

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-UFMG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

Samira Diniz Resende

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE RESPOSTAS ALÉRGICAS E INFECCÃO  
POR *Schistosoma mansoni* EM INDIVÍDUOS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA  
RESIDENTES NO DISTRITO RURAL DE BREJO DO AMPARO, EM JANUÁRIA –  
MG**

Belo Horizonte

2016

Samira Diniz Resende

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE RESPOSTAS ALÉRGICAS E INFECÇÃO  
POR *Schistosoma mansoni* EM INDIVÍDUOS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA  
RESIDENTES NO DISTRITO RURAL DE BREJO DO AMPARO, EM JANUÁRIA –  
MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra. Debora Aparecida Negrão-Corrêa

Coorientador: Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Área de concentração: Imunoparasitologia

Belo Horizonte

2016

Samira Diniz Resende

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE RESPOSTAS ALÉRGICAS E INFECÇÃO  
POR *Schistosoma mansoni* EM INDIVÍDUOS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA  
RESIDENTES NO DISTRITO RURAL DE BREJO DO AMPARO, EM JANUÁRIA –  
MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Debora Aparecida Negrão-Corrêa – UFMG (Orientador)

---

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – CPqRR/Fiocruz-Minas (Banca Examinadora)

---

Prof. Dr. David Soeiro Barbosa – UFMG (Banca Examinadora)

Belo Horizonte, 20 de outubro de 2016.

Pelas demonstrações de companheirismo e amizade,  
dedico este trabalho à Vinicius, Vanessa e Elis!

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais lindos, maravilhosos que já me viram ir pra Divinópolis, Diamantina, voltar pra casa e depois BH e em nenhum momento deixaram de me apoiar e incentivar na busca dos meus sonhos! Sei que tenho levado uma vida de andarilha e que isso preocupa vocês, por isso agradeço imensamente o carinho e a confiança em mim.

Ao Paulo, que admiro e tenho muito orgulho de ser irmã, obrigada por sempre se colocar a disposição pra me ajudar na minha vida nômade! À minha cunhada Letícia, que estudou comigo até nos domingos pra me ajudar passar nesse mestrado. Agora to no fim e você é parte disso! Estou muito feliz por tê-la em minha família e trazido pra ela o Rafael, coisa mais linda fofa da titia!!!

Às minhas tias Aparecida e Maisé, pela presença e carinho têm comigo, e também por todas as coisas gostosas que fazem pra mim quando vou pra Pitangui! Isso faz toda diferença pra mim!

Ao Wagner, pelo companheirismo, por ter o coração mais lindo que já vi, por ajudar a colocar meus dados na planilha e me ceder uma sala no seu escritório estudar, por fazer as comidas mais delicias enquanto gasto meu tempo nessa dissertação, e entre milhares de outras coisas, te agradeço pelo carinho e amor que dedicados a mim!

À Elis, uma grande amiga, companheira pra ir pra balada ou pra ler e formatar a dissertação da amígneia desesperada com a defesa do mestrado! Você foi um dos grandes presentes que a parasitologia me deu, e hoje é minha base e porto seguro em BH e juntamente com o Paulo formamos a família Woodstock. Não há palavras que expressem o quão grata sou a vocês por me darem um lar!

Aos meus queridos amigos Vini, Vanessa (Flu) e Danizuda!!! Caramba, como amo vocês, como temos histórias, como já rimos, comemos e passeamos desde o ano passado, hein? Parece que conheço vocês a um século e sei que essa amizade vou levar pra vida! Quis demais entrar nesse mestrado e conseguir o título, mas hoje vejo que sem vocês na minha vida nada disso teria a menor graça!

Aos amigos que estão comigo desde a época de Diamantina: Kamila, Tata, Clarissa, Bels e Filipe. Obrigada por mesmo longe se fazerem presente de alguma forma na minha vida, dando carinho, incentivo e me deixando mais feliz!

À todos do Laboratório de Imunologia de Helminhos, Jailza por me ensinar com toda paciência do mundo os Elisas, Fernanda por me ajudar com as análises estatísticas que só a gente sabe como foi sofrido né? A minha IC Giovana que deve ter decorado o banco de dados

de tanto que me auxiliou na montagem! À Vanessa F., Michele, Laurinha, João e Guilherme, por tornar esse ambiente de trabalho muito divertido!

À minha orientadora Deborah, um exemplo de profissional! Obrigada pela confiança e oportunidade de trabalhar com esse projeto incrível, é imensurável o quanto tenho aprendido com você!

Por fim agradeço a todos do Departamento de Pós-graduação em Parasitologia por todo o suporte e apoio oferecido durante o meu mestrado. Também agradecemos o apoio financeiro das Agências de Fomento CNPq, através do Edital doenças negligenciadas – DECIT, e FAPEMIG que permitiram a realização deste estudo.

É uma dádiva trabalhar com o que se ama, e eu posso dizer com toda certeza que fui muito feliz nesse mestrado, seja pelo curso, pelo projeto, pela orientadora ou pelos amigos que fiz... E no final das contas é isso que realmente importa!

*Não contavam com minha astúcia!*

(Chapolin Colorado, 1972)

## RESUMO

Doenças alérgicas e infecções produzidas por helmintos parasitos induzem uma resposta imune predominantemente Th2, estimulando o aumento e ativação de eosinófilos, basófilos, mastócitos e altos níveis de IgE circulantes. No caso da esquistossomose, a resposta Th2 é estimulada com o início da ovipostura e geralmente é acompanhada por aumento de IL-10, resultando em uma infecção crônica modulada que persiste por anos. Alguns estudos epidemiológicos têm relatado associações inversas entre alergia e helmintoses, propondo que a exposição frequente do sistema imune a agentes infecciosos pode levar ao desenvolvimento de uma resposta imune modulada, evitando, em parte, o desenvolvimento de doenças inflamatórias. Entretanto, a maioria dos trabalhos publicados tem sido realizados em áreas com alta carga parasitária, situação que tem sido alterada em muitas áreas endêmicas brasileiras nos últimos anos devido ao impacto dos programas de controle. Com o intuito de esclarecer alguns destes aspectos, o presente estudo transversal visa analisar possíveis relações entre infecções por helmintos e reações alérgicas em 257 residentes no distrito rural de Brejo do Amparo, município de Januária, MG. Os participantes do estudo responderam um questionário socioeconômico e outro específico para identificação de doenças alérgicas (ISAAC), e também forneceram amostras de fezes e sangue para realização dos exames parasitológicos, imunológicos, moleculares e hemograma. Os dados mostram que a população do estudo tem baixa escolaridade e renda, além de exposição frequente a fontes de infecção parasitária. O questionário ISAAC identificou 38 (17%) indivíduos com sintomas declarados e frequentes de Asma, 134 (59%) com Rinite e 32 (14%) com Eczema. Exames complementares revelam que 23,8% dos participantes apresentaram níveis séricos elevados de IgE reativo a alérgenos frequentes na poeira doméstica. Para garantir o diagnóstico da infecção por *S. mansoni* em indivíduos com carga parasitária muito baixa, as amostras de fezes foram analisadas por várias técnicas parasitológicas (Kato-Katz, Helmintex<sup>®</sup> e Gradiente salino) e por PCR-ELISA, revelando uma prevalência de 54,4% e mediana de 4 ovos/g fezes. O soro de cada participante foi utilizado para determinar a concentração de IgE total e de IL-10 através da técnica de ELISA. Apesar dos indivíduos com alta carga parasitária apresentarem elevação da concentração de IgE total e do número de eosinófilos circulantes, estas variáveis foram semelhantes entre os indivíduos infectados e não infectados, enquanto que somente 14 % apresentaram níveis detectáveis de IL-10 no soro. A análise de regressão linear multivariada revelou que indivíduos infectados com *S. mansoni* com mais de 12 OPG tiveram 5 vezes menos chance de desenvolver reatividade de IgE contra alérgenos de poeira doméstica. Conforme estabelecido pelo questionário ISAAC na população estudada, a Asma foi 7 vezes mais frequente em crianças menores de 10 anos e não houve associação entre Asma e reatividade de IgE (Atopia), sugerindo que os sintomas de asma estavam relacionados com infecções virais na infância. Curiosamente, indivíduos infectados com *S. mansoni* com mais de 12 OPG tiveram 3 vezes menos chance de ter Asma.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, doenças alérgicas, Asma, imunomodulação

## ABSTRACT

Allergic diseases and infections caused by helminth induces an immune response predominantly Type 2, stimulating the increase and activation of eosinophils, basophils, mast cells and high levels of IgE circulating. In the case of schistosomiasis, the Th2 response is stimulated with the beginning of oviposition and is usually followed by an increase in IL-10, resulting in a modulated chronic infection that persists for years. Some epidemiological studies have reported inverse associations between allergy and helminths, suggesting that frequent exposure of the immune system to infection can lead to development of a modulated immune response, avoiding, in part, development of inflammatory diseases. However, most studies have been conducted in areas with high parasitic load, a situation that has been changed in many Brazilian endemic areas in recent years due to the impact of control programs. In order to clarify some of these aspects, the present cross-sectional study aims to establish possible relationship between helminth infections and allergic reactions in 257 residents in the rural district of Brejo do Amparo, Januária city, State of Minas Gerais. The volunteers of the study answered a socioeconomic questionnaire and other specific questionnaire for identification of allergic diseases (ISAAC), and also provided stool and blood samples to perform the parasitological, immunologic and molecular tests and hemogram. The results showed that the study population have low education and income, and are frequent exposure to sources of parasitic infection. The ISAAC questionnaire identified 38 (17%) individuals with declared and frequent symptoms of asthma, 134 (59%) with rhinitis and 32 (14%) with Eczema. Complementary tests revealed that 23.8% of volunteers had high serum levels of IgE reactive to common allergens in house dust. To ensure the diagnosis of infection in individuals with very low parasitic load, stool samples were examined by several parasitologic techniques (Kato-Katz, Helmintex<sup>®</sup> and saline gradient) and by PCR-ELISA, showing a prevalence of 54.4% and a median of 4 eggs/g faeces. Serum from each subject was used to determine the total IgE concentration and IL-10 by ELISA. The serum levels of total IgE and number of circulating eosinophils were similar among infected and uninfected subjects, while only 14% presented detectable levels of IL-10 in serum. Multivariate linear regression analysis revealed that *S. mansoni*-infected individuals with more than 12 OPG had 5 times less chance to develop IgE reactivity against allergen of domestic dust. As established by ISAAC questionnaire in the study population, Asthma was 7 times more frequent in children under 10 years and there was no association between Asthma and IgE reactivity (Atopy), suggesting that the Asthma symptoms was related to viral infections in childhood. Interestingly, *Schistosoma*-infected individuals with more than 12 OPG had 3 times less chance to have Asthma.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, allergens diseases, Asma, immunomodulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica dos países endêmicos para a esquistossomose.....	20
Figura 2 – Ciclo evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i> . Esquematização das etapas de desenvolvimento e formas evolutivas do parasito, tanto no hospedeiro intermediário como no hospedeiro definitivo.....	22
Figura 3 – Prevalência da esquistossomose no Brasil. Encontrada em 13 estados brasileiros com a maior concentração de casos nos estados de Minas Geras e Bahia.....	24
Figura 4 – Indução de células Th1, Th2 e T regulatórias após a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> .....	27
Figura 5 – Localização do município de Januária em Minas Gerais; B: Igreja do Rosário em Brejo do Amparo, distrito de Januária-MG.....	37
Figura 6 – Fluxograma do estudo transversal realizado na população da comunidade rural de Brejo do Amparo em Januária-MG.....	40
Figura 7 – Distribuição da carga parasitária entre os infectados por <i>S. mansoni</i> (n=140) no Distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.....	51
Figura 8 Distribuição da carga parasitária por faixa etária entre os infectados por <i>S. mansoni</i> (n=140) no Distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.....	52
Figura 9 – Número de ovos de <i>S. mansoni</i> eliminados nas fezes de indivíduos com ou sem alergia declarada. A: Asma; e B- Rinite; e C- Eczema.....	55
Figure 10 – : Intensidade de atopia em pacientes infectados e não infectados por <i>S. mansoni</i> ; B- distribuição de carga parasitária em pacientes atópicos e não atópicos; e C- Intensidade de atopia para carga parasitária na população de Brejo do Amparo, Januária-MG. A e B*.....	56
Figura 11 – Intensidade da atopia em pacientes declarados como positivos ou negativos para: A- Asma; B- Rinite; e C- Eczema, na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	57
Figura 12 – Associação da eosinofilia com: A- Infectados e não infectados por <i>S. mansoni</i> na população do estudo; B- medida categórica de opg; C- medida contínua de opg;.....	59

Figura 13 – Associação da eosinofilia com atopia: A- medida contínua de atopia; e B- medida categórica de atopia.....	59
Figura 14 –Distribuição da eosinofilia em indivíduos positivos e negativos para: A- Asma; B- Rinite; C- Eczema.....	60
Figura 15 – Associação de IgE Total com: A- Infecção por <i>S. mansoni</i> ; e B- medida continua de atopia; Cmedida categórica de atopia; e D- medida continua de carga parasitária; e E- Eosinofilia.....	61
Figura 16- Distribuição de IgE Total em indivíduos positivos e negativos para: A- Asma; B- Rinite; e CEczema.....	62
Figura 17- Distribuição e associação da IL-10 com: A: infecção por <i>S. mansoni</i> ; B- medida contínua de atopia; e C- medida categórica de atopia; D- medida contínua de carga parasitária; e E- medida categórica de carga parasitária; F- Eosinofilia; e G- IgE Total.....	63
Figura 18 –Distribuição de IgE Total em indivíduos positivos e negativos para: A- Asma; B- Rinite; e CEczema.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas e socioeconômicas dos moradores (n=229) do Distrito de Brejo do Amparo, Januária MG.....	47
Tabela 2 – Caracterização da estrutura sanitária nas 53 residências avaliadas no Distrito de Brejo do Amparo, Januária MG.....	48
Tabela 3 – Perfil da população com relação à infecção e/ou coinfecção por helmintos e protozoários, entre os indivíduos examinados no Distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.....	49
Tabela 5 - Análise de concordância entre os testes parasitológicos e moleculares utilizados para identificação da infecção por <i>S. mansoni</i> em moradores de Distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.....	50
Tabela 6 – Prevalência e Intensidade da infecção para <i>Schistosoma mansoni</i> quanto à gênero e faixa etária na população do distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.....	51
Tabela 7 – Prevalência e intensidade da infecção parasitária em indivíduos que relataram tratamento antihelmíntico recente na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	52
Tabela 8 – Classificação dos sintomas declarados em cada módulo avaliado no questionário ISAAC de acordo com o tempo em que ocorreram, frequência e intensidade na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	53
Tabela 9 – Prevalência de indivíduos sintomáticos para Asma, Rinite e Eczema em relação ao gênero e faixa etária na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	54
Tabela 10 – Prevalência de indivíduos positivos por <i>S. mansoni</i> entre os indivíduos que foram classificados como alérgicos ou não alérgicos na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	54
Tabela 11 – Distribuição por faixa etária e sexo da prevalência de pacientes reativos para os alérgenos de poeira testados na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	55
Tabela 12 – Distribuição por faixa etária e sexo da prevalência de pacientes reativos para os alérgenos de poeira testados na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	56
Tabela 13 – Prevalência da atopia em pacientes declarados como alérgicos no questionário ISAAC na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	57
Tabela 14 – Quantificação sérica de eosinofilia por gênero e faixa etária dos moradores de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	58
Tabela 15 - Quantificação de IgE Total para gênero e faixa etária nos moradores de Brejo do Amparo, JanuáriaMG.....	60

Tabela 16 - Conc sérica da citocina IL-10 para gênero e faixa etária nos moradores de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	62
Tabela 17 – Modelo de regressão logística para a associação da IL-10 na atopia população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	64
Tabela 18 – Modelo de análise multivariada para Atopia, na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	65
Tabela 19: Modelo de análise multivariada para Asma, na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

BSA - Albumina de Soro Bovino

COEP – Comitê de Ética e Pesquisa

ELISA – Ensaio imunoenzimático

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucinas

IL1RL1- IL-1 receptor-like 1

INF- $\gamma$  – Interferon gama

ISAAC – “*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*” Estudo Internacional de Asma e Alergias em Crianças

ng/ml – Nanograma por mililitro

OPG- Gramas por ovos

PBS – Salina tamponada “*phosphate buffered saline*”

pg/ml – picogramas por mililitro

TGF- $\beta$ - Fator de transformação de crescimento

Th 1 - Resposta imune do tipo 1

Th17- Resposta imune do tipo 17

Th2 – Resposta imune do tipo 2

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

Treg- Células TCD4+designadas reguladoras

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UI/ml – Unidades Internacionais por mililitro

WHO- Organização Mundial de Saúde

$\mu$ l – Microlitros

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO .....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
SUMÁRIO.....	15
1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Gênero <i>Schistosoma</i> .....	19
2.2 <i>Schistosoma mansoni</i> .....	20
2.3 Esquistossomose no Brasil .....	22
2.4 Resposta imune na esquistossomose .....	25
2.5 Doenças alérgicas e teoria da higiene.....	27
2.6 Doenças alérgicas e helmintos.....	31
3. JUSTIFICATIVA .....	35
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. Geral.....	36
4.2 Específicos.....	36
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
5.1 Desenho do estudo e seleção dos participantes.....	37
5.2 Critérios de elegibilidade.....	38
5.3 Considerações éticas.....	38
5.4 Aplicação do questionário familiar, socioeconômico e ISAAC.....	38
5.5 Coletas e processamento das amostras.....	39
5.6 Exames Parasitológicos .....	40
5.7 Testes Moleculares.....	42
5.8 Quantificação dos níveis de IgE Total.....	43
5.9 Quantificação dos níveis de IgE Específico.....	43
5.10 Quantificação dos níveis de IL-10.....	44
5.12 Análise de dados .....	45
6. RESULTADOS .....	46
6.1 Caracterização da População .....	46

6.2	Perfil de infecção parasitária na população de Estudo .....	49
6.3	Caracterização dos indivíduos alérgicos na população de Brejo do Amparo .....	53
6.3.1	Análise do questionário ISAAC para caracterização de Asma, Rinite e Eczema alérgica na população de estudo .....	53
6.4	Nível de reatividade de IgE sérica à alérgenos da poeira na população de Brejo do Amparo	56
6.5	Parâmetros da resposta imunológica na população de Brejo do Amparo .....	58
6.5.1	Eosinófilos .....	58
6.5.2	IgE Total .....	61
6.5.3	IL-10 .....	63
6.6	Modelos de análise multivariada .....	65
7.	DISCUSSÃO .....	67
8.	CONCLUSÃO .....	77
9.	REFERÊNCIAS .....	78
	<b>ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....</b>	<b>93</b>
	<b>ANEXO 2 – Parecer Consubstanciado do CEP .....</b>	<b>102</b>
	ANEXO 3 – Questionário familiar .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	ANEXO 4 – Questionário socioeconômico .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	ANEXO 5 – Questionário ISAAC .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Descrita por Theodor Bilharz no Egito, em 1851, a esquistossomose é uma doença infecciosa crônica que afeta mais de 230 milhões pessoas em todo o mundo e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, localizadas principalmente na África, Ásia e América (WHO, 2014; Vos, *et al.*, 2012). Apesar de ter havido redução nos casos fatais decorrentes de esquistossomose, a doença ainda hoje representa uma importante causa de morbidade e mortalidade, sendo responsável por cerca de 280 mil óbitos/ano devido ao parasitismo e suas complicações (Van der Werf *et al.*, 2003).

No Brasil, a esquistossomose é causada exclusivamente por *Schistosoma mansoni* e afeta 2-8 milhões de pessoas que vivem principalmente no Espírito Santo, Minas Gerais, Bahia e região litorânea dos Estados Nordestinos (Noya *et al.*, 2015). O homem se infecta através da penetração ativa das cercarias, fase larval do parasito que são eliminadas para o meio aquático por moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados, através da pele ou mucosas expostas. Após migração pela circulação, os vermes adultos habitam o as veias mesentéricas inferiores do sistema porta hepático onde liberam poucas centenas de ovos. Somente 40-50 % dos ovos eliminados na circulação atravessam o endotélio vascular, a mucosa intestinal e são eliminados pelas fezes do hospedeiro, o restante dos ovos do parasito fica retido no intestino ou são carregados para o intestino induzindo a formação de granulomas em resposta aos antígenos produzidos no local, podendo causar patologia intestinal e hepática (Andrade & Prata 1963; Andrade 2008; WHO/PAHO 2014). A morbidade dessa doença está relacionada à carga parasitária, tempo de exposição ao parasito e/ou frequência de reinfecções, estado nutricional e co-morbidades do hospedeiro. Outro fator determinante na morbidade da esquistossomose é o tipo e intensidade da resposta imunológica do hospedeiro à infecção (Hiatt *et al.* 1980; De Jesus *et al.* 2002; Abath *et al.* 2006).

A resposta imunológica induzida pela infecção por *S. mansoni* altera no decorrer do desenvolvimento do parasito; durante a migração dos esquistossômulos e maturação dos vermes adultos ocorre à indução de uma resposta imune de perfil Th1 (Pearce *et al.* 1991), caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), interleucinas 2 (IL-2), IL-1, IL-12, IL-6, e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Pearce & MacDonald 2002; Wilson *et al.* 2007). Com o início da ovipostura, antígenos excreto-secretado pelos ovos induzem uma mudança no perfil das citocinas circulantes e a resposta imune torna-se predominantemente Th2 (Grzych *et al.* 1991; Pearce *et al.* 1991). Com o

estabelecimento da resposta do tipo 2 ocorre a diminuição da resposta Th1, ocorrendo então um aumento na produção das interleucinas 4 (IL-4), IL-5 que atuam na estimulação da produção de IgE (imunoglobulina E) e de eosinófilos circulantes (Mosmann 1992). Paralelamente, também ocorre a indução da produção de IL-10 e consequente modulação do processo inflamatório (Wynn *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2007). Este processo de modulação da resposta granulomatosa na fase crônica é de grande importância, e tem sido associado com o prognóstico benigno da doença, garantindo a sobrevivência do hospedeiro (Pearce & MacDonald 2002; Chuah *et al.* 2014). A produção de IL-10 apresenta importante função regulatória da formação granulofibrótica (Hesse *et al.* 2004; Baumgart *et al.* 2006; Van Der Vlugt *et al.* 2012). Durante o período inicial da resposta granulomatosa, a IL-10 através da regulação da expressão IL-12/IL-12R atua modulando a produção de IFN- $\gamma$ , citocina de perfil Th1 (Wynn *et al.* 1998; Wilson *et al.* 2007). Posteriormente, IL-10 e TGF- $\beta$  induzem células regulatórias (Treg) que regulam o balanço da resposta Th1/Th2 (Wilson *et al.* 2007; Wynn *et al.* 2004; Pearce & MacDonald 2002). Assim, IL-10 também é essencial para evitar excessivas respostas Th2 e consequentemente a patologia grave da fase crônica (Hoffmann *et al.* 2000).

A resposta imune à infecção por helmintos tem sido conhecida por compartilhar características com as infecções alérgicas. Ambas são caracterizadas por possuírem resposta celular Th2, presença de células T CD4+ produzindo altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, acompanhada por eosinofilia, alta produção de IgE, mastocitose (Yazdanbakhsh *et al.*, 2001; Fallon *et al.*, 2007).

Alergias são doenças poligênicas multifatoriais (Matricardi *et al.*, 1998; Gale 2002), mediadas por respostas imunes Th2, que têm tido um drástico aumento nos últimos anos principalmente em países mais desenvolvidos. Fatores genéticos têm sido insuficientes para explicar este aumento e estudos epidemiológicos têm buscado identificar fatores ambientais que possam estar associados. Entre os fatores ambientais que tem sido associado ao aumento de alergia, alguns estudos relatam a reduzida exposição a patógenos durante a infância. A falta de estimulação de resposta imune Th-1 na infância poderia favorecer o desenvolvimento de resposta Th-2 inapropriadas, que seria a base da teoria da higiene (Strachan, 1989; Garn & Renz 2007). Estudos epidemiológicos, no entanto, indicam que helmintos parasitas, que também são fortes indutores da resposta Th2, também podem modular doenças alérgicas, por meio da geração de células T reguladoras capazes de suprimir as respostas imunes Th1 e Th2 (Wilson *et al.*, 2005). Pesquisadores têm sugerido que os mecanismos imunes regulatórios,

que atenuam a resposta anti-parasita também podem beneficiar o hospedeiro bloqueando a progressão para reações atópicas (Yazdanbakhsh et al., 2001; Wilson et al., 2005).

Vários estudos epidemiológicos em áreas de endemicidade alta e moderada têm demonstrado associação inversa entre a reatividade para alérgenos e a presença de infecções crônicas por helmintos como *A. lumbricoides* e *T. trichiura* em áreas rurais do Equador (Cooper et al., 2003); ancilostomíase no sudeste asiático (Flohr et al., 2006); e *S. haematobium* em crianças do Gabão (van den Biggelaar et al., 2000). Rodrigues e colaboradores (2008) relataram que as infecções por *T. trichiura* nos primeiros anos de vida são associados a uma prevalência reduzida de reatividade à alérgenos em testes cutâneos no fim da infância independente de infecções posteriores. Karadag e colaboradores (2006) também demonstraram em um estudo com crianças europeias de áreas rurais uma relação inversa entre a sensibilização para ascaridíase (medida pela presença de anticorpos IgG específicos) e a presença de IgE específica para o aero-alérgenos.

No entanto, nem todos os estudos têm mostrado uma associação inversa entre alergia e helmintoses; alguns trabalhos têm fornecido evidências para associações positivas entre a presença de infecção por helmintos e testes cutâneos (Palmer et al., 2002; Obihara et al., 2006; Hunninghake et al., 2007; da Silva et al., 2008) ou IgE específica elevada para alérgenos (Dold et al., 1998). No estudo de Obihara e colaboradores (2006) realizados com crianças de uma área endêmica na África do Sul, no qual foi aplicado o questionário ISAAC, teste cutâneo e IgE específico para *Ascaris*; foi demonstrado que em crianças com níveis elevados de IgE específico anti-*Ascaris* houve um aumento significativo no risco de positividade para aero-alérgenos, especialmente para ácaros, aumento de asma atópica, rinite atópica e aumento da hiperresponsividade brônquica relacionados com atopia. Outros estudos (Ferreira et al., 2007 ; Cooper 2008) têm também relatado associações entre o aumento do risco de chiado em algumas populações que podem ser causados pela resposta imune do hospedeiro ao parasita ou por uma resposta Th2 reforçada para aero-alérgenos.

Estudos populacionais em áreas onde a intensidade de infecção por helmintos são baixas, esporádicas ou transitórias (por exemplo, quando seres humanos não são hospedeiros definitivos e a infecção crônica não é estabelecida), parece haver uma potencialização dos distúrbios atópicos. Como mostrou Palmer e colaboradores (2002) em estudo realizado com crianças em áreas rurais da China, a infecção por *A. lumbricoides* foi associada ao maior risco de Asma e a um aumento de positivos para alérgenos nos testes cutâneos. Gonzalez-Quintela et al., 2006 também demonstraram em seu estudo que a exposição a *Toxocara* está associada com a sensibilização alérgica em uma população adulta na Espanha.

Essas discrepâncias em estudos populacionais que associam infecções helmínticas com doenças alérgicas podem ser justificadas por quatro fatores: 1) Momento e duração da primeira infecção, infecções precoces ou crônicas podem induzir efeitos imunomoduladores que suprimem a inflamação alérgica causada por parasitas e alérgenos enquanto as infecções tardias ou esporádicas podem aumentar a alergia (Cooper et al., 2006; Rodrigues et al., 2008); 2) A intensidade da infecção, quanto maior a carga parasitária maior pode ser a indução da resposta de imunomodulação, ao passo que infecções leves podem ser mais propensas a ter o efeito oposto (Cooper et al., 2009); 3) Genética do hospedeiro, que leva em conta a capacidade de induzir mecanismos específicos de regulação imune (Peisong et al., 2005; Moller et al., 2007); 4) A espécie do parasita, que pode ter efeitos diferentes sobre o risco de atopia e doenças alérgicas (Leonardi-Bee et al., 2006).

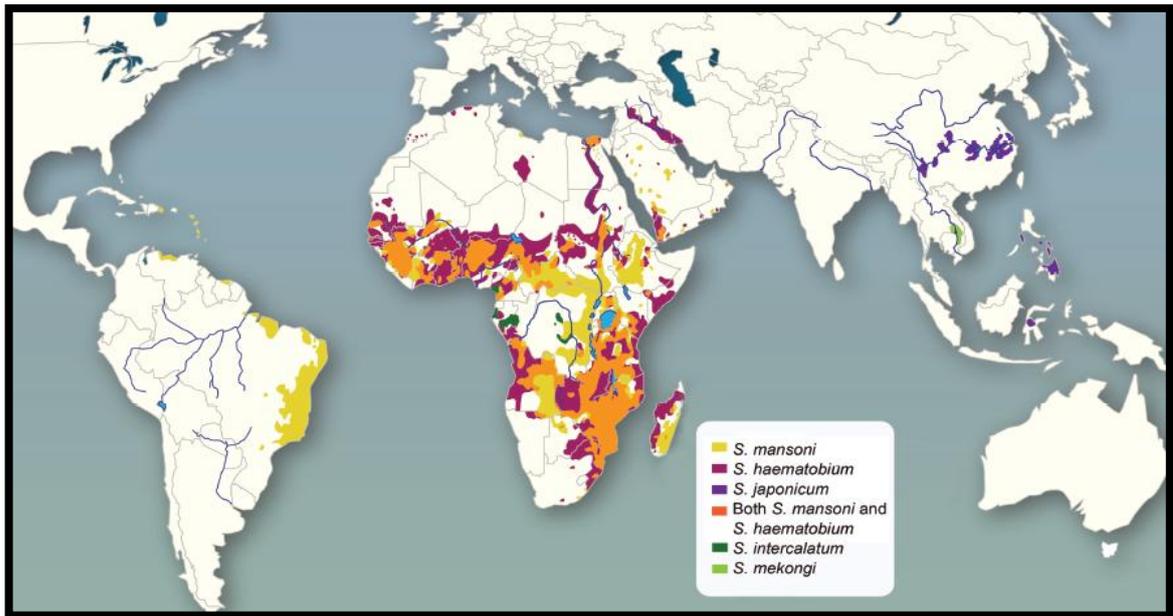
Para diminuir as inconsistências e melhor compreender essa associação, mais estudos são necessários. A maioria dos trabalhos publicados foram realizados em áreas endêmicas com alta carga parasitária, nos quais tem sido observado uma indução à supressão da resposta imune (Smits 2010). É preciso considerar que essa realidade tem mudado após a implementação dos programas de intervenção e controle, tornando possível que esteja ocorrendo não só uma mudança no perfil epidemiológico, mas também no perfil imunológico do hospedeiro. Além disso, os programas de tratamento também podem trazer implicações para a modulação da resposta imune, bem como na produção de IL-10 um dos principais moduladores na regulação desse sistema (Maizels et al., 2014). De acordo com Correale & Farez (2011), pacientes cronicamente infectados exibem altos níveis citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- $\beta$ , e a produção dessas citocinas pode diminuir após o tratamento anti-helmíntico. Outros estudos têm relatado que o tratamento anti-helmíntico em crianças de áreas endêmicas aumenta a sensibilidade alérgica (van den Biggelaar et al., 2004).

