

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**Helane Catarine Dantas do Nascimento Ribeiro**

**DESVENDANDO A RESPOSTA DOS EOSINÓFILOS, DOS NEUTRÓFILOS E  
DOS MONÓCITOS NAS PARASIToses INTESTINAIS, NA ASMA E NA  
ASSOCIAÇÃO DE AMBAS EM CRIANÇAS**

**BRASÍLIA/DF**

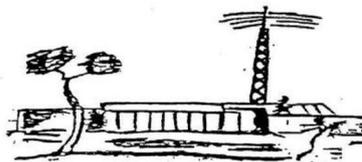
**2015**

**Helane Catarine Dantas do Nascimento Ribeiro**

**DESVENDANDO A RESPOSTA DOS EOSINÓFILOS, DOS NEUTRÓFILOS E  
DOS MONÓCITOS NAS PARASIToses INTESTINAIS, NA ASMA E NA  
ASSOCIAÇÃO DE AMBAS EM CRIANÇAS**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao programa de Pós-Graduação em  
Medicina Tropical da Faculdade de  
Medicina da Universidade de Brasília,  
como requisito parcial para obtenção  
do título de Mestre em Medicina  
Tropical.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria  
Imaculada Muniz Barboza Junqueira



**BRASÍLIA/DF**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Dd

Dantas do Nascimento Ribeiro, Helane Catarine  
DESVENDANDO A RESPOSTA DOS EOSINÓFILOS, DOS  
NEUTRÓFILOS E DOS MONÓCITOS NAS PARASITOSES  
INTESTINAIS, NA ASMA E NA ASSOCIAÇÃO DE AMBAS EM  
CRIANÇAS / Helane Catarine Dantas do Nascimento  
Ribeiro; orientador Maria Imaculada Muniz Barboza  
Junqueira. -- Brasília, 2015.  
158 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Medicina  
Tropical) -- Universidade de Brasília, 2015.

1. Resposta imune celular. 2. Ativação de  
eosinófilos. 3. Fagocitose pelos neutrófilos e  
monócitos. 4. Asma. 5. Parasitoses intestinais. I.  
Muniz Barboza Junqueira, Maria Imaculada , orient.  
II. Título.

## **Banca examinadora**

Professora Dr<sup>a</sup> Carmen Livia Faria da Silva Martins  
Universidade de Brasília (UnB) – Faculdade de Medicina

Professora Dr<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira  
Universidade de Brasília (UnB) – Faculdade de Medicina

Professora Dr<sup>a</sup> Tatiana Karla dos Santos Borges  
Universidade de Brasília (UnB) – Faculdade de Medicina

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a todas as crianças de hoje, independente de raça, cor, sexo, religião ou nível socioeconômico. Crianças que –se criadas com amor e carinho, com alimentação saudável, práticas esportivas e de lazer em condições de moradia, higiene e estudo adequados, além da ênfase cotidiana dos ensinamentos para a prática do bem, para adquirir conquistas e progresso pelo estudo e esforço próprios, trabalho digno na fase adulta, respeito aos semelhantes e aos seres/elementos da natureza, amizade, fraternidade, dignidade e honradez – constituirão adultos capazes para o progresso individual, da família e da sociedade.

## **Agradecimentos**

Muitas pessoas contribuíram para a minha pesquisa de mestrado e para que a presente dissertação fosse concluída. Abaixo, eu agradeço àqueles que estiveram mais próximos nesta jornada.

Agradeço inicialmente aos meus pais, pela oportunidade da vida, por todo amor, dedicação, cuidado e carinho para comigo e aos meus irmãos. Os ensinamentos dos porquês da vida, sobre como agir com razão e voltada à prática do bem, com respeito ao semelhante e à natureza, visando obter conquistas pelo próprio estudo e trabalho, com honestidade, dignidade e sempre falando a verdade, são lições que vocês nos transmitiram e que procuro exercitar a cada dia.

Agradeço aos meus irmãos, Hugo e Hani, pelo amor e cuidado para comigo e minha família, bem como pela ajuda na realização deste trabalho. Como é bom ter vocês!

Agradeço especialmente ao meu marido Thiago, pelo amor e pela construção da nossa família, com nossos filhos Hiago Henrique e Hannah Helena, os quais nos trazem mais brilho, alegria e amor. Muito obrigada, vida e filhos!

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pelo apoio dado em cada etapa do trabalho. Por diversas vezes, o caminho parecia escuro, mas foram a sua paciência e competência científica e acadêmica que serviram como farol para superar os obstáculos e fazer caminhar a pesquisa. Agradeço a Prof<sup>a</sup> Eleuza pela colaboração na análise dos exames parasitológicos e pelo grande auxílio para obtenção dos pacientes desse estudo. Agradeço também à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmen Livia pelo empréstimo do microscópio óptico para análise das lâminas.

Agradeço particularmente ao colega de mestrado Mateus Glehn, à Vera (Verinha, Gerente do GGPMA Centro de Saúde do Núcleo Bandeirante no período), à Francineide, Teasdele, Ézia e Marlene (da equipe de Saúde do Centro de Saúde 4 Riacho Fundo II), ao Marco Aurélio e Gean (da equipe de Saúde do Centro de Saúde da Estrutural) que muito contribuíram na captação dos pacientes nas comunidades e na coleta do material de pesquisa.

Agradeço ainda aos meus amigos e colegas do mestrado e do trabalho - Mariangela Souza, Shirley Claudino, Danilo Coraza, Roberta Kelly, Geane Chaves, Elkyane Arraes, Sheila Pacheco, Renata Colaço, Betania Azevedo, Cecília Silva, Elza Pastor, Renata Cerqueira, Alaine Cavalcante, Madalena Gonçalves, Ana Maria Vieira, bem como à Mônica Iassanã, Stella Bacas e Raquel Passos, à Diretoria de Regulação, pela amizade, paciência e apoio de vocês enquanto eu tinha que me ausentar para poder me dedicar ao mestrado; ao Hospital da Criança de Brasília José Alencar, e à Secretaria de Saúde do Distrito Federal pelo apoio à pesquisa; e à Aline Silva, Ana Carolina Sardeiro e Wallace Santos pelo apoio técnico na realização e análise dos experimentos.

Agradeço à minha segunda família, Hilda e Zeca, Vovô Hildenir e Vovó Helena, Débora e demais familiares e amigos, pelo apoio moral, pela ajuda e pela presença nessa longa jornada.

Agradeço ao Dr. Wellington Borges, Dr<sup>a</sup> Marta Guidacci, Dr<sup>a</sup> Fabíola Scancetti, Dr<sup>a</sup> Cláudia Valente, Dr<sup>a</sup> Valéria Botan e ao Dr. Dennis Alexandre pelos ensinamentos da alergia pediátrica, com estímulo ao estudo, aulas e atualização contínuos para o adequado exercício da medicina na Alergia e Imunologia Pediátrica.

Por fim agradeço ao Dr. Marcelo Nicaretta e à Dr<sup>a</sup> Maria Conceição Krause pelo apoio e tratamento para superação das percepções adversas.

Este projeto foi parcialmente suportado por recursos da Fundação de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Hospital Universitário de Brasília (FAHUB) (processo 008/2015) e por recursos do programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical.

# Sumário

Banca examinadora .....	iv
Dedicatória .....	v
Agradecimentos .....	vi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Abreviaturas .....	xvii
Resumo.....	xx
Abstract.....	xxii
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1 Asma.....	3
1.2 Parasitoses intestinais .....	6
1.2.1 Ancylostomidae .....	6
1.2.2 Ascarididae.....	8
1.2.3 <i>Giardia</i> .....	10
1.2.4 <i>Hymenolepis</i> .....	12
1.2.5 <i>Trichuris</i> .....	14
1.3 Mecanismos de defesa contra os parasitos intestinais .....	16
1.4 Papel da imunidade inata e adquirida na defesa contra os parasitos intestinais.....	16
1.5 Justificativa .....	21
2 OBJETIVOS.....	23
3 GRUPOS DE ESTUDO E MÉTODOS .....	24
3.1 Delineamento experimental .....	24
3.2 Tipo de estudo .....	26
3.3 Grupos de estudo .....	29
3.4 Avaliação clínica inicial dos pacientes e coletas de sangue .....	30
3.5 Protocolo para exame parasitológico de fezes .....	32
3.5.1 Método de Ritchie.....	32
3.5.2 Método de Lutz ou de Hoffmann, Pons e Janer .....	33
3.5.3 Método de Kato-Katz.....	34
3.6 Teste da ativação dos eosinófilos em lâmina.....	34

