquine e Albendazol (n=14; p<0,05, teste Wilcoxon).

**Tabela 2.** Sintomas de asma em indivíduos infectados por helmintos incluindo *S. mansoni* antes e três meses após o tratamento com anti-helmínticos.

	Pré-tratamento	3 meses após tratamento
Sintomas de Asma	1 / 19	9 / 19
(Sibilos)	(5,3%)	(47,4%)



## 8 DISCUSSÃO

A hipótese de que a infecção por helmintos interfere com a alergia é sugerida em vários estudos que demonstram uma associação inversa entre infecção por helmintos e diminuição da positividade aos testes cutâneos a aeroalérgenos, e redução na prevalência e gravidade de asma (LYNCH et al., 1993; ARAUJO et al., 2000; NYAN et al., 2001; SCRIVENER et al., 2001; COOPER et al., 2003; MEDEIROS et al., 2003). A resposta imune tanto nas alergias quanto nas helmintíases crônicas envolve as células do tipo Th2, com produção de IL-4, IL-5, IL-13, e IL-10, sendo esta última altamente produzida por indivíduos infectados por alguns helmintos, a exemplo de *Schistosoma mansoni* (WILLIAMS et al., 1994; ARAUJO et al., 1996). Enquanto que a IL-4, IL-5 e IL-13 são claramente envolvidas na patogênese das alergias por induzirem aumento da síntese de IgE e número de eosinófilos e mastócitos, estas mesmas citocinas podem participar da defesa contra a infecção ou re-infecção por helmintos (DESSEIN et al., 1992) ou estarem envolvidas com a patogênese da doença, o que parece ocorrer na esquistossomose (WYNN & CHEEVER, 1995). Por cursarem com respostas imunológicas aparentemente semelhantes, não seria esperado que as alergias e helmintíases ocorrendo em um mesmo indivíduo pudesse modificar a prevalência ou o curso destas doenças. Entretanto, alguns estudos mostram menor prevalência de infecções por helmintos em indivíduos atópicos (HAGEL et al., 1993; COOPER et al., 2003), e é vasta a literatura que sugere que infecções por helmintos interferem nas alergias (LYNCH et al., 1993; YEMANEBERHAN et al., 1997; LYNCH et al., 1998; ARAUJO et al., 2000; NYAN et al., 2001; BIGGELAAR et al., 2001; ARAUJO et al., 2004; COOPER et al., 2004; MEDEIROS et al., 2004). Apesar de todos estes estudos, os mecanismos envolvidos na modulação da resposta alérgica pelos helmintos ainda não estão bem esclarecidos, existindo algumas hipóteses que não tem sido adequadamente testadas ou não tem sido confirmadas. Estas hipóteses incluem a indução da produção de anticorpo bloqueador IgG4

e a inibição da síntese de IgE específica para aeroalérgenos, decorrente da presença de altos níveis de IgE policlonal induzida por antígenos dos helmintos (HAGEL et al., 1993; LYNCH et al., 1993), além da indução de mecanismos moduladores da resposta imune, a exemplo do aumento da síntese de IL-10 (BIGGELAAR et al., 2000).

A IgE participa da reação de hipersensibilidade imediata envolvida nas alergias e altos níveis desta imunoglobulina específica para alérgenos foram encontrados em populações da Europa Central (RIEDLER et al., 2001) e Austrália (SCRIVENER et al., 2001), coincidindo com alta prevalência de doenças respiratórias alérgicas nestas regiões. Entretanto, não existem evidências que dão suporte à hipótese de que a menor reatividade aos testes de alergia e a menor gravidade da asma em indivíduos infectados, decorrem da baixa produção de IgE específica para os aeroalérgenos. Neste estudo, avaliando indivíduos residentes na área endêmica do município do Conde-BA, foi observada IgE sérica específica para o antígeno Der p 1 em níveis acima de 0,70 KU/L (classe II) em 40,6% dos asmáticos infectados por outros helmintos, incluindo *S. mansoni*, a despeito da baixa positividade destes indivíduos aos testes cutâneos de alergia (12,1%). Estudos anteriores realizados em área endêmica em *S. mansoni*, Caatinga do Moura-BA, corroboraram estes achados, uma vez que demonstraram menor positividade aos testes de alergia no grupo com alta carga parasitária apesar de não ter sido encontrado diferença significativa nos níveis de IgE específica para Der p 1 entre os indivíduos com alta ou baixa carga (ARAUJO et al., 2000). Comparando a gravidade da asma em indivíduos infectados com *S. mansoni* residentes em área endêmica, com asmáticos não infectados residentes em áreas não endêmicas, Medeiros et al. (2003), demonstraram uma menor gravidade da asma nos indivíduos infectados, a despeito de não ter observado diferenças significativas nos níveis séricos de IgE específica para Der p 1 nestes grupos de asmáticos. Portanto, à despeito da presença de IgE específica para ácaros da poeira domiciliar, indivíduos parasitados com helmintos, de alguma

forma, apresentam menor degranulação mastocitária e resposta inflamatória, quando expostos aos aeroalérgenos que são sensibilizados.

Desde que no presente estudo observou-se que todos os asmáticos não infectados responderam ao teste cutâneo de alergia caracterizando portanto, a presença da IgE específica, a dosagem desta imunoglobulina não foi realizada em soros deste grupo.

Existem dados na literatura que sugerem uma dissociação entre resposta ao teste cutâneo de alergia e o desenvolvimento de asma em países em desenvolvimento (FANIRAN et al., 1999; NYAN et al., 2001). Scrivener et al. (2001), demonstraram menor gravidade de asma em indivíduos parasitados com alta carga de ancilostomídeos, mesmo na presença de teste cutâneo positivo, o que fala a favor de que diferentes helmintos induzam mecanismos regulatórios distintos. A infecção por estes helmintos, apesar de não bloquear a resposta ao teste cutâneo de alergia, poderia suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da fase crônica da asma, melhorando o curso da mesma.

A segunda e mais importante hipótese testada no presente estudo para explicar a diminuição da positividade aos testes cutâneos em indivíduos parasitados por helmintos, incluindo *S. mansoni*, foi a de que a IL-10 interfere com a resposta imune para aeroalérgenos. Existem dados que apóiam a suposição de que a infecção por helmintos, através principalmente da produção de IL-10, modula a resposta imune à vacinação (SABIN et al., 1996) e a resposta do tipo Th1 envolvida na patogênese de doenças inflamatórias auto-imunes, tanto em humanos (WEINSTOCK et al., 2002), quanto em modelos murinos (COOKE et al., 1999; LA FLAMME et al., 2003). Além do papel da IL-10 na modulação da resposta do tipo Th1, esta citocina é também capaz de modular a resposta do tipo Th2 (DEL PRETE et al., 1993). O papel da IL-10 na resposta alérgica do tipo Th2 vem sendo estudada, e Biggelaar et al. (2000), demonstraram maiores níveis de IL-10 específica para *Schistosoma haematobium* em indivíduos com testes cutâneos negativos para aeroalérgenos, comparados com os indivíduos com testes positivos. No

presente estudo foi observado, pela primeira vez, que a produção de IL-10 específica para aeroalérgeno foi maior em asmáticos infectados por helmintos do que em asmáticos não infectados, enquanto que a produção de IL-5 e expressão de IL-4, citocinas envolvidas na patogênese da asma, foram menores nos asmáticos infectados. A modulação da resposta inflamatória do tipo Th2 neste estudo, foi também sugerida por experimentos que demonstraram redução nos níveis de IL-5 específica para Der p 1 em sobrenadantes de culturas de células de asmáticos não infectados adicionadas de IL-10 exógena, e pela diminuição da produção desta citocina nos asmáticos infectados, após o tratamento com anti-helmínticos, coincidindo com a piora clínica destes pacientes. A resposta Th2 foi suprimida, sem entretanto haver estimulação da resposta do tipo Th1, como demonstrado pela baixa produção de IFN- $\gamma$  nas culturas de células dos asmáticos infectados, que não diferiu do observado nos asmáticos não infectados.