Desta forma, fica evidente a necessidade de estudos mais detalhados que esclareçam a relação da infecção por *S. mansoni* na evolução de doenças alérgicas em áreas onde os indivíduos estão sujeitos a baixa carga parasitária e re-infecções frequentes e este será o foco deste estudo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Gênero *Schistosoma*

Taxonomicamente, as espécies do gênero *Schistosoma* pertencem à classe Trematoda e ao filo Platyelminthes, são dioicos e vivem na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. As fêmeas se alongam no canal ginecóforo do macho, onde madurem sexualmente e são fecundadas, produzindo seus ovos que são liberados na circulação sanguínea (Gryseels, 2012). Das espécies de *Schistosoma* que são capazes de infectar o homem, as espécies *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma mansoni* (Sambon 1907) e *Schistosoma japonicum* (Katsurada 1904) são responsáveis pela maioria dos casos humanos. *S. haematobium* e *S. mansoni* encontram-se amplamente distribuído na África e no Oriente Médio, sendo que apenas *S. mansoni* também está presente nas Américas (Figura 1). *S. japonicum* é transmitido em áreas da Ásia, principalmente nas Filipinas e na China (Colley *et al.*, 2014). Outras três espécies do gênero *Schistosoma intercalatum* (Fisher 1934), *Schistosoma mekongi* (Voge, Bruckner & Bruce, 1978) e *Schistosoma malayensis* (Greer 1988), são parasitos cuja transmissão está relacionada a focos limitados e com menor importância epidemiológica, sendo verificado que casos de infecção por *S. mekongi* ocorrem em comunidades localizadas na bacia do Rio Mekong, enquanto que a infecção por *S. guineensis* e *S. intercalatum* ocorre em áreas da África Ocidental e Central China (Ross *et al.* 2002; WHO 2002; Gryssels *et al.* 2006; Gryssels 2012; Colley *et al.* 2014).



**Figura 1** - Distribuição geográfica dos países endêmicos para a esquistossomose. FONTE: Weerakoon *et al.* (2015).

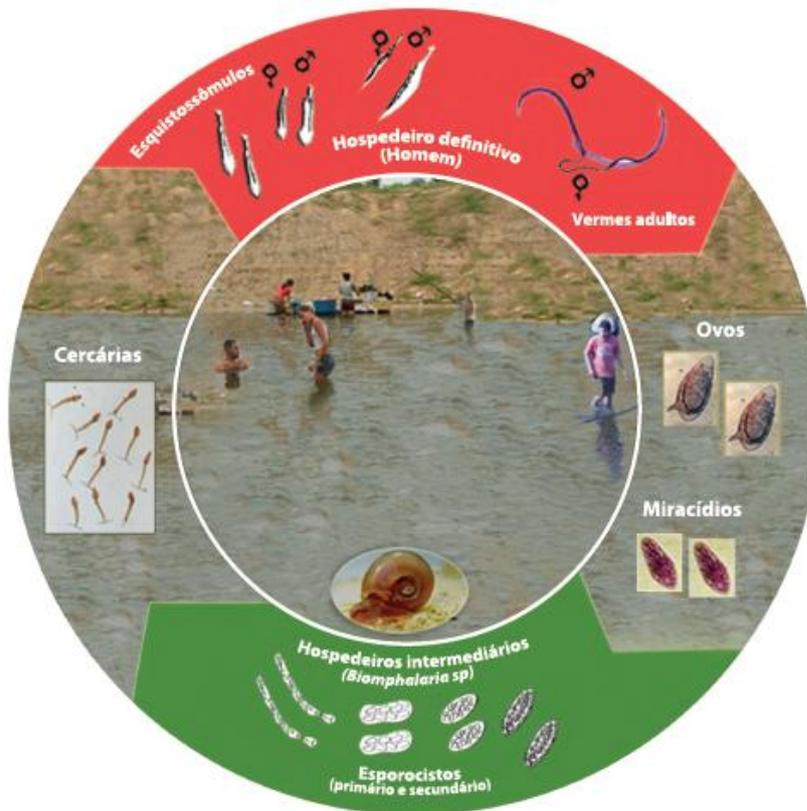
## 2.2 *Schistosoma mansoni*

A espécie *S. mansoni* é o agente da esquistossomose mansoni ou moléstia de Pirajá da Silva, única das infecções causadas pelo gênero *Schistosoma* que é endêmica no Brasil. Estudos indicam que a esquistossomose foi introduzida pelos portos de Salvador e Recife, em meados do século XVI, com o comércio de escravos africanos certamente infectados com *S. mansoni* e *S. haematobium*. *S. mansoni* foi a única espécie do parasito que se estabeleceu encontrar pelo menos três espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* susceptíveis ao seu desenvolvimento: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, propiciando assim o estabelecimento da espécie no país. No século XVIII, com a descoberta de ouro e diamante em Minas Gerais, ocorreu intensa migração para estas áreas. A introdução e disseminação da esquistossomose sempre estiveram ligadas ao desenvolvimento econômico do país. Assim, no meio do século XIX, a migração para São Paulo e para o norte do Paraná foi iniciada, onde vários focos de esquistossomose foram criados. O mesmo ocorreu em Fordlândia (Estado do Amazonas), uma cidade criada pela empresa Ford para explorar goma durante a Segunda Guerra Mundial, contou com o trabalho dos migrantes nordestinos (Lambertucci *et al.*, 1987; Amaral & Porto, 1994).

A espécie *S. mansoni* foi nomeada por Sambon, em 1907, em homenagem a Patrick Manson, mas foi Pirajá da Silva que realmente descreveu pela primeira vez os vermes desta espécie, visto que Sambon tinha examinado um único verme proveniente de um paciente e

que estava em péssimas condições. Em 1908, Manoel Pirajá da Silva, diagnosticou 20 casos por meio de exame de fezes e realizou necropsias em três destes pacientes que vieram a óbito, tornando possível a descrição detalhada dos vermes adultos e do ovo com espinho lateral no útero da fêmea, diferenciando *S. mansoni* de *S. haematobium* (Pirajá da Silva 1909).

Para completar seu desenvolvimento (Figura 2), *S. mansoni* necessita de um hospedeiro intermediário, que são algumas espécies de molusco do gênero *Biomphalaria*, sendo que no Brasil as espécies que são encontradas naturalmente infectadas são *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. glabrata* (Paraense, 2001) e um hospedeiro definitivo, sendo o homem o hospedeiro de maior importância epidemiológica (Coelho, 1995; Santos *et al.*, 2008; Gryseels, 2012). No homem, *S. mansoni* fica alojado nas veias do sistema porta-hepático e mesentéricas, liberando seus ovos na circulação. Aproximadamente 50% dos ovos produzidos ficam retidos em vários tecidos provocando uma inflamação granulomatosa. Os demais ovos são capazes de aderir ao endotélio vascular, ultrapassar a mucosa intestinal e ser excretado do hospedeiro pelas fezes. No ambiente, os ovos que atingem coleções hídricas liberam o miracídeo, larva ciliada que nada até encontrar o seu hospedeiro intermediário, que são algumas espécies do gênero *Biomphalaria*. Ao penetrar no molusco, os miracídeos se transformam em esporocistos, que sofrem multiplicações assexuadas até originar as cercárias, que são liberadas para o meio aquático pelo estímulo de luz e temperatura. As cercárias penetram ativamente na derme ou mucosa do hospedeiro definitivo com o auxílio do conteúdo de suas glândulas adesivas e de penetração, se transformando em esquistossômulos. Após a penetração, os esquistossômulos migram preferencialmente pelos vasos sanguíneos para o coração e pulmões e posteriormente se alongam nas veias do sistema porta hepático, onde sofrem maturação sexual e copulam completando seu desenvolvimento (Coelho, 1995; Santos *et al.*, 2008).



**Figura 2** - Ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*. Esquemática das etapas de desenvolvimento e formas evolutivas do parasito, tanto no hospedeiro intermediário como no hospedeiro definitivo. FONTE: Carvalho *et al.*, (2008).

### 2.3 Esquistossomose no Brasil

Nas últimas décadas, têm ocorrido mudanças epidemiológicas significativas na América, como melhorias socioeconômicas, aumento nas atividades de saúde, invasões de novas espécies competidoras do gênero *Biomphalaria* como *Marisa cornuarietis* e *Melanoides tuberculata* (Pointier *et al.*, 2011), mudanças na gestão ambiental, migração da população rural para as cidades onde há um contato mais limitado com rios locais e outros corpos d'água. Estas alterações resultam em diminuição da possibilidade de contato com a água contaminada e, conseqüentemente, reduz a transmissão do parasito (Noya *et al.*, 2015).

No Brasil, o controle da esquistossomose foi inicialmente baseado na tentativa de eliminação do hospedeiro intermediário com o uso de químicos moluscidas. A partir de 1984, a estratégia reorientou-se para o uso de quimioterápicos em indivíduos infectados, sendo inicialmente Oxaminiquina o fármaco de escolha e, posteriormente, Praziquantel. O Praziquantel se mostrou um fármaco eficaz, com baixa toxicidade e de baixo custo, além de poder ser utilizado em dose única por via oral. Desde 2006, o Praziquantel tem sido usado

como estratégia de redução da morbidade e transmissão através do tratamento periódico preventivo de grupos quem vivem em áreas de grande risco de transmissão (WHO, 2013). Após a implementação dessas medidas de controle da esquistossomose, a prevalência e, principalmente, a intensidade da infecção por *S. mansoni* teve grande redução (Barbosa *et al.*, 2008, Rabello *et al.*, 2008), mesmo assim estudos recentes revelam que pelo menos cerca de 2 milhões de pessoas ainda estejam infectadas no Brasil (Hotez *et al.*, 2008; Noya *et al.*, 2015).

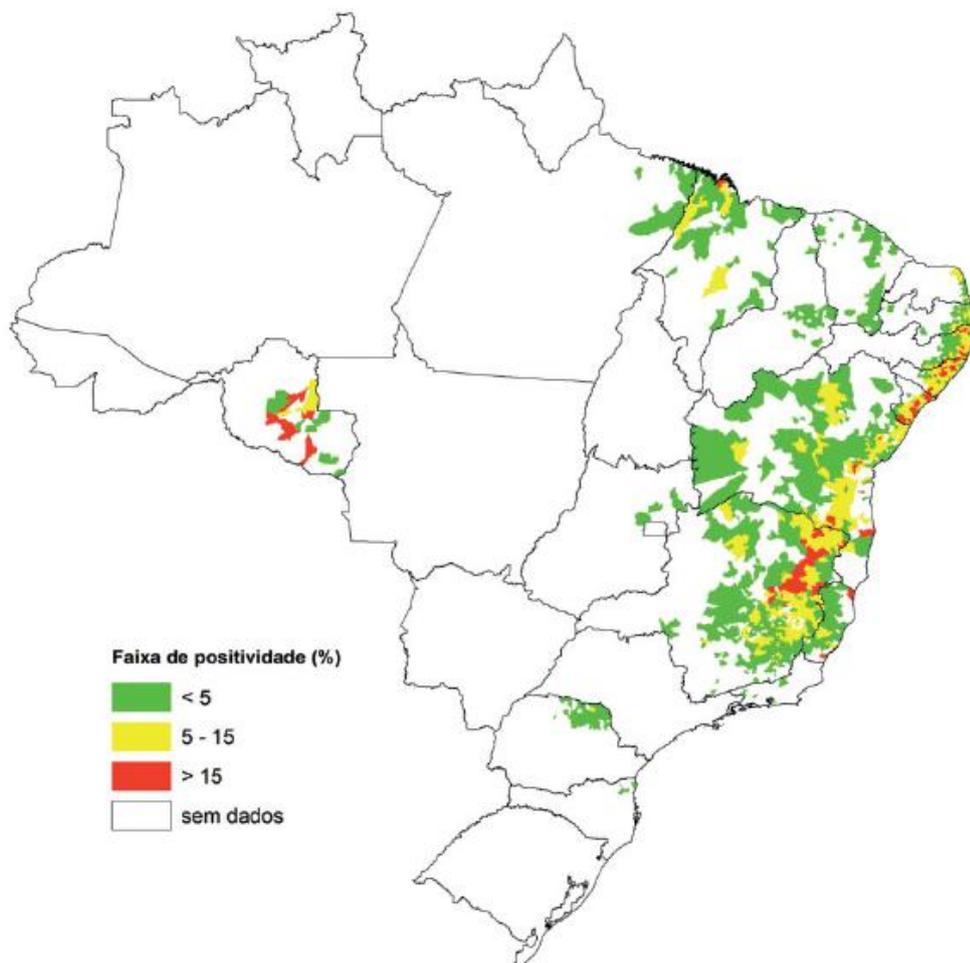
Atualmente a transmissão ocorre do Maranhão ao Espírito Santo (Figura 3), com grande parte dos casos concentrados em Minas Gerais, na Bahia e no litoral do Nordeste (Drummond *et al.*, 2006; Noya *et al.*, 2015). Também têm sido encontrados focos isolados no Distrito Federal, Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Além disso, há casos importados de áreas endêmicas registrados em quase todo o território nacional, principalmente, nos estados que são considerados pontos de migração mais recente, como Rondônia (Coura & Amaral 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014), os indivíduos infectados por *S. mansoni* são diagnosticados por exame de fezes pela técnica Kato-Katz, no qual são confeccionadas duas lâminas oriundas de uma única amostra. A intensidade de carga parasitária da população é considerada baixa com até 99 opg, moderada quando tem de 100 a 399 e alta quando estiver acima de 400 opg. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil (MS, 2014), a técnica do Kato-Katz também é utilizada para diagnóstico da esquistossomose, sendo recomendado a coleta duas amostras de fezes e a realização e exame de duas lâminas por pessoa, sendo ainda recomendado a utilização de métodos sorológicos para aumentar a sensibilidade do diagnóstico. Os programas de controle e tratamento são direcionados pelos exames coprológicos, e a intensidade da infecção foi re-classificada em baixa (1-4 ovos); moderada (5-16 ovos) e alta (17 ou mais ovos).

As áreas do território brasileiro que originalmente apresentavam alta prevalência de infecção e carga parasitária elevada sofreram modificações em relação ao perfil de transmissão da infecção devido aos programas de controle, tratamento com Praziquantel, migração de populações rurais e melhorias socioeconômicas e no saneamento (Rabello *et al.*, 2008). Embora o tratamento quimioterápico seja eficaz, ainda é comum nas áreas endêmicas a reinfecção dos indivíduos tratados, geralmente com menor carga parasitária. Tudo isso dificulta o diagnóstico pelo Kato-Katz, exame parasitológico de fezes que devido ao baixo custo e facilidade operacional é recomendado pela Organização Mundial (WHO, 1994). Apesar de eficiente para detecção de infecções moderadas e intensas, o Kato-Katz não detecta

com eficácia indivíduos com baixa carga parasitária (De Vlas e Gryseels, 1992; Enk *et al.*, 2010).

Entretanto, tanto o Praziquantel quanto a Oxaminiquina não afetam a viabilidade dos ovos e apresentam baixo efeito sob as formas imaturas do parasito. As reinfecções dos indivíduos tratados ocorrem, mas geralmente com menor carga. Neste contexto, grande parte dos indivíduos infectados residentes em áreas endêmicas submetidas ao controle quimioterápico apresenta baixa carga parasitária e são dificilmente diagnosticados por exame parasitológico de fezes. Essa mudança no perfil epidemiológico associada as dificuldades do diagnóstico preciso faz com que a prevalência seja maior do que a relatada, o que pode também estar causando mudanças na modulação da resposta imunológica. De acordo com Coura *et al.*, (2008) a maioria dos pacientes de áreas endêmicas são assintomáticos e apresentam um perfil Th2, no qual a intensidade da infecção é capaz de favorecer a produção da interleucina 10 (IL-10).



**Figura 3** - Prevalência da esquistossomose no Brasil. Encontrada em 13 estados brasileiros com a maior concentração de casos nos estados de Minas Gérias e Bahia. FONTE: Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SISPCE/SVS/MS (2014).

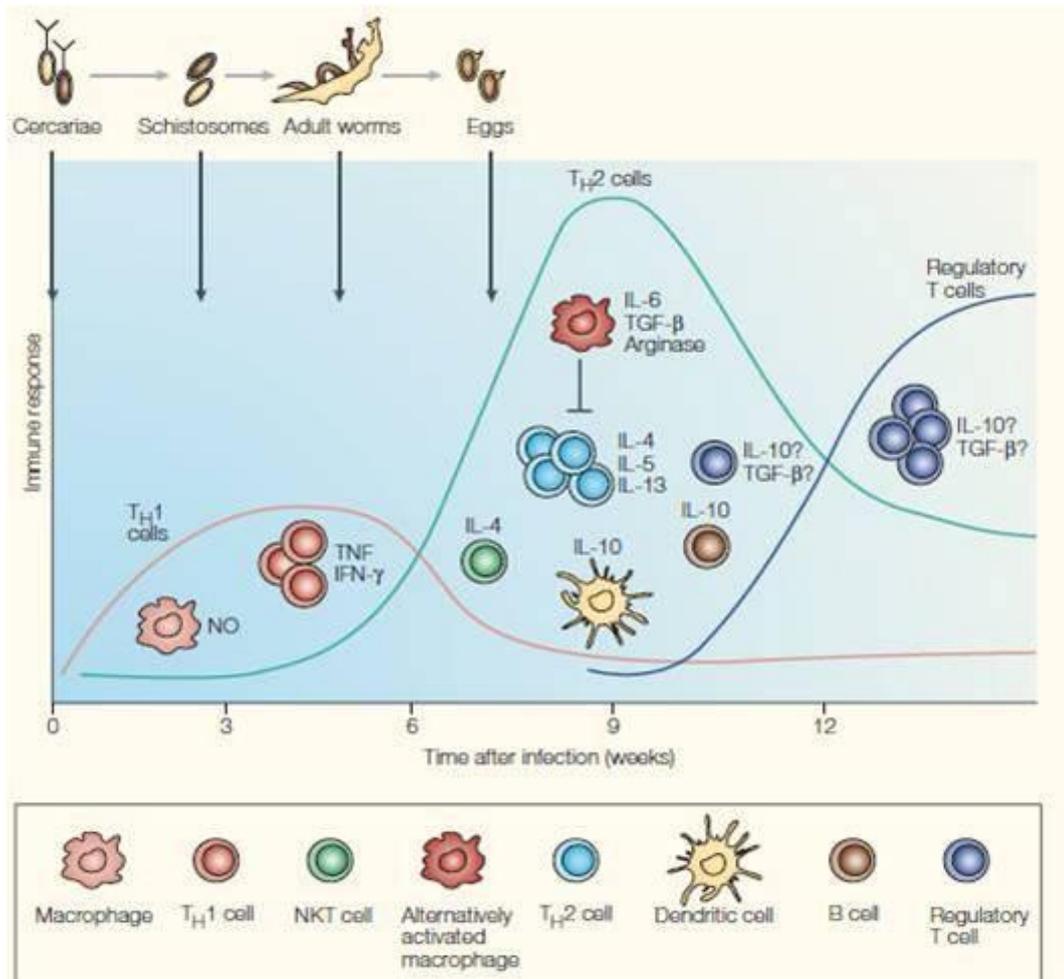
## 2.4 Resposta imune na esquistossomose

Após a penetração das cercarias e migração dos esquistossômulos, o hospedeiro possui uma resposta imune celular predominantemente Th1, com aumento da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que ativam macrófagos e induzem a imunoglobulina G (IgG) mediando a opsonização e fagocitose de antígenos (Correa-Oliveira *et al.*, 1998; De Jesus *et al.*, 2002). Durante esse período o hospedeiro pode apresentar sintomas evidentes como a dermatite cercariana, uma reação de hipersensibilidade induzida pela penetração da cercária, levando a erupções micropapulares eritematosas e discretamente edemaciada. Posteriormente, durante a migração dos esquistossômulos e amadurecimentos dos vermes adultos, podem aparecer sintomas sistêmicos como um quadro febril, calafrios, sudorese, fadiga, mialgia, dores de cabeça, náuseas, vômitos diarreia com numerosas evacuações e eosinofilia com placas de infiltrados que são visíveis em radiografias pulmonares (Gryssels *et al.* 2006). (Coura *et al.* 1970; Hiatt *et al.* 1979; Ross *et al.* 2002).

Com o início da postura dos ovos, ocorre uma forte estimulação da produção de IL-4 e IL-5, que aliada ao aumento de IL-10, resulta na modulação da resposta Th1 inicial e polarização da resposta Th2 (Grzych *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 2006; Layland *et al.*, 2007), estimulando o aumento e ativação de eosinófilos, basófilos, mastócitos e altos níveis de IgE circulantes (Anthony *et al.*, 2007, Malaquias *et al.*, 1997; Dunne-Cook, 2009), ilustrado na figura 4. A deposição de ovos de *S. mansoni* nos tecidos do hospedeiro é apontada como principal estímulo para indução da resposta Th2 (Grzych *et al.*, 1991), sendo que algumas proteínas excreto-secretada do ovo, como omêga-1, IPSE, e peroxiredoxina, são especialmente importantes no processo de polarização para resposta imune do tipo-2 (Everts *et al.*, 2009; Steinfelder *et al.*, 2009). Em resposta a produção dos antígenos produzidos pelos ovos do parasito ocorre a ativação de células teciduais, que juntamente com as células recrutadas da circulação durante a resposta Th2 e a produção e deposição de matriz extracelular formam uma reação celular organizada denominada de granuloma esquistossomótico. A doença começa a evoluir então para um curso crônico no qual os ovos do parasito depositados nos tecidos do hospedeiro secretam enzimas que provocam uma inflamação eosinofílica, culminando na formação de granulomas periovulares isolados que evoluem progressivamente para depósitos de fibrose (Andrade & Prata 1963; Raso *et al.* 1986; Cheever *et al.* 2000; Andrade 2008). Nessa fase é possível observar fortes sintomas na região abdominal causados em resposta a migração dos ovos e ao granuloma formado ao redor dos

ovos na mucosa intestinal levando a formação de microulcerações e sangramento superficial (King 2001; Ross *et al.* 2002). Esse quadro pode evoluir para a forma intestinal grave e alguns pacientes podem desenvolver a forma hepatoesplênica, que é a forma grave da esquistossomose (Andrade & Prata 1963). A carga parasitária e a exposição às re-infecções estão entre as principais causas da evolução para forma grave (Bina & Prata 2003; Carvalho & Andrade 2005; Andrade 2008), porém outros fatores são propostos como genéticos e imunológicos (Butterworth *et al.* 1985; Cheever *et al.* 1987; Dessein *et al.* 1999; Dunne & Pearce 1999).

Em alguns modelos de infecção por helmintos, a polarização da resposta Th2 tem sido apontada como uma estratégia de evasão, por permitir maior sobrevivência do parasito e reduzir danos para o hospedeiro (Medzhitov *et al.*, 2012). A indução de uma resposta do tipo-2 por antígenos do ovo do parasito estimula mecanismos responsáveis pela remodelação tecidual e também tem efeito inibidor sobre a inflamação mediada pela elevação de citocinas do tipo Th1 ou Th17 que é predominante no início da infecção e geralmente provoca maior dano tecidual (Chen *et al.*, 2012; Medzhitov *et al.*, 2012; Gause *et al.*, 2013). A incapacidade de desenvolver uma resposta Th2 eficaz resulta em uma resposta Th1 e Th17 mais intensa e consequente exacerbação da lesão tecidual (Stadecker *et al.*, 2004). Desta forma, grande parte da morbidade na fase crônica da esquistossomose está associada à quantidade de granulomas e a intensidade e o tipo desta reação, sendo necessário que o hospedeiro desenvolva um granuloma capaz de minimizar os danos teciduais, especialmente no fígado e no intestino, mas que esta reação não comprometa extensas áreas do tecido e desenvolva fibrose (Hans *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2008). Acredita-se que a produção aumentada de IL-10 durante a infecção esteja envolvida na regulação da resposta imune, no controle da morbidade e na modulação da resposta imune em pacientes crônicos assintomáticos ou com sintomatologia leve (Malaquias *et al.*, 1997; Montenegro *et al.*, 1999). A produção desta interleucina pode contribuir para o desenvolvimento da população de células T regulatórias e inibir respostas inflamatórias, tanto a resposta imune Th1 quanto a Th2, regulando a intensidade da inflamação, atuando na redução da formação de granulomas hepáticos e da indução de fibrose (Dunne & Cooke 2005; Van der Vlugt *et al.*, 2014).



**Figura 4** - Indução de células Th1, Th2 e T regulatórias após a infecção por *Schistosoma mansoni*. FONTE: Dunne and Cooke (2005).

A resposta imune Th2, associada à eosinofilia, mastocitose e produção de IgE, não é apenas característica de infecções helmínticas, mas também de alergias (Fitzsimmons, *et al.*, 2014). Alergias são doenças crônicas complexas caracterizadas pela resposta Th2 exacerbada e desregulada a antígenos ambientais (Tang *et al.*, 2003; Lynch & Boushey, 2016).

## 2.5 Doenças alérgicas e teoria da higiene

Doenças alérgicas resultam da interação entre fatores genéticos e ambientais podem afetar diferentes órgãos manifestando-se como asma, rinite, eczema e alergias alimentares. A atopia foi definida por níveis elevados de IgE total e presença de IgE específico para alérgenos ambientais comuns, ou evidência *in vivo* de respostas de hipersensibilidade imediata, tal como determinado por testes cutâneos com os mesmos alérgenos (Backer *et al.*, 1994). A utilização de um questionário validado internacionalmente para estimar a

prevalência de algumas doenças alérgicas denominado de ISAAC (International Study of Asthma e Allergies in Childhood – Estudo Internacional de Asma e Alergias em Crianças), mostraram uma maior prevalência de doenças alérgicas em países industrializados em relação aos países com economias agrícolas mais tradicionais (Strachan et al., 1997; ISAAC, 1998; Williams et al., 1999). Entre as principais causas para essas doenças foram identificados histórico familiar, prematuridade, infecções respiratórias virais no início da vida, inalação de poluentes no local de trabalho, falta de exposição a agentes infecciosos e vida urbana (Tang *et al.*, 2003; Lynch & Boushey, 2016). A prevalência de diferentes doenças alérgicas, como a febre do feno, asma e alergia alimentar, tem apresentado uma intensa e rápida elevação nos últimos 60 anos, porém a taxa e o padrão de crescimento não tem sido uniforme entre as doenças e nem entre as diferentes regiões do mundo (Heinrich *et al.*, 1998; Alcantâra-Neves *et al.*, 2010). Em geral, as maiores taxas de prevalência de doenças alérgicas têm sido encontradas na Europa Ocidental, América do Norte, Japão, Austrália e Nova Zelândia, mas as taxas de prevalência estão aumentando, mesmo em países em desenvolvimento, com economia em grande parte agrária (Pearce et al., 2007).

Os fatores genéticos têm sido insuficientes para explicar esse aumento. Exposições ambientais têm sido determinantes importantes de sensibilização alérgica e expressão de doenças alérgicas. Tais fatores ambientais incluem a alta exposição aos alérgenos (Platts-Mills et al., 1998), a exposição a animais de estimação e de áreas rurais (Platts-Mills et al., 2002, Braun-Fahrländer & Lauener 2003), nível socioeconômico (Strachan et al., 1997), o estado nutricional (von Mutius et al., 2001), o número de irmãos (von Mutius et al., 1994), o atendimento a creche na infância (Kramer et al., 1999; Ball et al., 2000), o estilo de vida e dieta alimentar (Hijazi et al., 2000), as práticas de amamentação (Strachan 2000), e tabagismo materno (Celedon et al., 2001).

Estudos epidemiológicos têm buscado identificar fatores ambientais que podem estar associados com aumento do risco de alergia, destacando as diferenças no estilo de vida, sendo a diminuição da exposição a agentes infecciosos, incluindo infecções por helmintos, um dos fatores investigados. Fatores ambientais podem influenciar na expressão da inflamação clinicamente aparente dos pulmões associada à sensibilização alérgica, e tem havido um interesse crescente em relação ao potencial papel de doenças infecciosas na determinação da expressão de doenças alérgicas (Cooper *et al.*, 2010, Wills-Karp et al., 2001).

O declínio nas infecções durante a primeira infância têm sido um dos principais argumentos utilizados para justificar a elevação de doenças alérgicas em países industrializados (Yazdanbakhsh et al., 2002; Cooper et al., 2009). Alguns estudos (Mosmann

et al., 1989) sugeriram que a exposição limitada aos agentes patogênicos bacterianos e virais durante a primeira infância resulta numa estimulação insuficiente de células Th1, que por sua vez não conseguem contrabalançar a expansão de células Th2, resultando em uma predisposição para doenças alérgicas. Estas observações deram origem à “teoria da higiene” como base para explicar o grande aumento dos casos de doenças alérgicas. Esta hipótese tem sido impulsionada por estudos transversais e longitudinais que mostram efeitos protetores de condições associadas com a exposição a micróbios benéficos e efeitos indutivos em ambientes desprovidos de tal contato microbiano (Greenwood et al., 1968 e 1970). Posteriormente, a hipótese da higiene foi relacionada aos países mais desenvolvidos, quando Strachan (2000) postulou que a exposição precoce a infecções comuns na infância protegia irmãos mais novos em famílias maiores de desenvolver alergias, como a febre do feno.