3.7	Teste da fagocitose em lâmina .....	35
3.8	Teste do <i>nitroblue tetrazolium</i> .....	38
3.9	Análise estatística .....	39
4	RESULTADOS.....	40
4.1	Avaliação socioeconômica das famílias das crianças estudadas. ..	40
4.2	Avaliação estado nutricional .....	43
4.3	Avaliação clínica dos pacientes e exames laboratoriais. ....	46
4.4	Caracterização dos grupos de estudo segundo os parasitos encontrados no exame parasitológico de fezes.....	56
4.5	Ativação dos eosinófilos em crianças parasitadas, asmáticas, asmáticas e parasitadas e controles .....	57
4.5.1	Eosinófilos normais .....	58
4.5.2	Eosinófilos espalhados.....	60
4.5.3	Eosinófilos apresentando pseudópode localizado.....	62
4.5.4	Eosinófilos emitindo grânulos em pequena quantidade .....	64
4.5.5	Outros parâmetros de ativação dos eosinófilos.....	66
4.6	Capacidade fagocitária .....	75
4.6.1	Fagocitose das leveduras pelos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos .....	75
4.6.2	Fagocitose das leveduras pelos neutrófilos pelos receptores para opsoninas .....	79
4.6.3	Fagocitose das leveduras pelos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos .....	83
4.6.4	Fagocitose das leveduras pelos monócitos pelos receptores para opsoninas .....	86
4.7	Produção de ânions superóxido avaliado pelo teste do <i>nitroblue tetrazolium</i> - NBT.....	94
5	DISCUSSÃO.....	101
6	CONCLUSÕES.....	113
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
	ANEXOS .....	121
	Anexo 1 – Protocolo de avaliação clínica .....	121

Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido .....	123
Anexo 3 – Termo de anuência do menor .....	124
Anexo 4 – Termo de concordância de Faculdade de Medicina da UNB	125
Anexo 5 – Termo de concordância do Hospital da Criança de Brasília José de Alencar .....	126
Anexo 6 – Aprovação do Comitê de Ética .....	127
Anexo 7 – Fotos da Chácara Santa Luzia na Cidade Estrutural, Guará, Brasília.....	129
Anexo 8 – Fotos do Riacho Fundo II, Brasília .....	136

## Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida dos parasitas da familia Ancylostomidae. Fonte: CDC (Center for Disease Control and Prevention) dos EUA. ....	7
Figura 2: Ciclo de vida do <i>Ascaris lumbricoides</i> . Fonte: CDC .....	9
Figura 3: Ciclo de vida da <i>Giardia</i> . Fonte: CDC .....	12
Figura 4: Ciclo de vida <i>Hymenolepis nana</i> . Fonte: CDC .....	14
Figura 5: Ciclo de vida <i>Trichuris trichiura</i> . Fonte: CDC .....	15
Figura 6: Diagrama de estudo da pesquisa .....	25
Figura 7: Diagrama da amostra por grupo de pesquisa .....	26
Figura 8: Mapa do Distrito Federal mostrando a localização das residências dos pacientes estudados provenientes da Cidade Estrutural e Chácara Santa Luzia. Fotos no Anexo 7. ....	28
Figura 9: Mapa do Distrito Federal mostrando a localização das residências dos pacientes estudados provenientes do Riacho Fundo II. Fotos no Anexo 8. ....	28
Figura 10: Condições socioeconômicas nas famílias das crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses. ....	41
Figura 11: Escore Z das crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses. ....	44
Figura 12: Percentil do IMC para das crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses. ....	45
Figura 13: Hemoglobina sérica dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. ....	48
Figura 14: Número absoluto de leucócitos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. ....	49

Figura 15: Número absoluto de linfócitos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. ....	51
Figura 16: Número absoluto de monócitos e neutrófilos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. ....	52
Figura 17: Número percentual de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. ....	54
Figura 18: Dosagem de IgE sérica total e número total absoluto de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. ....	55
Figura 19: Porcentagem de eosinófilos normais em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses intestinais. ....	59
Figura 20: Porcentagem de eosinófilos espiroides em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses intestinais. ....	61
Figura 21: Porcentagem de eosinófilos com emissão de pseudópode localizado em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses intestinais. ....	63
Figura 22: Porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em pequena quantidade em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses intestinais. ....	65
Figura 23: Porcentagem de eosinófilos com vacúolos citoplasmáticos em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses intestinais. ....	67

Figura 24: Porcentagem de eosinófilos emitindo pseudópodes múltiplos em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	68
Figura 25: Porcentagem de eosinófilos liberando média quantidade de grânulos em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	69
Figura 26: Porcentagem de eosinófilos liberando grande quantidade de grânulos em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	70
Figura 27: Porcentagem de eosinófilos em degeneração nas crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	72
Figura 28: Porcentagem de eosinófilos com presença de grânulos isolados em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	73
Figura 29: Porcentagem de eosinófilos em contato com outras células nas crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	74
Figura 30: Capacidade fagocitária dos neutrófilos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	76
Figura 31: Capacidade fagocitária dos neutrófilos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	78
Figura 32: Índice fagocitário dos neutrófilos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, em crianças dos grupos parasitadas apenas por helmintos e parasitadas apenas por protozoários na ausência de asma. ....	79
Figura 33: Capacidade fagocitária dos neutrófilos por receptores para opsoninas, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos	

grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	80
Figura 34: Capacidade fagocitária dos neutrófilos por receptores para opsoninas, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	82
Figura 35: Capacidade fagocitária dos monócitos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	84
Figura 36: Capacidade fagocitária dos monócitos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	85
Figura 37: Capacidade fagocitária dos monócitos por receptores para opsoninas, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	87
Figura 38: Capacidade fagocitária dos monócitos por receptores para opsoninas, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	89
Figura 39: Capacidade fagocitária dos monócitos por receptores para opsoninas, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma mais todos os parasitos intestinais. ....	91
Figura 40: Capacidade fagocitária dos monócitos por receptores para opsoninas, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma mais todos os parasitos intestinais. ....	93

Figura 41: Capacidade de oxidação dos fagócitos pelo NBT basal nas crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	95
Figura 42: Capacidade de oxidação dos fagócitos pelo NBT estimulado nas crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. ....	97
Figura 43: Porcentagem de redução do NBT estimulado nas crianças dos grupos controle, parasitadas por protozoário, com asma e com associação asma mais parasitose por protozoário. ....	98
Figura 44: Porcentagem de redução do NBT estimulado nas crianças dos grupos controle, parasitadas por helminto, com asma e com associação asma e parasitose por helminto. ....	99
Figura 45: Porcentagem de redução do NBT estimulado nas crianças dos grupos controle, parasitado, asma e com associação asma e parasitoses. ....	100

## Lista de Abreviaturas

C4 - leucotrienos	Leucotrieno C4
CD4	Linfócitos T CD4
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> dos EUA
CR1	Receptor de Complemento 1
CR3	Receptor de complemento3
DP	Desvio padrão
EPF	Exame parasitológico de fezes
ES62	Proteínas excretadas e excretadas pelos helmintos, fração 62
Fc	Porção de ligação Fc
FcR	Receptor da porção de ligação Fc
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos e granulócitos
HCB	Hospital da Criança de Brasília José de Alencar
IFN	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IgG (rFclgG)	Imunoglobulina G ( receptor para porção Fc da imunoglobulina G)
IL - 1	Interleucina 1
IL - 2	Interleucina 2
IL - 3	Interleucina 3
IL - 4	Interleucina 4
IL - 5	Interleucina 5
IL - 6	Interleucina 6

IL - 8	Interleucina 8
IL - 10	Interleucina 10
IL - 12	Interleucina 12
IL - 13	Interleucina 13
IL - 16	Interleucina 16
IL - 17	Interleucina 17
IL - 18	Interleucina 18
IL - 22	Interleucina 22
IL - 23	Interleucina 23
IL - 25	Interleucina 25
IL - 33	Interleucina 33
ILC2	Células linfóides inatas tipo 2
IMC	Índice de massa corpórea
NBT	teste do nitroblue tetrazolium
Padrão Ta2	Resposta imune por linfócitos T auxiliares tipo 2
RANTES	Quimiocina R
rC	Receptor de complemento
rIL-4 alfa	Receptor de interleucina 4 porção alfa
rIL-5 alfa	Receptor de interleucina 5 porção alfa
rIL-13 alfa	Receptor de interleucina 13 porção alfa
rINF-gama e alfa	Receptor de interferon alfa e gama
RNAses	Enzima de quebra do ácido ribonucléico
rOps	Receptor para opsoninas
rPMP	Receptor para padrões moleculares de patógenos
rTNF- alfa 1 e 2	Receptor para fator de necrose tumoral alfa 1 e alfa 2

SE	Produtos secretados e excretados
SFB	Soro fetal bovino
Ta1	LinfócitoT auxiliar tipo 1
Ta2	LinfócitoT auxiliar tipo 2
TGF $\beta$	Fator de crescimento transformador - beta
TGF- $\alpha$	Fator de crescimento transformador - alfa
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral – alfa
Treg	Linfócito T regulador