Corroborando com os dados da literatura de que os antígenos dos ovos do *S. mansoni* induzem a produção de IL-10 (GRZYCH et al., 1991, SHER et al., 1991), foi observada neste estudo, uma associação positiva entre níveis de IL-10 específica para Der p 1 e carga parasitária de *S. mansoni*, o que também reitera a idéia de que quanto maior a carga parasitária, e conseqüentemente maiores os níveis de IL-10, maior será a modulação da atopia, como demonstrado no estudo de Araujo et al. (2000). Além dos antígenos dos ovos, vários outros antígenos das outras fases do ciclo evolutivo do *S. mansoni* são capazes de induzir a produção da IL-10 (HASSANEIN et al., 1999; BRITO et al., 2000; VELUPILLAI et al., 2000), o que é um campo promissor para o desenvolvimento de vacinas com propriedades anti-inflamatórias para as alergias.

Apesar da baixa prevalência de teste cutâneo positivo para antígenos de ácaros da poeira domiciliar neste estudo, foram encontrados alta prevalência destes ácaros em níveis sensibilizantes em amostras de poeira obtidas nas residências de asmáticos da área endêmica, o que favoreceria o desenvolvimento de asma (SCRIVENER et al., 2001).

Além da alta prevalência do *D. pteronyssinus* nas residências dos asmáticos infectados, outros estudos mostraram que esta é a principal espécie de ácaro encontrada em ambientes domiciliares no Brasil (ARRUDA et al., 1991; RIZZO et al., 1993; RIZZO et al., 1997) e em zonas rurais e capital do estado da Bahia (MEDEIROS et al., 2003). Portanto, a avaliação da resposta imunológica dos indivíduos asmáticos do estudo foi realizada utilizando-se o antígeno 1 do *D. pteronyssinus*, Der p 1.

Enquanto nas infecções crônicas por helmintos, a IL-10 é encontrada em níveis elevados (ARAUJO et al., 1996; JOSEPH et al., 2004), baixos níveis desta citocina tem sido detectados em cultura de CMSP de asmáticos, apesar da resposta imune nas alergias também ser mediada por um padrão de citocinas do tipo Th2 (BORISH et al., 1996). O fato de que células de asmáticos residentes em área endêmica em helmintíases produzirem altos níveis de IL-10 em resposta a aeroalérgeno, como demonstrado no presente estudo, sugere um papel protetor desta citocina sobre o desenvolvimento da asma. Neste sentido, tem sido demonstrado altos níveis desta citocina após imunoterapia específica para alérgenos (AKDIS et al., 2001). Adicionalmente, Macaúbas et al. (1999) demonstraram uma correlação negativa entre o tamanho da pápula nos testes cutâneos para aeroalérgenos e a produção de IL-10 específica para alérgeno. Posteriormente foi demonstrado que células secretoras de IL-10 inibem a hiperreatividade das vias aéreas e a inflamação induzida por células Th2, e que a neutralização da IL-10 suprime este efeito (OH et al., 2002). Dentre os mecanismos supressores da reação de hipersensibilidade imediata exercida pela IL-10, existem evidências de que esta citocina inibe a liberação de histamina e de outros mediadores inflamatórios por mastócitos ativados (ROYER et al., 2001). Por ser a degranulação de mastócitos um dos eventos finais da reação alérgica, e ser esta reação dependente da presença de IL-4 e IL-5, além de IL-13, é possível que a IL-10, produzida cronicamente por indivíduos infectados por helmintos aja em diferentes etapas na inibição da reação alérgica. Neste estudo, foi demonstrado que a IL-10 inibe a produção das

referidas citocinas Th2, que são essenciais para a produção e ativação das diferentes células envolvidas na reação alérgica (HOLT et al., 1999). Adicionalmente, a IL-10 suprime a síntese de TNF- $\alpha$  e óxido nítrico, outros mediadores envolvidos na resposta inflamatória na asma (ROYER et al., 2001). De acordo com estes achados, a baixa frequência de positividade aos testes de alergia e a menor gravidade da asma observadas em indivíduos infectados por helmintos podem ser explicados, pelo menos em parte, pelos níveis da IL-10.

O fato de que a neutralização de IL-10 não ter resultado em aumento da produção de IL-5 em indivíduos infectados por helmintos, não contradiz o papel desta citocina na modulação da resposta imune a aeroalérgenos. A regulação da resposta imune é tão intensa durante a infecção por helmintos que, nos indivíduos com alta carga parasitária de *S. mansoni*, após vacinação com toxóide tetânico, além de não ser detectado IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de culturas de CMSP estimuladas com antígeno de toxóide tetânico, não houve expressão de RNA mensageiro para esta citocina (SABIN et al., 1996). Neste caso, a neutralização da IL-10 por um curto período de tempo em culturas, pode não ter sido suficiente para restaurar a habilidade das células para produzirem IL-5.

Não houve diferença nos níveis de IL-13 induzidos por Der p 1 entre os asmáticos infectados por *S. mansoni* e os asmáticos não infectados, possivelmente devido à baixa sensibilidade do método utilizado para a detecção desta citocina. Por outro lado, não se pode afastar a hipótese de que a IL-13 é pouco sensível à atividade modulatória da IL-10.

Recentemente, vem aumentando o interesse no estudo dos mecanismos regulatórios envolvidos na expressão da asma e alergia, e tem sido descritas populações de células com propriedades regulatórias. O termo células regulatórias refere-se a células que, de forma ativa, controlam ou suprimem as funções de outras células (UMETSU et al., 2003). Segundo Umetsu et al. (2003), a exposição a alérgenos poderia resultar no desenvolvimento de tolerância e células regulatórias, sendo o surgimento das células Th2 uma alteração durante o

desenvolvimento de células regulatórias, possivelmente como resultado de inadequada produção de IL-10 ou presença de IL-4 e IL-13 no momento da diferenciação das células, resultando assim, no desenvolvimento de alergia e asma. As células regulatórias descritas até o momento, são CD4<sup>+</sup> e parecem diferir entre si na capacidade de sintetizarem IL-10 (células regulatórias do tipo 1, Tr1) (GROUX et al., 1997), IL-10 e TGF- $\beta$  (células T helper 3, Th3) (CHEN et al., 1994), ou exercerem suas ações por contato direto com outras células, via CTLA-4 (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) (SAKAGUCHI et al., 1995).

A ativação das células T CD4<sup>+</sup> requer a presença da molécula CD28, que é o receptor para moléculas B7 presentes nas células apresentadoras de antígenos. Uma vez que as células T estejam ativadas, elas passam a exibir um receptor adicional chamado CTLA-4 (CD152). Este liga-se a moléculas B7, com maior avidéz do que a CD28, e emitem um sinal inibitório a célula T ativada, limitando a quantidade de produção do fator de crescimento de célula T, interleucina-2 (IL-2) (AKDIS et al., 1999). Assim, a ligação de CTLA-4 às moléculas B7 é essencial para a limitação de resposta proliferativa das células T ativadas (JOSS et al., 2000, TAYLOR et al., 2004). É possível que a IL-10 esteja envolvida no bloqueio da interação B7/CD28 e no subsequente processo de ativação das células T (SCHANDENE et al., 1994).