Entretanto, esta teoria do balanço de resposta Th1/Th2 como base para justificar o aumento de doenças alérgicas tem sido contrariada por observações de que a prevalência das doenças auto-imunes Th1 também estão aumentando (Stene & Nafstad 2001) e que infecções por helmintos parasitas com resposta imune polarizada Th2 estão inversamente associadas com a alergia (Khan & Fallon 2013). Tais dados sugerem que a causa do aumento de doenças alérgicas e do agravamento de doenças auto-imunes não pode simplesmente ser explicada pelo desequilíbrio entre Th1 e TH2, mas em vez disso tem de ter um denominador imunológico em comum (Yazdanbakhsh, et al., 2012).

Uma nova perspectiva sobre a hipótese da higiene foi introduzida por um estudo de crianças no Gabão. Neste país africano há uma alta prevalência da esquistossomose, que impulsiona uma forte resposta Th2 (Fairfax et al., 2012). Notavelmente, escolares com esta infecção apresentaram menores níveis de reatividade alérgica do que seus colegas não infectados, embora tanto o parasita quanto o alérgeno estimulem uma resposta Th2 (Van den Biggelaar et al., 2000). Um ponto chave deste estudo foi a demonstração de que as crianças infectadas apresentavam elevados níveis da citocina imunossupressiva IL-10, que juntamente com TGF- $\beta$  são produzidos por células Tregs e atuam na regulação do sistema imune (Moore et al., 2001; Li Mo & Flavell 2008). Estudos demonstram que mecanismos imunoregulatorios controlados por células Tregs foram associados ao controle de doenças alérgicas de perfil Th2 (Akdis et al., 2004; Hawrylowicz & O’Garra 2005), bem como de doenças auto-imunes e patologias inflamatórias, onde se observa respostas Th1 e/ou Th17 (Kim et al., 2007). Assim, a hipótese da higiene foi atualizada para postular que as infecções podem balancear de um lado as células Tregs e por outro lado as populações de células Th1 ativas, Th2 e Th17 (Yazdanbakhsh et al., 2001; Maizels 2005).

Numerosos outros estudos têm suportado a conclusão de que infecções helmínticas e outras infecções crônicas estão associadas com a modulação da reatividade alérgica. Como Araújo e colaboradores (2000) que selecionaram indivíduos infectados e não infectados para *S. mansoni* e realizaram testes cutâneos e de IgE total e específico com soro dos pacientes. Eles observaram que a proporção de indivíduos com um teste cutâneo positivo para alérgenos foi maior no grupo não infectado (24,3%) do que no grupo infectado (4,8%). Os dados mostraram uma forte e significativa associação inversa entre a resposta do teste cutâneo imediato para aeroalérgenos e infecção por *S. mansoni*. Cooper e colaboradores (2003) também observaram em escolares de uma área rural no Equador que infecções ativas por geohelmintos e a presença de marcadores sorológicos de infecções crônicas (níveis elevados de IgE total no soro e a presença de IgG4 anti-*A. lumbricoides*) são fatores de proteção independentes contra teste cutâneo alérgico entre as crianças em idade escolar que vivem em uma região endêmica de trópicos rurais.

A importância da flora intestinal no desenvolvimento do sistema imune do hospedeiro também vem sendo apontada como um dos fatores responsáveis pelo aumento das doenças alérgicas. Estudos que demonstraram pela primeira vez a importância da microbiota intestinal no balanço do sistema imunológico foram desenvolvidos com camundongos livres de germes (Macpherson & Harris 2004 e Round & Mazmanian 2009). Estes animais apresentam intestino e linfonodos mesentéricos pouco desenvolvidos, diminuição da produção de IgA e resistência diminuída a infecções. A presença de bactérias específicas parece ser crítica para a proliferação de subconjuntos de células T auxiliares em camundongos, e uma deficiência nestas espécies ou um excesso de outras espécies no trato gastrointestinal pode desequilibrar a função imunológica, subjacente à doença alérgica.

O trato gastrointestinal dos mamíferos é um local preferencial para a colonização por inúmeros comensais e possui uma microbiota diversificada que é vital para uma boa digestão e aquisição de nutrientes, assim como a resistência a infecções patogênicas. A microbiota comensal também contribui para o desenvolvimento, maturação e ativação do sistema imune do hospedeiro, influenciando através de uma relação mutualística, tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (Kabat et al., 2014). A interrupção deste equilíbrio pode conduzir a patologias crônicas mediadas pelo sistema imunológico do trato gastrointestinal, tais como doenças inflamatórias intestinais ou alergias alimentares (Maloy et al., 2011; Pabst et al., 2012). Nos últimos anos, Kabat e colaboradores (2014, 2016) demonstraram que processos fisiológicos de autofagia celular na mucosa intestinal tem um papel chave para dotar as células T com uma flexibilidade metabólica de se adaptar aos desafios provocados pela dieta.

A autofagia regula de forma diferente a sobrevivência de células Treg e células Th2, podendo facilitar adaptações metabólicas necessárias para a sobrevivência das células Treg intestinais, enquanto que células Th2 são mais resistentes a essas perturbações metabólicas introduzidas por deficiências nos processos de autofagia. Estes resultados identificam um novo mecanismo que potencialmente associa a autofagia à susceptibilidade genética em desenvolver inflamação intestinal através da desregulação de subpopulações de células T nas mucosas. Além disso, como deficiências nas células Treg e elevação de respostas Th2 na mucosa têm sido observadas em alergias e asma, estes achados também podem ter implicações para estas condições que afetam tecidos da mucosa. Assim, as manifestações imunológicas de deficiência no processo de autofagia dependem não só do tipo de célula considerado, mas igualmente no contexto do tecido (Kabat et al., 2016).

Essas contribuições coletivas podem ser resumidas afirmando que as raízes do aumento na prevalência da sensibilização alérgica a partir de alterações pós-industriais nas exposições ambientais afetam a composição da microbiota bacteriana intestinal no início da vida, e conseqüentemente alteram interações funcionais na microbiota do hospedeiro capaz de reformar padrões históricos de respostas imunes na exposição aos alérgenos e infecções (Lynch et al., 2016).

## **2.6 Doenças alérgicas e helmintos**

Infecções por helmintos intestinais estão entre as mais prevalentes infecções em crianças em muitas regiões do mundo (Mishra *et al.*, 2014), sendo que alguns estudos epidemiológicos têm relatado associações inversas entre a presença de infecções helmínticas crônicas e o aparecimento de atopias (Smits *et al.*, 2010), ou de quadros alérgicos caracterizados por chiados (Cooper *et al.*, 2010).

É provável que helmintos tenham exercido uma pressão de seleção considerável durante centenas de milhões de anos de coevolução com seus hospedeiros mamíferos (Jackson *et al.*, 2009, Gause *et al.*, 2013). Assim, a evolução da resposta imune Th2 associada com mecanismos modulatórios, é uma consequência provável da pressão de seleção exercida pela infecção com helmintos sob seus hospedeiros, permitindo a sobrevivência do parasito e uma menor patologia do hospedeiro (Gause *et al.*, 2013, Palm *et al.*, 2012). Tem sido proposto que a exposição frequente do sistema imune a agentes infecciosos pode levar ao desenvolvimento de uma resposta imune modulada, evitando, em parte, o desenvolvimento de doenças inflamatórias (Schaub *et al.*, 2006). Dessa forma, helmintos tornam-se potenciais

reguladores do sistema imune do hospedeiro, por modular o tipo de resposta efetora no controle do parasito estimulando uma hiporreatividade de células T, que facilita a indução de uma rede reguladora. Esta rede de modulação inclui a atividade de células T reguladoras, células B modulatória e de modulação das células da resposta inata, tais como macrófagos, células dendríticas e células estromais locais, resultando em um ambiente anti-inflamatório, caracterizada pelo aumento dos níveis de IL -10 e TGF- $\beta$  (Mahanty & Nutman 1995; Akdis et al., 1998; Holt et al., 1999; Doetze et al., 2000; Maizels *et al.*, 2008). Através desses estímulos, os helmintos limitam seus danos teciduais e garantem sua sobrevivência no hospedeiro durante anos (Lynch et al., 2006).

A indução dessa rede regulatória provocada pela exposição crônica a antígenos do parasito pode afetar localmente a resposta a outros antígenos, oferecendo uma explicação para a relação inversa da associação de muitas infecções com doenças alérgicas (Khan et al., 2013). Smits e colaboradores (2010) sugeriram que a hiporresponsividade não é apenas dirigida para antígenos de parasitos, mas também se estender a antígenos “*bystander*”, ou seja, outros antígenos que estejam nesse microambiente, como é o caso de antígenos vacinais, outros patógenos ou mesmo alérgenos. Nesta hipótese, a regulação imune induzida pela infecção crônica por helmintos pode também controlar respostas inflamatórias específicas para alérgenos e, assim, levar a menor prevalência ou morbidade de doenças alérgicas em indivíduos infectados por helmintos.

Um dos primeiros estudos que associaram infecção por helmintos e alergia foi desenvolvido por Lynch e seus colaboradores (1993) na cidade de Caracas, na Venezuela. Nesta área, os autores verificaram que crianças cujas infecções foram tratadas com anti-helmínticos desenvolveram reatividade cutânea aumentada para alérgenos de ácaros em poeira doméstica (de 17% para 68%), em contraste com indivíduos não tratados. Um ano depois, em 1994, Steel e colaboradores sugeriram que filhos de mães com infecções por *Wuchereria bancrofti* durante a gravidez tiveram, na idade adulta uma tolerância imunológica ao parasito. Estudo mais recentes (Elliott et al., 2005; Mpairwe et al., 2011) demonstraram que, além da tolerância específica para o antígeno, a exposição materna a infecções helmínticas na gravidez é capaz de proteger o recém-nascido de eczema alérgica na infância.

Na América do Sul, Alcântara-Neves e seus colaboradores (2014) analisaram 1.271 crianças participantes do Programa SCAALA (“*Social Change in Asthma and Allergies in Latin America*” – Mudança Social em Asma e Alergias na América Latina). Os resultados mostraram associações fortes e positivas entre infecções por helmintos (*A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *Toxocara* spp), eosinofilia e IgE totais e uma associação inversa entre infecções

por helmintos e a reatividade alérgica identificada através de medições no soro de IgE específico para alérgenos e teste cutâneo. Os autores sugeriram que infecções múltiplas por helmintos sejam mais eficientes na indução de uma rede reguladora propiciada pelo aumento na produção de IL-10, que pode desempenhar um papel na supressão de respostas alérgicas, como as reações de hipersensibilidade imediata na pele.

No Brasil, Figueiredo e seus colaboradores (2010) examinaram o sangue de 1.060 crianças residentes na periferia de Salvador, Bahia, com infecções crônicas para *A. lumbricoides* e *T. trichiura*. Foram medidas citocinas Th1, Th2 e Treg em leucócitos do sangue periférico e os níveis de IgE total e anti-*A. lumbricoides*, IgG4 e IgE no soro. Nas crianças infectadas foi observada uma supressão generalizada na produção de citocinas e aumento da produção espontânea de IL-10. Assim, de acordo com os autores, esse fenótipo induzido de resposta imune regulada por helmintos pode contribuir para o desenvolvimento de um fenótipo anti-inflamatório que é capaz de mediar a modulação de alergias.

Oliveira e colaboradores (2014) sugeriram que em áreas de baixa endemicidade, a infecção com *S. mansoni* também pode reduzir o risco de desenvolvimento de doenças alérgicas em indivíduos com baixa carga parasitária. Essa associação foi investigada em moradores de uma área rural no estado do Ceará, que possuíam baixa carga parasitária. Dentre os 39 indivíduos infectados com *S. mansoni* apenas 7 (17,9%) reagiram a um ou mais antígenos do teste cutâneo, enquanto que 38,5% dos 52 indivíduos não infectados positivaram neste teste.

Contudo, muitos estudos sobre o efeito das helmintoses na prevalência das doenças alérgicas têm sido inconsistentes e discrepantes. Cooper e colaboradores (2010) compararam a prevalência do teste cutâneo e sintomas alérgicos entre escolares de uma área rural do Equador que receberam tratamento com Invernectina com outro grupo de crianças não tratadas que vivem em comunidades adjacentes. Eles observaram que o tratamento periódico de longo prazo foi associado com um aumento na prevalência da reatividade para alérgenos no teste cutâneo, mas não houve associação com os sintomas de asma ou rino-conjuntivite. Croft e colaboradores (2012) também não encontraram associações significativas na comparação de um grupo placebo e pacientes com rinite alérgica, infectados experimentalmente com *Necator americanus* e *Trichuris suis*.

Outros estudos têm relatado ainda um aumento nas doenças alérgicas em pacientes infectados por helmintos. Alcantara-Neves e colaboradores (2010) observaram uma associação positiva entre *T. trichiura* e sibilância atópica em crianças do Equador,

demonstrando que a infecção por *T. trichiura* pode desempenhar um papel na patogênese do chiado atópico na primeira infância.

Essas discrepâncias têm sido atribuídas à espécie de helminto presente, tempo em que ocorreram as primeiras infecções, carga parasitária e cronicidade da infecção (Smits, *et al.*, 2007). Infecções precoces ou de longa duração são mais eficientes na modulação da doença alérgica, enquanto infecções tardias ou esporádicas com perfil transitório podem agravar sintomas clínicos alérgicos. Altas cargas parasitárias podem induzir a supressão da resposta imune, ao passo que infecções ligeiras podem promover a doença alérgica. Assim estudos de associação entre infecções parasitárias e doenças alérgicas precisam ser mais estudados (Cooper *et al.*, 2006).

### 3. JUSTIFICATIVA

Doenças alérgicas são raras em áreas com alta exposição a helmintos parasitos e comuns em áreas urbanas de países desenvolvidos e industrializados, onde a prevalência de helmintoses é significativamente reduzido. Evidências experimentais indicam que infecções crônicas por helmintos podem induzir uma rede de imunomodulação sistêmica, que inclui ativação de células T reguladoras (Flohr *et al.*, 2008), células B reguladoras, macrófagos alternativamente ativados, aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , e da produção de anticorpos IgG4 que neutralizam IgE, que em conjunto são capazes de modular outros processos inflamatórios concomitantes (McSorley *et al.*, 2012). Alguns estudos epidemiológicos realizados em áreas de alta endemicidade confirmam que o aumento da concentração de IL-10 induzido pela infecção por *S. mansoni* foi negativamente correlacionado com a sensibilidade poeira-ácaro em crianças do Gabão (Van den Biggelaar *et al.*, 2000). Entretanto, a associação inversa entre helmintoses e reações alérgicas não ocorre em todos os casos (Cooper *et al.*, 2010; Alcantara-Neves *et al.*, 2014).

A grande maioria dos estudos que relacionam alergia com helmintose foi realizado em áreas de alta carga parasitária (Van den Biggelaar *et al.*, 2000; Dagoye *et al.*, 2010). Ações de educação em saúde, programas de controle e melhorias em condições sanitárias que tem ocorrido em várias regiões em desenvolvimento tem reduzido significativamente a prevalência e a intensidade de helmintoses na população (Kabatereine *et al.*, 2006; Fenwick *et al.*, 2008).

Diante do exposto, torna-se necessário a realização de mais estudos para melhor compreender a possível associação entre as doenças parasitárias e reações alérgicas, em especial nas áreas endêmicas com baixa carga parasitária.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Geral

Analisar a prevalência e possíveis relações entre infecção por *Schistosoma mansoni* e doenças alérgicas em indivíduos residentes na comunidade rural de Brejo do Amparo, município de Januária-MG.

### 4.2 Específicos

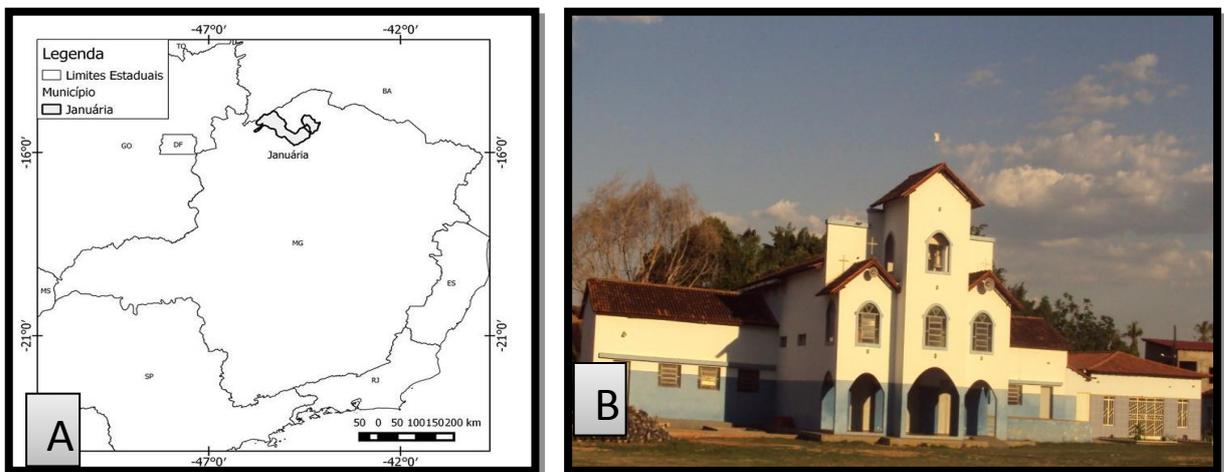
- Estimar a prevalência de *S. mansoni* e parasitoses intestinais em residentes da comunidade rural de Brejo do Amparo, através de múltiplos exames parasitológicos e testes moleculares.
- Estimar a carga parasitária dos indivíduos infectados por *S. mansoni* na população do estudo.
- Quantificar os níveis séricos de IgE total nos indivíduos residentes de Brejo do Amparo.
- Estimar a prevalência de doenças alérgicas entre os residentes de Brejo do Amparo, através da aplicação do questionário específico;
- Estimar a prevalência de atopia entre os residentes de Brejo do Amparo através da reatividade de IgE à alérgenos presentes na poeira doméstica;
- Investigar a possíveis associações entre esquistossomose e a ocorrência de doenças alérgicas na população residente em Brejo do Amparo, distrito de Januária-MG.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Desenho do estudo e seleção dos participantes

Este é um estudo epidemiológico observacional transversal de acordo com o escopo do STROBE (*The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology - Iniciativa Fortalecimento da Comunicação de Estudos Observacionais em Epidemiologia*, 2004).

Januária é um município brasileiro situado no norte do estado de Minas Gerais (Figura 5A) na região do Médio São Francisco. Conta com uma população de 68.065 habitantes (Estimativa IBGE 1º Julho/2014) e está localizado a 635 km da capital Belo Horizonte. O município é endêmico para a esquistossomose e possui deficiências no saneamento básico, tratamento de água e educação em saúde o que dificulta o controle desta parasitose. Inúmeros distritos deste município não possuem água encanada/tratada para suprir as necessidades da população, dentre eles está Brejo do Amparo (Figura 5B), área escolhida para o desenvolvimento da pesquisa, que está localizada em torno de 3 km da sede do município. O distrito tem cerca de 270 habitantes, que residem em uma área rural próxima dos córregos Pé da Serra, Tocantins e Santana, onde em vários pontos foram encontradas pequenas populações de caramujos *Biomphalaria glabrata*. Esta área, historicamente conhecida por ser endêmica para a esquistossomose, é constituída por moradores fixos, que não receberam tratamento para esquistossomose nos últimos dois anos. Neste distrito, toda a população que obedeceu aos critérios de inclusão foi incluída, portanto o estudo será de base populacional (censitário).



**Figura 5** – **A:** Localização do município de Januária em Minas Gerais; **B:** Igreja do Rosário em Brejo do Amparo, distrito de Januária-MG. FONTE: Elaborado pelo autor.

## 5.2 Critérios de elegibilidade

Critérios de Inclusão: Foram incluídos no estudo moradores da região, com idade entre dois anos e setenta anos de idade, de ambos os sexos, que concordaram em participar do estudo e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (anexo 1). No caso dos indivíduos menores de idade, a autorização na participação da pesquisa foi obtida pelos pais ou responsáveis; todo menor de idade acima de sete anos ou que sabe ler e escrever assinou o Termo de Assentimento. Os participantes foram instruídos a não utilizar nenhum antiparasitário durante o período de coleta de material biológico.

Critérios de Exclusão: Foram excluídos da pesquisa aqueles indivíduos que não consentiram em participar do estudo ou não assinaram o TCLE; mulheres grávidas; indivíduos portadores de doenças cognitivas, psiquiátricas e distúrbios de comportamento, que poderiam de alguma forma interferir na habilidade do voluntário de entender e cooperar com o protocolo de estudo.

## 5.3 Considerações éticas

Todos os participantes do estudo ou seus responsáveis legais foram devidamente informados do estudo e dos possíveis riscos, e solicitados a assinar um Termo de Consentimento Livre Esclarecido e/ou Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (anexo 1), antes da coleta de dados. Foram agendados os exames clínicos com coleta de sangue, urina e fezes. Após cada tempo de avaliação, os resultados individuais foram encaminhados para cada participante e pacientes com exames positivos receberam tratamento oral gratuitamente no posto de saúde local, sendo utilizado para esquistossomose o Praziquantel (40-60 mg/kg), Albendazol (400 mg em dose única) para helmintos intestinais e metronidazol (250 mg / 2x / 5 dias) para controle de protozoários parasitas.

Os objetivos do estudo foram apresentados e explicados a todos os participantes, e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Termo de Assentimento foram individualmente assinados e armazenados. O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da CPqRR-COEP (CAAE#21824513.9.0000.5091 - anexo 2).

## 5.4 Aplicação do questionário familiar, socioeconômico e ISAAC

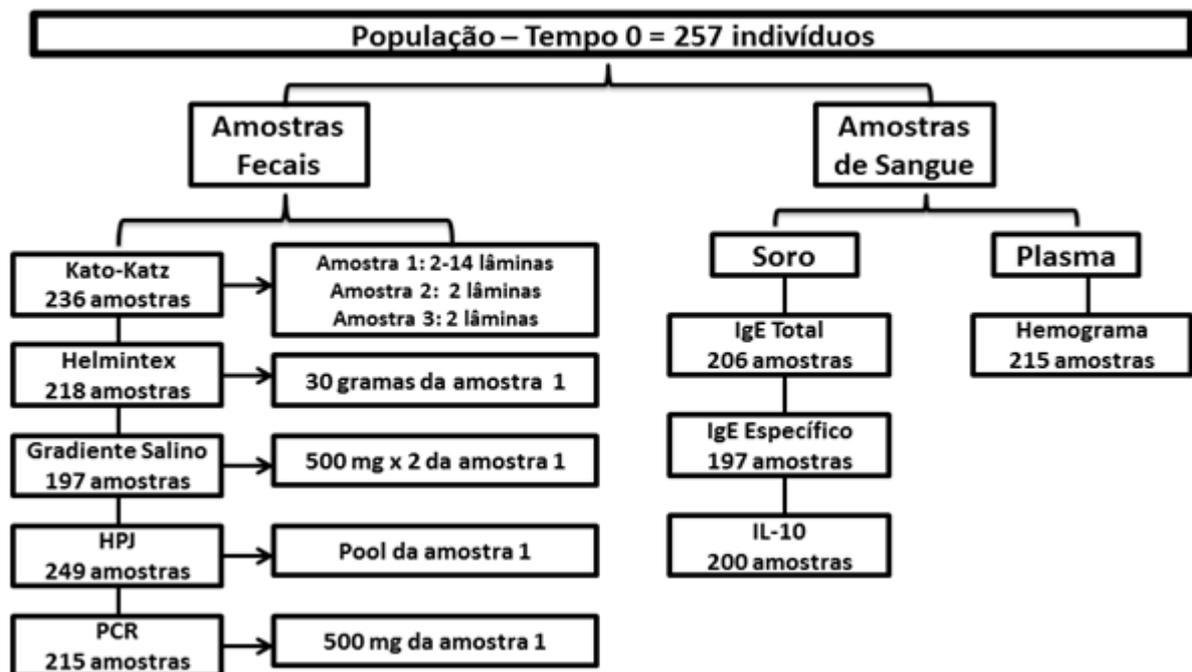
Primeiramente foi aplicado o questionário familiar (anexo 3), na qual um membro de cada residência foi selecionado para responder à questões domiciliares, ambientais e características familiares. Posteriormente, foi aplicado um questionário individual (anexo 4) com informações socioeconômicas, demográficas, ocupacionais e clínicas relevantes ao estudo. Juntamente com o questionário socioeconômico foi aplicado o questionário ISAAC "*International Study of Asthma and Allergies in Childhood*" ("Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância"- anexo 5). O questionário ISAAC é composto por 3 módulos de até 8 questões relacionadas a sintomas e gravidade de asma, rinite e eczema atópica, que foi validado em estudos pilotos realizados em diferentes países e permite estimar a prevalência e gravidade destas doenças alérgicas e sua evolução (ISAAC Manual, 1992; Asher *et al.*, 1995). Para as análises deste estudo, cada resposta do questionário ISAAC obteve uma pontuação previamente estabelecida: Não = 0, Sim = 1, Sim (últimos 12 meses) = 2 e questões relacionadas à frequência/intensidade = 3. A somatória dos pontos permite um score da intensidade de alergia, sendo Dessa forma as questões de cada módulo do questionário (asma, rinite e eczema) somaram um resultado que foi classificado em: 0-2 = não alérgico; 3-4 = alérgico moderado e acima de 5 = fortemente alérgico.

Os questionários foram pré-codificados e aplicados por entrevistadores previamente treinados. As informações obtidas foram utilizadas para o abastecimento do banco de dados.

## **5.5 Coletas e processamento das amostras**

Os participantes foram convidados a fornecer três amostras fecais, que foram recolhidas em dias consecutivos. A primeira amostra fecal foi recolhida num recipiente de plástico de 500 ml, suficiente para uma evacuação completa fecal, contendo, pelo menos, 50 gramas de fezes. As outras duas amostras fecais eram menores e foram coletadas em potes de plástico de 80 ml. As amostras fecais foram levadas para o laboratório de campo em Januária e imediatamente processadas para realização de análises parasitológicas. Da primeira amostra fecal, 500 mg foi separado e congelado para realização do teste molecular. O restante do material fecal da primeira coleta foi utilizado para preparação de 14 lâminas de Kato-Katz, 500mg das fezes foi utilizada para realização da técnica de Gradiente Salino, 30 g para a técnica de Helmintex e o restante processado para realização do método de sedimentação espontânea, que foi usado apenas para avaliar a presença/ausência de protozoários. A segunda e terceira amostras de fezes de cada indivíduo foram utilizadas para realização de 2 laminas de Kato Katz por amostra, segundo ilustrado no esquema 1.

Juntamente com a primeira amostra de fezes, cada participante também forneceu uma amostra de sangue venoso que foi realizada na mão e no antebraço. Em adultos, o volume máximo de sangue retirado foi de 5 ml em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid) e mais 15 ml em tubo sem anticoagulantes. Em crianças ou adolescentes (6-17 anos) o volume foi reduzido para 5ml em tubos com EDTA e 10 ml para obtenção de soro. As amostras de sangue dos participantes foram coletadas em jejum no período da manhã, sendo que a amostra de sangue contendo EDTA foi encaminhada a um laboratório para realização do Hemograma e a outra amostra foi centrifugada para retirada do soro, que posteriormente foi congelado para quantificação dos níveis da citocina IL-10 e IgE totais e reativos a antígenos comumente presentes na poeira doméstica (Figura 6).



**Figura 6:** Fluxograma do estudo transversal realizado na população da comunidade rural de Brejo do Amparo em Januária-MG. Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5.6 Exames Parasitológicos

Conforme ilustrado (Figura 6), as análises parasitológicas de fezes foram realizadas através dos métodos de Kato-Katz, Gradiente Salino, Helmintex® e Sedimentação Espontânea.

Para a realização da técnica de Kato-Katz (Kato, 1954, modificado por Katz *et al.*, 1972) foi utilizado o kit HELM TEST (Bio Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ). Nesta técnica, uma amostra de fezes frescas de cada indivíduo foi colocada sobre um papel de filtro e foi

pressionada sob uma tela descartável com auxílio de uma espátula, fornecidos pelo kit. Posteriormente, o material fecal filtrado pela tela foi utilizado para preencher completamente o orifício de uma placa de plástico (6 mm de diâmetro) acomodada sobre uma lamina de vidro para microscopia, resultando em uma amostra de aproximadamente de 42 mg de fezes. Uma lamínula de celofane embebida em solução aquosa com 50% de glicerina contendo 0,15 % Verde Malaquita foi sobreposta na amostra sob a lâmina de vidro e esta foi pressionada com o polegar até obter uma uniformidade do material. As lâminas foram secadas por pelo menos 60 min., examinadas sob o microscópio ótico (100x) e a presença de ovos de *S. mansoni* e ovos de outros helmintos intestinais foram anotados. Os exames foram realizados por microscopistas experientes e, pelo menos 15% de todas as lâminas, foram lidas e confirmadas por uma segunda pessoa.

O exame parasitológico denominado de Gradiente Salino foi realizado conforme descrito por Coelho et al. (2009), sendo utilizado 500 mg de fezes coletada da primeira amostra fecal de cada indivíduo. Esta técnica baseia-se na maior densidade dos ovos de *S. mansoni* em relação ao material fecal, permitindo sua sedimentação em uma solução salina concentrada. As fezes foram homogeneizadas em solução fisiológica com auxílio de um bastão de vidro e a mistura foi depositada sob a placa porosa das colunas do aparelho previamente umedecida com solução salina 3%. Cada coluna contendo as amostras fecais foi submetida a um fluxo lento de solução salina à 3% durante uma hora. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi recolhido e examinado em microscópio ótico para identificação dos ovos de *S. mansoni*.

O método Helmintex<sup>®</sup> foi realizado como descrito por Teixeira et al. (2007). Nesta técnica qualitativa foram utilizados 30 gramas de fezes da primeira amostra coletada que foram submetidas a várias etapas de filtração e sedimentação para limpeza da amostra. Ao sedimento contendo os ovos do parasito foi adicionada uma solução com partículas magnéticas e a solução foi exposta a um campo magnético. Os ovos de *S. mansoni* aderem às partículas magnéticas e são separados do restante do material fecal pelo campo magnético. Finalmente, a suspensão livre é descartada e as partículas ligadas são transferidas para lâminas de microscópio para a procura de ovos de *S. mansoni*.