## Resumo

As parasitoses intestinais apresentam uma alta prevalência no mundo. Estudos revelam o aumento das doenças alérgicas e da asma e concomitantemente redução das doenças infectoparasitárias em crianças. A existência de uma correlação é estudada demonstrando a ação imunossupressora dos parasitos intestinais sobre a resposta imune sistêmica. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar o estado de ativação dos eosinófilos e as funções dos fagócitos comparativamente em crianças com asma, com parasitoses intestinais e na associação de ambas. Foi realizado estudo transversal com 68 crianças residentes no Riacho Fundo II e na Cidade Estrutural, em Brasília/Distrito Federal. Os pacientes foram separados nos grupos: A) crianças com parasitoses intestinais; B) crianças asmáticas sem parasitoses intestinais; C) crianças com parasitoses intestinais e asma e D) grupo controle. Após técnica de aderência em lâmina, foram avaliados: o estado de ativação dos eosinófilos do sangue periférico por parâmetros morfológicos; a fagocitose pelos monócitos (MON) e neutrófilos (NEU) por receptores para padrões moleculares de patógenos (rPMP) e para opsoninas (rOps), como também a produção de ânions superóxido (ASO) pelo teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT). As análises estatísticas foram realizadas pelos testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis. Observamos, além da baixa renda familiar e reduzidas condições de escolaridade, a prática de evacuações no peridomicílio pelas crianças e a ausência de tratamento domiciliar da água de beber. Os parasitos intestinais mais prevalentes foram *Ascaris lumbricoides* e *Giardia lamblia*, seguida por *Hymenolepis nana* e houve associação de parasitos intestinais em 38% dos pacientes parasitados. A ativação dos eosinófilos foi menor nas crianças com enteroparasitoses, em relação ao percentual de eosinófilos normais, espriamento, liberação de pequenas quantidades de grânulos e emissão de pseudópode único comparativamente às crianças asmáticas. A capacidade fagocitária pelos rPMP dos NEU das crianças parasitadas exclusivamente

por protozoários foi menor do que a das crianças asmáticas. Quando a fagocitose foi avaliada pelos rOps, a capacidade fagocitária dos MON das crianças asmáticas e também parasitadas foi maior do que a das crianças controle, pela maior ingestão de leveduras pelos MON. A produção de ASO pelos fagócitos foi menor nas crianças parasitadas por protozoários do que nas crianças asmáticas e parasitadas por protozoários. Contudo, a produção dos ASO foi maior nas crianças parasitadas por helmintos do que nas crianças asmáticas. Em conclusão, a infecção parasitária e o quadro de asma tiveram efeitos opostos sobre as diversas funções da imunidade inata estudada. O tipo de resposta dependeu do tipo de parasito e helmintos e protozoários determinaram repostas opostas: enquanto os protozoários, particularmente a *Giardia intestinalis*, diminuíram a capacidade fagocitária dos NEU pelos rPMP, os helmintos estimularam a fagocitose pelos MON pelos rOps. Em adição, enquanto no quadro de asma observamos certo grau de ativação dos eosinófilos, nas crianças parasitadas, essa ativação dos eosinófilos no sangue periférico não ocorreu, possivelmente por fatores supressores produzidos pelos parasitos. Tais achados podem contribuir para o esclarecimento sobre a resposta imune inata aos parasitos e suas repercussões no indivíduo, auxiliando na abordagem das parasitoses e no desenvolvimento de novas terapêuticas para a asma e atopias.

## **Abstract**

Intestinal parasites have a high prevalence worldwide, mainly in developing countries in places showing poor sanitary and socio-economic conditions. Several studies point to an increase in allergic diseases and asthma over the years, and show a concomitant reduction in infectious and parasitic diseases in children. The existence of such a correlation or causal factor has been investigated in experimental models with animal and human beings, leading to findings that demonstrate the immunosuppressive action of the parasites on the systemic immune response. Factors depending on the host, such as genotype, immune competence and nutritional status; and factors depending on the parasite, as the parasite load and the pathogenicity and virulence of helminths or protozoans, will determine the type of immune response triggered in infected individuals. In this context, this work aimed to evaluate eosinophil activation status and phagocytes' functions comparatively in children with asthma, intestinal parasites and in combination of both. A cross-sectional study was done in 68 children living in Riacho Fundo II and Chácara Santa Luzia in Cidade Estrutural, in Brasília/Federal District, Brazil. The socio-economic-cultural evaluation of the families, and clinical, laboratory and stool testing of each child was made. Four groups were studied: A) Helminths or/and protozoan parasitized children; B) asthmatic children; C) asthmatic and parasitized children and D) control group. The blood eosinophil activation status was assessed by morphologic parameters after adherence to glass. The phagocytic capacity of monocytes and neutrophils was evaluated by pathogen-associated molecular pattern receptors (PAMPs) and the opsonin receptors, as well as superoxide anions production by nitroblue tetrazolium test (NBT). Statistic analyses were performed by ANOVA or Kruskal-Wallis test. Eosinophils were lower activated in children with intestinal parasites than asthmatic children, by percentage of normal eosinophils, spreading, releasing of small quantities of

granules and emission of a single pseudopod. The phagocytic capacity of neutrophils of children exclusively parasitized by protozoan was lower than that of asthmatic children, by pathogen-associated molecular pattern receptors. When the phagocytosis was evaluated by opsonin receptors, phagocytic capacity of monocytes in asthmatic children concomitantly parasitized was higher than that of controls. Superoxide anions production lower in children parasitized by protozoan than in children with asthma plus protozoan. However, superoxide anions production was higher in children who were parasitized by helminths than in asthmatic children. In conclusion, our data showed that parasitic infection and asthma had opposite effects on several functions immune innate functions. Furthermore, immune response depended on the type of parasite, and helminths and protozoa determined opposite responses: whereas protozoan, mainly *Giardia intestinalis*, decreased phagocytic capacity by neutrophils by PAMPs helminths stimulated phagocytosis by monocytes by opsonin receptors. In addition, whereas in asthmatic children there were some eosinophil activation, in parasitized children there was no blood eosinophil activation possibly determined by suppressive factors produced by parasites. These findings may contribute to make clear the innate immune response to parasites and their impact on individual, assisting to understand parasites and in development of new therapies for treatment of asthma and atopies.

# 1 REVISÃO DA LITERATURA

Uma carga de helmintíase desproporcionalmente alta ocorre em indivíduos e populações marginalizados, em locais com restrição de recursos, em populações de baixa renda, com aproximadamente um bilhão de pessoas infectadas com uma ou mais espécies de parasitos intestinais. A morbidade causada por tais infecções impõe uma carga substancial de doença, contribuindo para o círculo vicioso de infecção, pobreza, baixa produtividade e desenvolvimento socioeconômico inadequado (Lustigman, Prichard, Gazzinelli, *et al.*, 2012). A asma é um problema sério de saúde por todo o mundo e estima-se afetar 300 milhões de pessoas no mundo, sendo mais frequente em populações mais desenvolvidas (Bateman, Hurd, Barnes, *et al.*, 2008). O que tem em comum entre essas duas das mais importantes doenças que afetam o ser humano é a eosinofilia sanguínea, que na primeira faz parte dos mecanismos de defesa antiparasitária e na segunda faz parte dos mecanismos de imunopatogenia. Por que a mesma célula desempenha funções tão opostas? Sendo protetora nas parasitoses, mas determinante de imunopatogenia nos processos alérgicos, revelando diferentes mecanismos intrínsecos em cada doença.

Os eosinófilos são leucócitos granulócitos com função efetora citotóxica, que atuam na imunidade inata e adaptativa, inclusive na interação entre estas. Eles atuam na regulação da inflamação, na manutenção da barreira epitelial e no remodelamento de tecidos afetados. Os grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos representam sua característica principal, conferindo-lhes a capacidade de armazenar citocinas, quimiocinas, proteínas catiônicas, metaloproteinases, mediadores lipídicos, RNAses e fatores de crescimento (Shamri, Xenakis & Spencer, 2011).

Os eosinófilos geralmente estão nos tecidos próximos a mucosas ou nos tecidos linfóides para resposta rápida local após identificação de um patógeno ou agressor; e em pequena percentagem, na circulação sanguínea

periférica. Eles são rapidamente recrutados em resposta ao linfócito T auxiliar do tipo 2 (Ta2) a alérgenos ou parasitos, com capacidade imediata de liberar uma variedade de mediadores, apresentando papel-chave na imunidade inata. Além disso, expressam uma diversidade de receptores (rTNF- alfa 1 e 2, rINF- gama e alfa, rIL-4 alfa, rIL-13 alfa, cadeia gama comum, entre outros), capacitando-os a reconhecer e responder às citocinas pró-inflamatórias e a agentes da imunidade Ta1 ou Ta2 (Shamri, Xenakis & Spencer, 2011).

A função citotóxica efetora dos eosinófilos é implicada nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra helmintos, infecções virais e bacterianas e também no dano tecidual, como efeito colateral.

O aumento dos eosinófilos no sangue periférico, observado como eosinofilia, pode ocorrer tanto na asma e doenças alérgicas quanto nas parasitoses como ascaridíase, com consequências distintas ao ser humano. Enquanto na asma os eosinófilos participam da fisiopatogênese da doença, na ascaridíase a função dos eosinófilos determina um combate ao parasita para proteção do indivíduo.

Mais estudos sobre os mecanismos de ação dos eosinófilos se fazem necessários para esclarecer suas funções e capacidade de produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 do padrão Ta2; IL-10 e IL-18 do padrão imunorregulador; IFN $\gamma$  e IL-12 do padrão Ta1; IL-1, IL-2, IL-3, IL-16, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, TGF $\alpha/\beta$ ; e das quimiocinas IL8, RANTES, eotaxina, mediadores lipídicos de ativação das plaquetas, leucotrienos C4 e as proteínas catiônicas: a) neurotoxina derivada de eosinófilo, b) peroxidase de eosinófilos, c) proteína básica principal e d) proteína catiônica eosinofílica (Alam & Busse, 2004; Takeda, Shiraishi, Ashino, *et al.*, 2015; Melo-Reis, Diniz-Filho, Dias- Penna, *et al.*, 2007)

A imunoglobulina E (IgE) apresenta maior afinidade pelos antígenos e por seus receptores e sua produção é principalmente nos tecidos linfóides associados aos tratos gastrintestinal e respiratório. O aumento da concentração sérica de IgE pode representar um processo de doença, uma desregulação do sistema imune, uma resposta específica a alérgenos ou

alterações inespecíficas na produção de proteínas e catabolismo. A meia vida da IgE é de 1 a 5 dias. Nas doenças parasitárias por helmintos, o aumento da concentração de IgE resulta na produção de IgE específica contra o parasita e suas larvas e IgE policlonal inespecífica. Um mecanismo proposto para tal produção é a liberação de fatores pelos parasitas que estimulam a produção de interleucina-4 (IL-4) e/ou interleucina 13 (IL-13).

O presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a ativação dos eosinófilos durante as respostas protetora e lesiva nos pacientes com asma, parasitoses e associação de ambas para o melhor entendimento desses mecanismos e possibilidades de intervenções nos pacientes acometidos.

## **1.1 Asma**

A asma é uma doença heterogênea, caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas, representada pelos sintomas de sibilância pulmonar e sua prevalência vem aumentando em vários países principalmente em crianças (FitzGerald & Reddel, 2015; Takeda, Shiraishi, Ashino, *et al.*, 2015; Bateman, Hurd, Barnes, *et al.*, 2008).

A asma se destaca como a doença crônica mais comum na infância e está associada a altas taxas de hospitalização, atendimento em serviços de emergência e importante morbidade com expressivo impacto no SUS.

As manifestações da asma dependem das características genéticas do indivíduo e suas interações com o ambiente. Os fatores durante a vida intra-útero e após o nascimento - como os hábitos nutricionais, a exposição a alérgenos inalados ou ingeridos, a presença de poluição e exposição à fumaça do cigarro - constituem fatores de risco para o desenvolvimento da asma (FitzGerald & Reddel, 2015).

A prevalência da asma no mundo é estimada em 300 milhões de pessoas afetadas, com importante impacto socioeconômico decorrente do

absenteísmo ao trabalho ou escolar e das mortes por exacerbações da doença (SBPT, 2012; FitzGerald & Reddel, 2015).

No Brasil, a prevalência da asma é estimada em 20 milhões de pessoas, cerca de 10 a 20% da população conforme a faixa etária e região analisada (SBPT, 2012).

A asma é considerada a terceira causa de hospitalizações entre crianças e adultos jovens (Bragatti, Chaves, Ferreira, *et al.*, 2013).

Conforme dados da SES/DF, durante o ano de 2014 no Distrito Federal, em crianças na faixa etária de 1 a 4 anos, a taxa de internação hospitalar por asma foi de 29,2%, nas crianças entre 5 a 9 anos a taxa de internação hospitalar foi de 15,3% e na faixa etária de 10 a 14 anos, 3,3%.

Vários estudos sugerem que a melhoria das condições de vida, maior cobertura vacinal, melhoria nos hábitos de higiene, acesso à água potável, maior uso de antibióticos, redução das doenças infecciosas nos primeiros anos de vida são fatores para aumento da prevalência das doenças alérgicas e da asma, pois estes fatores interferem na maturação do sistema imune inato, favorecendo uma resposta predominantemente alérgica com Ta2.

Estudos experimentais em animais revelam o aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 na asma, além da redução dos níveis de TGF- $\beta$  e IL-10 (Takeda, Shiraishi, Ashino, *et al.*, 2015).

Os eosinófilos apresentam um importante papel pró-inflamatório na patogênese da asma. Eles ficam aumentados em número tanto no sangue periférico quanto nas secreções das vias aéreas e estão relacionados com a gravidade da doença e hiper-responsividade brônquica. Os eosinófilos estão diretamente relacionados ao dano epitelial, contração da musculatura e ativação com aumento da sobrevivência dos mastócitos nas vias aéreas inferiores, determinando o broncoespasmo. Já na fase de remodelamento do tecido pulmonar afetado, os eosinófilos têm papel na produção de matriz extracelular e secreção de muco, ativação e proliferação de fibroblastos, miofibroblastos, e proliferação da camada muscular (Trivedi & Lloyd, 2007).

Esse remodelamento ocasiona perda funcional total ou parcial do tecido acometido.

A eosinofilia na asma é determinada por vários fatores, como pela ação da IL-5 via resposta Ta2, e na ausência desta, pela imunidade inata ou resposta do tipo Ta1.

Os eosinófilos presentes nas vias aéreas são mais dependentes do GM-CSF para sua sobrevivência e função do que da IL-5, uma vez que os eosinófilos nas vias aéreas perdem o receptor para IL5 $\alpha$  (rIL-5 $\alpha$ ). Na asma, o papel dos eosinófilos envolve a participação de mediadores que podem desencadear: a agressão e inflamação nas vias respiratórias inferiores, o remodelamento tissular pulmonar pela indução da diferenciação de miofibroblastos e a imunorregulação. A produção da neurotoxina derivada de eosinófilos, quimiotática para as células dendríticas, contribui para a persistência da inflamação alérgica; a produção da proteína básica principal, antagoniza os receptores muscarínicos acarretando hiper-reatividade das vias aéreas; a produção de TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , fator de crescimento de ligação a heparina epidérmico, fator de crescimento derivado de plaquetas  $\beta$ , fator de crescimento endotelial vascular, IL-4, atuam no remodelamento pulmonar (Alam & Busse, 2004; Takeda, Shiraishi, Ashino, *et al.*, 2015).

Observou-se que as alterações morfológicas dos eosinófilos, que caracterizam seu estado de ativação, como emissão de pseudópodes simples ou múltiplos, vacúolos citoplasmáticos, liberação de grande quantidade de grânulos e com espraiamento, podem diferenciar pacientes em crise de asma com apresentações clínicas leve e moderada, daqueles pacientes em crise aguda de asma grave, demonstrando seu papel fundamental no desenvolvimento da asma e que seu estado de ativação tem relação com a gravidade da doença (Muniz-Junqueira, Barbosa-Marques & Junqueira, 2013).

## 1.2 Parasitoses intestinais

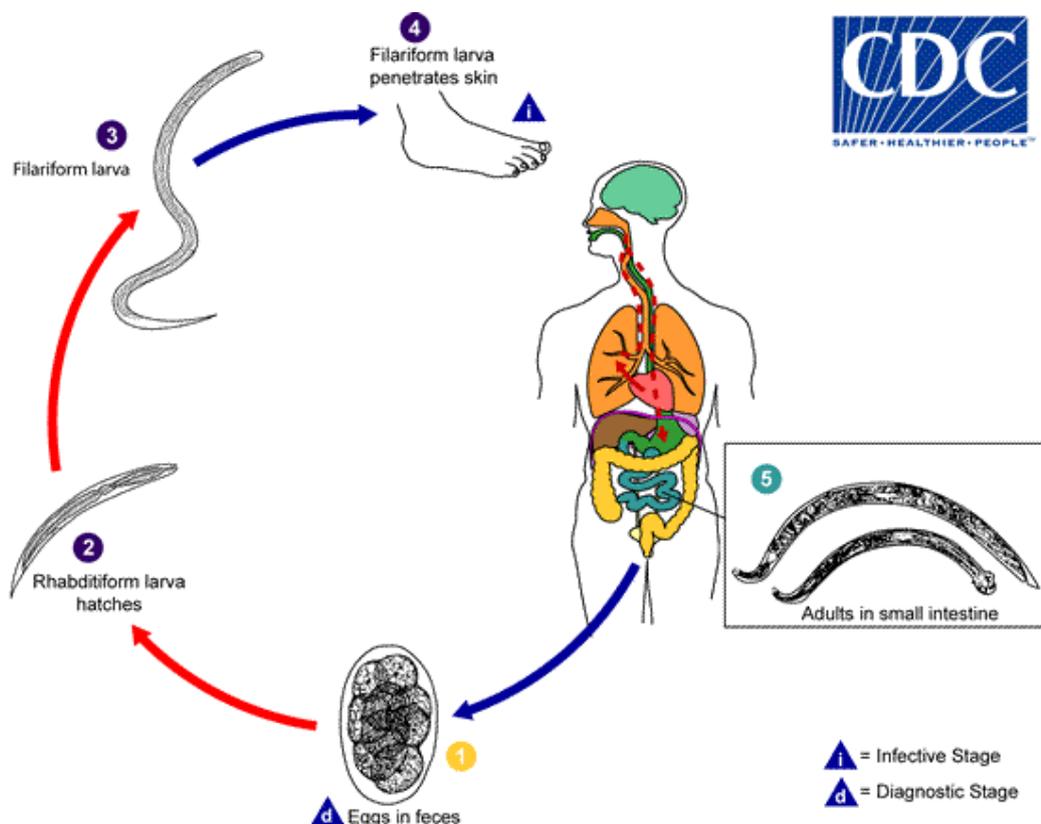
Vários são os helmintos causadores de doenças em seres humanos. Já existe, há mais de 70 anos, relatos do papel dos eosinófilos na morte e agressão dos helmintos, por efeito citotóxico direto. Diversos estudos *in vitro* sugerem a hipótese de que a ação dos eosinófilos é devida aos grânulos de proteínas (como as metaloproteinases, proteínas catiônicas eosinofílicas, neurotoxina derivada de eosinófilo, peroxidase eosinofílica) e presença de anticorpos e/ou complemento, levando à morte ou inviabilidade do parasito (Shamri, Xenakis & Spencer, 2011; Hayes, Bancroft & Grencis, 2004).