A IL-10 tem um importante papel homeostático no controle de processos inflamatórios alérgicos. Ela é capaz de suprimir a produção de IL-5 por clones de células Th0 e Th2 humanas (SCHANDENE et al., 1994; ZUANY-AMORIM et al., 1996; PRETOLANI et al., 1997), de induzir anergia prolongada específica para alérgenos em células T CD4<sup>+</sup> humanas (GROUX et al., 1996; ADACHI et al., 1999), e de inibir a produção de GM-CSF e a expressão de CD40 por eosinófilos ativados, além de promover a morte destas células (TAKANASKI et al., 1994; OHKAWARA et al., 1996).

Em modelo experimental de asma, foi observado que tanto para o desenvolvimento quanto para a função destas células T regulatórias é necessário a presença de IL-10 e da co-

estimulação envolvendo ICOS, um membro da família CD28 (AKBARI et al., 2002). Além disso, células T regulatórias induzidas pela exposição das células dendríticas ao alérgeno produz IL-10 e expressam altos níveis de ICOS ligante que, potencialmente, inibem o desenvolvimento de inflamação das vias aéreas e hiperreatividade brônquica em modelo experimental de asma (AKBARI et al., 2002).

Enquanto que existem vários estudos avaliando as funções das células regulatórias nas alergias, pouco se conhece sobre as funções destas células nas infecções por helmintos. Certamente estas células devem participar da modulação da resposta imune no sentido de permitir a sobrevivência do hospedeiro e perpetuação do parasita. Em indivíduo com oncocercose disseminada, por exemplo, foi demonstrado que a IL-10 e o TGF- $\beta$ , produzidas por células Th3, foram associados com a inibição da resposta proliferativa celular (DOETZE et al., 2000), e na esquistossomose experimental, células T regulatórias produtoras de IL-10, reduzem a morbidade e prolongam a sobrevivência do parasita (HESSE et al., 2004; MCKEE et al., 2004).

O papel das células regulatórias não foi avaliado neste estudo, entretanto foi demonstrado que enquanto nos asmáticos não infectados apenas os monócitos expressaram IL-10, nos infectados pelo *S. mansoni* e outros helmintos foi observada expressão desta citocina, principalmente, em células T CD8<sup>+</sup>. Estas células parecem então participar da modulação da resposta do tipo Th2 CD4<sup>+</sup>, que parece ter papel fundamental no desenvolvimento das alergias. Pouco se conhece sobre o papel modulador das células T CD8<sup>+</sup> nas alergias e helmintíases. Trabalhos recentes sobre estado de ativação de células T, demonstraram que indivíduos assintomáticos com infecção crônica por *S. mansoni* apresentavam um aumento da porcentagem de células TCD8<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> supressora/ citotóxica, enquanto que em indivíduos com a forma aguda da infecção havia um aumento da porcentagem de células TCD4<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> (MARTINS-FILHO et al., 1999).



A compreensão dos mecanismos pelos quais indivíduos residentes em área endêmica em helmintos apresentam menor positividade aos testes cutâneos para aeroalérgenos e menor gravidade da asma podem fornecer novas perspectivas para o desenvolvimento de medidas de controle e tratamento da alergia.

## 9 SUMÁRIO

- Apesar da exposição a níveis sensibilizantes de aeroalérgenos, e produção de IgE específica para *D. pteronyssinus*, asmáticos infectados com *S. mansoni* e outros helmintos apresentaram baixa positividade aos testes cutâneos de alergia.
- As células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos infectados helmintos, incluindo *S. mansoni* produziram maiores níveis de IL-10 e menores níveis de IL-4 e IL-5 em resposta ao antígeno de *D. pteronyssinus*, *in vitro*, quando comparados com asmáticos não infectados.
- Houve associação positiva entre a carga parasitária de *S. mansoni* e níveis da IL-10 em culturas estimuladas por antígeno Der p 1 em asmáticos infectados.
- A adição de IL-10 exógena às culturas de células de asmáticos não infectados estimuladas com Der p 1 resultou na modulação da produção de IL-5.
- As fontes produtoras de IL-10 em asmáticos infectados por helmintos, incluindo *S. mansoni*, foram, principalmente as células T CD8<sup>+</sup> e monócitos.
- Foi observado uma diminuição da produção de IL-10 nos asmáticos infectados após o tratamento anti-helmíntico, coincidindo com a piora dos sintomas clínicos da asma.

## 10 CONCLUSÃO

A IL-10 é uma citocina regulatória com capacidade de suprimir a resposta Th2 em asmáticos infectados por *S. mansoni*, o que pode representar um dos mecanismos pelos quais indivíduos infectados por este helminto apresentam baixa reatividade aos testes cutâneos e menor gravidade de asma.

## 11 PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Estudar o fenótipo das células B, células T e células regulatórias no sangue periférico, “*ex-vivo*” e após estímulo *in vitro* com *D. pteronyssinus*, em asmáticos infectados e não infectados por helmintos, incluindo o *S. mansoni*, com o objetivo de determinar os principais tipos de células envolvidos na modulação da resposta inflamatória alérgica;
2. Analisar a expressão de moléculas co-estimulatórias presentes em linfócitos e macrófagos, no sentido de avaliar marcadores de atividade celular;
3. Dosar imuno-complexos circulantes em soro de asmáticos infectados por *S. mansoni*, antes e após o tratamento anti-helmíntico, com o objetivo de avaliar se os complexos imunes estão envolvidos no agravamento dos sintomas da asma após tratamento com anti-helmínticos;
4. Avaliar a relação IgE/IgG4 em soro de asmáticos infectados por *S. mansoni*, uma vez que tem sido demonstrada a competição entre IgG4 e IgE pela ligação com o alérgeno;
5. Quantificar as quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória alérgica em soro de pacientes asmáticos infectados ou não por *S. mansoni*, visando identificar possíveis marcadores de atividade inflamatória na asma;
6. Avaliar a produção da citocina regulatória TGF- $\beta$  e citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de cultura de CMSP de asmáticos infectados ou não por *S. mansoni*, estimulados com Der p 1, no sentido de correlacionar estas citocinas com a expressão clínica da asma em indivíduos infectados ou não por helmintos.

## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, **383**:787-793, 1996.

ADACHI, M.; ODA, N.; KOKUBU, F.; MINOGUCHI, K. IL-10 induces a Th2 cell tolerance in allergic asthma. **Int . Arch. Allergy Immunol.**, **118**:391-394, 1999.

AKBARI, O.; FREEMAN, G.J.; MEYER, E.H.; GREENFIELD, E.A.; CHANG, T.T.; SHARPE, A.H.; BERRY, G.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D.T. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. **Nat. Med.**, **8**:1024-1032, 2002.

AKDIS, C.A.; BLESKEN, T.; AKDIS, M.; WUTHRICH, B.; BLASER, K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. **J. Clin. Invest.**, **102**:98-106, 1998.

AKDIS, C.A.; BLASER, K. IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. **Faseb J.**, **13**: 603-609, 1999.