No exame qualitativo de Sedimentação Espontânea ou HPJ (Hoffman, Pons e Janer, 1934), foram utilizados cerca de 5g de fezes frescas. A amostra foi homogeneizada em um béquer com 10 mL de água filtrada e posteriormente foi transferida para um cálice passando por um filtro composto por uma gaze dobrada sobre uma peneira. Mais água filtrada foi adicionada sobre a amostra até completar o volume do cálice. Após 2h de decantação,

amostras do sedimento foram colocadas na lâmina com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para avaliação em microscopia óptica.

O Gradiente Salino e Helminex<sup>®</sup> foram utilizados como testes qualitativos apesar de permitirem a análise quantitativa. Para determinar a carga parasitária, o número médio de ovos de *S. mansoni* obtidos de seis lâminas, duas lâminas de cada amostra fecal, foi calculada e multiplicada por 24 para estimar o número total de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes (OPG) (Katz et al., 1972).

## 5.7 Testes Moleculares

Nos testes moleculares foram utilizados 500mg de fezes congeladas de cada indivíduo e a extração de DNA foi realizada de acordo com as metodologias descritas por Gomes e colaboradores (2010) e Enk e colaboradores (2012). Para a extração foi utilizado o Kit comercial Fast QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. Em resumo, as amostras de fezes de cada participante foram homogeneizadas com tampão de lise fornecido pelo kit e incubadas por 20 min. a 70 °C. Após a lise, as substâncias que danificam o DNA e inibidores da PCR presentes na amostra de fezes foram adsorvidas pela adição de 1 ml do tampão Inhibitex. Depois de adsorvido o material foi centrifugado e ao sedimento foi adicionado 15 µl da proteinase K para digestão de proteínas. O DNA presente no sobrenadante de cada amostra foi purificado em colunas de centrifugação Spin-QIAamp (membrana de sílica - 30 µg) e lavado com tampões de lavagem fornecidos pelo kit para garantir remoção completa das impurezas residuais que possam afetar a ligação ao DNA. O DNA eluído de cada amostra foi utilizada nas reações moleculares.

Para realização do teste PCR-ELISA *system* foram utilizados iniciadores que amplificam um fragmento de 110pb de uma sequência repetitiva de 121 bp de *S. mansoni*. A reação foi preparada para o volume final de 25µl, contendo 2µl de amostra de DNA extraído das fezes dos pacientes, 2 unidades de Taq DNA Polymerase (Amplitaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)), primer senso marcado com biotina (5'-GATCTGAATCCGACCAACCG-3'') e primer anti-senso não marcado (5'ATATTAACGCCACGCTCTC-3''). Os tubos foram colocados no termociclador e a amplificação foi conduzida nos seguintes ciclos de programas: 15 ciclos a 95°C por 1 min, 63°C por 1 min e 72°C por 30s, 12 ciclos a 80°C por 1 min, 63°C por 1 min e 72°C por 30 s, 7 ciclos a 80°C por 1 min, 65°C por 1 min e 72°C por 30s e uma etapa final de alongação a

72°C por 7 min. Cada ensaio incluiu controle da PCR (mix da PCR sem o DNA) e amostras controles positivos (DNA extraído de ovos de *S. mansoni*). Os produtos da amplificação foram revelados em placa de ELISA sensibilizada com estreptoavidina utilizando o Kit comercial “PCR Plate Detection” (Sigma, St. Louis, MO, USA), seguindo as recomendações do fabricante e a leitura em espectrofotômetro a 450 nm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

## 5.8 Quantificação dos níveis de IgE Total

Para medir a concentração de IgE total no soro dos pacientes, foi utilizado um kit comercialmente disponível (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX) e os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nunc International, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpo purificado anti-IgE humano diluído em tampão 0,1M carbonato-bicarbonato, pH 9,6, por uma hora. Entre cada etapa de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com tampão Tris-NaCl (Tris 50 mM, NaCl 0,14M contendo 0,005 % Tween 20, pH 8,0). Após bloqueio da placa com tampão Tris-NaCl acrescido de 1% de albumina bovina (BSA- Sigma), amostras de soro obtidas dos pacientes e diluídas 1:100 em tampão Tris-NaCl contendo 0,1% BSA ou amostras com concentrações conhecidas de IgE purificada para curva padrão foram aplicadas à placa e incubadas por 1 h a temperatura ambiente. Após a incubação das amostras e a lavagem da placa, foi adicionada tampão de diluição com o anticorpo de detecção (anti-IgE extraída de camundongos, conjugada a HRP, diluído 1:40.000) e as placas foram novamente incubadas por 1h a temperatura ambiente. Em seguida as placas foram lavadas e a reação revelada com adição da solução de substrato contendo Tetra-metil-benzidina (TMB) (Minneapolis, MN, USA). Após 20 minutos a reação foi interrompida com solução contendo 4N de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a leitura realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices - Versa Max) no comprimento de onda de 450 nm. A concentração de IgE nas amostras foi calculada pela interpolação do resultado da leitura de absorbância das amostras na curva padrão, a sensibilidade do teste é de 2,0 ng/mL.

## 5.9 Quantificação dos níveis de IgE Específico

O soro de todos os indivíduos foram submetidos ao teste imunológico para quantificação de IgE específico utilizando kit Dr. Fook - *Specific IgE REAST* comercialmente

disponível. As reações foram realizadas conforme recomendação do fabricante e foi selecionado para os testes um mistura de alérgenos (HMx3) frequentes na poeira das casas, que inclui antígenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, Pêlo de gato, Pêlo de cão.

Para os ensaios imunológicos foram fornecidas microplacas de 96 poços, previamente sensibilizadas com anticorpo anti-IgE humano e bloqueadas. Nestas placas foram adicionados 50 µl de solução contendo IgE humano purificado (6 concentrações diferentes para estabelecer a curva padrão), 50 µl de amostra de soro utilizada como controle positivo e 50µl de soro controle negativo, e nos outros poços foram adicionados 50 µl de soro não diluído dos pacientes do estudo. As amostras foram incubadas por 1 h para capturar IgE total e as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem concentrada proveniente do kit que foi diluída 1:25 em água destilada. Posteriormente, foram adicionados 100 µl do alérgeno conjugado a biotina (HMx3) nas amostras de soro e 100 µl de solução contendo anticorpo anti-IgE conjugado com biotina na curva padrão, sendo incubado por mais uma hora. Os poços foram novamente lavados três vezes e 100 µl do conjugado streptavidina/peroxidase (HRP) foram adicionados e incubado por 30 min. Após nova lavagem, a reação foi revelada com adição de 100 µl/poço da solução de substrato contendo Tetra-metil-benzidina (TMB). A reação foi interrompida após 20 min pela adição de 100 µl de solução 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a intensidade da cor foi medida espectrofotometricamente a 450nm (Molecular Devices - Versa Max). As concentrações do IgE específico da amostra de cada paciente foram estimadas com base na reatividade da curva padrão e foram expressas como valor total ou categorizada como não detectado (<35 UI/ml), Baixo (0.35 – 0.7 UI/ml), Moderado (0.7 – 3.5 UI/ml), Claramente positivo (3.5 – 17.5 UI/ml), Positivo forte (17.5 – 50 UI/ml), Positivo muito forte (50 – 100 UI/ml) e Extremamente positivo (>100 UI/ml). Todos os pacientes com reatividade acima de 0.35 UI/ml foram considerados atópicos.

### **5.10 Quantificação dos níveis de IL-10**

A dosagem de IL-10 (pg/ml) foi realizada com amostras de soro usando o Kit comercial de ELISA sanduíche para humanos (R&D, Systems) e seguindo as instruções do fabricante. No primeiro momento as microplacas Costar (Corning 3690) foram sensibilizadas por 18 h a 4 °C (overnight) com Tampão de PBS pH 7,4 contendo anticorpo de captura específico para IL-10 (concentração final). No dia seguinte e após cada etapa de incubação, as microplacas lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05 % de Tween-20 e bloqueadas PBS

contendo 1 % albumina bovina (BSA, onde?) Após o bloqueio foi adicionado 25µl do padrão contendo concentrações conhecidas de rIL-10 ou das amostras de soro dos pacientes diluídos em PBS/ 0,1 % BSA 1% e as placas foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente. Após a lavagem, a presença de IL-10 nas placas foi detectada pela adição de tampão PBS contendo 0,1 % de BSA e anticorpo anti-IL10 humana conjugado com biotina (diluído 1:xx) e incubada por mais 2 horas. Após a lavagem, foi adicionado 25µl de PBS/ BSA contendo estreptavidina conjugada com peroxidase às placas e o material foi incubado por 20 min em local abrigado de luz. Em seguida as placas foram lavadas e a reação revelada com adição da solução de substrato contendo Tetra-metil-benzidina (TMB) (Minneapolis, MN, USA). Após 20 minutos a reação foi interrompida com solução contendo 4N de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a leitura realizada em leitor de microplacas (Molecular Devices - Versa Max) no comprimento de onda de 450 nm. A concentração de IgE nas amostras foi calculada pela interpolação do resultado da leitura de absorbância das amostras com a curva padrão, a sensibilidade do teste é de 2,0 ng/mL.

### 5.11 Caracterização do desfecho

A prevalência e intensidade de carga da população foi calculada de acordo com os resultados dos exames coprológicos e moleculares que se mostram mais sensíveis do que o sugerido pela OMS (2014) e Ministério da Saúde (2014), no qual é preconizado apenas realização do teste Kato-Katz.

Para os modelos finais de análise multivariada foram consideradas como variáveis respostas a atopia (indivíduos reativos para os alérgenos testados no ELISA) e a Asma declarada pelo questionário ISAAC. As variáveis respostas foram associadas à exposição por *S. mansoni* levando em conta a prevalência e intensidade de carga. Os dados demográficos, socioeconômicos, as coinfeções, eosinofilia e níveis séricos de IL-10 e IgE total foram incluídos como co-variáveis.

### 5.12 Análise de dados

Bases de dados foram geradas usando EPI-INFO versão 6.04, e as análises estatísticas foram realizadas utilizando STATA versão 11.0 (Stata Corporation, 2010), e o qui quadrado foi realizado pelo Open Epi<sup>®</sup> versão 2.3. A verificação da distribuição normal dos dados foi

realizada através do teste de Shapiro-Wilk. Teste de Mann-Whitney foi utilizado para as comparações das médias e as médias comparadas pelo teste t ou análise de variância (ANOVA) de Student. Além disso, Análise de regressão linear foram utilizados para avaliar a relação entre a concentração sérica de imunoglobulinas, citocinas, eosinofilia e as covariáveis selecionadas (social, demográfica, parasitológicas e questionário ISAAC). As variáveis com valores de  $p < 0,25$  foram selecionadas para construir as multivariadas no modelo final. Além disso, as variáveis com baixa frequência e que mostraram colinearidade foram excluídas da análise multivariada. Modelos completos para atopia e asma foram construídos com todas as variáveis independentes selecionados na análise univariada, e modelação foram efetuadas por regressão logística. As únicas variáveis restantes no modelo foram aquelas que foram estatisticamente significativas, com um intervalo de confiança (IC) de 95% e valor de  $p < 0,05$ . Os resultados são apresentados como estimativas dos parâmetros de regressão linear, juntamente com IC de 95% para o efeito de variáveis independentes para cada variável resposta de interesse.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Caracterização da População**

O distrito de Brejo do Amparo possui cerca de 270 moradores, dos quais 257 atenderam aos critérios de inclusão no estudo transversal, assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE e entregaram a primeira amostra fecal para realização dos exames parasitológicos. Os indivíduos avaliados no presente estudo pertencem a 53 famílias, nas quais um membro foi selecionado para responder o questionário socioeconômico familiar. Os questionários individuais foram aplicados após a realização das coletas de amostras biológicas, sendo respondido por 229 pessoas, ou seja, 89 % da população original.

Os indivíduos da população de estudo tinham idade entre dois e oitenta e oito anos, com média de 35 anos e possui números semelhantes de homens e mulheres (Tabela 1). A população é autóctone da região e possui baixo grau de escolaridade, sendo que 145 indivíduos (63,3%) declararam não saber ler ou leem com dificuldade e apenas 43 (18,7%) indivíduos possuem ensino médio completo. O nível de desemprego na população de Brejo do

Amparo também é elevado, visto que 83 (36,2%) dos moradores declararam ter vínculo empregatício. Mais da metade dos moradores (55,8%) alegam não ter nenhum tipo de renda e a 34% tem renda menor ou igual a um salário mínimo (Tabela 1).

**Tabela 1** – Características demográficas e socioeconômicas dos moradores (n=229) do Distrito de Brejo do Amparo, Januária MG.

<b>Área Endêmica</b>	
<b>Idade</b>	2 – 88 anos (32; 15 – 51) <sup>a</sup>
<b>Sexo</b>	
Masculino	112 (48,9%)
Feminino	117 (51,0%)
<b>Escolaridade</b>	
Analfabeto e semianalfabeto	145 (63,3%)
Ens. fundamental completo	33 (14,4%)
Ens. médio completo	43 (18,7%)
Ens. superior completo	8 (3,4%)
<b>Renda</b>	
Sem renda	128 (55,8%)
≤ 1 salário mínimo	78 (34,0%)
1 a 2 salários mínimos	21 (9,1%)
≥ 2 salários mínimos	3 (1,3%)

<sup>a</sup> Mediana com percentil

Em relação à estrutura sanitária e o contato com água, que estão intimamente associadas ao risco de infecção por helmintos e protozoários, foi verificado que a grande maioria dos moradores, 188 indivíduos (82,1%), declarou ter algum tipo de contato direto com a água do riacho, principalmente para lazer (40,1%). Além do estreito contato com a água, 88% dos indivíduos entrevistados na população de residentes de Brejo do Amparo, também alega ter contato frequente e direto com a terra, principalmente com atividades relacionadas ao cuidado com o quintal, jardim ou horta (51,5%).

Apesar de grande parte das residências, 46 entre as 53 casas visitadas (86,7%), possuírem canalização interna para água, nenhuma das residências recebe água da rede municipal. A principal origem da água utilizada nas residências dos moradores de Brejo do Amparo é dos rios e córregos locais (60,3%) ou de poços artesianos (16,9%) (Tabela 2). Em 16,9% das residências, os moradores declararam não realizar nenhum tipo de tratamento na água utilizada para consumo humano, enquanto que nas demais 44 residências (83%) a água é filtrada e/ou clorada antes do consumo.

Apenas 30 residências (56,6%) declaram ter privadas dentro de casa, porém não há ligação com a rede pública de esgoto no Distrito de Brejo do Amparo. Em 11% das residências analisadas, o morador não sabe o destino do esgoto coletado e nas demais residências (88,6%) o esgoto é coletado em fossas rudimentares (Tabela 2).

**Tabela 2** – Caracterização da estrutura sanitária nas 53 residências avaliadas no Distrito de Brejo do Amparo, Januária MG.

<b>Caracterização das Residências</b>	
<b>Origem da água</b>	
Poço artesiano comunitário	21 (39,6%)
Rio/córrego	32 (60,3%)
<b>Rede de Esgoto</b>	
Fossa rudimentar	47 (88,6%)
Não sabe	6 (11,3%)

## 6.2 Perfil de infecção parasitária na população de Estudo

Inicialmente, o diagnóstico parasitológico na população de estudo foi realizado através de exames parasitológicos de fezes, conforme descrito na metodologia. Para verificação da presença de protozoários intestinais foi utilizado a técnica de sedimentação espontânea, que identificou 57 indivíduos infectados, sendo que 43 (75,4% dos infectados com protozoários) estavam co-infectados. Os protozoários mais frequentes nas fezes dos indivíduos examinados foram os comensais *Entamoeba coli* e *Endolimax nana* e dentre as espécies patogênicas a mais frequente foi *E. histolytica/dispar* com 9 indivíduos infectados, seguida de *Giardia lamblia* presente nas fezes de 4 indivíduos (Tabela 3). Também foram identificados 80 indivíduos (35%) que relataram diagnóstico anterior de Leishmaniose tegumentar. Para o diagnóstico da infecção por helmintos parasitos foi utilizada uma combinação de métodos parasitológicos, a citar Sedimentação Espontânea, Gradiente Salino, Helmintex® e Kato-Katz, sendo identificados helmintos nas fezes de 135 indivíduos (52,5% do total examinado), dentre os quais 74 (54,8% dos infectados) estavam co-infectados (Tabela 3). Utilizando o resultado combinado das análises parasitológicas de fezes, a infecção por *S. mansoni* foi a mais frequente na população do estudo, sendo identificados ovos do parasito nas fezes de 118 indivíduos examinados, que corresponde a uma prevalência de 45,9%. Outros helmintos também foram encontrados, porém com baixa prevalência; a citar: Ancilostomídeo (8,9%), *Enterobius vermicularis* (2,3%) e *Strongiloides stercoralis* e *Trichuris trichura* com apenas 0,4% de prevalência cada.

Baseado em todas as análises parasitológicas de fezes, 176 indivíduos da população de estudo estavam infectados, dentre os quais 99 (56,2% dos infectados) estavam coinfectados por helmintos e/ou protozoários intestinais, resultando em uma prevalência geral de 68,4%. Adicionando os indivíduos que relatam diagnóstico anterior de Leishmaniose tegumentar teremos um total de 186 indivíduos parasitados, uma prevalência aproximada de 72% em

moradores de Brejo do Amparo, sendo que destes 100 (53,7%) apresentaram-se coinfectados (Tabela 3).

**Tabela 3** – Perfil da população com relação à infecção e/ou coinfecção por helmintos e protozoários, entre os indivíduos examinados no Distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.

	<b>Infecção n (prevalência)</b>	<b>Coinfecção n (% dos infectados)</b>
<b>Protozoários intestinais</b>	57 (22,1%)	43 (75,4%)
<i>Entamoeba coli</i>	25	17
<i>Endolimax nana</i>	22	20
<i>Blastocystis hominis</i>	10	9
<i>Giardia lamblia</i>	3	2
<i>Iodamoeba butschlii</i>	2	2
<i>Entamoeba hartmani</i>	1	1
<i>Entamoeba histolytica/díspar</i>	9	9
<b>Protozoonoses</b>	80 (35,0%)	61 (26,6%)
<i>Leishmania</i>	80	61
<b>Helmintos</b>	135 (52,5%)	74 (54,8%)
<i>Schistosoma mansoni</i>	118	69
Ancilostomídeo	23	19
<i>Enterobius vermicularis</i>	6	5
<i>Strongyloides stercoralis</i>	1	0
<i>Trichuris trichiura</i>	1	0
<b>Total</b>	186 (72,3%)	100 (53,7%)

Para as análises propostas neste estudo, faz-se necessário a identificação dos indivíduos infectados mesmo com baixas cargas parasitárias. Assim, a confirmação da infecção por *S. mansoni*, a helmintose mais prevalente entre os moradores de Brejo do Amparo, foi confirmada através do teste molecular PCR-ELISA *system*, realizado em amostras fecais de 215 indivíduos, que corresponde a 83,6% da população original. Entre as amostras testadas, 117 (54,4%) mostraram reação positiva para DNA de *S. mansoni*, dos quais 22 não tinham sido identificados como infectados nos exames parasitológicos (Tabela 4).

**Tabela 4** – Pareamento dos resultados obtidos nos testes parasitológicos e molecular realizados nos moradores de Distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.

<b>Testes Parasitológicos</b>			
<b>PCR</b>	Positivo	Negativo	<b>Total</b>
Positivo	95	22	117
Negativo	9	89	98
	104	111	215

As análises de concordância entre o teste molecular e os testes parasitológicos estão indicadas na tabela 5, e demonstram um fator Kappa de 0,7125, classificado como bom por Landis & Koch, (1977). Além disso, as análises comparativas entre os testes de diagnósticos mostram que o diagnóstico molecular teve alta acurácia (85,5%), apresentando uma especificidade de 80,1% e sensibilidade de 91,3% (Tabela 5).

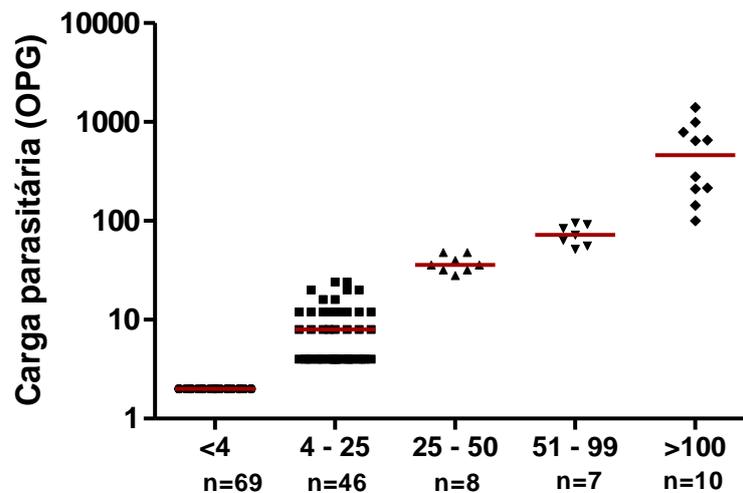
**Tabela 5** - Análise de concordância entre os testes parasitológicos e moleculares utilizados para identificação da infecção por *S. mansoni* em moradores de Distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.

Parâmetro	Cálculo (%)	IC 95% Inferior-Superior
Sensibilidade	91,35%	84.37, 95.38 <sup>a</sup>
Especificidade	80,18%	71.81, 86.53 <sup>a</sup>
Valor preditivo positivo	81,2%	73.17, 87.24 <sup>a</sup>
Valor preditivo negativo	90,82%	83.46, 95.09 <sup>a</sup>
Precisão de diagnóstico	85,58%	80.26, 89.65
Kappa de Cohen (sem ponderar)	0,7125	0.5798 - 0.8452

<sup>a</sup>Método: Pontos de Wilson

A somatória do diagnóstico molecular aos testes parasitológicos revelam que 140 indivíduos apresentam positividade para infecção por *S. mansoni* em pelo menos um dos testes utilizando, com prevalência estimada de 54,4%. Desta forma, a infecção por *S. mansoni* foi a parasitose mais frequente na população de estudo, sendo utilizada para os estudos posteriores de resposta imunológica e associação com doenças alérgicas.

A carga parasitária nos indivíduos infectados por *S. mansoni* foi estimada através da contagem de ovos eliminados por grama de fezes de cada paciente (opg). Para esta estimativa foram utilizadas as lamínas de Kato-Katz (média de ovos obtida em 2 lamínas de 3 amostras). Para os pacientes que apresentaram resultado positivo para infecção por *S. mansoni* nos testes parasitológicos qualitativos (Helmintex<sup>®</sup>, Gradiente Salino e PCR), mas tiveram as 6 amostras de Kato-Katz negativas ( $\leq 3$  ovos/g fezes), foi designado o valor de 2 opg. Desta forma, a mediana da carga parasitária na população do estudo foi de 4 ovos/g fezes com percentil entre 2 e 12. Na figura 7 é possível observar que a maior parte dos indivíduos positivos 69 (49,2%) possuem baixa infecção apresentando um opg menor que 4, que só foi detectado por testes mais sensíveis do que o Kato-Katz; outros 46 moradores (32,8%) eliminaram entre 4 e 25 opg e apenas 10 (7,1%) tiveram infecção acima de 100 opg, considerada alta ou moderada.



**Figura 7** – Distribuição da carga parasitária entre os infectados por *S. mansoni* (n=140) no Distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.

Não houve associações estatisticamente significativas entre intensidade e prevalência da esquistossomose em relação a gênero. A prevalência da infecção por *S. mansoni* foi semelhante entre os indivíduos de diferentes faixas etárias, porém foi verificada uma diferença estatística ( $p=0,0302$ ) na carga parasitária dos indivíduos de diferentes faixas etárias, sendo esta maior em adultos com idade entre 21 e 40 anos (Tabela 6).

**Tabela 6** – Prevalência e Intensidade da infecção para *Schistosoma mansoni* quanto à gênero e faixa etária na população do distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.

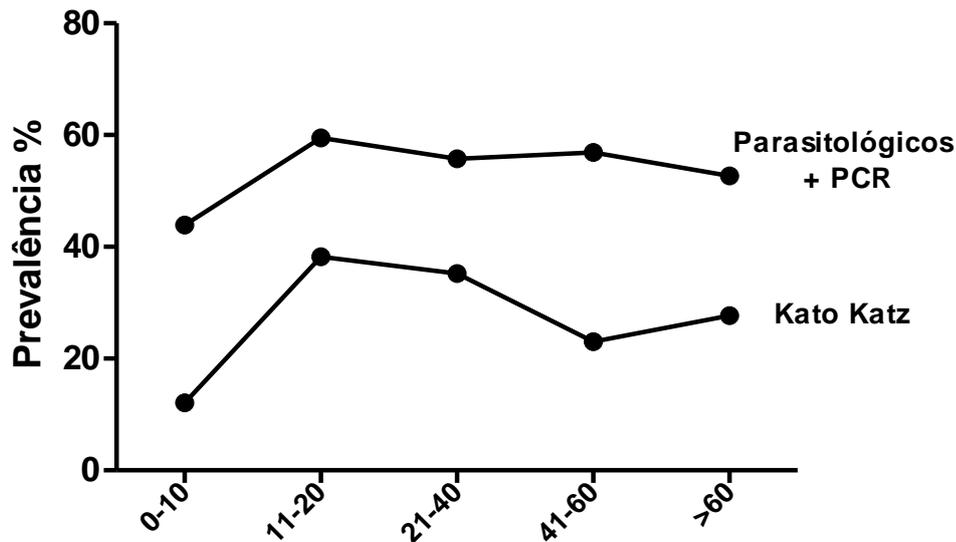
Sexo <sup>a</sup>	Positividade para <i>S. mansoni</i>	Carga Parasitária – OPG Mediana (Percentil)
Masculino	69/140	2 (2-12)
Feminino	71/140	2 (2-12)
Faixa etária <sup>b</sup>		
0 – 10	18/41 (43,9%)	2 (2 – 3,5)
11 – 20	28/47 (59,5%)	4 (2 – 21)
21 – 40	38/68 (55,8%)	6 (2 – 33)*
41 – 60	37/65 (56,9%)	2 (2 – 8)
>60	19/36 (52,7%)	2 (2 – 4)

<sup>a</sup>Teste T post-test Mann Whitney com nível de significância de  $p<0,05$ .

<sup>b</sup>Análise Anova post-test Kruskal-Wallis Multiple Comparison, com nível de significância de  $p<0,05$ .

\*Intensidade de carga estatisticamente significativa  $p=0,0302$ .

Na figura 8, é possível observar que a combinação dos testes moleculares e parasitológicos aumenta a prevalência do diagnóstico para esquistossomose em relação ao Kato-Katz, em todas as faixas etárias. Entretanto, a maior diferença foi observada em crianças e idosos, onde foi observado um aumento de em torno de quatro vezes na prevalência estimada.



**Figura 8** – Distribuição da carga parasitária por faixa etária entre os infectados por *S. mansoni* (n=140) no Distrito Brejo do Amparo, Januária-MG.

Apesar da elevada prevalência de parasitas e comensais na população em estudo, 98 (43,1%) dos moradores declarou ter usado de algum anti-helmíntico no último ano antes do projeto DECIT ser iniciado na região. Dentre os indivíduos que alegaram o tratamento anti-helmíntico, 56,1% estavam infectados por *S. mansoni* e outros 56,1% possuíam algum outro tipo de infecção parasitária. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para intensidade de carga entre os tratados e não tratados (Tabela 7).

**Tabela 7** – Prevalência e intensidade da infecção parasitária em indivíduos que relataram tratamento anti-helmíntico recente na população de Brejo do Amparo, Januária-MG

	Tratamento com anti-helmíntico <sup>a</sup>	Infecção <i>S. mansoni</i>	OPG <sup>b</sup> Mediana (percentil)	Outras infecções parasitárias
<b>Sim</b>	98/227 (43,1%)	55/98 (56,1%)	4 (2 - 24)	55/98 (56,1%)
<b>Não</b>	129/227 (56,8%)	69/129 (53,4%)	4 (2 - 8)	72/129 (55,5%)

<sup>a</sup>227 indivíduos responderam à essa questão.

<sup>b</sup>Teste T, post-test Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 6.3 Caracterização dos indivíduos alérgicos na população de Brejo do Amparo

#### 6.3.1 Análise do questionário ISAAC para caracterização de Asma, Rinite e Eczema alérgica na população de estudo

Entre os 257 participantes do projeto, 229 (89%) responderam ao questionário ISAAC, permitindo a identificação de sintomas clínicos associados a doenças alérgicas (Asma, Rinite e Eczema).

Na população de estudo somente 40 (17,4 %) declaram não ter qualquer tipo de sintoma associado a doenças alérgicas, 13 indivíduos (5,6 %) declaram alergia a algum medicamento e/ou alimento, 105 (45,8%) relatam algum sintoma associado à Asma, 167 (72,9%) tinham sintomas de Rinite e 45 (19,6%) para Eczema (Tabela 8). Também foi verificado que 87 indivíduos (37,9%) declaram ter sintomatologia associada tanto a Asma como a Rinite, sendo os sintomas mais frequentes e intensos em meses frios ou secos, como Junho e Julho.

A presença e intensidade dos sintomas foram pontuadas conforme descrito na metodologia, permitindo categorizar a população em Não sintomático (pontuação = 0); sintomas fracos e esporádicos (pontuação entre 1 e 2); alergia moderada (pontuação entre 3 e 4); e alergia intensa e frequente (pontuação >5). Baseado nesta classificação, 134 (58,5%) indivíduos apresentam sintomas intensos e frequentes associados à Rinite alérgica, 38 (16,5) indivíduos relatam quadros associados à Asma, 32 (13,9%) indivíduos têm sintomas frequentes de Eczema atópica (Tabela 8). Dos indivíduos entrevistados, 28 (12,2%) relataram sintomatologia relacionada a Asma e a Rinite. É importante salientar que apesar da frequência elevada de sintomas alérgicos, os residentes de Brejo do Ampara disseram informalmente durante a aplicação do questionário ISAAC nunca terem realizado exames médicos para confirmação de doenças alérgicas.

Para as análises utilizando os módulos investigados no questionário ISAAC, nós consideramos como alérgicos os pacientes que alegaram ter sintomatologia recente com maior frequência e intensidade, ou seja, aqueles classificados como sintomático moderado ou forte na Tabela 8.

**Tabela 8** – Classificação dos sintomas declarados em cada módulo avaliado no questionário ISAAC de acordo com o tempo em que ocorreram, frequência e intensidade na população de Brejo do Ampara, Januária-MG.