### 1.2.1 Ancylostomidae

A família Ancylostomidae (Farthing, 1993; Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011; Traub, 2013) é uma das principais famílias de nematoda e é responsável pela ancilostomose. Há mais de 100 espécies de ancilostomídeos, sendo que apenas três são agentes das ancilostomoses humanas: *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* e *Ancylostoma ceylanicu*.

Os três tipos de parasitas possuem ciclos de vida similares, não dependendo de hospedeiros intermediários na infecção de humanos (ver Figura 1). Os ovos dos ancilóstomos, produzidos por fêmeas adultas no intestino delgado humano, são expelidos nas fezes. No meio externo, no solo e em condições favoráveis (boa oxigenação, alta umidade - igual ou superior a 90% - e temperatura elevada), os ovos dão origem a larvas do tipo rabditóide (L1) que eclodem. Em seguida, essas larvas se desenvolvem até atingirem a forma filarióide (L3), a qual é infectante para o hospedeiro através de contato com a pele, conjuntiva e mucosas (modo ativo), ou passivamente, por via oral. Na infecção ativa, os parasitos alcançam a corrente sanguínea e/ou linfática, sendo levados para o coração, de onde migram para os pulmões. Através dos pulmões, enquanto mudam para forma L4, eles migram para a traqueia, laringe e faringe, quando, então, são

deglutidas e chegam ao intestino delgado. No intestino delgado, os parasitos se desenvolvem até a fase adulta (L5). Nesta fase, há diferenciação sexual e a cópula, com a produção de novos ovos. O processo da penetração das larvas filarióides L3 pela pele até a eliminação de ovos pelas fezes pode durar entre 35 e 60 dias para o *A. duodenale*, de 42 a 60 dias para o *N. americanus* e de 21 a 35 dias para o *A. ceylanicum* (Neves, de Melo, Linardi, et al., 2011; Looss, 1911).



**Figura 1:** Ciclo de vida dos parasitos da família Ancylostomidae. Fonte: CDC (Center for Disease Control and Prevention) dos EUA.

**Epidemiologia:** como mencionado anteriormente, os ovos dos parasitos Ancylostomidae dependem de boa oxigenação e altas umidade e temperatura para se desenvolverem, o que é comum em algumas localidades com clima temperado ou tropical. Assim, o *Ancylostoma duodenale* é encontrado na África, Ásia, Austrália e em partes da sul da

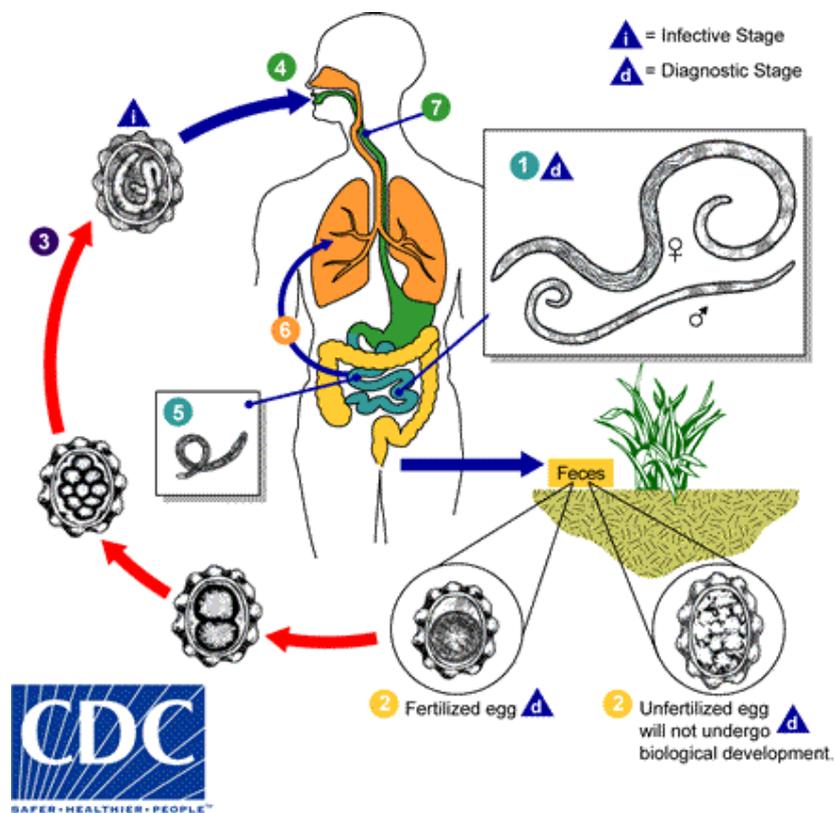
Europa. O *Necator Americanus* predomina na América Central e América do Sul, bem como em algumas localidades no Sudoeste da Ásia, do Pacífico e na Nigéria (Farthing, 1993). A ancilostomose ocorre com maior frequência em crianças com mais de seis anos, adolescentes e em indivíduos mais velhos, independente de sexo. Os parasitos podem sobreviver nesses hospedeiros por até 18 anos (Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Ascarididae

Os parasitos da família *ascarididae* (Brown, 2005; Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011), popularmente chamados no Brasil de lombriga, são os causadores da doença ascaridíase. Os dois espécimes mais representativos desse grupo são o *Ascaris lumbricoides* e o *Ascaris suum*, os quais parasitam, respectivamente, seres humanos e suínos.

A transmissão do parasito (cujo ciclo está ilustrado na Figura 2) se dá por meio da ingestão de alimentos crus e de água contaminada com ovos embrionados do *Ascaris*. Esses ovos eclodem no intestino delgado e a larva do parasito penetra na mucosa, entrando na circulação sanguínea. Pelo sangue, elas chegam ao fígado e depois ao coração. Deste, passam para os pulmões, seguindo a árvore brônquica e a traqueia até alcançarem a faringe. Lá, elas podem ser expelidas com a expectoração ou engolidas novamente, retornando ao intestino delgado. No intestino delgado, as larvas alcançam maturidade sexual em aproximadamente 60 dias após a infestação e iniciam a cópula. As fêmeas produzem cerca de 200.000 ovos não-embrionados por dia, os quais são expelidos juntos com as fezes. O período de incubação, que vai da ingestão de ovos à defecação de novos ovos, é de 60 a 70 dias, sendo que o parasito adulto pode viver por até dois anos dentro do hospedeiro humano. No ambiente externo, com temperatura entre 25°C e 30°C, umidade mínima de 70% e oxigênio em abundância, os ovos tornam-se embrionados em 15 dias (Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011).

**Epidemiologia:** o *Ascaris lumbricoide* é o helminto mais frequente nos países pobres. Ele está presente em mais de 150 países e territórios, sendo mais comum na Ásia, seguida da África e depois da América Latina. Estima-se que cerca de 30% da população mundial é afetada pelo *A. lumbricoide*. As condições favoráveis para a presença desse parasito envolvem fatores ambientais, sociais, econômicos e culturais; dentre eles, destacam-se as condições climáticas (clima quente e úmido), a ausência de saneamento básico, a alta densidade populacional e hábitos higiênicos inadequados.



**Figura 2:** Ciclo de vida do *Ascaris lumbricoide*. Fonte: CDC

O *Ascaris lumbricoide* é a principal causa de desconforto abdominal, especialmente em crianças, em países em desenvolvimento com áreas de condições sanitárias precárias (Masure, Vlaminc, Wang, *et al.*, 2013). A ascaridíase é uma das parasitoses mais frequentes no Brasil e no mundo. A ascaridíase afeta cerca de 760 milhões de indivíduos no mundo, com

distribuição cosmopolita em vários países. Estudos revelam a estimativa de 1,31 milhões de DALYs (*Disability Adjusted Life Years*) perdidos com a ascaridíase (Betson, Nejsun, Bendall, *et al.*, 2014).