AKDIS, C.A.; BLASER, K. Immunologic mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **495**:247-259, 2001.

AKDIS, C.A.; BLASER, K. Role of IL-10 in allergen-specific immunotherapy and normal response to allergens. **Microbes Infect.**, **3**:891-898, 2001.

ALMEIDA, M.C.F. **Influência do tratamento das helmintíases na gravidade da Asma.** 2004. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ARAUJO, M.I.; BACELLAR, O.; RIBEIRO-DE-JESUS, A.; CARVALHO, E.M. The absence of gamma-interferon production of *S. mansoni* antigens in patients with schistosomiasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **27**:1619-1625, 1994.

ARAUJO, M.I.; DE JESUS, A.R.; BACELLAR, O.; SABIN, E.; PEARCE, E.; CARVALHO, E.M. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur. J. Immunol.**, **26**:1399-1403., 1996.

ARAUJO, M.I.; LOPES, A.A.; MEDEIROS, M.; CRUZ, A.A.; SOUSA-ATTA, L.; SOLE, D.; CARVALHO, E.M. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **123**:145-148, 2000.

ARAUJO, M.I.; HOPPE, B.; MEDEIROS JUNIOR, M.; ALCANTARA, L.; ALMEIDA, M.C.; SCHRIEFER, A.; OLIVEIRA, R.R.; KRUSCHEWSKY, R.; FIGUEIREDO, J.P.; CRUZ, A.A.; CARVALHO, E.M. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. **J. Infect. Dis.**, **190**:1797-1803, 2004.

ARRUDA, L.K.; RIZZO, M.C.; CHAPMAN, M.D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T.A.; NASPITZ, C.K. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in Sao Paulo, Brazil. **Clin. Exp. Allergy**, **21**:433-439, 1991.

BIGGELAAR, A.H. van den, REE, R. van; RODRIGUES, L.C.; LELL, B.; DEELDER, A.M.; KREMSNER, P.G.; YAZDANBAKHSI, M. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. **Lancet**, **356**: 1723-1727, 2000.

BIGGELAAR, A.H. van den; LOPUHA A, C.; REE, R. van; ZEE, J.S. van der; JANS, J.; HOEK, A.; MIGOMBET, B.; BORRMANN, S.; LUCKNER, D.; KREMSNER, P.G.; YAZDANBAKHSI, M. The prevalence of parasite infestation and house dust mite sensitization in Gabonese schoolchildren. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **126**:231-238, 2001.

BIGGELAAR, A.H. van den; KREMSNER, P.; YAZDANBAKHSI, M. Immune responses induced by repeated treatment do not result in protective immunity to *Schistosoma haematobium*: interleukin (IL)-5 and IL-10 responses. **J. Infect. Dis.**, **186**: 1474-1482, 2002.

BINA, J.C. Estudo de variáveis que podem influenciar na evolução da esquistossomose mansônica: efeito da terapêutica específica e da interrupção da transmissão. **Rev. Patol. Trop.**, **26**:69-128, 1997.

BINA, J.C.; PRATA, A. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I- *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **36**: 211-216, 2003.

BOISIER, P.; RAMAROKOTO, C.E.; RAVAOALIMALALA, V.E.; RABARIJAONA, L.; RIEYE, J.; ROUX, J.; ESTERRE, P. Reversibility of *Schistosoma mansoni* associated morbidity after yearly mass praziquantel therapy: ultrasonographic assessment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **92**:451-453, 1998.

BORISH, L.; AARONS, A.; RUMBYRT, J.; CVIETUSA, P.; NEGRI, J.; WENZEL, S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **97**:1288-1296, 1996.

BRITO, C.F.; CALDAS, I.R.; COURA FILHO, P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, S.C. CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. **Scand. J. Immunol.**, **51**:595-601, 2000.

BUTTERWORTH, A.E. Immunological aspects of human schistosomiasis. **Br. Med. Bull.**, **54**:357-368, 1998.

CATAPAN, I W.R.; PINTO, P.L.; AMATO-NETO, V.; MENDES, E. Prevalence of allergic diseases in patients with schistosomiasis mansoni. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **100**:142, 1997.

CHEN, Y.; KUCHROO, V.K.; INOBE, J.; HAFLER, D.A.; WEINER, H.L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. **Science**, **265**:1237-1240, 1994.

COHN, L.; ELIAS, J.A.; CHUPP, G.L. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. **Annu. Rev. Immunol.**, **22**:789-815, 2004.

CONSENSO Brasileiro no Manejo da Asma. **J. Pneumol.** **28**: S6-S14, 2002. Suplemento 1

COOKE, A.; TONKS, P.; JONES, F.M.; O'SHEA, H.; HUTCHINGS, P.; FULFORD, A.J.; DUNNE, D.W. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. **Parasite Immunol.**, **21**:169-176, 1999.

COOPER, P.J. Can intestinal helminth infections (geohelminths) affect the development and expression of asthma and allergic disease? **Clin. Exp. Immunol.**, **128**:398-404, 2002.

COOPER, P.J.; CHICO, M.E.; BLAND, M.; GRIFFIN, G.E.; NUTMAN, T.B. Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **168**:313-317, 2003.

COOPER, P.J.; CHICO, M.E.; RODRIGUES, L.C.; ORDONEZ, M.; STRACHAN, D.; GRIFFIN, G.E.; NUTMAN, T.B. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **111**:995-1000, 2003.

COOPER, P.J.; CHICO, M.E.; SANDOVAL, C.; NUTMAN, T.B. Atopic phenotype is an important determinant of immunoglobulin E-mediated inflammation and expression of T helper cell type 2 cytokines to ascaris antigens in children exposed to ascariasis. **J. Infect. Dis.**, **190**:1338-1446, 2004.

COOPER, P.J.; ESPINEL, I.; PAREDES, W.; GUDERIAN, R.H.; NUTMAN, T.B. Impaired tetanus-specific cellular and humoral responses following tetanus vaccination in human onchocerciasis: a possible role for interleukin-10. **J. Infect. Dis.**, **178**:1133-1138, 1998.

DE JESUS, A.R.; ALMEIDA, R.P.; BACELLAR, O.; ARAUJO, M.I.; DEMEURE, C.; BINA, J.C.; DESSEIN, A.J.; CARVALHO, E.M. Correlation between cell-mediated immunity and



degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis. **Eur. J. Immunol.**, **23**:152-158, 1993.

DE JESUS, A.R.; SILVA, A.; SANTANA, L.B.; MAGALHAES, A.; DE JESUS, A.A.; DE ALMEIDA, R.P.; REGO, M.A.; BURATTINI, M.N.; PEARCE, E.J.; CARVALHO, E.M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J. Infect. Dis.**, **185**:98-105, 2002.

DEL PRETE, G.; DE CARLI, M.; ALMERIGOGNA, F.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; ROMAGNANI, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **J. Immunol.**, **150**:353-360, 1993.

DESSEIN, A.J.; COUISSINIER, P.; DEMEURE, C.; RIHET, P.; KOHLSTAEDT, S.; CARNEIRO-CARVALHO, D.; OUATTARA, M.; GOUDOT-CROZEL, V.; DESSEIN, H.; BOURGOIS, A. Environmental, genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. **Immunol. Invest.**, **21**:423-453, 1992.

DOETZE, A.; SATOQUINA, J.; BURCHARD, G.; RAU, T.; LOLIGER, C.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. **Int. Immunol.**, **12**: 623-630, 2000.