	<b>Assintomático</b>	<b>Sintomático</b>	<b>Fraco (1-2)</b>	<b>Moderado (3-4)</b>	<b>Forte (&gt;5)</b>
<b>Alergia (Alim-Med)</b>	216 (94,3%)	13 (5,6%)	Não se aplica <sup>b</sup>	Não se aplica <sup>b</sup>	Não se aplica <sup>b</sup>
<b>Asma</b>	124 (54,1%)	105 (45,8%)	67 (29,2%)	0	38 (16,6%)
<b>Rinite</b>	62 (27,0%)	167 (72,9%)	33 (14,4%)	39 (17,0%)	95 (41,4%)
<b>Eczema</b>	184 (80,3%)	45 (19,6%)	13 (5,6%)	20 (8,7%)	12 (5,2%)

<sup>b</sup>O questionário não permite classificar a intensidade ou frequência dos sintomas relacionados a alergia alimentar ou medicamentosa.

Nossos dados revelam que mulheres tiveram prevalência significativamente maior ( $p=0,00003$ ) de sintomas associados a Rinite que os homens, sendo que para os sintomas de Asma e Eczema não foram verificadas diferenças significativas de prevalência para gênero. Em relação a faixa etária, as crianças com idade menor ou igual a 10 anos apresentaram uma

maior prevalência significativamente maior ( $p= 0,007$ ) para Asma em comparação as demais faixas etárias. Eczema também apresentou diferença entre a prevalência de infectados que foi significativamente menor ( $p= 0,046$ ) na faixa que compreende idade entre 41 a 60 anos, como apresentado na tabela 9.

**Tabela 9** – Prevalência de indivíduos sintomáticos para Asma, Rinite e Eczema em relação ao gênero e faixa etária na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.

	<b>Asma</b>	<b>Rinite</b>	<b>Eczema</b>
<b>Sexo<sup>a</sup></b>			
Masculino (n=112)	14 (12,5%)	50 (44,6%)	14 (12,5%)
Feminino (n=117)	24 (20,5%)*	84 (71,7%)*	18 (15,3%)
<b>Faixa etária<sup>b</sup></b>			
≤ 10 (n=38)	17 (44,7%)**	25 (65,7%)	8 (21,0%)
11-20 (n=43)	4 (9,3%)	27 (62,7%)	9 (20,9%)
21 – 40 (n=61)	7 (11,4%)	35 (57,3%)	5 (8,1%)
41 – 60 (n=60)	7 (11,6%)	35 (58,3%)	4 (6,6%)***
>60 (n=27)	3 (11,1%)	12 (44,4%)	6 (22,2%)
<b>Total = 229</b>	<b>38 (16,5%)</b>	<b>134 (58,5%)</b>	<b>32 (13,9%)</b>

<sup>a</sup>Teste do qui-quadrado com nível de significância de  $p<0,05$ .

<sup>b</sup>Regressão logística com nível de significância de  $p<0,05$ .

\*Gênero – Rinite: estatisticamente significativo ( $p=0,00003$ ).

\*\*Faixa etária – Asma: estatisticamente significativo ( $p=0,007$ ).

\*\*\*Faixa etária – Eczema: estatisticamente significativo ( $p=0,046$ ).

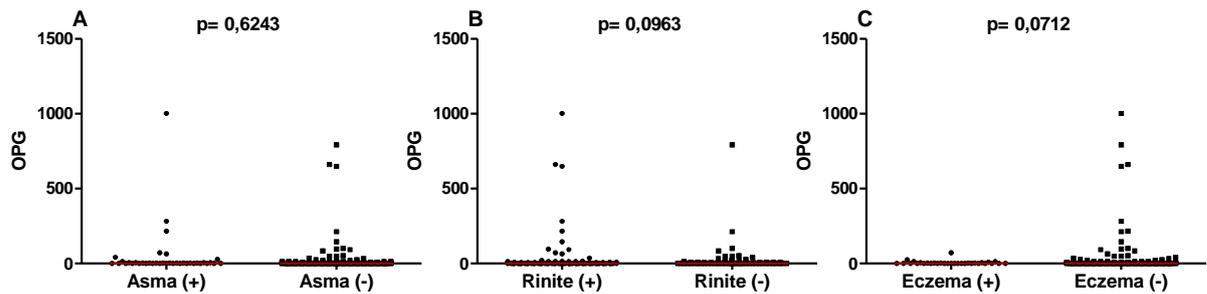
A prevalência da infecção por *S. mansoni* entre os indivíduos considerados alérgicos ou não alérgicos esta ilustrada na tabela 10. Não houve diferença estatística na prevalência da infecção por *S. mansoni* entre os indivíduos considerados alérgicos e os considerados não alérgicos, independente do sintoma ser relacionado à Asma, Rinite ou Eczema atópica.

**Tabela 10** – Prevalência de indivíduos positivos por *S. mansoni* entre os indivíduos que foram classificados como alérgicos ou não alérgicos na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.

<b>Prevalência de <i>S. mansoni</i></b>				
<b>Não alérgicos</b>		<b>Alérgicos</b>		<b>Valor de p<sup>b</sup></b>
<b>Asma (n=191)</b>	102 (53,4%)	<b>Asma (n= 38)</b>	25 (65,7%)	$p= 0.1607$
<b>Rinite (n=95)</b>	50 (52,60%)	<b>Rinite (n=134)</b>	77 (57,4%)	$p= 0.4686$
<b>Eczema (n=197)</b>	106 (53,8%)	<b>Eczema (n=32)</b>	21 (65,6%)	$p= 0.2126$

<sup>b</sup>Teste do Qui quadrado

A carga parasitária de *S. mansoni*, estimada pelo número de ovos do parasito eliminados nas fezes, também não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os pacientes positivos ou negativos para as alergias investigadas no questionário ISAAC, como mostra a figura 9.



**Figura 9** – Número de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes de indivíduos com ou sem alergia declarada. **A:** Asma; e **B-** Rinite; e **C-** Eczema. Teste T Mann Whitney, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

#### 6.4 Nível de reatividade de IgE sérica à alérgenos da poeira na população de Brejo do Amparo

Na população do estudo, a prevalência e intensidade da alergia também identificada através do nível de reatividade de IgE circulante à antígenos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *D. farinae*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, pêlo de cão e de gato, que são alérgenos frequentemente encontrados na poeira doméstica. Entre os 197 indivíduos avaliados, 47 (23,8%) tiveram reatividade de IgE superior à 0,35 UI/mL, sendo considerados atópicos aos antígenos da poeira doméstica. Nestes indivíduos a mediana de reatividade foi de 7,1 (5,1 – 9,5). Tanto a intensidade quanto a prevalência da atopia não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os gêneros ou faixa etária dos indivíduos, conforme ilustrado na tabela 11.

**Tabela 11** – Distribuição por faixa etária e sexo da prevalência de pacientes reativos para os alérgenos de poeira testados na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.

Sexo <sup>a</sup>	Prevalência de reativos para o IgE específico (n=197)	
	n(%)	Mediana com percentil
Feminino (n=105)	21 (20,0%)	7,1 (4,3 – 14,3)
Masculino (n=92)	26 (28,2%)	7,2 (5,2 – 8,6)
Faixa Etária <sup>b</sup>		
0-10 (n=16)	7 (43,7%)	7,5 (5,6 – 9,3)
11-20 (n=41)	8 (19,5%)	7,4 (5,9 – 16,0)
21-40 (n=61)	14 (22,9%)	7,4 (4,8 – 14,0)
41-60 (n=60)	14 (23,3%)	6,9 (3,5 – 15)
>60 (n=19)	4 (21,0%)	4,5 (1,2 – 7,5)

<sup>a</sup> Gênero - Teste T post-test Mann Whitney para intensidade da reação e qui-quadrado para prevalência com nível de significância de  $p < 0,05$ .

<sup>b</sup> Faixa etária - Análise Anova post-test Kruskal-Wallis Multiple Comparison para intensidade e Regressão logística para prevalência com nível de significância de  $p < 0,05$ .

Dentre os 47 pacientes identificados como atópicos, 21 (44,6%) eram mono ou coinfectados por *S. mansoni* e entre os 150 não atópicos (76,1%) a prevalência de *S. mansoni*

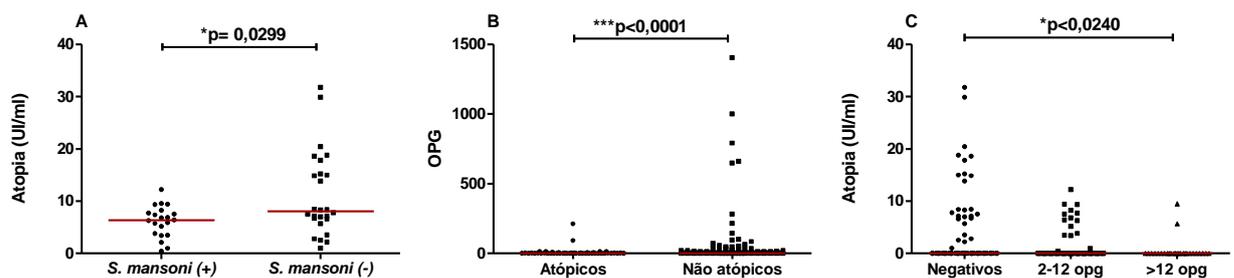
foi de 90 (60,0%). Apesar da prevalência de alergia ser mais elevada entre os não infectados, as análises não demonstram que esta diferença foi estatisticamente significativa (tabela 12).

**Tabela 12** – Distribuição por faixa etária e sexo da prevalência de pacientes reativos para os alérgenos de poeira testados na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.

Infecção por <i>S. mansoni</i>				
Atópicos	<i>S. mansoni</i> (+)	Não atópicos	<i>S. mansoni</i> (+)	Valor de p <sup>b</sup>
47 (23,8%)	21 (44,6%)	150 (76,1%)	90 (60,0%)	p= <b>0,06464</b>

<sup>b</sup>Teste do Qui quadrado com nível de significância de p<0,05

Entretanto, ao avaliar a intensidade da reatividade de IgE nos indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni* foi verificado que a população não infectada apresentou reatividade significativamente maior (p= 0,0299) em relação aos pacientes infectados (Figura 10A). A relação entre intensidade da atopia e infecção por *S. mansoni* ficou mais evidente quando os indivíduos infectados foram categorizados em baixa carga (menos de 12 ovos/g de fezes) e carga mais elevada (> que 12 ovos/g fezes). Esta categorização permitiu identificar que indivíduos não infectados apresentaram intensidade significativamente maior de atopia (p=0,0240) em relação aos indivíduos infectados que eliminam mais de 12 ovos/g de fezes, mas não houve diferença significativa na intensidade de atopia entre os não infectados e infectados com baixa carga parasitária (Figura 10B). Confirmando estes dados, a carga parasitária de *S. mansoni*, estimada pelo número de ovos do parasito eliminados nas fezes do hospedeiro, foi significativamente maior nos indivíduos não atópicos (p= 0,0001) como mostrado na figura 10C.



**Figura 10** – **A:** Intensidade de atopia em pacientes infectados e não infectados por *S. mansoni*; **B-** distribuição de carga parasitária em pacientes atópicos e não atópicos; e **C-** Intensidade de atopia para carga parasitária na população de Brejo do Amparo, Januária-MG. **A e B\*** Teste T Mann Whitney; e **C-** Anova post-test Kruskal-Wallis Multiple Comparision com nível de significância de p<0,05.

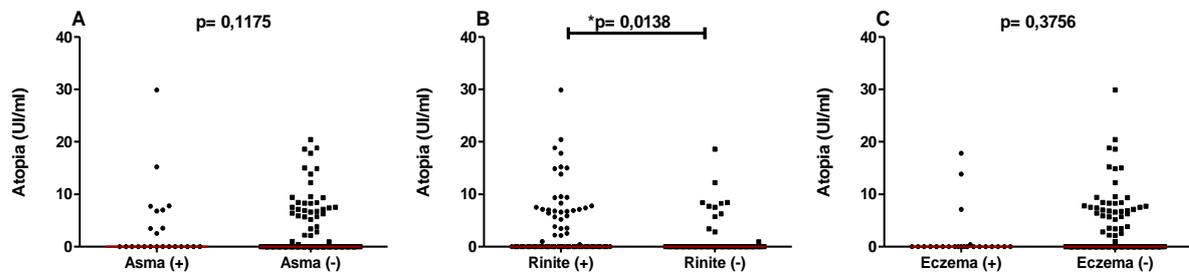
De acordo com a tabela 13, a prevalência de pacientes com Rinite foi maior dentre os atópicos quando comparados com os não atópicos, sendo estatisticamente significativa (p= 0,002713). Entres os indivíduos com Asma e Eczema não foram encontradas diferenças significativas na prevalência.

**Tabela 13** – Prevalência da atopia em pacientes declarados como alérgicos no questionário ISAAC na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.

Reatividade da Atopia (n=197)				
	Atopia	Asma	Rinite	Eczema
<b>Atópicos</b>	47 (23,8%)	9 (19,1%)	34 (72,3%)	4 (8,5%)
<b>Não atópicos</b>	150 (76,1%)	14 (9,3%)	71 (47,3%)	19 (12,6%)
	<b>Valor de p<sup>b</sup></b>	p= 0,06747	p= 0,002713	p= 0,4388

<sup>b</sup>Teste do Qui quadrado com nível de significância de  $p < 0,05$

A relação entre a intensidade da atopia em pacientes declarados como alérgicos ou não pelo questionário ISAAC não apresentou diferenças estatísticas tanto para Asma quanto para Eczema (Figura 11A e 11C), porém na Rinite foi observado um aumento significativo ( $p = 0,0188$ ) da intensidade entre os pacientes positivos quando comparados com os negativos (Figura 11B).



**Figura 11** – Intensidade da atopia em pacientes declarados como positivos ou negativos para: **A-** Asma; **B-** Rinite; e **C-** Eczema, na população de Brejo do Amparo, Januária-MG. \* Teste T Mann Whitney, com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 6.5 Parâmetros da resposta imunológica na população de Brejo do Amparo

### 6.5.1 Eosinófilos

Na população de estudo, 215 (83,6% da população original) colheram sangue para a realização do hemograma e os dados relativos ao número de eosinófilos circulantes foram utilizados neste estudo. Conforme mostra a tabela 14, não houve diferença significativa do número de eosinófilos circulantes entre as mulheres e homens que participaram do estudo. Entretanto, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a faixa etária que compreende crianças de 0 a 10 anos com os adultos entre 21 e 40, 41 e 60 e acima de 60, sendo também apresentado diferenças entre os adolescentes e jovens com idade entre 11 a 20 anos em comparação com as faixas etárias entre 41 e 60 e acima de 60 anos de idade ( $p = 0,0001$ ).

**Tabela 14** – Quantificação sérica de eosinofilia por gênero e faixa etária dos moradores de Brejo do Amparo, Januária-MG.

	Sexo <sup>a</sup>	Eosinofilia (n= 215)	
		N	Mediana com percentil
	Feminino	108	359,0 (199,0 – 550,8)
	Masculino	107	398,0 (216,0 – 680,0)
Faixa Etária <sup>b</sup>			
	0-10	28	588,5 (382,0 - 1100)*
	11-20	43	585,0 (310,0 – 848,0)*
	21-40	63	358,0 (215,0 – 604,0) <sup>#</sup>
	41-60	61	251,0 (132,5 – 251,0) <sup>#</sup>
	>60	20	264,0 (165,0 – 466,0) <sup>#</sup>

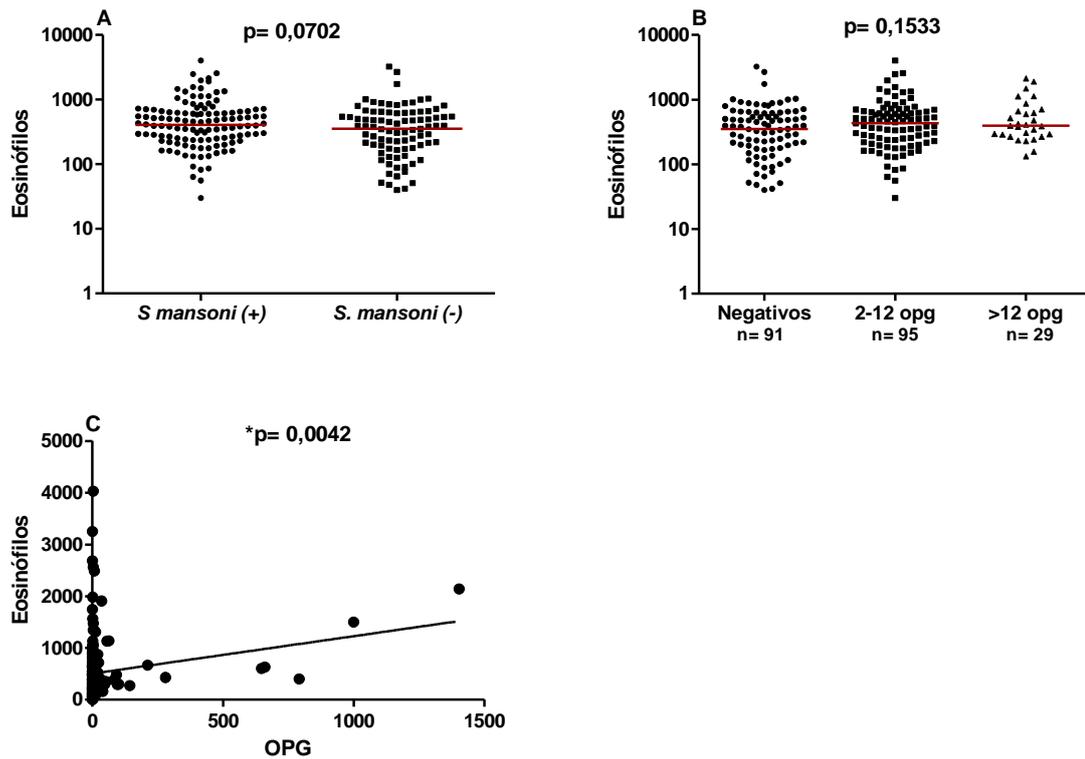
<sup>a</sup>Gênero - Teste T post-test Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$

<sup>b</sup>Faixa etária - Análise Anova post-test Kruskal-Wallis Multiple Comparison,  $p < 0,05$

\*Faixas etárias que não apresentaram diferenças estatísticas em relação à eosinofilia

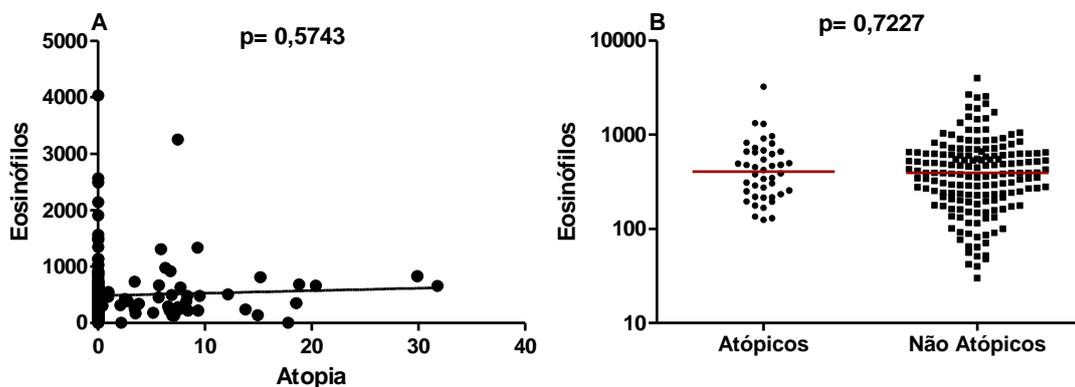
<sup>#</sup>Faixas etárias não diferentes entre-si, porém diferentes de (\*) em relação à eosinofilia.

Na população do estudo, o número de eosinófilos circulantes não foi significativamente diferente entre os indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni* (Figura 12A). Também não foi verificada diferença de eosinofilia entre os indivíduos com baixa ou moderada carga parasitária (Figura 12B). Porém, a regressão linear mostrou associação positiva ( $p = 0,0042$ ) entre o número de eosinófilos e o número de ovos do parasito eliminados nas fezes, analisados como variáveis contínuas (Figura 12C).



**Figura 12** - Associação da eosinofilia com: **A**- Infectados e não infectados por *S. mansoni* na população do estudo; **B**- medida categórica de opg; **C**- medida contínua de opg; \***A** - Teste T Mann Whitney; **B**- Análise Anova post-test Kruskal-Wallis Multiple Comparision **C**- Regressão linear com nível de significância de  $p < 0,05$ .

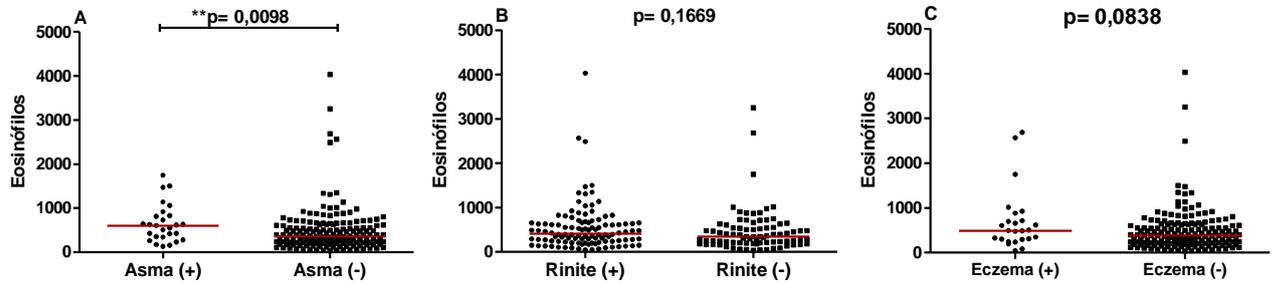
Como pode ser observado na figura 13, também não foi verificada diferença significativa na intensidade da atopia (Figura 13A), bem como no número eosinófilos circulantes entre os indivíduos atópicos e não atópicos (Figura 13B).



**Figura 13** – Associação da eosinofilia com atopia: **A**- medida contínua de atopia; e **B**- medida categórica de atopia; \***A** - Regressão linear; **B**- Teste T Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$ .

Em relação aos pacientes declarados como alérgicos pelo questionário ISAAC, a eosinofilia se mostrou estatisticamente elevada ( $p = 0,0098$ ) apenas para os pacientes

asmáticos (Figura 14A), mantendo níveis semelhantes tanto para Rinite quanto para Eczema (Figura 14B e 14C).



**Figura 14** - Distribuição da eosinofilia em indivíduos positivos e negativos para: **A-** Asma; **B-** Rinite; e **C-** Eczema; \*Teste T Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$ .

### 6.5.2 IgE Total

Dentre os 257 pacientes que constituíram a população original, 206 (80,1%) doaram amostras sorológicas para realização do ELISA para IgE total. Os níveis de IgE total apresentaram mediana de 1930 ng/ml de soro (837,0 - 4257) dentre os moradores de Brejo do Amparo e foram estatisticamente maiores ( $p = 0,0006$ ) no sexo masculino. Para a faixa etária não foram observadas diferenças significativas (Tabela 15).

**Tabela 15** - Quantificação de IgE Total para gênero e faixa etária nos moradores de Brejo do Amparo, Januária-MG.

Sexo <sup>a</sup>	IgE Total (n= 206)	
	n	Mediana com percentil
Feminino	109	1390 (642,8 - 3237)
Masculino	97	2844 (1261 - 4922)*
Faixa Etária <sup>b</sup>		
0-10	22	2745 (1309 - 4040)
11-20	40	2904 (1274 - 4754)
21-40	63	2063 (738,7 - 3887)
41-60	62	1380 (618,7 - 3658)
>60	19	2589 (997,4 - 5987)

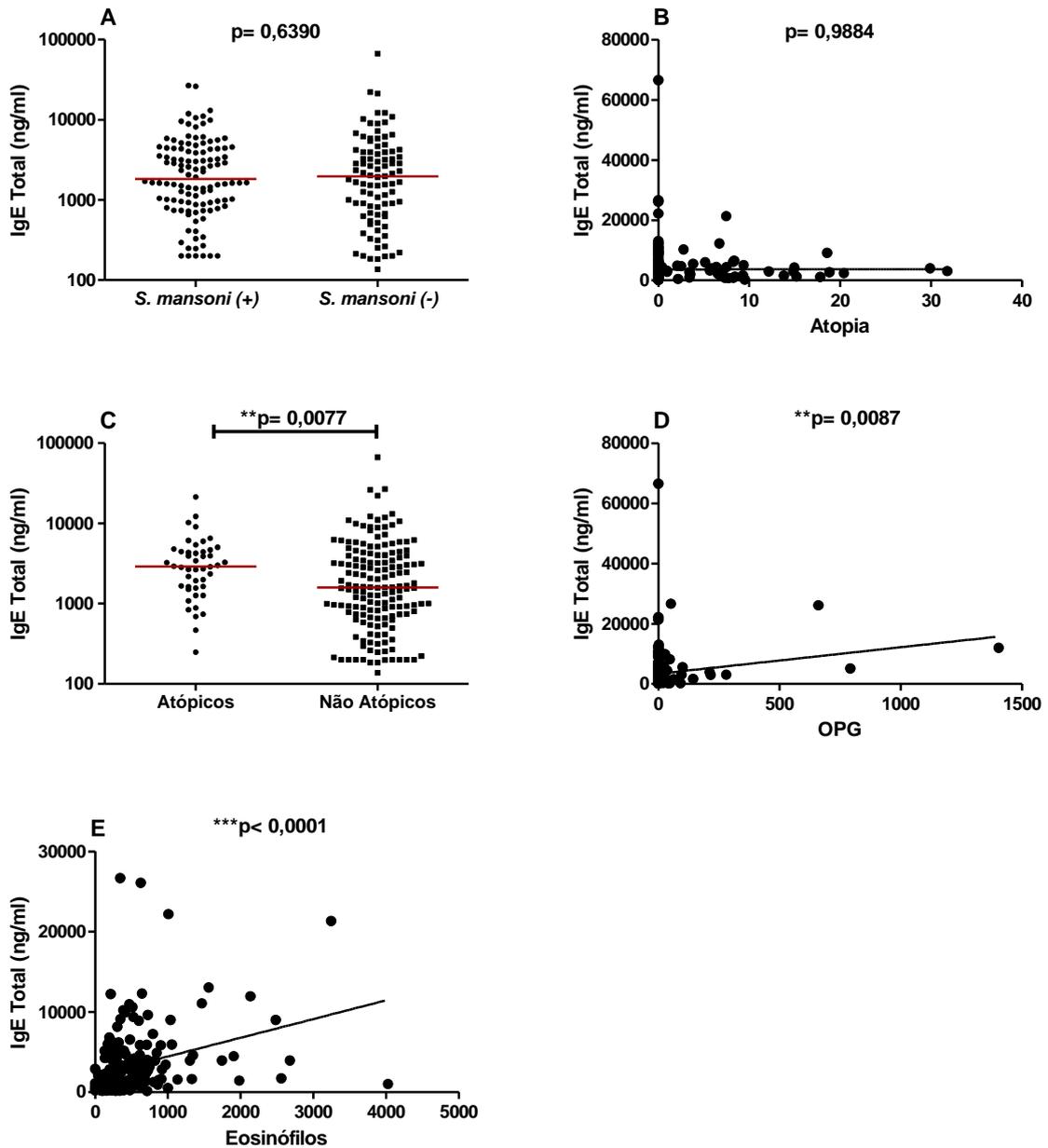
<sup>a</sup>Gênero - Teste T post-test Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$ .

<sup>b</sup> Faixa etária - Análise Anova post-test Kruskal-Wallis Multiple Comparison,  $p < 0,05$ .

\*Gênero com diferenças estatísticas em relação à intensidade de IgE Total,  $p = 0,0006$ .

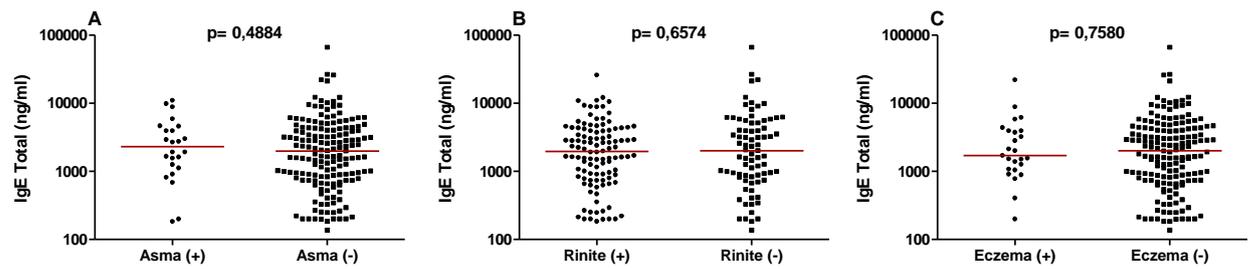
O IgE total também manteve níveis semelhantes entre os pacientes positivos ou negativos para *S. mansoni* na população de Brejo do Amparo (Figura 15A), mas a concentração de IgE total foi associada positivamente ( $p = 0,0077$ ) com a atopia categorizada

(Figura 15C), com a intensidade de carga parasitária apresentando um  $p= 0,0087$  (Figura 15D) e também com a eosinofilia ( $p= 0,0001$ ), como mostrado na figura 15E.



**Figura 15** – Associação de IgE Total com: **A-** Infecção por *S. mansoni*; e **B-** medida contínua de atopia; **C-** medida categórica de atopia; e **D-** medida contínua de carga parasitária; e **E-** Eosinofilia. \* **A e C-** Teste T Mann Whitney e **B, D e E-** Regressão linear com nível de significância de  $p < 0,05$ .

Não houve diferença significativa na concentração sérica de IgE total entre os indivíduos declarados como positivos ou negativos para todas as três alergias avaliadas pelo questionário ISAAC, como mostrado na figura 16.



**Figura 16** – Distribuição de IgE Total em indivíduos positivos e negativos para: **A-** Asma; **B-** Rinite; e **C-** Eczema; \*Teste T Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$

### 6.5.3 IL-10

A concentração sérica da citocina IL-10 foi estimada pela técnica de ELISA em 200 moradores de Brejo do Amparo, dos quais apenas 28 (14,0%) foram reativos. Dentre os reativos a mediana foi de 33,8 pg/ml (15,6 - 229,0 pg/ml), caracterizando dessa forma a população como baixa produtora de IL-10. Não foram observadas diferenças significativas na concentração de IL-10 sérica entre homens e mulheres ou entre os indivíduos de diferentes faixas etárias, como apresentado na tabela 16.