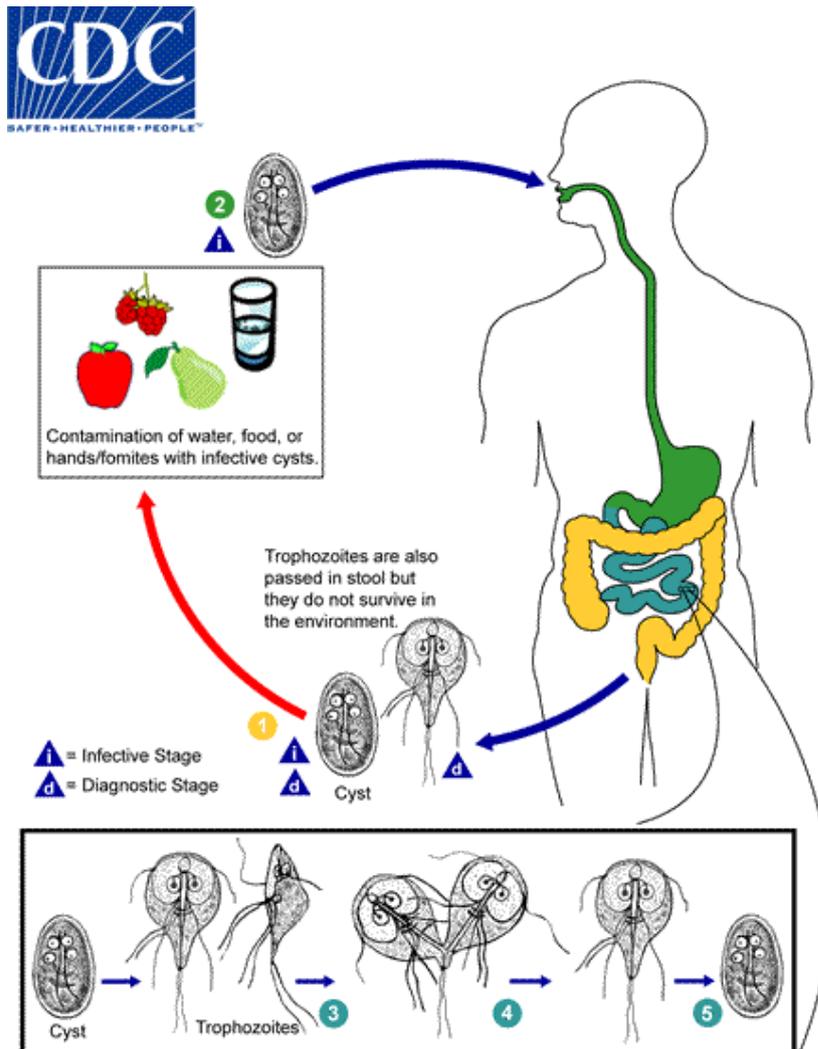
### **1.2.3 Giardia**

A giardíase (Farthing, 1993; Lebowhl, Deckelbaum & Green, 2003) é uma infecção intestinal causada pelo parasito *Giardia lamblia*, também conhecido como *Giardia intestinalis* e *Giardia duodenalis*. A infecção (Figura 3) ocorre pelo consumo de água e alimentos contaminados. É um protozoário flagelado que se encontra nas formas de cisto e de trofozoíto. O trofozoíto é responsável pela doença clínica e os cistos responsáveis pela transmissão. O trofozoíto mede de 10 µm a 20 µm por 5 µm a 15 µm, possui 4 pares de flagelos, 2 núcleos idênticos e um disco ventral, que serve para se alojar nas vilosidades intestinais. Os cistos medem de 11 µm a 14 µm por 7-10 µm, têm forma oval, contém 4 núcleos e liberam 2 trofozoitos cada durante o desencistamento no intestino delgado (Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011). A *Giardia* tem a capacidade de induzir a apoptose dos enterócitos, lesando a barreira epitelial intestinal e encurtando as microvilosidades intestinais dependente de linfócitos T CD8+, linfócitos intraepiteliais. O achatamento das microvilosidades com perda de superfície do duodeno ocasiona deficiência na digestão enzimática (pela redução das dissacaridases, sacarase, lactase, maltase) local e má absorção de nutrientes e eletrólitos (Solaymani-Mohammadi & Singer, 2010; Cotton, Beatty & Buret, 2011).

Os cistos possuem alta resistência a fatores ambientais e altas temperaturas, podem sobreviver na água por 3 meses. Após serem ingeridos e terem passado pelo estômago, ocorre o desencistamento na parte proximal do intestino delgado, originando 2 trofozoitos móveis que se reproduzem por fissão binária. A incubação ocorre de 3 a 25 dias. A maioria dos casos é assintomática, e nos casos sintomáticos pode ocorrer diarreia,

vômito, dor epigástrica, náuseas ou vômito. Em crianças pode ocasionar perda de peso com retardo do crescimento. Os exames parasitológicos de fezes, a endoscopia, exame do fluído duodenal e histologia são eficazes para o diagnóstico da doença. A prevenção consiste no saneamento dos alimentos e água e lavar bem as mãos antes de se alimentar e após as necessidades fisiológicas (Bartelt & Sartor 2015).

**Epidemiologia:** A giardíase é um agente patogênico em todo o mundo e a infecção atinge homens e mulheres com idades de 0 a 5 anos e 31 a 40 anos principalmente (Lebwohl, Deckelbaum & Green, 2003). A prevalência nos países em desenvolvimento, como o Brasil, é de 20 a 30% da população (Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011). Os hospedeiros incluem seres humanos e animais domésticos e selvagens. A giardíase é considerada uma doença negligenciada pela organização Mundial de Saúde (Cotton, Beatty & Buret, 2011).



**Figura 3:** Ciclo de vida da *Giardia*. Fonte: CDC

### 1.2.4 *Hymenolepis*

A himenolepíase é uma infecção intestinal causada por um cestódeo: *Hymenolepis nana*, um parasito que habita o intestino delgado principalmente o íleo e jejuno. Os vermes adultos medem cerca de 3 a 5cm, com 100 a 200 proglotes bem estreitos. Cada um destes possui genitália masculina e feminina, sendo a reprodução assexuada. Os ovos são encontrados nas fezes e a larva cisticercóide pode ser encontrada nas

vilosidades intestinais do próprio homem ou na cavidade geral do inseto hospedeiro intermediário (pulgas e carunchos de cereais). Possui dois ciclos: monoxênico e heteroxênico. No ciclo monoxênico, os ovos são eliminados juntamente com as fezes e após serem ingeridos por mãos ou alimentos contaminados passam pelo estômago, quando chegam ao intestino delgado onde ocorre a eclosão. Penetram nas vilosidades do jejuno ou íleo, gerando em quatro dias uma larva cisticercóide. Após 10 dias, a larva está madura e sai da vilosidade, desinvaginando-se e fixando-se à mucosa intestinal através do escólex. Cerca de 20 dias depois tornam-se vermes adultos. Esses possuem uma vida curta, pois cerca de 14 dias depois morrem e são eliminados. O ciclo monoxênico confere imunidade prévia e dificulta as superinfecções. Já no ciclo heteroxênico, os ovos presentes no meio externo são ingeridos pelas larvas de inseto e ao chegarem ao intestino desses hospedeiros intermediários, liberam a oncosfera, que se transforma em larva cisticercóide. A criança pode acidentalmente ingerir um inseto contendo larvas cisticercóides que ao chegarem no intestino delgado, desinvaginam-se, fixam-se à mucosa e 20 dias depois já são vermes adultos (Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011).

**Epidemiologia:** A himenolepíase é cosmopolita, ocorrendo com mais frequência nos países tropicais. Atinge mais de 20 milhões de pessoas. A incidência é 2 a 10 vezes mais alta na faixa etária pediátrica que entre adultos e verifica-se aumento dos 2 a 8 anos de idade, com declínio gradual a partir de então, tornando-se rara após os 20 anos (Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011).