DREBORG, S. Skin testing. The safety of skin tests and the information obtained from using different methods and concentrations of allergen. **Allergy**, **48**:473-475, 1993.

EBNER, C.; SIEMANN, U.; BOHLE, B.; WILLHEIM, M.; WIEDERMANN, U.; SCHENK, S.; KLOTZ, F.; EBNER, H.; KRAFT, D.; SCHEINER, O. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. **Clin. Exp. Allergy**, **27**:1007-1015, 1997.

ELIAS, D.; WOLDAY, D.; AKUFFO, H.; PETROS, B.; BRONNER, U.; BRITTON, S. Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccination. **Clin. Exp. Immunol.**, **123**:219-225, 2001.

FANIRAN, A.O.; PEAT, J.K.; WOOLCOCK, A.J. Prevalence of atopy, asthma symptoms and diagnosis, and the management of asthma: comparison of an affluent and a non-affluent country. **Thorax**, **54**:606-610, 1999.

FERNANDEZ-CALDAS, E. Biology and identification of house dust mites. Apostila apresentada no curso "Identificação de ácaros da poeira domiciliar". In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ALERGIA E IMUNOLOGIA CLÍNICA, 2., 1997, Salvador.

FINKELMAN, F.D.; SHEA-DONOHUE, T.; GOLDHILL, J.; SULLIVAN, C.A.; MORRIS, S.C.; MADDEN, K.B.; GAUSE, W.C.; URBAN JUNIOR, J.F. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annu. Rev. Immunol.**, **15**:505-533, 1997.

FINKELMAN, F.D.; WYNN, T.A.; DONALDSON, D.D.; URBAN, J.F. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. **Curr. Opin. Immunol.**, **11**:420-426, 1999.

FIorentino, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, **170**:2081-2095, 1989.

FOSTER, P.S.; HOGAN, S.P.; RAMSAY, A.J.; MATTHAEI, K.I.; YOUNG, I.G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. **J. Exp. Med.**, **183**:195-201, 1996.

FRASER, E.M.; CHRISTIE, J.F.; KENNEDY, M.W. Heterogeneity amongst infected children in IgE antibody repertoire to the antigens of the parasitic nematode *Ascaris*. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **100**:283-286, 1993.

GAZZINELLI, G.; COLLEY, .DG. Human immune responses during schistosomiasis mansoni. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **25**:125-134, 1992.

GEIGER, S.M.; MASSARA, C.L.; BETHONY, J.; SOBOSLAY, P.T.; CORREA-OLIVEIRA, R. Cellular responses and cytokine production in post-treatment hookworm patients from an endemic area in Brazil. **Clin. Exp. Immunol.**, **136**:334-340, 2004.

GLEICH, G.J.; ADOLPHSON, C.R.; LEIFERMAN, K.M. The biology of the eosinophilic leukocyte. **Annu. Rev. Med.**, **44**:85-101, 1993.

GODFREY, R.C. Asthma and IgE levels in rural and urban communities of the Gambia. **Clin. Allergy** **5**:201-207, 1975.

GROUX, H.; BIGLER, M.; DE VRIES, J.E.; RONCAROLO, M.G. INTERLEUKIN-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. **J. Exp. Med.**, **184**:19-29, 1996.

GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J.E.; RONCAROLO, M.G. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature**, **389**:737-742, 1997.

GRZYCH, J.M.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.; CAULADA, Z.A.; CASPAR, P.; HEINY, S.; LEWIS, F.; SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.**, **146**:1322-1327, 1991.

HAGEL, I.; LYNCH, N.R.; PEREZ, M.; DI PRISCO, M.C.; LOPEZ, R.; ROJAS, E. Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. **Parasite Immunol.** **15**:311-315, 1993.

HAGEL, I.; LYNCH, N.R.; PEREZ, M.; DI PRISCO, M.C.; LOPEZ, R.; ROJAS, E. Relationship between the degree of poverty and the IgE response to *Ascaris* infection in slum children. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **87**:16-18, 1993.

- HANSEN, G.; BERRY, G.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D.T. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. **J. Clin. Invest.**, **103**:175-183, 1999.
- HASSANEIN, H.; KAMEL, M.; BADAWY, A.; EL-GHORAB, N.; ABDEEN, H.; ZADA, S.; EL-AHWANY, E.; DOUGHTY, B. Anti-miracidial effect of recombinant glutathione S-transferase 26 and soluble egg antigen on immune responses in murine schistosomiasis mansoni. **APMIS**, **107**:723-736, 1999.
- HESSE, M.; PICCIRILLO, C.A.; BELKAID, Y.; PRUFER, J.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, M.; CHEEVER, A.W.; SHEVACH, E.M.; WYNN, T.A. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J. Immunol.**, **172**:3157-3166, 2004.
- HOLT, P.G.; MACAUBAS, C.; STUMBLES, P.A.; SLY, P.D. The role of allergy in the development of asthma. **Nature**, **402**:B12-B17, 1999.
- HUSSAIN, R.; POINDEXTER, R.W.; OTTESEN, E.A. Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass. **J. Immunol.**, **148**:2731-2737, 1992.
- JARRETT, E.E.; MILLER, H.R. Production and activities of IgE in helminth infection. **Prog. Allergy**, **31**:178-233, 1982.
- JEANNIN, P.; LECOANET, S.; DELNESTE, Y.; GAUCHAT, J.F.; BONNEFOY, J.Y. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **J. Immunol.**, **160**: 3555-3561, 1998.
- JOSEPH, S.; JONES, F.M.; KIMANI, G.; MWATHA, J.K.; KAMAU, T.; KAZIBWE, F.; KEMIJUMBI, J.; KABATEREINE, N.B.; BOOTH, M.; KARIUKI, H.C.; OUMA, J.H.; VENNERSVALD, B.J.; DUNNE, D.W. Cytokine production in whole blood cultures from a fishing community in an area of high endemicity for *Schistosoma mansoni* in Uganda: the differential effect of parasite worm and egg antigens. **Infect. Immun.**, **72**:728-734, 2004.

- JOSS, A.; AKDIS, M.; FAITH, A.; BLASER, K.; AKDIS, C.A. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. **Eur. J. Immunol.**, **30**: 1683-1690, 2000.
- KATZ, N.; COELHO, P.M.; PELLEGRINO, J. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. **J. Parasitol.**, **56**:1032-1033, 1970.
- KENNEDY, M.; QURESHI, F. Stage-specific secreted antigens of the parasitic larval stages of the nematode *Ascaris*. **Immunology**, **58**:515-522, 1986.
- KUEHR, J.; FRISCHER, T.; MEINERT, R.; BARTH, R.; FORSTER, J.; SCHRAUB, S.; URBANEK, R.; KARMAUS, W. Mite allergen exposure is a risk for the incidence of specific sensitization. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **94**:44-52, 1994.
- KUMAR RK. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. **Pharmacol. Ther.**, **91**:93-104, 2001.
- LA FLAMME, A.C.; RUDDENKLAU, K.; BACKSTROM, B.T. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Infect. Immun.**, **71**:4996-5004, 2003.
- LAMBERTUCCI, J.R. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, **35**:399-404, 1993.
- LEVINGS, M.K.; RONCAROLO, M.G. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **106**:S109-S112, 2000.
- LUCZYNSKA, C.M.; ARRUDA, L.K.; PLATTS-MILLS, T.A.; MILLER, J.D.; LOPEZ, M.; CHAPMAN, M.D. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, Der p I and Der f I. **J. Immunol. Methods**, **118**:227-235, 1989.