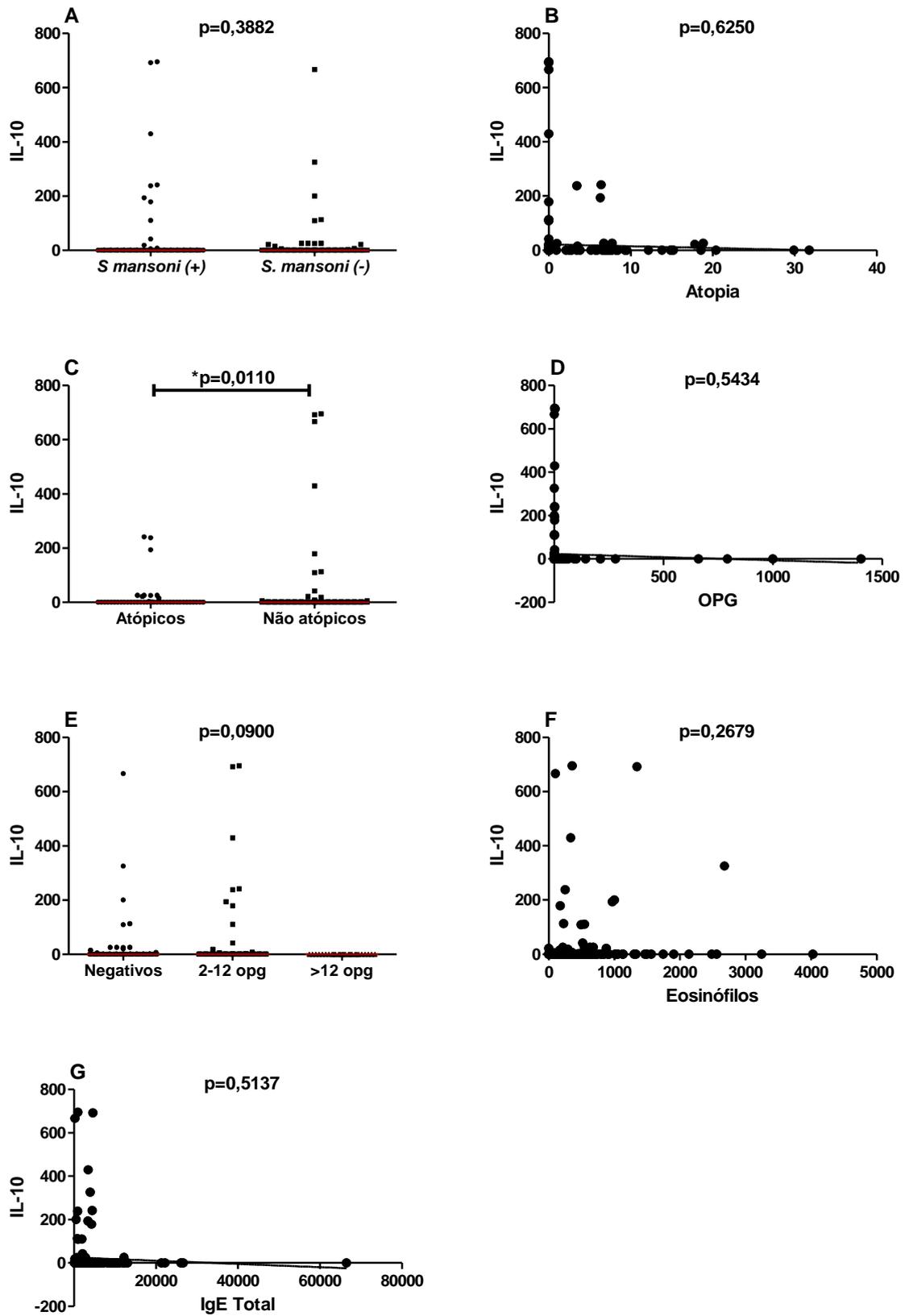
**Tabela 16** – Concentração sérica da citocina IL-10 para gênero e faixa etária nos moradores de Brejo do Amparo, Januária-MG.

Sexo <sup>a</sup>	IL-10 (n= 200)	
	n	Mediana com percentil
Feminino	15	24,74 (6,992 – 20,03)
Masculino	13	179,0 (20,03 – 282,3)
Faixa Etária <sup>b</sup>		
0-10	18	0 (0 – 0,3780)
11-20	43	0 (0 - 0)
21-40	61	0 (0 - 0)
41-60	61	0 (0 - 0)
>60	17	0 (0 – 0)

<sup>a</sup>Genêro - Teste T post-test Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$ .

<sup>b</sup>Faixa etária - Análise Anova post-test Kruskal-Wallis Multiple Comparision,  $p < 0,05$ .

Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de pacientes positivos ou negativos para *S.mansoni* (Figura 17A). A citocina IL-10 também não apresentou diferença quando foi associada a atopia de forma contínua (Figura 17B), porém quando esta foi categorizada revelou uma diferença significativa ( $p = 0,0110$ ), mostrando maiores níveis de IL-10 em pacientes não atópicos (Figura 17C). Os níveis de IL-10 também não apresentaram relação com intensidade de carga (Figura 17D e 17E), com eosinofilia (Figura 17F) ou com IgE total (Figura 17G).



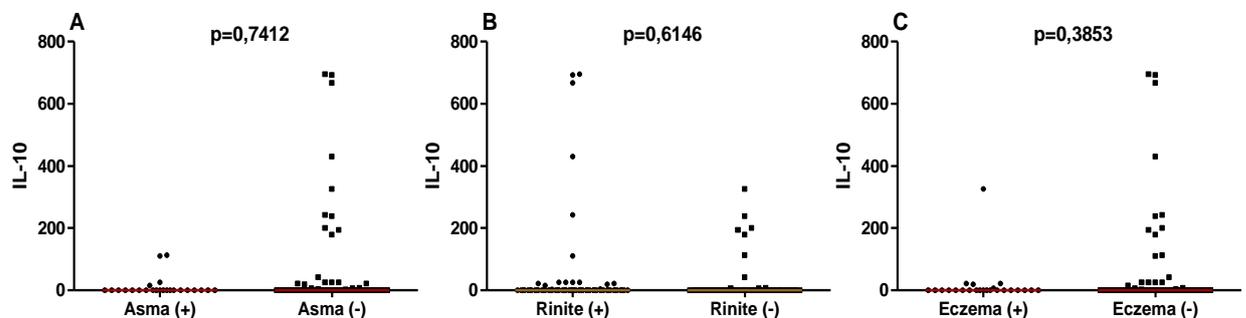
**Figura 17** - Distribuição e associação da IL-10 com: **A**- infecção por *S. mansoni*; **B**- medida contínua de atopia; e **C**- medida categórica de atopia; **D**- medida contínua de carga parasitária; e **E**- medida categórica de carga parasitária; **F**- Eosinofilia; e **G**- IgE Total. \***A** e **C**- Teste T Mann Whitney; **B**, **D**, **F** e **G**- Regressão linear; e **E**- Análise Anova post-test Kruskal-Wallis Multiple Comparison e com nível de significância de  $p < 0,05$ .

Apesar de ser significativamente associado à pacientes não atópicos, a citocina IL-10 não teve associação significativa para a atopia pelo modelo de regressão logística (Tabela 17).

**Tabela 17** – Modelo de regressão logística para a associação da IL-10 na atopia população de Brejo do Amparo, Januária-MG.

Atopia	Odds Ratio	Valor de p	Intervalo de confiança (95%)
IL-10	9997636	0.899	0.996112 – 1.003429

Os pacientes declarados como positivos ou negativos para Asma, Rinite e Eczema através do questionário ISAAC também não apresentaram diferenças significativas em relação aos níveis de IL-10 (Figura 18).



**Figura 18** – Distribuição de IgE Total em indivíduos positivos e negativos para: A- Asma; B- Rinite; e C- Eczema; \*Teste T Mann Whitney com nível de significância de  $p < 0,05$

## 6.6 Modelos de análise multivariada

Foram construídos modelos multivariados de regressão logística de análise com presença de todas as variáveis do banco de dados que na análise linear simples apresentaram  $p \leq 0,25$ . Para a construção dos modelos, as variáveis que foram selecionadas para o modelo final com  $p \leq 0,25$ , mas que apresentaram baixa frequência foram excluídas das análises finais.

Durante a análise univariada foi verificado que a intensidade de infecção por *S. mansoni* (opg), os níveis de IgE total, a prevalência da infecção por *S. mansoni*, a eosinofilia, os níveis de IL-10, a idade e o gênero permaneceram associadas com a intensidade e prevalência da atopia e Asma (Tabela 18).

**Tabela 18** – Variáveis associadas à atopia e Asma na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.

	Asma	Rinite	Eczema	Atopia
Gênero	-	P= 0,00003	-	-
Faixa etária	P= 0,007	-	-	-

<b>Prevalência <i>S. mansoni</i></b>	P= 0,1607	P= 0,0963	-	P= 0,0646
<b>Intensidade (&gt;12opg)</b>	-	-	P= 0,0712	-
<b>Reatividade da atopia</b>	P= 0, 0674	P= 0, 0027	-	-
<b>Eosinófilos</b>	P= 0,0042	P= 0,1669	P= 0,0838	-
<b>IgE Total</b>	-	-	-	P= 0,0077
<b>IL-10</b>	-	-	-	P= 0,0110

Quando analisados em modelo multivariado, verificou-se que a carga parasitária permaneceu inversamente associada ao aumento da atopia, ou seja, os indivíduos com carga parasitária acima de 12 ovos por grama de fezes apresentaram aproximadamente 5 vezes menos chance de desenvolver atopia.

A idade do indivíduo também se mostrou um fator importante para o aumento de atopia e apesar de não ter sido estatisticamente significativa foi mantida e ajustada ao modelo (Tabela 19).

**Tabela 19** – Modelo de análise multivariada para Atopia, na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.

Variáveis	Atopia (IgE específico)				
	Odds Ratio	Erro Padrão	z	Valor de p	IC 95%
<b>OPG</b>	0.19	0.15	-2.12	0,034	0.04 - 0.88
<b>Idade 1<sup>a</sup> (0-10)</b>	2.62	1.52	1.66	0,097	0.83 – 8.17
<b>Idade 2 (11-20)</b>	0.75	0.35	-0.59	0.552	0.30 – 1.90
<b>Idade 6 (&gt;41)</b>	0.69	0.30	-0.84	0.400	0.29 – 1.62

<sup>a</sup>Idade referência: 21 a 40

Ao contrário do observado para atopia, a intensidade da infecção por *S. mansoni* foi positivamente associada com Asma, ou seja, o paciente que tem mais de 12 ovos por grama de fezes, possui aproximadamente 3 vezes mais chances de desenvolver Asma. A idade também foi associada positivamente com a Asma, sendo observado que crianças com até 10 anos de idade tem aproximadamente 7 vezes mais chances de ter a doença em relação à faixa etária de referência (21 a 40 anos) como mostrado na Tabela 20.

**Tabela 20:** Modelo de análise multivariada para Asma, na população de Brejo do Amparo, Januária-MG.

Variáveis	Asma				
	Odds Ratio	Erro Padrão	Z	Valor de p	IC 95%
<b>OPG</b>	2.97	1.56	2.08	0.038	1.06 – 8.32
<b>Idade 1<sup>a</sup> (0-10)</b>	7.27	3.49	4.14	0.00	2.84 – 18.63
<b>Idade 2 (11-20)</b>	0.84	0.52	-0,28	0.780	0.24 – 2.85
<b>Idade 6 (&gt;41)</b>	1.00	0.55	0.02	0.986	0.34 – 2.95

<sup>a</sup>Idade referência: 21 a 40

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo transversal foi realizada uma investigação da possível associação entre fatores da resposta imunológica, infecção por *S. mansoni* e alergia. Os participantes no estudo são residentes em uma área endêmica para a esquistossomose mansônica caracterizada por apresentar baixa carga parasitária. Considerando a esquistossomose um problema de saúde pública e sua complexidade epidemiológica, estudos correlacionando a resposta imunológica com a presença de alergias, poderão ter implicações na terapia e consequente morbidade dessas doenças.

As infecções parasitárias têm uma prevalência elevada e estima-se que mais de três bilhões de pessoas estão infectadas por parasitas intestinais no mundo de hoje (Gonçalves et al., 2011). Estas infecções são mais comuns entre as comunidades com baixo poder aquisitivo e que vivem em áreas em desenvolvimento, sendo uma ameaça grave para a saúde e desenvolvimento das crianças e estão associadas com redução da atividade física e capacidade de aprendizagem prejudicada (Assis et al., 2013). Inúmeros estudos têm demonstrado que a precária alfabetização, status socioeconômico mais baixo, falta de banheiros no domicílio, disposição inadequada de dejetos humanos e estrutura sanitária precária estão relacionadas com aumento de risco de adquirir parasitoses (Holland et al., 1996, Tshikuka et al., 1995).

No distrito de Brejo do Amparo, a prevalência geral foi 68,4% para helmintos e protozoários intestinais. Resultado muito expressivo em comparação com outros estudos de prevalência de parasitoses realizados em Minas Gerais. Gonçalves e colaboradores (2012) mostraram que 29,3% dos escolares encontravam-se parasitados na cidade de Uberlândia, enquanto que Rocha e colaboradores (2000) observaram 583 escolares (20,1%) infectados em Bambuí. Em contrapartida, Assis e colaboradores (2013) encontraram prevalência de 89,5% de parasitoses intestinais na comunidade indígena Maxakali. Essa discrepância dos resultados apresentados em diferentes trabalhos pode estar relacionada a inúmeros fatores como os tipos de testes parasitológicos aplicados, condições de saneamento e hábitos culturais da população estudada.

Na população de Brejo do Amparo a alta prevalência de parasitoses pode estar relacionada a fatores como convivência direta com animais, alta concentração de indivíduos nos domicílios e falta de infraestrutura sanitária adequada. Não há rede de esgoto e distribuição de água vinculadas à rede pública do município, fatores que de acordo com Assis et al., (2013) podem propiciar a propagação de doenças com veiculação fecal-oral.

Outro fator que pode aumentar a prevalência de infecções parasitárias nesse distrito é o baixo grau de escolaridade, visto que mais de 60% dos entrevistados não são alfabetizados. De acordo com um trabalho realizado com escolares de Teerã por Nematian e colaboradores (2004), o aumento no nível de escolaridade dos pais diminui as infecções parasitárias em até 20%, concluindo que existe uma grande relação entre o nível educacional dos pais e a taxa de infecções, sugerindo que certas práticas de cuidados infantis de higiene sejam melhores quando os pais recebem um maior nível de educação.

Além disso, é importante ressaltar que para diagnóstico dos indivíduos positivos foi utilizada uma combinação de quatro testes parasitológicos diretos (Sedimentação Espontânea, Gradiente Salino, Helmintex® e Kato-Katz), aumentando assim a sensibilidade desses exames. Essa combinação de testes é de grande importância para não subestimar a real frequência de parasitoses em estudos populacionais, visto as diversidades biológicas e estruturais de cada parasito, necessitando assim de métodos diferentes para sua detecção (King et al., 2013; Saugar et al., 2015).

Dentre as infecções diagnosticadas pelos testes parasitológicos, o helminto trematódeo *S. mansoni* foi o mais frequente, apresentando prevalência de 45,9% na população em estudo. A elevada prevalência de esquistossomose na área de estudo pode estar relacionada ao fato de o Estado de Minas Gerais representar uma das maiores áreas endêmicas para a esquistossomose do país e a população continua aumentando em regiões com precárias condições sociais e sanitárias (Katz & Almeida, 2003; Gazzinelli et al., 2006), como a região norte do estado, onde está localizado o município de Januária, uma área endêmica para *S. mansoni* segundo o Programa de Controle da Esquistossomose (PCE). No entanto, as constantes ações promovidas por esses programas de controle, dentre elas o tratamento quimioterápico em massa, têm contribuído para redução carga parasitária nos indivíduos parasitados de áreas endêmicas, os quais são difíceis de serem diagnosticados (Grenfell *et al.*, 2014).

Para garantir a identificação dos indivíduos infectados com baixa carga parasitária foi realizado um exame molecular para confirmação dos diagnósticos, que mostrou boa concordância entre os diagnósticos de acordo com Landis & Koch, (1977). A carga parasitária apresentou mediana de 4 opg, caracterizando a população como de baixa carga parasitária de acordo com a OMS (2014). Esta característica pode ser consequência de uma população endêmica já submetida a vários tratamentos prévios, selecionada no campo e não em hospitais ou outros locais que poderiam viciar a amostragem.

Segundo relatos de moradores e funcionários do serviço de saúde local, o Programa de Controle da Esquistossomose, com o objetivo de controle e erradicação da esquistossomose, tem realizado a identificação e tratamento dos indivíduos positivos. Dentre os participantes 98 (42,7%) relataram o uso de tratamento anti-helmíntico no ano anterior ao início do projeto DECIT, que é determinante na diminuição da carga parasitária, diminuindo a quantidade de vermes, mas sem necessariamente erradicar a infecção, visto que a população se reinfecta ao continuar exposta aos fatores de risco. Dentre os indivíduos que alegaram o tratamento anti-helmíntico, 55,6% estavam infectados por *S. mansoni* e 56,7% possuíam algum outro tipo de infecção parasitária. Outro fator que pode influenciar na baixa quantidade de ovos do parasito nos indivíduos infectados é a exposição intrauterina a antígenos de *S. mansoni* em que estão expostos os indivíduos de áreas endêmicas, devido à infecção materna, ou mesmo após o nascimento através do leite materno, permitindo que os indivíduos infectados na infância respondam diferente daqueles fora da área endêmica (Novato-Silva et al., 1992; Attallah et al., 2003).

Na população de Brejo do Amparo, a prevalência e intensidade foram semelhantes entre gêneros ( $p = 0,793$ ), assim como também foi observado por Magueta et al, (2015) em duas comunidades rurais de Governador Valadares em Minas Gerais. Estes dados foram diferentes dos relatados por Enk et al, (2010); Sayed et al, (2014) e Rapport et al, (2015) em que o sexo masculino apresentou uma maior probabilidade de infecção por *S. mansoni* provavelmente devido às atividades na agricultura que são mais frequentes entre os homens em áreas rurais, resultando em aumento na exposição à infecção com o parasita e não necessariamente à diferença de suscetibilidade entre homens e mulheres (Kloss et al., 2008). No presente estudo não foi verificada diferença de prevalência entre gêneros, o que pode se dever ao fato de que as mulheres estão tão expostas quanto os homens, pois alegaram também utilizar a água do riacho para atividades domésticas e lazer.

Nossos dados indicam que a prevalência da esquistossomose nos moradores de Brejo do Amparo foi estatisticamente semelhante nas diferentes faixas etárias, sendo que os infectados de 31 a 40 anos apresentaram carga parasitária estatisticamente maior que as demais faixas etárias. Esses dados contradizem o que alguns trabalhos têm mostrado em áreas endêmicas para esquistossomose, onde a primo-infecção frequentemente ocorre em torno dos dois anos de idade e a maior prevalência e intensidade de infecção tendem a ocorrer em jovens e adolescentes, geralmente diminuindo na idade adulta (Conceição & Coura, 1978; Coura-Filho et al., 1995; Fleming et al., 2006; Colley et al., 2014). Essa diferença que observamos na distribuição da prevalência entre as faixas etárias pode estar relacionada à

combinação de testes parasitológicos e molecular, ressaltando que a contagem de opg foi baseada em seis lâminas de K-K (duas de cada amostra), o que aumenta a sensibilidade no diagnóstico e melhora consequentemente a identificação dos pacientes verdadeiramente negativos. Esse conjunto de diagnósticos não é comumente observado em estudos populacionais, que geralmente utilizam apenas o K-K, eficiente em identificar infecções moderadas e intensas (De Vlas e Gryssels, 1992), realidade que não é observada na população em estudo. Estudos têm demonstrado que ao aumentar o número de amostras ou lâminas analisadas, bem como a combinação de diferentes métodos, em áreas de média e baixa endemicidade (Enk *et al.*, 2008; Siqueira *et al.*, 2011) ou em pacientes com leve e moderada infecção (Utzinger *et al.*, 2000), há um aumento da prevalência quando comparado à avaliação de uma única amostra fecal, a qual tenha originado uma única lâmina.

Outros fatores também podem estar associados com essa homogeneidade da prevalência, como, histórico de exposição ao *S. mansoni*, taxa de resistência adquirida que depende do estado imunológico do indivíduo e tratamentos anti-helmínticos. Estudos recentes revelam que as áreas endêmicas de esquistossomose localizadas principalmente em Minas Gerais e Bahia, onde originalmente encontrava-se alta prevalência de infecção e indivíduos infectados com alta carga parasitária sofreram grandes modificações no perfil de transmissão da infecção devido às sucessivas intervenções terapêuticas (Rabello *et al.*, 2008; Guimarães *et al.*, 2010; Scholte *et al.*, 2012). Como os indivíduos tratados não são protegidos contra reinfecções e o fármaco não afeta a viabilidade dos ovos e as formas imaturas do parasito, grande parte dos residentes em áreas endêmicas submetidas ao controle quimioterápico apresenta baixa carga parasitária e são dificilmente diagnosticados por exame parasitológico de fezes.

Para identificação de pacientes alérgicos na população do distrito de Brejo do Amparo, foi primeiramente aplicado o questionário ISAAC, específico para identificação de pacientes alérgicos através da sintomatologia clínica em três módulos: asma, rinite e eczema; sendo adicionado também um módulo para identificar pacientes já diagnosticados com alergia para alimentos ou medicamentos.

Nessa população a sintomatologia mais prevalente foi para Rinite (58,5%), seguida de Asma (16,5%), sendo que dentre estes, 28 (12,2%) declararam ter sintomatologia associada com ambas as doenças alérgicas, alegando maior intensidade em meses frios ou secos. Apenas 13,9% dos entrevistados declararam sintomas de Eczema, não sendo observada sintomatologia evidente no momento da aplicação do questionário. As mulheres declaram mais sintomas para as três doenças, entretanto, somente para rinite esta diferença foi

estatisticamente significativa. Leung et al., (1997) também apresentaram resultados semelhantes em um estudo com 400 escolares de Hong Kong, assim como Pearce et al., (1993) observou uma menor sintomatologia do sexo masculino em relação ao feminino em um estudo comparativo com adolescentes de quatro países: Austrália, Inglaterra, Alemanha e Nova Zelândia. No entanto, Alcantâra-Neves et al., (2010) observou uma maior prevalência de sintomas de Asma no sexo masculino em escolares de Salvador, na Bahia. Essas diferenças têm sido atribuídas a questões hormonais pelos autores, visto que trabalharam com escolares na adolescência, fase na qual ocorrem grandes alterações hormonais. Em nosso trabalho pode-se observar que a prevalência elevada de Rinite em mulheres se manteve semelhante ao longo de todas as faixas etárias, então provavelmente essa diferença pode estar relacionada a fatores de exposição ambiental. Essa questão foi reforçada por Sears et al., (1993) afirmando que o papel patogênico do ambiente deve ser objetivamente estudado e fatores individuais cuidadosamente avaliados para fornecer informações sobre essas variações. Outra hipótese de acordo com Leung et al., (1997) poderia ser que os meninos tendem a subestimar a sintomatologia, enquanto as meninas tendem a superestimar a gravidade da sua doença.

As alergias investigadas pelo questionário ISAAC não apresentaram associação com carga parasitária ou IgE total, entretanto pacientes declarados asmáticos apresentaram associação com a eosinofilia ( $p= 0,0098$ ), dado que corrobora com o trabalho de Medeiros et al., 2006 com pacientes alérgicos em Pernambuco.

Os 47 (23,8%) pacientes que apresentaram reatividade de IgE a alérgenos da poeira ( $>0,35\text{UI/ml}$ ) foram considerados atópicos. A atopia se apresentou distribuída de forma semelhante na população e não teve relação com a Asma identificada pelo ISAAC, porém se mostrou positivamente associada com a Rinite ( $p= 0,002713$ ). Esse dado já era esperado visto que a Rinite se constitui de uma reação alérgica da mucosa nasal a determinados alérgenos, principalmente inalatórios (Asher et al., 1995). A falta de associação entre Asma e atopia detectado no presente estudo corrobora estudos anteriores baseado em dados obtidos de países desenvolvidos, que mostram prevalência elevada de sintomas de Asma na primeira infância; entretanto, neste caso a sintomatologia não estava relacionada com a Asma alérgica, sendo que esta condição principalmente associada com a infecção por vírus do sistema respiratório (Wright, 2002; Heymann et al., 2004).

Neste estudo, os indivíduos atópicos tiveram menor prevalência de infecção por *S. mansoni* e os infectados atópicos tiveram menor carga parasitária que os não atópicos, assim como a intensidade da atopia também se mostrou mais elevada ( $p= 0,0240$ ) em pacientes não infectados ou com baixa carga parasitária. Esses dados estão de acordo com o trabalho de

Oliveira et al., (2014) também realizado em uma área endêmica para esquistossomose, localizada no Ceará caracterizada por apresentar baixa intensidade de carga parasitária, sugerindo que o *S. mansoni* é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro e reduzir as alergias mesmo nessas áreas.

Além disso, os pacientes infectados por *S. mansoni* exibiram níveis um pouco mais elevados de eosinofilia apresentando uma mediana de 405 contra 318 dos pacientes parasitologicamente negativos. Apesar de não ter sido significativamente associada com a prevalência, a eosinofilia mostrou estar fortemente associada tanto com a intensidade de carga (opg) quanto em pacientes asmáticos. Contudo, é importante lembrar que esses dados são de eosinofilia periférica o que não exclui a possibilidade de inflamação eosinofílica tecidual (Jacoby et al., 2001; Alan & Busse, 2004). Além disso, os eosinófilos podem se apresentar em número normal no sangue periférico, mas estarem ativados e repletos de grânulos ativos com proteína básica principal, com proteína catiônica eosinofílica e outros mediadores (Martin et al., 1996; Alan & Busse, 2004). Também deve se considerar para a contagem normal de eosinófilos séricos em pacientes alérgicos que o processo inflamatório esteja brando, sem repercussão em nível periférico, o que pode ser decorrente do uso de medicação para controle do quadro alérgico ou ainda de uma regulação, para baixo, do número de eosinófilos na circulação, fato habitual na fase crônica das parasitoses intestinais (Klion & Nutman, 2004). Após a fase migratória de larvas de parasitas intestinais, há uma marcada redução de eotaxina, que é fundamental para a quimiotaxia e eosinofilia nesses pacientes (Lima et al., 2002).

Alcântara-Neves et al. (2014) também mostraram associações fortes e positivas entre infecções por helmintos (*A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *Toxocara* spp) com eosinofilia e IgE total, e uma associação inversa entre infecções por helmintos e a reatividade alérgica. Os autores sugeriram que infecções múltiplas por helmintos são mais eficientes na indução de uma rede reguladora propiciada pelo aumento na produção de IL-10, que pode desempenhar um papel na supressão de respostas alérgicas, como as reações de hipersensibilidade imediata na pele. Resultado semelhante foi observado por Figueiredo et al. (2010) em crianças da periferia de Salvador, Bahia, com infecções crônicas para *A. lumbricoides* e *T. trichiura* que mostraram um aumento da produção espontânea de citocinas com perfil regulatório. De acordo com os autores, esse fenótipo induzido de resposta imune regulada por helmintos pode contribuir para o desenvolvimento de um fenótipo anti-inflamatório que é capaz de mediar a modulação de alergias.

Níveis elevados de IgE total e eosinofilia estão associados não apenas com helmintíases, mas também com doenças alérgicas (Schneider et al., 2002; Arruda e Santos,

2005). Na população de Brejo do Amparo a produção do IgE total se mostrou elevada de forma semelhante entre as faixas etárias e também nos grupos infectados ou não infectados com *S. mansoni*. Porém mostrou associação positiva com a intensidade da carga parasitária ( $p= 0,0087$ ), com a eosinofilia ( $p= 0,0001$ ) e também se apresentou significativamente mais elevada em indivíduos com atopia ( $p= 0,0077$ ) em relação aos não atópicos. Com esses dados é possível observar que a população de Brejo do Amparo possui níveis homogêneos de IgE total distribuídos de forma semelhante entre os moradores. De acordo com Daher et al., (2009) no Brasil com regularidade são detectados níveis elevados de IgE total em indivíduos não infectados. Isto provavelmente reflete o grau de exposição pessoal aos parasitos. Helmintos, incluindo *S. mansoni*, podem estimular uma forte amplificação de anticorpos IgE policlonais não específicos. Alguns pesquisadores têm argumentado que a natureza policlonal deste anticorpo pode resultar no bloqueio de hipersensibilidade alérgica por supressão na produção de IgE específica ou saturando receptores de IgE em mastócitos e basófilos e, assim, impedindo a ativação celular e liberação de mediadores por antígeno, assim esses parasitas encontram-se associados a altos níveis circulantes de IgE total. (Hagel et al., 1993; Heymann et al., 2004). Esses resultados corroboram com a hipótese de que helmintoses sejam capazes prevenir a atopia ou reduzir o seu grau (Sales et al., 2002; Cooper et al., 2003). De acordo com Cooper et al., (2000) indivíduos atópicos que se encontram infectados apresentam incremento dos sintomas alérgicos logo após o tratamento com anti-helmínticos. Desta forma, a infecção parasitária crônica, particularmente em fase precoce da vida, podem modular a resposta imune e reduzir a inflamação alérgica e seus efeitos fisiopatológicos.

A produção sérica de IL-10 também foi avaliada na população de Brejo do Amparo, sendo observada em baixos níveis, visto que apenas 28 (14,0%) dos pacientes foram reativos na quantificação desta citocina, na qual mediana da população foi 33,8 pg/ml com percentil entre 15,6 e 229,0 pg/ml. Levando em consideração o perfil parasitológico da população que apresenta alta prevalência para esquistossomose (54,4%), mas com baixa carga parasitária (mediana= 4), histórico de tratamento anti-helmíntico prévio e frequente reinfecção, é possível que a indução da resposta imune pelo parasito, incluindo a produção de IL-10, seja baixa e restrita ao tecido. De acordo com Correale & Farez (2011) pacientes cronicamente infectados induzem a produção de citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , e a produção dessas citocinas pode diminuir após o tratamento anti-helmíntico.