**i** = Infective Stage  
**d** = Diagnostic Stage

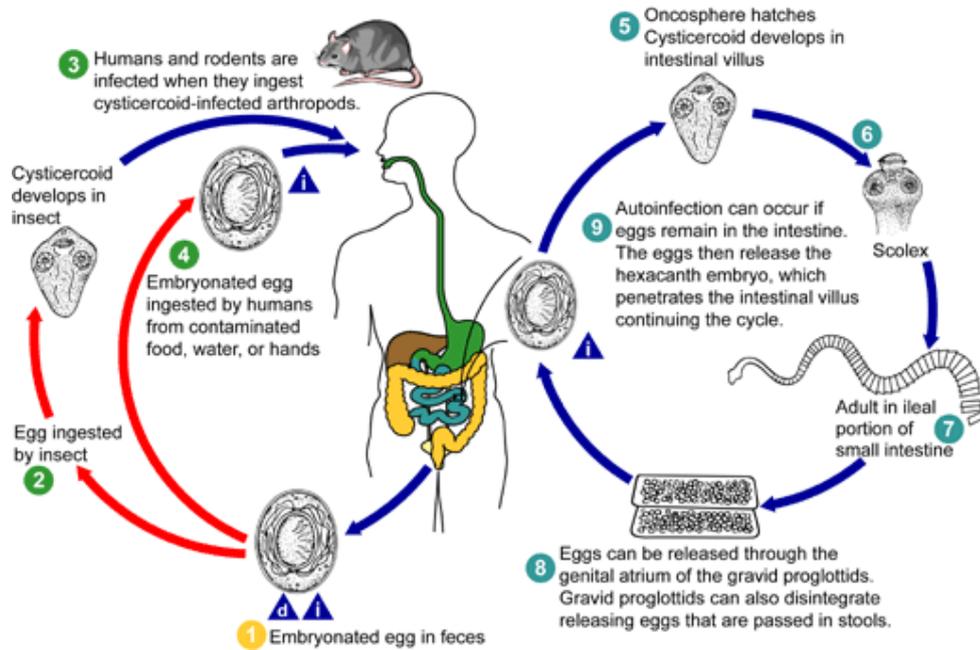


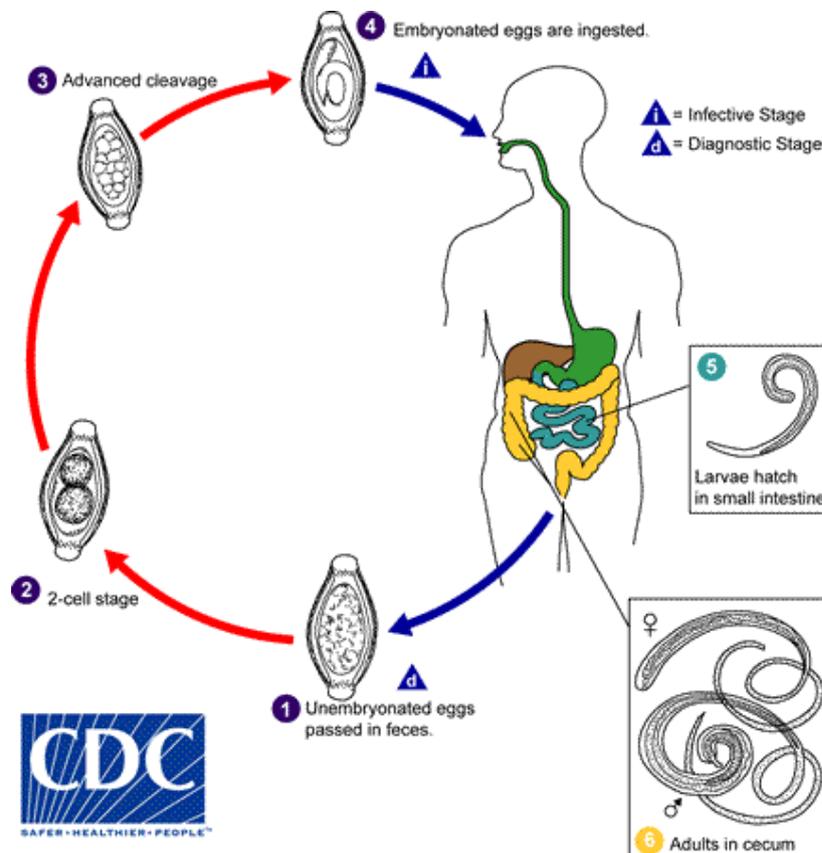
Figura 4: Ciclo de vida *Hymenolepis nana*. Fonte: CDC

### 1.2.5 *Trichuris*

A tricuriase é uma infecção causada pelo *Trichuris trichiura*, um parasito nematódeo que habita o intestino grosso dos indivíduos infectados. Os vermes adultos apresentam uma forma semelhante a um chicote, sendo a reprodução sexuada e os ovos liberados nas fezes. A fêmea libera de 3 mil a 20 mil ovos por dia podendo parasitar o ser humano durante 2 a 3 anos. A contaminação ocorre pela ingestão dos ovos que contaminam a água e os alimentos, principalmente em locais onde não há saneamento básico. A larva no ovo recém-eliminado se desenvolve no ambiente para se tornar infectante. O período de desenvolvimento do ovo depende das condições ambientais como temperatura de 34°C e a liberação ocorre em 13 dias. Após a ingestão dos ovos, eles conseguem atravessar o estômago e eclodem ao chegar no intestino delgado, liberando as larvas do parasito. As

larvas eclodem através de um dos poros presentes nas extremidades do ovo. Após cerca de 3 meses, as larvas se tornam vermes adultos e migram para o intestino grosso, onde habitarão definitivamente (Farthing, 1993; Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011).

**Epidemiologia:** A tricuriase ocorre principalmente em países subdesenvolvidos e com condições precárias de higiene, apresentando uma prevalência de aproximadamente 15% da população mundial. A infecção atinge homens e mulheres, sendo a incidência maior em crianças na fase escolar, diminuindo em jovens e permanecendo quase inexistente em adultos (Neves, de Melo, Linardi, *et al.*, 2011).



**Figura 5:** Ciclo de vida *Trichuris trichiura*. Fonte: CDC

### **1.3 Mecanismos de defesa contra os parasitos intestinais**

Nas helmintíases, os antígenos do parasito estimulam uma intensa resposta Th2, com produção de IL-4 e IL-5, que induzem à síntese de IgE e ativação dos eosinófilos, respectivamente. A eosinofilia, com finalidade de destruir as larvas e helmintos, geralmente é detectada no período inicial das parasitoses, antes dos vermes se tornarem adultos (Shamri, Xenakis & Spencer, 2011; Masure, Vlamincq, Wang, *et al.*, 2013).

Em estudos experimentais com modelos suínos infectados por *Ascaris suum* (Masure, Vlamincq, Wang, *et al.*, 2013), foi demonstrado o efeito tóxico dos eosinófilos. Na presença das larvas dos vermes e do soro de animais imunizados, foi observada a liberação de espécies reativas do oxigênio *in vitro* pela desgranulação dos eosinófilos. Houve redução do número de larvas capazes de migrar no hospedeiro, caracterizando uma resposta protetora para o hospedeiro.

Esse papel de defesa dos eosinófilos foi também descrito em outros estudos com helmintos, *in vitro*, observando-se redução da sua viabilidade pelos eosinófilos (Hogan, Rosenberg, Moqbel, *et al.*, 2008). Outros estudos mostraram alteração na produção de IL-5 ou IL-4 e sugerem a necessidade de novas pesquisas para melhores estratégias terapêuticas nas patologias com desregulação dos eosinófilos (Rosenberg, Dyer & Foster, 2013).

### **1.4 Papel da imunidade inata e adquirida na defesa contra os parasitos intestinais**

A resposta imune intestinal tem importância fundamental para diferenciação pelo organismo entre nutrientes, antígenos próprios e não próprios, micro-organismos comensais e simbiontes de micro-organismos patogênicos e dos vermes. Provavelmente, a resposta imune adaptativa na região intestinal foi a primeira a ser desenvolvida pelos seres vertebrados. O epitélio intestinal atua como uma barreira e pode ser uma fonte inicial de

citocinas para desencadeamento da resposta imune (Mishra, Palma, Bleich, *et al.*, 2014).

Os estudos sobre a resposta imune nas parasitoses intestinais em seres humanos geralmente são conduzidos pela análise de sangue periférico em virtude da dificuldade na realização de biópsias intestinais. As infecções por helmintos desencadeiam a liberação de citocinas e ativação de células do padrão Th2 semelhantes em diferentes espécies de parasitos (*Necator* e *Ancylostoma*, *Trichuris*, *Ascaris* ou *Cestoda*) com resposta imune tanto inata quanto adaptativa (Salgame, Yap & Gause, 2013; Mishra, Palma, Bleich, *et al.*, 2014; Hayes, Bancroft & Grencis, 2004).

A presença de produtos secretados e excretados (SE) pelos helmintos estimulam e direcionam as células apresentadoras de antígeno. Dentre essas células, as células dendríticas ativadas e outras células da resposta imune inata migram da lâmina própria e das placas de Peyers pelos vasos linfáticos para os linfonodos mesentéricos, onde ocorre estímulo para a resposta imune adaptativa com desvio para o padrão Th2 e Treg. Há supressão da ativação de células e produção de citocinas do tipo Th1 e Th17 (Salgame, Yap & Gause, 2013; Mishra, Palma, Bleich, *et al.*, 2014).

O dano tecidual determinado pela presença e infecção por helmintos no hospedeiro induz a liberação das citocinas IL33, IL25 e linfopietina estromal tímica (TSLP) que estimulam os eosinófilos, basófilos, células Th2 e células linfóides inatas tipo 2 (ILC2) a também produzirem as citocinas do padrão Th2 - IL5 e IL13 – direcionando os macrófagos para a via alternativa M2 e concomitantemente suprimindo a via clássica dos macrófagos, padrão M1 (Li & Hendriks 2013; Hams & Fallon 2012). Os eosinófilos e basófilos ativados produzem inicialmente a IL4 (Salgame, Yap & Gause, 2013; Mishra, Palma, Bleich, *et al.*, 2014). Eosinófilos agrupados podem ser encontrados ao redor dos vermes e de suas larvas no organismo. Observa-se também o aumento do número de mastócitos desgranulados (Hayes, Bancroft & Grencis, 2004; Martinez & Gordon, 2014).

Observa-se na fase aguda da infecção por helmintos a produção de IL-10, principalmente pelas células T, os macrófagos são ativados pela via

alternativa M2, há marcada eosinofilia e níveis elevados de IgE específica aos antígenos parasitários. A eosinofilia ocorre tanto no sangue quanto nos tecidos e imobilizam ou destroem os parasitos. O nível elevado de IgE específica atua como fator relevante para aumentar o recrutamento de eosinófilos para o local da agressão (Mishra, Palma, Bleich, *et al.*, 2014; Salgame, Yap & Gause, 2013; Lynch, Hagel, Palenque, *et al.*, 1998).

Os macrófagos M2 determinam a liberação das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$  com aumento na expressão de arginase-1, promovem a cicatrização de feridas e atuam na resistência contra helmintos. Já as citocinas pró-inflamatórias, que são liberadas pelos macrófagos M1 com elevada produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, conferem capacidade efetora contra patógenos intracelulares (Salgame, Yap & Gause, 2013; Mishra, Palma, Bleich, *et al.*, 2014).

A carga genética de cada organismo, associada aos fatores ambientais, determina a resistência ou susceptibilidade às verminoses com cargas parasitárias altas ou baixas e a possibilidade da cronicidade da infecção.

Em observações *in vitro*, as células de defesa do hospedeiro, os neutrófilos e os eosinófilos apresentam a capacidade de matar as larvas de helmintos (Hayes, Bancroft & Grencis, 2004).

A resposta na fase tardia da infecção, após repetidos períodos de agressão, inicia-se com uma adaptação entre o hospedeiro e o parasita, em que a migração larvária é mínima, mantendo a infestação parasitária (Salgame, Yap & Gause, 2013; Mishra, Palma, Bleich, *et al.*, 2014).