LYNCH, N.R.; LOPEZ, R.I.; DI PRISCO-FUENMAYOR, M.C.; HAGEL, I.; MEDOUZE, L.; VIANA, G.; ORTEGA, C.; PRATO, G. Allergic reactivity and socio-economic level in a tropical environment. **Clin. Allergy**, **17**:199-207, 1987.

LYNCH, N.R.; HAGEL, I.; PEREZ, M.; DI PRISCO, M.C.; LOPEZ, R.; ALVAREZ, N. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **92**:404-411, 1993.

LYNCH, N.R.; PALENQUE, M.; HAGEL, I.; DIPRISCO, M.C. Clinical improvement of asthma after anthelmintic treatment in a tropical situation. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, **156**:50-54, 1997.

LYNCH, N.R.; HAGEL, I.A.; PALENQUE, M.E.; DI PRISCO, M.C.; ESCUDERO, J.E.; CORAO, L.A.; SANDIA, J.A.; FERREIRA, L.J.; BOTTO, C.; PEREZ, M.; LE SOUEF, P.N. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **101**:217-221, 1998.

MACAUBAS, C.; SLY, P.D.; BURTON, P.; TILLER, K.; YABUHARA, A.; HOLT, B.J.; SMALLACOMBE, T.B.; KENDALL, G.; JENMALM, M.C.; HOLT, P.G. Regulation of T-helper cell responses to inhalant allergen during early childhood. **Clin. Exp. Allergy**, **29**: 1223-1231, 1999.

MALHOTRA, I.; MUNGAI, P.; WAMACHI, A.; KIOKO, J.; OUMA, J.H.; KAZURA, J.W.; KING, C.L. Helminth- and Bacillus Calmette-Guerin-induced immunity in children sensitized *in utero* to filariasis and schistosomiasis. **J. Immunol.**, **162**:6843-6848, 1999.

MARTINS-FILHO, O.A.; CUNHA-MELO, J.R.; LAMBERTUCCI, J.R.; SILVEIRA, A.M.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules. **Dig. Dis. Sci.**, **44**:570-577, 1999.

MCKEE, A.S.; PEARCE, E.J. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J. Immunol.**, **173**:1224-1431, 2004.

MEDEIROS JUNIOR, M.; ALMEIDA, M.C.; FIGUEIREDO, J.P.; ATTA, A.M.; MENDES, C.M.; ARAUJO, M.I.; TAKETOMI, E.A.; TERRA, S.A.; SILVA, D.A.; CARVALHO, E.M. Low frequency of positive skin tests in asthmatic patients infected with *Schistosoma mansoni* exposed to high levels of mite allergens. **Pediatr. Allergy Immunol.**, **15**:142-147, 2004.

MEDEIROS JUNIOR, M.; FIGUEIREDO, J.P.; ALMEIDA, M.C.; ATTA, A. M.; TAKETOMI, E.A.; SILVA, D.A.; TERRA, S.A.; AMORIM, W.W.; PINHO, R.S.; ARAUJO, M.I.; CARVALHO, E.M. Association between mite allergen (Der p 1, Der f 1, Blo t 5) levels and microscopic identification of mites or skin prick test results in asthmatic subjects. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **129**:237-241, 2002.

MEDEIROS JUNIOR, M.; FIGUEIREDO, J.P.; ALMEIDA, M.C.; MATOS, M.A.; ARAUJO, M.I.; CRUZ, A.A.; ATTA, A.M.; REGO, M.A.; DE JESUS, A.R.; TAKETOMI, E.A.; CARVALHO, E.M. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **111**:947-951, 2003.

MERRETT, T.G.; MERRETT, J.; COOKSON, J.B. Allergy and parasites: the measurement of total and specific IgE levels in urban and rural communities in Rhodesia. **Clin. Allergy**, **6**:131-134, 1976.

MONTENEGRO, S.M.; MIRANDA, P.; MAHANTY, S.; ABATH, F.G.; TEIXEIRA, K.M.; COUTINHO, E.M.; BRINKMAN, J.; GONCALVES, I.; DOMINGUES, L.A.; DOMINGUES, A.L.; SHER, A.; WYNN, T.A. Cytokine production in acute versus chronic human *Schistosomiasis mansoni*: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J. Infect. Dis.**, **179**:1502-1514, 1999.

MWATHA, J.K.; KIMANI, G.; KAMAU, T.; MBUGUA, G.G.; OUMA, J.H.; MUMO, J.; FULFORD, A.J.; JONES, F.M.; BUTTERWORTH, A.E.; ROBERTS, M.B.; DUNNE, D.W.

High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. **J.**

**Immunol.**, **160**:1992-1999, 1998.

NYAN, O.A.; WALRAVEN, G.E.; BANYA, W.A.; MILLIGAN, P.; SANDE, M. van der; CEESAY, S.M.; DEL PRETE, G.; MCADAM, K.P. Atopy, intestinal helminth infection and total serum IgE in rural and urban adult Gambian communities. **Clin. Exp. Allergy**, **31**:1672-1678, 2001.

OH, J.W.; SEROOGY, C.M.; MEYER, E.H.; AKBARI, O.; BERRY, G.; FATHMAN, C.G.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D.T. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **110**:460-468, 2002.

OHKAWARA, Y.; LIM, K.G.; XING, Z.; GLIBETIC, M.; NAKANO, K.; DOLOVICH, J.; CROITORU, K.; WELLER, P.F.; JORDANA, M. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. **J. Clin. Invest.**, **97**:1761-1766, 1996.

OTTESEN, E.A.; POINDEXTER, R.W.; HUSSAIN, R. Detection, quantitation, and specificity of antiparasite IgE antibodies in human schistosomiasis mansoni. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **30**:1228-1237, 1981.

PEREIRA, B.S.A.C. Valores de Referencia para Espirometria em uma Amostra da População Brasileira Adulta. **J. Pneumol.**, **18**:10-22, 1992.

PLATTS-MILLS, T.A.; WHEATLEY, L.M. The role of allergy and atopy in asthma. **Curr. Opin. Pulm Med.**, **2**:29-34, 1996.

PLATTS-MILLS, T.A.; VERVLOET, D.; THOMAS, W.R.; AALBERSE, R.C.; CHAPMAN, M.D. Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **100**:S2-24, 1997.



PLATTS-MILLS, T. A.; VAUGHAN, J.; SQUILLACE, S.; WOODFOLK, J.; SPORIK, R. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. **Lancet**, **357**:752-726, 2001.

PRETOLANI, M.; GOLDMAN, M. IL-10: a potential therapy for allergic inflammation? **Immunol. Today**, **18**:277-280, 1997.

RABELLO, A. Acute human schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **90**: 277-280, 1995.

RABELLO, A.L.; GARCIA, M.M.; PINTO DA SILVA, R.A.; ROCHA, R.S.; KATZ, N. Humoral immune responses in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed up for two years after treatment. **Clin. Infect. Dis.**, **24**:304-308, 1997.

RANDOLPH, D.A.; CARRUTHERS, C.J.; SZABO, S.J.; MURPHY, K.M.; CHAPLIN, D.D. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. **J. Immunol.**, **162**:2375-2383, 1999.