Segundo Conceição et al., (2008) a maioria dos pacientes de áreas endêmicas são assintomáticos e apresentam um perfil Th2, enquanto que a intensidade da infecção é capaz de favorecer a produção da IL-10. Na população do distrito de Brejo do Amparo a IL-10 não

mostrou associação significativa com a prevalência da infecção por *S. mansoni* e nem com a quantidade de ovos por grama opg, porém é preciso ressaltar que a maioria dos indivíduos infectados apresenta baixíssima carga parasitária. Apesar disso, a IL-10 apresentou um aumento significativo ( $p= 0,0110$ ) em indivíduos categorizados como não atópicos quando comparados aos atópicos, porém quando foi realizada a regressão logística essa diferença não foi significativa. É preciso ressaltar que nesse estudo a quantificação da citocina IL-10 pode ter sido subestimada visto que foi realizada através de amostras sorológicas que em geral contém poucas citocinas de perfil regulatório circulantes, já que estas são recrutadas para os sítios de infecção durante o processo inflamatório, onde são encontradas em maiores quantidades. Fato que pode justificar a maior concentração de IL-10 em pacientes negativos ou com baixa carga parasitária observada neste estudo, no qual há ausência ou pouca reação inflamatória, mantendo o nível basal dessas citocinas na circulação sistêmica.

No modelo final de análise multivariada foram incluídas todas as variáveis sociais, clínicas, parasitológicas ou demográficas que mostraram tiveram associação ( $p<0,25$ ) com a atopia e asma. Esse modelo revelou que a intensidade de carga parasitária em indivíduos infectados por *S. mansoni* foi inversamente associada com os níveis séricos de IgE específico para alérgenos de poeira. O indivíduo com carga maior que 12 ovos por grama de fezes apresentou menores chances de desenvolver atopia, enquanto que em pacientes com carga abaixo de 12 opg tiveram comportamento semelhante ao de pacientes negativos. Essa associação se manteve consistente mesmo após o ajuste para fatores de confusão na análise de regressão logística múltipla. Este dados corroboram com o trabalho de Smits et al., (2007) no qual foi verificado que a carga parasitária desempenha um importante papel na relação entre a infecção pelo parasita e a resposta imune do hospedeiro. Oliveira et al., 2014 no Ceará e Alcântara-Neves et al., (2014) em crianças de programas sociais da América do Sul, mostraram que indivíduos com baixa carga conseguem modular doenças alérgicas. Nossos dados mostram que a grande maioria dos pacientes com carga parasitária entre 2 e 12 opg não afetam doenças alérgicas, fato este que só ocorreu em pacientes com carga superior a 12 opg.

Para a Asma a intensidade de carga também apresentou uma forte associação com carga parasitária ( $p= 0,038$ ), porém diferente do observado para a atopia, essa associação foi positiva, ou seja, pacientes com carga parasitária acima de 12 ovos por grama de fezes tem aproximadamente 3 vezes mais chances de desenvolver tal doença. Resultados semelhantes foram observados por Alcântara-Neves et al., 2010, no qual foram observadas associações positivas entre a helmintíases causadas por *A. lumbricoides* e *T. trichiura* em pacientes de Salvador na Bahia que apresentaram sintomatologias evidentes para Asma de acordo com o

questionário ISAAC. Hagel et al., (2007) também observaram hiperreatividade brônquica associada significativamente com IgE específico para anticorpos anti-*A. lumbricoides* em crianças de uma área rural na Venezuela, e Pereira et al., (2007) também mostraram que a infecção com alta carga parasitária de *A. lumbricoides* foi um fator de risco para a asma declarada no questionário ISAAC em escolares de Uruguaiana no extremo sul do Brasil.

Tendo em vista que crianças com idade até 10 anos também foram associadas positivamente ( $p= 0,000$ ) com a Asma, tendo aproximadamente 7 vezes mais chances de desenvolver a doença do que indivíduos da faixa etária de referência (21 a 40 anos), e que a Asma não foi associada com a atopia e nem com a prevalência da infecção com *S. mansoni*, é possível concluir que esta doença não está ligada a alergia na primeira infância e sim com infecções virais como também descrito por (Heymann et al., 2004).

A eosinofilia e a concentração serica de IgE total não permaneceram no modelo final apesar de se mostrarem associados com a infecção por *S. mansoni* e as alergias investigadas no modelo univariado visto que essas variáveis apresentaram níveis muito semelhantes na população, sendo classificadas como variáveis de confusão.

Em resumo, o presente estudo demonstrou que trabalhar com uma população de baixa carga parasitária como observada no distrito de Brejo do Amparo foi de grande relevância para o estudo, visto que representa a realidade que hoje é encontrada na maioria das áreas de transmissão de esquistossomose no Brasil. Assim, apesar das limitações encontradas nesse tipo de estudo populacional como a subjetividade das respostas no questionário ISAAC e a dificuldade nas coletas das amostras de todos os pacientes, a população de Brejo do Amparo foi apropriada para avaliar o papel do *S. mansoni* na modulação de doenças alérgicas.

Também foi possível demonstrar que a intensidade da carga parasitária é um dos elementos importantes associados à modulação da resposta imune no hospedeiro cronicamente infectado, confirmando as sugestões oferecidas por outros estudos epidemiológicos (Conceição et al., 2008). Nossos dados confirmam que infecções por *S. mansoni* modula respostas inflamatórias no homem e foi associada com uma redução na prevalência e intensidade da reatividade a alérgenos da poeira entre os residentes da comunidade rural de Brejo do Amparo. Entretanto, nossos dados também demonstram claramente que cargas parasitárias muito baixas ( $< 12$  ovos/g/fezes) não estimulam mecanismos modulatórios e não afetam a prevalência ou intensidade de respostas alérgicas. Outro dado importante do presente trabalho foi identificar que sintomas associados a Asma, identificados pelo questionário ISAAC especialmente em crianças, não necessariamente representam doenças alérgicas. Pesquisas adicionais em estudos prospectivos de observação e

intervenção são necessárias para abordar a questão da causalidade e as discrepâncias e inconsistências encontradas nos estudos populacionais. Uma compreensão dos mecanismos pelos quais os parasitas de helmintos modulam a resposta inflamatória alérgica do hospedeiro pode levar ao desenvolvimento de intervenções anti-inflamatórias. Esses estudos podem impulsionar e direcionar programas de tratamento anti-helmíntico em populações.

## 8. CONCLUSÃO

- A população residente no distrito de Brejo do Amparo em Januária, Minas Gerais, possui precárias condições sanitárias, pouca escolaridade e alto nível de desemprego, fatores que podem estar intimamente ligados a alta prevalência (72,3%) de infecção por *S. mansoni* e por enteroparasitas encontradas nos moradores, dentre eles Ancilostomídeos (8,9%), *E. vermicularis* (2,3%); *G. lamblia* (1,1%). Essa população se encontra constantemente exposta a fatores de risco para essas infecções visto que não há tratamento de água ou rede de esgoto ligada a rede pública e grande parte das residências não possuem privadas. A intensidade da infecção por *S. mansoni* nesta comunidade rural foi baixa com mediana de 4 opg. Dessa forma, o distrito rural de Brejo do Amparo é uma área endêmica com alta prevalência de esquistossomose, mas com indivíduos apresentam baixa carga parasitária.

- Entre os moradores de Brejo de Amparo que participaram do estudo, (47) 23,8% apresentaram reatividade para alérgenos de poeira, que foi semelhante entre os gêneros e as faixas etárias. O questionário ISAAC identificou 38 (17%) indivíduos com sintomas declarados e frequentes de Asma, 134 (59%) com Rinite e 32 (14%) com Eczema.

- A população também revelou elevada concentração sérica de IgE total e elevado número de eosinófilos na circulação, mas sem diferença entre os indivíduos infectados ou não infectados ou entre os alérgicos e não alérgicos. Não foi possível detectar a concentração de IL-10 no soro da maioria dos indivíduos do presente estudo, devido aos baixos níveis detectados desta citocina, que não apresentou relação com a prevalência e infecção por *S. mansoni*.

- No modelo final de análise multivariada demonstrou que todos os fatores que apresentaram alguma associação foram relacionados com atopia e Asma. Dentre estes fatores a intensidade de carga foi a variável que se mostrou inversamente associada com atopia na população do estudo. Ao contrario do detectado para atopia, indivíduos com sintoma de Asma foram positivamente associados com a intensidade da infecção por *S. mansoni*, ou seja, pacientes com mais de 12 ovos por gramas de fezes tem menores chances de desenvolver atopias e maiores chances de desenvolver sintomas da Asma.

## 9. REFERÊNCIAS

- Abath, F. G., Morais, C. N., Montenegro, C. E. L., Wynn, T. A., & Montenegro, S. M. (2006). Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies?. *Trends in parasitology*, **22**(2), 85-91.
- Akdis, C. A., Blesken, T., Akdis, M., Wüthrich, B., & Blaser, K. (1998). Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*, **102**(1), 98.
- Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., ... & Kegel, C. (2004). Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *The Journal of experimental medicine*, **199**(11), 1567-1575.
- Alam, R. & Busse, W. W. (2004) The eosinophil--quo vadis? *Journal of allergy and clinical immunology*, **113**, 38.
- Alcântara-Neves, N. M., Badaró, S. J., dos Santos, M. C., Pontes-de-Carvalho, L. & Barreto, M. L. (2010) The presence of serum anti-*Ascaris lumbricoides* IgE antibodies and of *Trichuris trichiura* infection are risk factors for wheezing and/or atopy in preschool-aged Brazilian children. *Respiratory research*, **11**, 1.
- Alcântara-Neves, N. M., de SG Britto, G., Veiga, R. V., Figueiredo, C. A., Fiaccone, R. L., da Conceição, J. S., ... & Barreto, M. L. (2014). Effects of helminth co-infections on atopy, asthma and cytokine production in children living in a poor urban area in Latin America. *BMC research notes*, **7**(1), 1.
- Amaral, R. and M. Porto (1994). "Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **27**(supl III): 73-90.
- Andrade, Z. A. (2008). "Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression." *Acta Tropica* **108**(2): 79-82.
- Andrade, Z. A. and A. Prata (1963). "Asymptomatic Schistosomiasis studied by Needle Biopsy of the Liver." *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **12**(6): 854-858.
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Stadecker, M. J., & Gause, W. C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, **7**(12), 975-987.
- Araujo, M. I., Lopes, A. O. N. A., Medeiros, M., Cruz, Á. A., Sousa-Atta, L., Solé, D., & Carvalho, E. M. (2000). Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *International archives of allergy and immunology*, **123**(2), 145-148.
- Arruda, L. K. & Santos, A. B. R. (2005) Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, **5**, 399-402.

- Asher, M. I., Keil, U., Anderson, H. R., Beasley, R., Crane, J., Martinez, F., ... & Stewart, A. W. (1995). International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *European respiratory journal*, **8**(3), 483-491.
- Assis, E. M. d., Oliveira, R. C. d., Moreira, L. E., Pena, J. L., Rodrigues, L. C. & Coelho, G. L. L. M. (2013) Prevalência de parasitos intestinais na comunidade indígena Maxakali, Minas Gerais, Brasil, 2009.
- Attallah, A. M., Ghanem, G. E., Ismail, H. & El Waseef, A. M. (2003) Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **68**, 647-651.
- Ball, T. M., Castro-Rodriguez, J. A., Griffith, K. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D., & Wright, A. L. (2000). Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *New England journal of medicine*, **343**(8), 538-543.
- Barbosa, C., T. Favre, Amaral, R. S., & Pieri, O. S. (2008). "Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni." *Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Fiocruz: 965-1008.
- Baumgart, M., Tompkins, F., Leng, J., & Hesse, M. (2006). Naturally occurring CD4+ Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *The journal of immunology*, **176**(9), 5374-5387.
- Bilharz, T. (1852). "Fernere Beobachtungun Uber Das Pfortader Des Menschen Bewohnende Distomum Haematobium Und Sein Verhältniss Zu Gewissen Pathologischen Bildungen Aus Brieflichen Mitheilungen an Professor v. Sielbold vom 29 Marz 1852." *Zeitschrift fur Wissenschaftliche Zoologie Leipzig* **4**: 72-76.
- Bina, J. C. and A. Prata (2003). "Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I- Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves." *Rev Soc Bras Med Trop* **36**(2): 211-216.
- Braun-Fahrlander, C. and R. Lauener (2003). "Farming and protective agents against allergy and asthma." *Clinical & Experimental Allergy* **33**(4): 409-411.
- Butterworth, A. E., Capron, M., Cordingley, J. S., Dalton, P. R., Dunne, D. W., Kariuki, H. C., ... & Prentice, M. A. (1985). Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**(3), 393-408.
- Celedón, J. C., Soto-Quiros, M. E., Silverman, E. K., Hanson, L. A., & Weiss, S. T. (2001). Risk factors for childhood asthma in Costa Rica. *CHEST Journal*, **120**(3), 785-790.
- Cheever, A. W., Hoffmann, K. F., & Wynn, T. A. (2000). Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunology Today*, **21**(9), 465-466.
- Chen, F., Liu, Z., Wu, W., Rozo, C., Bowdridge, S., Millman, A., ... & Gause, W. C. (2012). An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nature medicine*, **18**(2), 260-266.

- Chuah, C., Jones, M. K., Burke, M. L., McManus, D. P., & Gobert, G. N. (2014). Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in parasitology*, **30**(3), 141-150.
- Coelho, P. and F. Barbosa (1995). "Relação molusco/parasita: resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*." *Tópicos em Malacologia Médica*.
- Coelho, P. M. Z., Jurberg, A. D., Oliveira, Á. A., & Katz, N. (2009). Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **104**(5), 720-723.
- Colley, D. G., Bustinduy, A. L., Secor, W. E., & King, C. H. (2014). Human schistosomiasis. *The Lancet*, **383**(9936), 2253-2264.
- Conceição, M. J. & Coura, J. (1978) Morbidade da esquistossomose mansoni em uma comunidade rural de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **12**, 87-103.
- Conceição, M. J., Lenzi, H. L. & Coura, J. R. (2008) Human study and experimental behavior of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with different clinical forms of schistosomiasis. *Acta tropica*, **108**, 98-103.
- Cooper, P. J., Chico, M. E., Rodrigues, L. C., Ordonez, M., Strachan, D., Griffin, G. E. (2003) Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **111**, 995-1000.
- Cooper, P. J., Chico, M. E., Sandoval, C., Espinel, I., Guevara, A., Kennedy, M. W., (2000) Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. *Journal of Infectious Diseases*, **182**, 1207-1213.
- Cooper, P. J., Rodrigues, L. C., Cruz, A. A., & Barreto, M. L. (2009). Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. *Allergy*, **64**(1), 5-17.
- Cooper, P. J., Barreto, M. L., & Rodrigues, L. C. (2006). Human allergy and geohelminth infections: a review of the literature and a proposed conceptual model to guide the investigation of possible causal associations. *British medical bulletin*, **79**(1), 203-218.
- Correale, J. & Farez, M. F. (2011) The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, **233**, 6-11.
- Correa-Oliveira, R., Malaquias, L. C. C., Falcao, P. L., Viana, I. R. C., Bahia-Oliveira, L. M. G., Silveira, A. M. S., ... & Cunha-Melo, J. R. (1998). Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Brazilian journal of medical and biological research*, **31**(1), 171-177.
- Coura, J. and R. Amaral (2004). "Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**: 13-19.
- Coura, J. R., Camillo-Coura, L., Kalache, A., & Argendo, C. A. (1970). Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro: Estudo de 22 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **4**(6), 387-397.

- Coura-Filho, P., Farah, M. W. C., Rezende, D. F. d., Lamartine, S. d. S., Carvalho, O. S. & Katz, N. (1995) Determinantes ambientais e sociais da esquistossomose mansoni em Ravena, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública*, **11**, 254-265.
- Croft, A. M., Bager, P., & Garg, S. K. (2012). Helminth therapy (worms) for allergic rhinitis. *The Cochrane Library*.
- Daher, S., Galvão, C., Abe, A. & Cocco, R. (2009) Diagnóstico em doenças alérgicas mediadas por IgE. *Rev Bras Alerg Immunopatol*, **32**, 3-8.
- de Jesus, A. R., Silva, A., Santana, L. B., Magalhaes, A., de Jesus, A. A., de Almeida, R. P., ... & Carvalho, E. M. (2002). Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases*, **185**(1), 98-105.
- De Vlas, S. & Gryseels, B. (1992) Underestimation of *Schistosoma mansoni* prevalences. *Parasitology Today*, **8**, 274-277.
- Dessein, A. J., Marquet, S., Henri, S., El Wali, N. E. M., Hillaire, D., Rodrigues, V., ... & Magzoub, M. M. (1999). Infection and disease in human schistosomiasis mansoni are under distinct major gene control. *Microbes and Infection*, **1**(7), 561-567.
- Doetze, A., Satoguina, J., Burchard, G., Rau, T., Löliger, C., Fleischer, B., & Hoerauf, A. (2000). Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by Th3/Tr1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor- $\beta$  but not by a Th1 to Th2 shift. *International Immunology*, **12**(5), 623-630.
- Dold, S., Heinrich, J., Wichmann, H. E., & Wjst, M. (1998). Ascaris-specific IgE and allergic sensitization in a cohort of school children in the former East Germany. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **102**(3), 414-420.
- dos Santos Carvalho, O., Jannotti-Passos, L. K., & Caldeira, R. L. (2008). Importância Epidemiológica e Biologia Molecular Aplicada ao Estudo dos Moluscos do Gênero Biomphalaria. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*, 309.
- Drummond, S. C., Silva, L. C. D. S., Amaral, R. S. D., Sousa-Pereira, S. R., Antunes, C. M., & Lambertucci, J. R. (2006). Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**, 37-44.
- Dunne, D. W. and A. Cooke (2005). "A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease." *Nature Reviews Immunology* **5**(5): 420-426.
- Dunne, D. W. and E. J. Pearce (1999). "Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective." *Microbes and infection* **1**(7): 553-560.
- Elliott, A. M., Mpairwe, H., Quigley, M. A., Nampijja, M., Muhangi, L., Oweka-Onyee, J., ... & Whitworth, J. A. (2005). Helminth infection during pregnancy and development of infantile eczema. *Jama*, **294**(16), 2028-2034.
- Enk, M. J., e Silva, G. O., & Rodrigues, N. B. (2012). Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area. *PloS one*, **7**(6), e38947.

- Enk, M. J., Lima, A. C. L., Barros, H. d. S., Massara, C. L., Coelho, P. M. Z. & Schall, V. T. (2010) Factors related to transmission of and infection with *Schistosoma mansoni* in a village in the South-eastern Region of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **105**, 570-577.
- Everts, B., Perona-Wright, G., Smits, H. H., Hokke, C. H., van der Ham, A. J., Fitzsimmons, C. M., ... & Mohrs, M. (2009). Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *The Journal of experimental medicine*, **206**(8), 1673-1680.
- Fairfax, K., Nascimento, M., Huang, S. C. C., Everts, B., & Pearce, E. J. (2012, November). Th2 responses in schistosomiasis. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 34, No. 6, pp. 863-871). Springer-Verlag.
- Fallon, P. G. and N. E. Mangan (2007). "Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection." *Nature Reviews Immunology* **7**(3): 220-230.
- Fenwick, A., Webster, J. P., Bosque-Oliva, E., Blair, L., Fleming, F. M., Zhang, Y., ... & Kabatereine, N. B. (2009). The Schistosomiasis Control Initiative (SCI): rationale, development and implementation from 2002–2008. *Parasitology*, **136**(13), 1719-1730.
- Ferreira, M. U., Rubinsky-Elefant, G., de Castro, T. G., Hoffmann, É. H. E., da Silva-Nunes, M., Cardoso, M. A., & Muniz, P. T. (2007). Bottle feeding and exposure to *Toxocara* as risk factors for wheezing illness among under-five Amazonian children: a population-based cross-sectional study. *Journal of tropical pediatrics*, **53**(2), 119-124.
- Figueiredo, C. A., Barreto, M. L., Rodrigues, L. C., Cooper, P. J., Silva, N. B., Amorim, L. D., (2010) Chronic intestinal helminth infections are associated with immune hyporesponsiveness and induction of a regulatory network. *Infection and immunity*, **78**, 3160-3167.
- Fisher, A. (1934). "A study of the schistosomiasis of the Stanleyville district of the Belgian Congo." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **28**(3): 277IN1283-1282IN2306.
- Flohr, C., Tuyen, L. N., Lewis, S., Quinnell, R., Minh, T. T., Liem, H. T., ... & Williams, H. (2006). Poor sanitation and helminth infection protect against skin sensitization in Vietnamese children: a cross-sectional study. *Journal of allergy and clinical immunology*, **118**(6), 1305-1311.
- Flohr, T., Schrauder, A., Cazzaniga, G., Panzer-Grümayer, R., van der Velden, V., Fischer, S., ... & Sutton, R. (2008). Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, **22**(4), 771-782.
- Gale, E. (2002). "A missing link in the hygiene hypothesis?" *Diabetologia* **45**(4): 588-594.
- Garn, H. and H. Renz (2007). "Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis." *Immunobiology* **212**(6): 441-452.
- Gause, W. C., Wynn, T. A., & Allen, J. E. (2013). Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nature Reviews Immunology*, **13**(8), 607-614.

- Gazzinelli, A., Velasquez-Melendez, G., Crawford, S. B., LoVerde, P. T., Correa-Oliveira, R. & Kloos, H. (2006) Socioeconomic determinants of schistosomiasis in a poor rural area in Brazil. *Acta tropica*, **99**, 260-271.
- Gonçalves, A. L. R., Belizário, T. L., Pimentel, J. d. B., Penatti, M. P. A. & Pedroso, R. d. S. (2011) Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **44**, 191-193.
- Gonzalez-Quintela, A., Gude, F., Campos, J., Garea, M. T., Romero, P. A., Rey, J., ... & Vidal, C. (2006). Toxocara infection seroprevalence and its relationship with atopic features in a general adult population. *International archives of allergy and immunology*, **139**(4), 317-324.
- Greenwood, B. (1968). "Autoimmune disease and parasitic infections in Nigerians." *The Lancet* **292**(7564): 380-382.
- Greenwood, B. M., Herrick, E. M., & Voller, A. (1970). Suppression of autoimmune disease in NZB and (NZB× NZW) F1 hybrid mice by infection with malaria.
- Greer, G. J., Ow-Yang, C. K., & Yong, H. S. (1988). *Schistosoma malayensis* n. sp.: a *Schistosoma japonicum*-complex schistosome from Peninsular Malaysia. *The Journal of parasitology*, 471-480.
- Gryseels, B. (2012). "Schistosomiasis." *Infectious Disease Clinics of North America* **26**(2): 383-397.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., & Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *The Lancet*, **368**(9541), 1106-1118.
- Grzych, J. M., Pearce, E. D. W. A. R. D., Cheever, A., Caulada, Z. A., Caspar, P. A. T. R. I. C. I. A., Heiny, S. A. R. A., ... & Sher, A. L. A. N. (1991). Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*, **146**(4), 1322-1327.
- Guimarães, R. J., Freitas, C. C., Dutra, L. V., Scholte, R. G., Amaral, R. S., Drummond, S. C., ... & Carvalho, O. S. (2010). Evaluation of a linear spectral mixture model and vegetation indices (NDVI and EVI) in a study of schistosomiasis mansoni and Biomphalaria glabrata distribution in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **105**(4), 512-518.
- Hagel, I., Cabrera, M., Hurtado, M. A., Sanchez, P., Puccio, F., Di Prisco, M. C., & Palenque, M. (2007). Infection by Ascaris lumbricoides and bronchial hyper reactivity: an outstanding association in Venezuelan school children from endemic areas. *Acta tropica*, **103**(3), 231-241.
- Hagel, I., Lynch, N., Pérez, M., Prisco, M., López, R. & Rojas, E. (1993) Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. *Parasite immunology*, **15**, 311-315.
- Hawrylowicz, C. and A. O'garra (2005). "Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma." *Nature Reviews Immunology* **5**(4): 271-283.

- Heinrich, J., Popescu, M. A., Wjst, M., Goldstein, I. F., & Wichmann, H. E. (1998). Atopy in children and parental social class. *American Journal of Public Health*, **88**(9), 1319-1324.
- Hesse, M., Piccirillo, C. A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., ... & Wynn, T. A. (2004). The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, **172**(5), 3157-3166.
- Heymann, P. W., Carper, H. T., Murphy, D. D., Platts-Mills, T. A., Patrie, J., McLaughlin, A. P., (2004) Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **114**, 239-247.
- Hiatt, R. A., Ottesen, E. A., Sotomayor, Z. R., & Lawley, T. J. (1980). Serial observations of circulating immune complexes in patients with acute schistosomiasis. *Journal of Infectious Diseases*, **142**(5), 665-670.
- Hiatt, R. A., Sotomayor, Z. R., Sanchez, G., Zambrana, M., & Knight, W. B. (1979). Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases*, **139**(6), 659-666.
- Hijazi, N., Abalkhail, B., & Seaton, A. (2000). Diet and childhood asthma in a society in transition: a study in urban and rural Saudi Arabia. *Thorax*, **55**(9), 775-779.
- Hoffman, W. A., Pons, J. A., & Janer, J. L. (1934). The Sedimentation-Concentration Method In Schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine*, **9**(3), 283-291.
- Hoffmann, K. F., Cheever, A. W., & Wynn, T. A. (2000). IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *The Journal of Immunology*, **164**(12), 6406-6416.
- Holland, C., Asaolu, S., Crompton, D., Whitehead, R. & Coombs, I. (1996) Targeted anthelmintic treatment of school children: effect of frequency of application on the intensity of *Ascaris lumbricoides* infection in children from rural Nigerian villages. *Parasitology*, **113**, 87-95.
- Holt, P. G., Macaubas, C., Stumbles, P. A., & Sly, P. D. (1999). The role of allergy in the development of asthma. *Nature*, **402**, 12-17.
- Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., & Periago, M. R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**(9), e300.
- Hunninghake, G. M., M. E. Soto-Quiros (2007). "Sensitization to *Ascaris lumbricoides* and severity of childhood asthma in Costa Rica." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **119**(3): 654-661.
- Jackson, J. A., I. M. Friberg (2009). "Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies?" *Immunology* **126**(1): 18-27.

- Jacoby, D. B., Costello, R. M. & Fryer, A. D. (2001) Eosinophil recruitment to the airway nerves. *Journal of allergy and clinical immunology*, **107**, 211-218.
- Kabat, A. M., Pott, J., & Maloy, K. J. (2016). The Mucosal Immune System and Its Regulation by Autophagy. *Frontiers in Immunology*, **7**.
- Kabat, A. M., Srinivasan, N., & Maloy, K. J. (2014). Modulation of immune development and function by intestinal microbiota. *Trends in immunology*, **35**(11), 507-517.
- Kabatereine, N. B., E. Tukahebwa,(2006). "Progress towards countrywide control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in Uganda." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **100**(3): 208-215.
- Karadag, B., Ege, M., Bradley, J. E., Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Nowak, D., & Von Mutius, E. (2006). The role of parasitic infections in atopic diseases in rural schoolchildren. *Allergy*, **61**(8), 996-1001.
- Kato, K. and M. Miura (1954). "Comparative examinations." *Japanese Journal of Parasitology* **3**(5).
- Katsurada, F. (1904). "Schistosoma japonicum, a new parasite of man, by which an endemic disease in various areas of Japan is caused." *Annotationes Zoologicae Japonenses* **5**: 146-160.
- Katz, N. & Almeida, K. (2003) Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, **55**, 38-43.
- Katz, N., CHAVES, A., & Pellegrino, J. (1972). A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **14**(6), 397-400.
- Khan, A. R. and P. G. Fallon (2013). "Helminth therapies: translating the unknown unknowns to known knowns." *International Journal for Parasitology* **43**(3): 293-299.
- Kim, J. M., Rasmussen, J. P., & Rudensky, A. Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nature immunology*, **8**(2), 191-197.
- King, C. H. & Bertsch, D. (2013) Meta-analysis of urine heme dipstick diagnosis of Schistosoma haematobium infection, including low-prevalence and previously-treated populations. *PLoS Negl Trop Dis*, **7**, e2431.
- King, C. H. (2001). "Epidemiology of schistosomiasis: determinants of transmission of infection." *Schistosomiasis. Imperial College Press, London, United Kingdom*: 115-132.
- Klion, A. D. & Nutman, T. B. (2004) The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **113**, 30-37.
- Krämer, U., Heinrich, J., Wjst, M., & Wichmann, H. E. (1999). Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *The Lancet*, **353**(9151), 450-454.
- Lambertucci, J. R., R. S. Rocha (1987). "A esquistossomose mansoni em Minas Gerais." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **20**(1): 47-52.

- Layland, L. E., Rad, R., Wagner, H., & Da Costa, C. U. P. (2007). Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2. *European journal of immunology*, **37**(8), 2174-2184.
- Leonardi-Bee, J., Pritchard, D., & Britton, J. (2006). Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **174**(5), 514-523.
- Li, M. O. and Flavell, R. A. (2008). TGF- $\beta$ : a master of all T cell trades. *Cell*, **134**(3), 392-404.
- Lima, C., Perini, A., Garcia, M., Martins, M., Teixeira, M. & Macedo, M. (2002) Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, **32**, 1659-1666.
- Lynch, N. R., Hagel, I., Perez, M., Di Prisco, M. C., Lopez, R., & Alvarez, N. (1993). Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **92**(3), 404-411.
- Lynch, S. V. and H. A. Boushey (2016). "The microbiome and development of allergic disease." *Current opinion in allergy and clinical immunology* **16**(2): 165-171.
- Macpherson, A. J. and N. L. Harris (2004). "Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system." *Nature Reviews Immunology* **4**(6): 478-485.
- Magueta, E. B., Miranda, A., Carvalho, R. A. S., Maria, A., Silveira, S., Moreno, E. C. (2015) Risk Factors to Schistosomiasis in Communities from Minas Gerais State, Brazil: The Importance of Baseline Studies for Evaluations in the Endemic Area. *Journal of Medical and Biological Science Research*, **1**, 62-70.
- Mahanty, S. and T. B. Nutman (1995). "Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of interleukin 10." *Parasite immunology* **17**(8): 385-392.
- Maizels, R. and M. Yazdanbakhsh (2008). T-cell regulation in helminth parasite infections: implications for inflammatory diseases. *T Cell Regulation in Allergy, Asthma and Atopic Skin Diseases*, Karger Publishers. **94**: 112-123.
- Maizels, R. M. (2005). "Infections and allergy—helminths, hygiene and host immune regulation." *Current opinion in immunology* **17**(6): 656-661.
- Maizels, R. M., McSorley, H. J., & Smyth, D. J. (2014). Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later?. *Clinical & Experimental Immunology*, **177**(1), 38-46.
- Malaquias, L. C. C., Falcao, P. L., Silveira, A. M. S., Gazzinelli, G., Prata, A., Coffman, R. L., ... & CORREA-OLIVEIRA, R. (1997). Cytokine Regulation of Human Immune Response to *Schistosoma mansoni*: Analysis of the Role of IL-4, IL-5 and IL-10 on Peripheral Blood Mononuclear Cell Responses. *Scandinavian journal of immunology*, **46**(4), 393-398.
- Maloy, K. J. and F. Powrie (2011). "Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease." *Nature* **474**(7351): 298-306.

- Martin, L. B., Kita, H., Leiferman, K. M. & Gleich, G. J. (1996) Eosinophils in allergy: role in disease, degranulation, and cytokines. *International archives of allergy and immunology*, **109**, 207-215.
- Matricardi, P. M., Franzinelli, F., Franco, A., Caprio, G., Murru, F., Cioffi, D., ... & Rosmini, F. (1998). Sibship size, birth order, and atopy in 11,371 Italian young men. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **101**(4), 439-444.
- McSorley, H. J. and R. M. Maizels (2012). "Helminth infections and host immune regulation." *Clinical microbiology reviews* **25**(4): 585-608.
- Medzhitov, R., Schneider, D. S., & Soares, M. P. (2012). Disease tolerance as a defense strategy. *Science*, **335**(6071), 936-941.
- Mishra, P. K., Palma, M., Bleich, D., Loke, P., & Gause, W. C. (2014). Systemic impact of intestinal helminth infections. *Mucosal immunology*, **7**(4), 753-762.
- Montenegro, S. M., Miranda, P., Mahanty, S., Abath, F. G., Teixeira, K. M., Coutinho, E. M., ... & Sher, A. (1999). Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- $\gamma$  and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *Journal of Infectious Diseases*, **179**(6), 1502-1514.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, **19**(1), 683-765.
- Mosmann, T. (1992). "T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions." *Annals of the New York Academy of Sciences* **664**(1): 89-92.
- Mpairwe, H., Webb, E. L., Muhangi, L., Ndibazza, J., Akishule, D., Nampijja, M., ... & Dunne, D. W. (2011). Anthelmintic treatment during pregnancy is associated with increased risk of infantile eczema: randomised-controlled trial results. *Pediatric Allergy and Immunology*, **22**(3), 305-312.
- Novato-Silva, E., Gazzinelli, G. & Colley, D. (1992) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonates. *Scandinavian journal of immunology*, **35**, 429-437.
- Noya, O., Katz, N., Pointier, J. P., Theron, A., & de Noya, B. A. (2015). Schistosomiasis in America. In *Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean* (pp. 11-43). Springer Vienna.
- Obihara, C. C., Beyers, N., Gie, R. P., Hoekstra, M. O., Fincham, J. E., Marais, B. J., ... & Kimpen, J. L. (2006). Respiratory atopic disease, Ascaris-immunoglobulin E and tuberculin testing in urban South African children. *Clinical & Experimental Allergy*, **36**(5), 640-648.
- Oliveira, S. M. d., Bezerra, F. S. d. M., Carneiro, T. R., Pinheiro, M. C. C. & Queiroz, J. A. N. (2014) Association between allergic responses and Schistosoma mansoni infection in residents in a low-endemic setting in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **47**, 770-774.

- Organization, W. H. (2002). *Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee*, World Health Organization.
- Pabst, O. and A. Mowat (2012). "Oral tolerance to food protein." *Mucosal immunology* **5**(3): 232-239.
- Palm, N. W., Rosenstein, R. K., & Medzhitov, R. (2012). Allergic host defences. *Nature*, **484**(7395), 465-472.
- Palmer, L. J., Celedón, J. C., Weiss, S. T., Wang, B., Fang, Z., & Xu, X. (2002). *Ascaris lumbricoides* infection is associated with increased risk of childhood asthma and atopy in rural China. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **165**(11), 1489-1493.
- Paraense, W. L. (2001). "The schistosome vectors in the Americas." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **96**: 7-16.
- Pearce, E. J. and A. S. MacDonald (2002). "The immunobiology of schistosomiasis." *Nat Rev Immunol* **2**(7): 499-511.
- Pearce, E. J. and A. Sher (1991). "Functional dichotomy in the CD4+ T cell response to *Schistosoma mansoni*." *Experimental parasitology* **73**(1): 110-116.
- Pearce, N., Ait-Khaled, N., Beasley, R., Mallol, J., Keil, U., Mitchell, E., & Robertson, C. (2007). Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*, **62**(9), 758-766.
- Pereira, M. U., Sly, P. D., Pitrez, P. M., Jones, M. H., Escouto, D., Dias, A. C. O. (2007) Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *European Respiratory Journal*, **29**, 1154-1160.
- Pirajá da Silva, M. (1908). "Contribuição para o estudo da schistosomiase na Bahia." *Brasil Med* **22**: 281-283.
- Platts-Mills, T. A., Mueller, G. A., & Wheatley, L. M. (1998). Future directions for allergen immunotherapy. *Journal of allergy and clinical immunology*, **102**(3), 335-343.
- Platts-Mills, T. A. E., Perzanowski, M., Woodfolk, J. A., & Lundback, B. (2002). Relevance of early or current pet ownership to the prevalence of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*, **32**(3), 335-338.
- Pointier, J. P., David, P., & Jarne, P. (2011). The biological control of the snail hosts of schistosomes: the role of competitor snails and biological invasions. In *Biomphalaria snails and larval trematodes* (pp. 215-238). Springer New York.
- Rabello, A., Pontes, L., Enk, M., Montenegro, S. & Morais, C. (2008) Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*, Fiocruz, Rio de Janeiro, 897-925.
- Raso, P., Pedroso, E. R. P., & Neves, J. (1986). Patologia da forma aguda, toxêmica, da esquistossomose mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **19**(1), 45-55.

- Rodrigues, L. C., Newcombe, P. J., Cunha, S. S., Alcantara-Neves, N. M., Genser, B., Cruz, A. A., ... & Barreto, M. L. (2008). Early infection with *Trichuris trichiura* and allergen skin test reactivity in later childhood. *Clinical & Experimental Allergy*, **38**(11), 1769-1777.
- Rook, G. A. (2009). "Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis." *Immunology* **126**(1): 3-11.
- Ross, A. G. P., Bartley, P. B., et al. (2002). "Schistosomiasis." *New England Journal of Medicine* **346**(16): 1212-1220.
- Round, J. L. and S. K. Mazmanian (2009). "The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease." *Nature Reviews Immunology* **9**(5): 313-323.
- Sales, V. S., Rodrigues, C. E., Cavalcanti, G., Trombone, A. P. F., Lima, R. C., Santos, A. B. R., (2002) Infection with *Ascaris lumbricoides* in pre-school children: role in wheezing and IgE responses to inhalant allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **109**, S27.
- Saugar, J. M., Merino, F. J., Martín-Rabadán, P., Fernández-Soto, P., Ortega, S., Gárate, T. (2015) Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain. *Acta tropica*, **142**, 20-25.
- Schaub, B., Lauener, R., & von Mutius, E. (2006). The many faces of the hygiene hypothesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **117**(5), 969-977.
- Schneider, M., Hilgers, R. & Sennekamp, J. (2002) Allergy, total IgE and eosinophils in East and West--serious effects of different degrees of helminthiasis and smoking. *European journal of medical research*, **7**, 63-71.
- Scholte, R. G., Gosoniu, L., Malone, J. B., Chammartin, F., Utzinger, J. & Vounatsou, P. (2014) Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta tropica*, **132**, 57-63.
- Sears, M., Burrows, B., Flannery, E., Herbison, G. & Holdaway, M. (1993) Atopy in childhood. I. Gender and allergen related risks for development of hay fever and asthma. *Clinical & Experimental Allergy*, **23**, 941-948.
- Siqueira, L. M. V., Coelho, P. M. Z., Oliveira, Á. A. d., Massara, C. L., Carneiro, N. F. d. F., Lima, A. C. L. (2011) Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **106**, 844-850.
- Smits, H. H. & Yazdanbakhsh, M. (2007) Chronic helminth infections modulate allergen-specific immune responses: Protection against development of allergic disorders? *Annals of medicine*, **39**, 428-439.
- Smits, H. H. and M. Yazdanbakhsh (2007). "Chronic helminth infections modulate allergen-specific immune responses: Protection against development of allergic disorders?" *Annals of medicine* **39**(6): 428-439.
- Smits, H. H., Everts, B., Hartgers, F. C., & Yazdanbakhsh, M. (2010). Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Current allergy and asthma reports*, **10**(1), 3-12.

- Stadecker, M. J., Asahi, H., Finger, E., Hernandez, H. J., Rutitzky, L. I., & Sun, J. (2004). The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunological reviews*, **201**(1), 168-179.
- Steinfelder, S., Andersen, J. F., Cannons, J. L., Feng, C. G., Joshi, M., Dwyer, D., ... & Jankovic, D. (2009). The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *The Journal of experimental medicine*, **206**(8), 1681-1690.
- Stene, L. C. and P. Nafstad (2001). "Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma." *The Lancet* **357**(9256): 607-608.
- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." *BMJ: British Medical Journal* **299**(6710): 1259.
- Strachan, D. P. (2000). "Family size, infection and atopy: the first decade of the 'hygiene hypothesis'." *Thorax* **55**(Suppl 1): S2.
- Strachan, D., Sibbald, B., Weiland, S., Ait-Khaled, N., Anabwani, G., Anderson, H. R., ... & Clayton, T. (1997). Worldwide variations in prevalence of symptoms of allergic rhinoconjunctivitis in children: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Pediatric allergy and immunology*, **8**(4), 161-168.
- Tang, P., Mohan, S., Sigler, L., Witterick, I., Summerbell, R., Campbell, I., & Mazzulli, T. (2003). Allergic fungal sinusitis associated with *Trichoderma longibrachiatum*. *Journal of clinical microbiology*, **41**(11), 5333-5336.
- Taylor, J. J., Mohrs, M., & Pearce, E. J. (2006). Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th Responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector Population. *The Journal of Immunology*, **176**(10), 5839-5847.
- Teixeira, C. F., Neuhauss, E., Ben, R., Romanzini, J., & Graeff-Teixeira, C. (2007). Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. *PLoS Negl Trop Dis*, **1**(2), e73.
- Tshikuka, J., Scott, M. & Gray-Donald, K. (1995) *Ascaris lumbricoides* infection and environmental risk factors in an urban African setting. *Annals of tropical medicine and parasitology*, **89**, 505-514.
- Van Den Biggelaar, A. H., L. C. Rodrigues. (2004). "Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren." *Journal of Infectious Diseases* **189**(5): 892-900.
- Van den Biggelaar, A. H., van Ree, R., Rodrigues, L. C., Lell, B., Deelder, A. M., Kremsner, P. G., & Yazdanbakhsh, M. (2000). Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *The Lancet*, **356**(9243), 1723-1727.
- van der Vlugt, L. E., Zinsou, J. F., Ozir-Fazalalikhani, A., Kremsner, P. G., Yazdanbakhsh, M., Adegnik, A. A., & Smits, H. H. (2014). Interleukin 10 (IL-10)-Producing CD1dhi Regulatory B Cells From *Schistosoma Haematobium*-Infected Individuals Induce IL-10-Positive T Cells and Suppress Effector T-Cell Cytokines. *Journal of Infectious Diseases*, **210**(8), 1207-1216.

- Van der Vlugt, L. E., Labuda, L. A., Ozir-Fazalalikhani, A., Lievers, E., Gloudemans, A. K., Liu, K. Y., ... & Feugap, E. N. (2012). Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d hi B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. *PLoS One*, *7*(2), e30883.
- van der Werf, M. J., Borsboom, G. J., & de Vlas, S. J. (2003). No effect of recall period length on prevalence of self-reported haematuria in *Schistosoma haematobium*-endemic areas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *97*(4), 373-374.
- Voge, M., Bruckner, D., & Bruce, J. I. (1978). *Schistosoma mekongi* sp. n. from man and animals, compared with four geographic strains of *Schistosoma japonicum*. *The Journal of parasitology*, 577-584.
- Von Mutius, E., Martinez, F. D., Fritzschi, C., Nicolai, T., Reitmeir, P., & Thiemann, H. H. (1994). Skin test reactivity and number of siblings. *Bmj*, *308*(6930), 692-695.
- Von Mutius, E., Schwartz, J., Neas, L. M., Dockery, D., & Weiss, S. T. (2001). Relation of body mass index to asthma and atopy in children: the National Health and Nutrition Examination Study III. *Thorax*, *56*(11), 835-838.
- Vos, T., Flaxman, A. D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., ... & Abraham, J. (2013). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, *380*(9859), 2163-2196.
- Weerakoon, K. G., Gobert, G. N., Cai, P., & McManus, D. P. (2015). Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. *Clinical microbiology reviews*, *28*(4), 939-967.
- Williams, H., Robertson, C., Stewart, A., Ait-Khaled, N., Anabwani, G., Anderson, R., ... & Clayton, T. (1999). Worldwide variations in the prevalence of symptoms of atopic eczema in the International Study of Asthma and Allergies in Childhood. *Journal of allergy and clinical immunology*, *103*(1), 125-138.
- Wills-Karp, M., Santeliz, J., & Karp, C. L. (2001). The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nature Reviews Immunology*, *1*(1), 69-75.
- Wilson, M. S., Taylor, M. D., Balic, A., Finney, C. A., Lamb, J. R., & Maizels, R. M. (2005). Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*, *202*(9), 1199-1212.
- Wilson, M. S., Mentink-Kane, M. M., Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Thompson, R., & Wynn, T. A. (2007). Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and cell biology*, *85*(2), 148-154.
- Wright, A. L. (2002) Epidemiology of asthma and recurrent wheeze in childhood. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, *22*, 33-44.
- Wynn, T. A., Cheever, A. W., Williams, M. E., Hieny, S., Caspar, P., Kühn, R., ... & Sher, A. (1998). IL-10 regulates liver pathology in acute murine *Schistosomiasis mansoni* but is not

required for immune down-modulation of chronic disease. *The Journal of Immunology*, **160**(9), 4473-4480.

Wynn, T. A., Thompson, R. W., Cheever, A. W., & Mentink-Kane, M. M. (2004). Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological reviews*, **201**(1), 156-167.

Yazdanbakhsh, K., Ware, R. E., & Noizat-Pirenne, F. (2012). Red blood cell alloimmunization in sickle cell disease: pathophysiology, risk factors, and transfusion management. *Blood*, **120**(3), 528-537.

Yazdanbakhsh, M., van den Biggelaar, A., & Maizels, R. M. (2001). Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends in immunology*, **22**(7), 372-377.

Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P. G., & Van Ree, R. (2002). Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, **296**(5567), 490-494.

## ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Participantes menores de 7 anos Convite para participar

Seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, cujo nome é \_\_\_\_\_ está convidado(a) para participar, voluntariamente do Projeto “*Schistosoma mansoni* e geohelmintos – Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos.”

Leia e/ou ouça atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento.

#### Informações sobre o Estudo

O projeto em andamento será realizado nos Municípios de Januária e Montes Claros, Minas Gerais onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Instituto René Rachou, da Fiocruz Minas Gerais e nos Municípios de Turiaçu no Maranhão e Primavera no Pará, onde o estudo será conduzido por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde. A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS Nº 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas para o diagnóstico e controle da esquistossomose. Também esperamos verificar se outras verminoses, doenças alérgicas ou outras alterações podem afetar a gravidade da esquistossomose. É importante lembrar que a Esquistossomose (também conhecida como xistose ou barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. As pessoas que são diagnosticadas podem ser tratadas e curadas, mas o diagnóstico das pessoas com baixa carga parasitária é difícil e sem o tratamento alguns casos xistose podem produzir alterações no fígado e sangramentos (no vômito e nas fezes).

Ao concordar com a participação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade você deverá responder a um questionário confidencial com perguntas relacionadas a situação de moradia, características comportamentais e pessoais que estão associadas a transmissão das parasitoses em estudo. Você também autoriza a coleta de uma amostra de fezes, urina e sangue que serão utilizados para detectar ovos ou produtos do verme (como DNA) ou induzidos por ele (anticorpos) que permitam confirmar a presença da esquistossomose. Nas

amostras de fezes também iremos investigar a presença de outros vermes e no sangue de outras doenças que possam interferir na gravidade da esquistossomose.

### **Riscos e Benefícios**

Os benefícios provenientes da participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da esquistossomose no município. Os participantes que apresentarem xistose serão tratados gratuitamente com Praziquantel ou oxamniquine, ou com Albendazol ou Mebendazol em caso de outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

O risco para o seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade que porventura participe da pesquisa são mínimos. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Entretanto, a coleta será realizada por profissionais especializados em local adequado e utilizando material descartável, evitando problemas de contaminação. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses está no momento da coleta de sangue.

### **Confidencialidade:**

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e a identificação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes, urina e sangue de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade serão guardados apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

### **Informações adicionais**

Você e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade também podem e devem fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender.

A participação é totalmente voluntária e você e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade poderão se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal para ambos.

Você e seu filho (a) ou menor sob sua responsabilidade têm a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

A desistência não causará nenhum prejuízo à saúde ou bem estar físico do seu filho ou menor sob sua responsabilidade. Não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

**Consentimento e Assentimento:**

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do Responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do Entrevistador: \_\_\_\_\_

<b>Impressão Digital (opcional)</b>
---

Data: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_ .

**ENDEREÇO E TELEFONE DOS PESQUISADORES**

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Coordenador Geral da Pesquisa

Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz

Av. Augusto de Lima 1715, CEP: 30190-002, Barro Preto, Belo Horizonte-MG

Tel. (31)3349-7740; E-mail: [coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br](mailto:coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br)

Dr. Stefan Michael Geiger

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco L4, Sala 168; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG

Tel.: (31)3409-2869 ; E-mail: [stefan.geiger76@gmail.com](mailto:stefan.geiger76@gmail.com)

Dr. Martin Johannes Enk

Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde, Laboratório de Esquistossomose, Rodovia BR 316 – km 07, SNº; Bairro Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua-PA

Tel.: (91)3214-2149 ; E-mail: [martinenk@iec.pa.gov.br](mailto:martinenk@iec.pa.gov.br)

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da CPqRR

(Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou -

FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825

Email: [cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br](mailto:cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**Participantes menores de 18 anos**  
**Convite para participar**

Seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, cujo nome é \_\_\_\_\_ está convidado(a) para participar, voluntariamente do Projeto “*Schistosoma mansoni* e geohelmintos – Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos.”

Leiam e/ou ouçam atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento ou assentimento.

**Informações sobre o Estudo**

O projeto em andamento será realizado nos Municípios de Januária e Montes Claros, Minas Gerais onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Instituto René Rachou, da Fiocruz Minas Gerais e nos Municípios de Turiaçu no Maranhão e Primavera no Pará, onde o estudo será conduzido por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde. A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS Nº 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas para o diagnóstico e controle da esquistossomose. Também esperamos verificar se outras verminoses, doenças alérgicas ou outras alterações podem afetar a gravidade da esquistossomose. É importante lembrar que a Esquistossomose (também conhecida como xistose ou barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. As pessoas que são diagnosticadas podem ser tratadas e curadas, mas o diagnóstico das pessoas com baixa carga parasitária é difícil e sem o tratamento alguns casos xistose podem produzir alterações no fígado e sangramentos (no vômito e nas fezes).

Ao concordar com a participação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade você deverá responder a um questionário confidencial com perguntas relacionadas a situação de moradia, características comportamentais e pessoais que estão associadas a transmissão das parasitoses em estudo. Você também autoriza a coleta de uma amostra de fezes, urina e sangue que serão utilizados para detectar ovos ou produtos do verme (como DNA) ou induzidos por ele (anticorpos) que permitam confirmar a presença da esquistossomose. Nas

amostras de fezes também iremos investigar a presença de outros vermes e no sangue de outras doenças que possam interferir na gravidade da esquistossomose.

### **Riscos e Benefícios**

Os benefícios provenientes da participação do seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da esquistossomose no município. Os participantes que apresentarem xistose serão tratados gratuitamente com Praziquantel ou oxamniquine, ou com Albendazol ou Mebendazol em caso de outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

O risco para o seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade que porventura participe da pesquisa são mínimos. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Entretanto, a coleta será realizada por profissionais especializados em local adequado e utilizando material descartável, evitando problemas de contaminação. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses está no momento da coleta de sangue.

### **Confidencialidade:**

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e a identificação de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes, urina e sangue de seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade serão guardados apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

### **Informações adicionais**

Você e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade também podem e devem fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender.

A participação é totalmente voluntária e você e seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade poderão se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal para ambos.

Você e seu filho (a) ou menor sob sua responsabilidade têm a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

A desistência não causará nenhum prejuízo à saúde ou bem estar físico do seu filho ou menor sob sua responsabilidade. Não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

**Consentimento e Assentimento:**

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do Responsável: \_\_\_\_\_

Assinatura do Entrevistador: \_\_\_\_\_

<b>Impressão Digital (opcional)</b>
---

Data: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_ .

**ENDEREÇO E TELEFONE DOS PESQUISADORES**

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Coordenador Geral da Pesquisa

Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz

Av. Augusto de Lima 1715, CEP: 30190-002, Barro Preto, Belo Horizonte-MG

Tel. (31)3349-7740; E-mail: [coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br](mailto:coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br)

Dr. Stefan Michael Geiger

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco L4, Sala 168; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG

Tel.: (31)3409-2869 ; E-mail: [stefan.geiger76@gmail.com](mailto:stefan.geiger76@gmail.com)

Dr. Martin Johannes Enk

Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde, Laboratório de Esquistossomose, Rodovia BR 316 – km 07, SNº; Bairro Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua-PA

Tel.: (91)3214-2149 ; E-mail: [martinenk@iec.pa.gov.br](mailto:martinenk@iec.pa.gov.br)

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da CPqRR

(Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou -

FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825

Email: [cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br](mailto:cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**Participantes maiores de 18 anos**  
**Convite para participar**

Você, \_\_\_\_\_ está convidado(a) para participar, voluntariamente do Projeto “*Schistosoma mansoni* e geohelmintos – Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos.”

Leia e/ou ouça atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento.

**Informações sobre o Estudo**

O projeto em andamento será realizado no Município de Januária e Montes Claros, Minas Gerais onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Instituto René Rachou, da Fiocruz Minas Gerais e nos Municípios de Turiçu no Maranhão e Primavera no Pará, onde o estudo será conduzido por pesquisadores do Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde. A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS N° 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é aperfeiçoar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicas para o diagnóstico e controle da esquistossomose. Também esperamos verificar se outras verminoses, doenças alérgicas ou outras alterações podem afetar a gravidade da esquistossomose. É importante lembrar que a Esquistossomose (também conhecida como xistose ou barriga d’água) é uma doença que se adquire no contato com águas que contém caramujos infectados. As pessoas que são diagnosticadas podem ser tratadas e curadas, mas o diagnóstico das pessoas com baixa carga parasitária é difícil e sem o tratamento alguns casos da xistose podem produzir alterações no fígado e sangramentos (no vômito e nas fezes).

Ao concordar com a participação você deverá responder a um questionário confidencial com perguntas relacionadas a situação de moradia, características comportamentais e pessoais que estão associadas a transmissão das parasitoses em estudo. Você também autoriza a coleta de uma amostra de fezes, urina e sangue que serão utilizados para detectar ovos ou produtos do verme (como DNA) ou induzidos por ele (anticorpos) que permitam confirmar a presença da esquistossomose. Nas amostras de fezes também iremos investigar a presença de outros vermes e no sangue de outras doenças que possam interferir na gravidade da esquistossomose.

**Riscos e Benefícios**

Os benefícios provenientes da participação consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da esquistossomose no município. Os participantes que apresentarem xistose serão tratados gratuitamente com Praziquantel ou oxamniquine, ou com Albendazol ou Mebendazol em caso de outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

O risco para você é mínimo. Existe o desconforto da picada da agulha no momento da retirada do sangue. Entretanto, a coleta será realizada por profissionais especializados em local adequado e utilizando material descartável, evitando problemas de contaminação. Os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses está no momento da coleta de sangue.

**Confidencialidade:**

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e sua será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes, urina e sangue serão guardadas apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

**Informações adicionais**

Você também pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender.

A participação é totalmente voluntária e você poderá se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal.

Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

A desistência não causará nenhum prejuízo à sua saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

**Consentimento:**

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_  
 Assinatura do Responsável: \_\_\_\_\_  
 Assinatura do Entrevistador: \_\_\_\_\_

<b>Impressão          Digital          (opcional)</b>
---

Data: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_ .

#### ENDEREÇO E TELEFONE DOS PESQUISADORES

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho – Coordenador Geral da Pesquisa

Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz

Av. Augusto de Lima 1715, CEP: 30190-002, Barro Preto, Belo Horizonte-MG

Tel. (31)3349-7740; E-mail: [coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br](mailto:coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br)

Dr. Stefan Michael Geiger

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco L4, Sala 168; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG

Tel.: (31)3409-2869 ; E-mail: [stefan.geiger76@gmail.com](mailto:stefan.geiger76@gmail.com)

Dr. Martin Johannes Enk

Instituto Evandro Chagas, Ministério de Saúde, Laboratório de Esquistossomose, Rodovia BR 316 – km 07, SNº; Bairro Levilândia, CEP 67030-000, Ananindeua-PA

Tel.: (91)3214-2149 ; E-mail: [martinenk@iec.pa.gov.br](mailto:martinenk@iec.pa.gov.br)

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da CPqRR

(Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou -

FIOCRUZ). Endereço: Av. Augusto de Lima, nº 1715 – Bairro Barro Preto/ Belo Horizonte – MG. Cep: 30190-002. Tel.: (31) 3349 7825

Email: [cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br](mailto:cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br)

## ANEXO 2 – Parecer Consubstanciado do CEP

CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Novas técnicas de diagnóstico para Schistosoma mansoni e geohelminhos.

**Pesquisador:** Paulo Marcos Zech Coelho

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 21824513.9.0000.5091

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPQRR/

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 518.888

**Data da Relatoria:** 27/01/2014

**Apresentação do Projeto:**

Projeto: Schistosoma mansoni e geohelminhos, Aprimoramento de técnicas diagnósticas para levantamento de prevalência e controle de cura, monitoramento da transmissão e identificação de marcadores de morbidade em áreas com cenários eco-epidemiológicos distintos, coordenado por Dr. Paulo Marcos Zech Coelho do CPQRR e equipe de pesquisadores de outras quatro instituições. Recursos do DCIT totalizando R\$650.000,00

**Objetivo da Pesquisa:**

Meta: Realizar estudos parasitológicos, epidemiológicos e imunológicos em áreas de média a baixa endemicidade para a esquistossomose mansoni, visando obter uma visão real e atual dos aspectos de transmissão e morbidade associados à infecção por Schistosoma mansoni e geohelminhos que permita a proposição de estratégias de controle e tratamento compatível com realidade da doença e com a atuação do sistema de saúde.

**Objetivos específicos:**

1. Levantamento da prevalência da infecção por S. mansoni e geohelminhos em áreas da Amazônia, baixada Maranhense e Norte de Minas Gerais, onde as características de transmissão da infecção humana por helmintos são bastante diferenciadas.
2. Comparação da sensibilidade do método de Kato-Katz com os novos testes diagnósticos (Helmintex, gradiente, CCA modificado e PCR) para monitoramento da transmissão e cura após

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715

**Bairro:** Barro Preto

**CEP:** 30.190-002

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3349-7825

**Fax:** (31)3349-7825

**E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/**



Continuação do Parecer: 518.888

tratamento.

3. Tratamento dos indivíduos infectados e monitoramento da eficácia do controle quimioterápico de helmintoses na transmissão e na morbidade (reversão do quadro clínico)
4. Levantamento malacológico e monitoramento de taxas de infecção natural de *Biomphalaria* antes e após interferência
5. Padronização de metodologia molecular baseada no LAMP para detecção da infecção por *S. mansoni* em moluscos do gênero *Biomphalaria*.
6. Avaliação de marcadores de morbidade (imagem e imunológicos) da esquistossomose mansoni, antes do primeiro tratamento e durante o seguimento.
7. Analisar o possível efeito de co-morbidades (co-infecção por geohelminhos, status nutricional e doenças inflamatórias crônicas) na morbidade de esquistossomose mansoni.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:** Os riscos envolvidos nesse projeto referem-se à venipuntura. Os voluntários serão informados dos possíveis riscos e terão atendimento médico especializado garantido. Venipuntura - A venipuntura é um procedimento muito seguro e realizado de rotina em qualquer centro de saúde de atenção básica. Alguns eventos adversos relacionados com a venipuntura podem ser: hematomas no local da introdução da agulha, uma complicação atinge cerca de 3% das pessoas submetidas a tal procedimento, e que resolve em até duas semanas; tonteira ou desmaio, devido a reação vasovagal, que atinge cerca de 1% das pessoas submetidas à venipuntura; síncope, que ocorre 1 vez a cada 10.000 procedimentos; e punção arterial que é um evento raríssimo (1:50.000).

**Benefícios:**

Todos os participantes do estudo ou seus responsáveis legais serão devidamente informados do estudo e solicitados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta de dados. Os voluntários serão informados que não obterão benefícios diretos pela participação no projeto. Entretanto, todos os voluntários receberão atenção médica personalizada oferecida pelo projeto sem ônus para o participante, incluindo exames laboratoriais de rotina. Todos os indivíduos com infecção por *S. mansoni* ou geohelminhos confirmadas serão encaminhados para o serviço de saúde para tratamento específico, indivíduos com outras doenças que possam ser identificadas também serão encaminhados para tratamento especializado.

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 518.888

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa bem fundamentada do ponto de vista científico, com objetivos relevantes. A coordenação e a equipe têm qualificação e experiência importantes, assim como as competências das instituições participantes e o orçamento aprovado, são garantias suficientes de que a pesquisa será conduzida como planejada e levada à termo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Não se aplica.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Todas as recomendações sugeridas no parecer emitido em outubro/2013 foram adequadamente atendidas. Não há novas inadequações e pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Colocado em discussão o parecer do relator, o Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas, decidiu pela Aprovação deste projeto.

BELO HORIZONTE, 31 de Janeiro de 2014

Assinador por:  
Naftale Katz  
(Coordenador)

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.190-002

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3349-7825

Fax: (31)3349-7825

E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br