RIEDLER, J.; BRAUN-FAHRLANDER, C.; EDER, W.; SCHREUER, M.; WASER, M.; MAISCH, S.; CARR, D.; SCHIERL, R.; NOWAK, D.; MUTIUS, E. von Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. **Lancet**, **358**:1129-1133, 2001.

RIHET, P.; DEMEURE, C.E.; DESSEIN, A.J.; BOURGOIS, A. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. **Eur. J. Immunol.**, **22**:2063-270, 1992.

RIZZO, M.C.; ARRUDA, L.K.; CHAPMAN, M.D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T.A.; NASPITZ, C.K. IGG and IgE antibody responses to dust mite allergens among children with asthma in Brazil. **Ann. Allergy**, **71**:152-158, 1993.

- RIZZO, M.C.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; SOLE, D.; NASPITZ, C.K. IgE antibodies to aeroallergens in allergic children in Sao Paulo, Brazil. **J. Investig. Allergol Clin. Immunol.**, **7**:242-248, 1997.
- ROYER, B.; VARADARADJALOU, S.; SAAS, P.; GUILLOSSON, J.J.; KANTELIP, J.P.; AROCK, M. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. **Clin. Exp. Allergy**, **31**:694-704, 2001.
- SABIN, E.A.; ARAUJO, M.I.; CARVALHO, E.M.; PEARCE, E.J. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Infect. Dis.**, **173**:269-272, 1996.
- SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M.; TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, **155**:1151-1164, 1995.
- SCHANDENE, L.; ALONSO-VEGA, C.; WILLEMS, F.; GERARD, C.; DELVAUX, A.; VELU, T.; DEVOS, R.; DE BOER, M.; GOLDMAN, M. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. **J. Immunol.**, **152**:4368-4374, 1994.
- SCRIVENER, S.; YEMANEBERHAN, H.; ZEBENIGUS, M.; TILAHUN, D.; GIRMA, S.; ALI, S.; MCELROY, P.; CUSTOVIC, A.; WOODCOCK, A.; PRITCHARD, D.; VENN, A.; BRITTON, J. Independent effects of intestinal parasite infection and domestic allergen exposure on risk of wheeze in Ethiopia: a nested case-control study. **Lancet**, **358**: 1493-1499, 2001.
- SEARS, M.R. Epidemiology of childhood asthma. **Lancet**, **350**:1015-1020, 1997.
- SERRAVALLE, K.; MEDEIROS JUNIOR, M. Ácaros na poeira domiciliar na cidade de Salvador-BA. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, **22**:19-24, 1999.

- SHER, A.; FIORENTINO, D.; CASPAR, P.; PEARCE, E.; MOSMANN, T. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J. Immunol.**, **147**:2713-2716, 1991.
- SORNASSE, T.; LARENAS, P.V.; DAVIS, K.A.; DE VRIES, J.E.; YSSEL, H. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. **J. Exp. Med.**, **184**:473-483, 1996.
- STRACHAN, D.P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, **299**:1259-1260, 1989.
- TAKANASKI, S.; NONAKA, R.; XING, Z.; O'BYRNE, P.; DOLOVICH, J.; JORDANA, M. Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. **J. Exp. Med.**, **180**:711-715, 1994.
- TAYLOR, A.; VERHAGEN, J.; AKDIS, C.A.; AKDIS, M. T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, **135**:73-82, 2004.
- UMETSU, D.T.; AKBARI, O.; DEKRUYFF, R.H. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, **112**:480-487, 2003.
- VELUPILLAI, P.; DOS REIS, E.A.; DOS REIS, M.G.; HARN, D.A. Lewis(x)-containing oligosaccharide attenuates schistosome egg antigen-induced immune depression in human schistosomiasis. **Hum. Immunol.**, **61**:225-232, 2000.
- WALRAVEN, G.E.; NYAN, O.A.; SANDE, M.A. van der; BANYA, W.A.; CEESAY, S.M.; MILLIGAN, P.J.; MCADAM, K.P. Asthma, smoking and chronic cough in rural and urban adult communities in the Gambia. **Clin. Exp. Allergy**, **31**:1679-1685, 2001.
- WEINSTOCK, J.V.; SUMMERS, R.W.; ELLIOTT, D.E.; QADIR, K.; URBAN JUNIOR, J.F.; THOMPSON, R. The possible link between de-worming and the emergence of immunological disease. **J. Lab. Clin. Med.**, **139**:334-348, 2002.

WHO. **Workshop R. Global strategy for asthma management and prevention.** Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Heart Lung and Blood Institute, 1995. Publication n° 95, p.3659.

WILLIAMS, M.E.; MONTENEGRO, S.; DOMINGUES, A.L.; WYNN, T.A.; TEIXEIRA, K.; MAHANTY, S.; COUTINHO, A.; SHER, A. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. **J. Infect. Dis.**, **170**:946-954, 1994.

WILLS-KARP, M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. **Annu. Rev. Immunol.**, **17**:255-281, 1999.

WILLS-KARP, M.; SANTELIZ, J.; KARP, C.L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. **Nat. Rev. Immunol.**, **1**:69-75, 2001.

WORLDWIDE variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **Eur. Respir. J.**, **12**:315-335, 1998.

WYNN, T.A.; CHEEVER, A.W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr. Opin. Immunol.**, **7**:505-511, 1995.

WYNN, T.A.; CHEEVER, A.W.; WILLIAMS, M.E.; HIENY, S.; CASPAR, P.; KUHN, R.; MULLER, W.; SHER, A. IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **J. Immunol.**, **160**:4473-4480, 1998.

YAZDANBAKHSH, M.; BIGGELAAR, A. van den; MAIZELS, R.M. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. **Trends Immunol.**, **22**:372-377, 2001.

YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P.G.; REE, R. van. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, **296**:490-494, 2002.

YEMANEBERHAN, H.; BEKELE, Z.; VENN, A.; LEWIS, S.; PARRY, E.; BRITTON, J. Prevalence of wheeze and asthma and relation to atopy in urban and rural Ethiopia. **Lancet**, **350**:85-90, 1997.

YSSEL, H.; LECART, S.; PENE, J. Regulatory T cells and allergic asthma. **Microbes Infect.**, **3**:899-904, 2001.

ZUANY-AMORIM, C.; CREMINON, C.; NEVERS, M.C.; NAHORI, M.A.; VARGAFTIG, B.B.; PRETOLANI, M. Modulation by IL-10 of antigen-induced IL-5 generation, and CD4+ T lymphocyte and eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity. **J. Immunol.**, **157**:377-84, 1996.

# **ANEXO I**

**SERVIÇO DE IMUNOLOGIA**  
**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

NOME: _____	
Endereço: _____	
Número de Inclusão : _____ DATA : ____/____/____	
IDADE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____ ( ) MASC ( ) FEM.	
NÍVEL SÓCIO-ECONÔMICO : (RENDA FAMILIAR)	
( ) ATÉ UM SALÁRIO MÍNIMO	( ) ENTRE 5 E 10 SALÁRIOS MÍNIMOS
( ) ENTRE 1 E 2 SALÁRIOS MÍNIMOS	( ) MAIS DE 10 SALÁRIOS MÍNIMOS
( ) ENTRE 2 E 5 SALÁRIOS MÍNIMOS	

Quantos habitantes na casa: _____		
Tabagismo	Sim ( ) Não ( )	
	Quantidade: _____ cigarros / Tempo: ____ ( ) meses ( ) anos	
Outros tabagistas na casa	Sim ( ) Não ( ) Quantos: _____	
Fogão à lenha:	Sim ( )	Não ( )
Diesel	Grãos	Polens
Sim ( ) Não ( )	Sim ( ) Não ( )	Sim ( ) Não ( )
Outros poluentes	Sim ( ) Não ( )	
	Quais: _____	

## QUESTIONÁRIO I

1. Alguma vez na vida teve chiado no peito ou falta de ar (cansaço) ?

Sim                       Não

**caso a resposta seja NÃO, passe para a pergunta numero 6.**

2. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito ou falta de ar (cansaço) ?

Sim                       Não

3. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve quantas crises de chiado no peito ou de falta de ar ?

nenhuma crise

1 a 3 crises

4 a 12 crises

mais de 12 crises

4. Nos últimos 12 (doze) meses, você acordou a noite com chiado no peito ou com falta de ar?

nenhuma

menos de uma noite por semana

uma ou mais noites por semana

5. Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado no peito ou falta de ar, foi tão forte, a ponto de impedir que você falasse normalmente ?

Sim                       Não

6. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito ou falta de ar, após exercícios físicos?

Sim                       Não

7. Nos últimos 12 (doze) meses, você tem tido crises de tosse seca, à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória ?

Sim                       Não



## QUESTIONÁRIO II

1. Qual a frequência de suas gripes ou resfriado ?
  - uma ou duas por ano.
  - uma vez por mês.
  - mais de uma vez por mês
  
2. Alguma vez na vida você teve problema de espirros, coriza (corrimento nasal), coceira ou obstrução nasal, quando não estava resfriado ou gripado ?
  - Sim             Não
  
3. Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema ocorreu ?
  - Janeiro         Maio         Setembro
  - Fevereiro       Junho       Outubro
  - Março           Julho       Novembro
  - Abril             Agosto      Dezembro
  
4. Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por esses sintomas nasais (espirros, coriza, coceira ou entupimento) ?
  - nenhuma
  - pouco (alguns minutos ou poucas horas do dia)
  - moderado (uma parte do dia – manhã, tarde ou noite)
  - muito (sintomas diários e constantes)
  
5. Quando você tem contato com poeira, mofo ou cheiro forte, você tem coceira, espirros ou coriza ?
  - Sim             Não
  
6. Quando isso acontece você tem coceira nos olhos ou coceira na garganta ?
  - Sim             Não

### QUESTIONÁRIO III

1. Alguma vez na vida você teve irritações ou coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos, mais de uma vez por ano ?

( ) Sim ( ) Não

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

( ) Sim ( ) Não

3. Quando bebê, você apresentava brotoejas ou assaduras de difícil controle em pescoço, bochechas, atrás das orelhas, ou na área das fraldas?

( ) Sim (....) Não

### QUESTIONÁRIO IV

1. Alergia a medicamentos, bebidas ou alimentos ?

( ) Sim ( ) Não Qual: \_\_\_\_\_

2. Algum familiar direto ( PAI, MÃE, IRMÃO, FILHOS, AVÓS OU TIOS ) apresenta alguma manifestação alérgica ( ASMA, RINITE, URTICÁRIA OU DERMATITE ) ?

( ) Sim ( ) Não Qual: \_\_\_\_\_

3. Nos últimos 15 dias fez uso de algum tipo de medicamento para a sua doença ?

( ) Sim ( ) Não Qual: \_\_\_\_\_

4. Você tem alguma outra doença que necessita uso de medicamentos ?

( ) Sim ( ) Não Qual: \_\_\_\_\_

#### OBSERVAÇÕES A CRITÉRIO DO MÉDICO :

---



---



---

## **ANEXO II**

**SERVIÇO DE IMUNOLOGIA**  
**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**ALERGODIAGNÓSTICO**

**RESULTADO DE TESTES CUTÂNEOS A ANTÍGENOS INALAVEIS**

Nome : \_\_\_\_\_ N.º : \_\_\_\_\_

<b>I</b>		<b>II</b>	
<b>Controle + ( Histamina 1/1000 )</b>		<b>Controle – ( excipiente. Solução. )</b>	
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		<i>Blomia tropicalis</i>	
<i>Dermatophagoides farinae</i>		Fungos anemófilos (mistura)	
<i>Blatella germânica</i>		<i>Periplaneta americana</i>	

COMENTÁRIOS :

---



---



---

DATA : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

## **ANEXO III**

**SERVIÇO DE IMUNOLOGIA****HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGAR SANTOS – UFBA**

Rua Augusto Viana, s/n – Canela – CEP 40140.000 – Salvador-BA

**CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

O presente estudo tem a finalidade de observar e avaliar a associação entre a asma e a infecção por helmintos e você está sendo selecionado para participar deste estudo, na condição de voluntário.

Esta participação, implica na sua concordância em submeter-se, periodicamente, durante um ano, aproximadamente, a exames para determinar a presença de alergia, que consistem em: testes alérgicos, a coleta de amostras de sangue e de amostras de fezes. Adicionalmente, deverá permitir que uma amostra de poeira de sua cama seja aspirada para exames.

Os testes cutâneos serão realizados pela técnica de puntura, feito com o auxílio de puntores descartáveis. O teste por puntura consiste em pingar na face ventral do antebraço da pessoa uma gota da substância que vai ser testada. A seguir faz-se uma puntura (pequena picada na pele sem, porém, provocar sangramento) e, após 20 minutos faz-se a leitura do teste. O exame consistirá de 06 (seis) punturas: 04 (quatro) antígenos diferentes e 02 (dois) controles. Quando uma pessoa tem alergia a um determinado antígeno, surge no local um eritema (vermelhidão) e uma pápula (placa) e pode ocorrer prurido (coceira) no local do teste. Esta reação dura, em média 20 a 30 minutos e desaparece espontaneamente, sem deixar seqüelas (cicatrizes), e não há necessidade de se usar qualquer medicamento para o seu desaparecimento. O tipo de teste que vamos realizar é seguro e, raramente, a pessoa pode ter um aumento dos seus sintomas alérgicos e, se isso vier a ocorrer, será durante o teste e com intensidade muito leve. Esses sintomas podem ser rapidamente controlados com o uso de medicamentos, que no caso serão fornecidos gratuitamente para a pessoa.

Além do teste serão colhidas amostras de 20ml de sangue venoso, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. Pretendemos dosar no soro a presença de anticorpos e de outras proteínas que podem se elevar ou não nas doenças alérgicas. Quando da marcação do dia do teste, o voluntário

receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos.

As pessoas que se submeterem aos exames receberão, se desejarem, os resultados dos mesmos. No caso de detectarmos a presença de parasitas intestinais, você será tratado gratuitamente e, no caso de observarmos a presença de doença alérgica, você receberá instruções para o tratamento da mesma.

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá ser esclarecida com o Dra. Maria Ilma Araújo, coordenadora do projeto e com a Dra. Joanemile Pacheco de Figueiredo, médica do projeto no Serviço de Imunologia do HUPES, Rua Augusto Viana, s/n – Canela, telefone (071)237-7353. Caso você decida deixar de participar do estudo em qualquer momento, mesmo depois de assinar este consentimento, você continuará, sem prejuízos, sendo acompanhado pelo nosso ambulatório ou por outro médico que o tenha encaminhado até nós.

Afirmo que compreendi o que está escrito acima e concordo em participar deste projeto de pesquisa, voluntariamente.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Assinatura: \_\_\_\_\_ Ficha n.º: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_