O estímulo para síntese de anticorpos policlonais da classe IgE, que resulta na elevação da IgE sérica total em indivíduos com infecção parasitária intestinal por helmintos, pode ocasionar a supressão da resposta alérgica devido à redução na produção de IgE específica contra alérgenos (Lynch, Hagel, Palenque, *et al.*, 1998). Isso ocorre devido a alternativamente, a IgE policlonal se ligar aos receptores de alta afinidade dos mastócitos e dos basófilos, evitando a ligação entre esses e a IgE específica contra alérgenos, impedindo a desgranulação celular dos

mesmos. Essa ação supressora pode contribuir para a redução das doenças alérgicas em populações parasitadas (Lynch, Hagel, Palenque, *et al.*, 1998). A tolerância aos alérgenos ambientais pode ser provocada tanto por reação cruzada antígeno-específico destes e do parasito após exposição aos helmintos, quanto não específica via secreção de imunomoduladores, como a IL10 e o TGF- $\beta$ , marcantes nas infecções crônicas por helmintos (Cooper, 2004).

Já a reatividade cruzada com estímulo para uma atividade inflamatória alérgica e quadro de asma pode ocorrer em indivíduos atópicos (história de asma alérgica ao ácaro) durante exposição aos helmintos em virtude das tropomiosinas, proteínas de superfície dos invertebrados – ácaros, baratas, crustáceos, ascaris – possuírem sequências de aminoácidos semelhantes, e funcionarem como antígenos compartilhados (Arruda, Vailes, Virginia, *et al.*, 2001).

As infecções por helmintos podem atuar ativando populações de células imunorregulatórias e do padrão Ta2 e desencadeando um papel supressor ou de controle sobre agressões autoimunes e doenças inflamatórias. Estudos experimentais com inoculação de ovos de helmintos ou produtos destes em indivíduos com manifestações autoimunes ou inflamatórias avaliam o benefício com essa terapêutica (Weinstock & Elliott, 2013). Pesquisas revelam que a erradicação das parasitoses por helmintos pode alterar tanto a capacidade de defesa contra micro-organismos quanto propiciar o aumento na incidência e prevalência de doenças autoimunes e doenças inflamatórias (Salgame, Yap & Gause, 2013; Weinstock & Elliott, 2013).

Em modelos experimentais murinos foi possível demonstrar um fator protetor contra alergias determinado pela infecção com helmintos; a transferência de certas células do sistema imune regulatório de camundongos parasitados foi capaz de agir como fator protetor mesmo na ausência de infecção prévia pelos parasitos; e um antígeno proteico manipulado e proveniente do helminto foi capaz de bloquear a via Ta2 da resposta atópica. Essas descobertas sugerem possibilidades de tratamento

das alergias sem a necessidade de infectar o organismo com os parasitos (Lambrecht & Hammad, 2014; McSorley, Blair, Smith, *et al.*, 2014).

A resposta contra micro-organismos unicelulares é principalmente do padrão Ta1, com elevação da IL-12, IL-23, INF- $\gamma$  e IL-17. Os fagócitos mononucleares são importantes células na defesa do organismo contra a *Giardia* (Hill & Pearson, 1987). Os monócitos, macrófagos e granulócitos atuam também na destruição dos trofozoítos por meio de reações de citotoxicidade anticorpo-dependentes (Kohli, Bushen, Pinkerton, *et al.*, 2008; Solaymani-Mohammadi & Singer, 2010; Stark, Barratt, Van Hal, *et al.*, 2009). Observa-se maior prevalência de giardíase crônica em pacientes com hipogamaglobulinemia como a imunodeficiência comum variável e a agamaglobulinemia ligada ao X (doença de Bruton) (Stark, Barratt, Van Hal, *et al.*, 2009).

O indivíduo inicialmente imunocompetente já primo-infectado por giardia apresenta redução no risco para reinfecção ou menor risco para apresentar sintomatologia da giardíase em infecções subsequentes (Kohli, Bushen, Pinkerton, *et al.*, 2008; Solaymani-Mohammadi & Singer, 2010).

Estudos experimentais em animais observaram a cura pela resposta T dependente com aumento da relação células T auxiliares/supressores na lâmina própria do jejuno de camundongos infectados com *Giardia*. O padrão de resposta efetivo é do tipo Ta1 (CD25+CD26 que produzem INF- $\gamma$ ). Em pesquisas simulando a supressão das células CD4, foi possível identificar a persistência da infecção e aumento na eliminação de cistos (Bartelt & Sartor, 2015; Martinez & Gordon, 2014; Solaymani-Mohammadi & Singer, 2010).

Nas infecções por *Giardia*, há indução de genes para apoptose dos enterócitos após contatos destes com os trofozoítos pela ativação das caspases. Ocorre a perda da integridade da barreira epitelial intestinal e atrofia da mesma (Cotton, Beatty & Buret, 2011).

## 1.5 Justificativa

Tem sido observado, por dados epidemiológicos, redução do número de infecções por helmintos e aumento do número de doenças alérgicas ou autoimunes em populações de países mais desenvolvidos, e vários estudos têm sugerido que: I) há proteção contra alergias na presença de infecções crônicas por helmintos; II) o tratamento contra nematódeos gastrintestinais aumenta a reatividade cutânea a alérgenos; e III) os vermes podem induzir grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF beta) pelas células T regulatórias, as quais inibem a inflamação alérgica (Carvalho, Bastos & Araújo, 2006; Ponte, Rizzo & Cruz, 2007; Hopkin, 2009; Moreau & Chauvin, 2010; Cardoso, Costa, Almeida, *et al.*, 2012). Vários estudos atuais investigam a possibilidade de tratar as alergias com estímulo imunomodulador de moléculas derivadas de helmintos, induzindo expansão de células T regulatórias (Moreau & Chauvin, 2010).

Outro aspecto intrigante nas duas doenças relaciona-se a pergunta: por que os eosinófilos desempenham funções tão opostas nessas duas doenças? Sendo protetora nas parasitoses, mas determinante de imunopatogenia nos processos alérgicos. Tem sido demonstrada uma relação entre o estado de ativação dos eosinófilos e a gravidade da asma. Será que é o estado de ativação em que se encontram os eosinófilos que determinará se haverá proteção ou patogenia? Entretanto, ainda é desconhecido o estado de ativação dos eosinófilos nas parasitoses intestinais.

Há, portanto, a necessidade de maior esclarecimento em relação ao estado de ativação dos eosinófilos comparativamente nessas duas doenças, haja vista que os eosinófilos apresentam importantes funções fisiológicas e fisiopatológicas: I) nas doenças alérgicas e asma, pois contribuem para a fisiopatogenia dessas doenças, corroborando com o dano tecidual e consequentes manifestações alérgicas; II) nas doenças enteroparasitárias, onde os eosinófilos participam na defesa do paciente hospedeiro com

agressão direta às larvas dos parasitas; e III) na associação de asma e parasitoses, que é protetora contra asma.

A análise do estado de ativação dos eosinófilos na asma, nas parasitoses e na associação de ambas poderá esclarecer se há diferenças entre a resposta protetora de defesa antiparasitária e a de agressão aos tecidos nos indivíduos alérgicos, para possibilitar mecanismo de intervenção nas doenças alérgicas, como também propiciar melhor tratamento aos indivíduos parasitados. Isso propiciará um maior entendimento desses mecanismos de resposta imune e possibilitará novas perspectivas de intervenções terapêuticas para os pacientes acometidos.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o estado de ativação dos eosinófilos e as funções dos fagócitos comparativamente em crianças com asma, com parasitoses intestinais e na associação de ambas por meio da:

- Avaliação do estado de ativação dos eosinófilos por parâmetros morfológicos na asma, nas parasitoses intestinais e na associação de ambas, em crianças.
- Avaliação da produção de radicais de oxigênio pelo teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT) na asma, nas parasitoses intestinais e na associação de ambas em crianças.
- Avaliação da capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos, em lâmina, na asma, nas parasitoses intestinais e na associação de ambas, em crianças.

# 3 GRUPOS DE ESTUDO E MÉTODOS

## 3.1 Delineamento experimental

Nesta pesquisa, foi avaliado comparativamente o estado de ativação dos eosinófilos e as funções dos fagócitos em crianças com quadro de asma, de parasitoses intestinais e na associação de ambas. O estado de ativação dos eosinófilos foi avaliado pela observação à microscopia óptica dos parâmetros morfológicos após aderência destas células à lâmina. A capacidade fagocitária dos neutrófilos e monócitos foi analisada pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos e por receptores para opsoninas e pela capacidade de produção dos ânions superóxido pelos fagócitos, avaliado pelo teste do *nitroblue tetrazolium* - NBT.

O diagrama do estudo realizado encontra-se descrito na Figura 6 e Figura 7.

O estudo foi realizado em locais onde havia maior possibilidade de captação de pacientes parasitados:

I - Quadra 12 C do Riacho Fundo II, na população atendida pelo Centro de Saúde 4 Riacho Fundo II –SES/DF no Riacho Fundo II - 2A Etapa Qc 6 Conjunto 16, 1 - Núcleo Bandeirante, Brasília/DF. É nesta área que residem famílias de trabalhadores com catação e reciclagem de lixo. Imagens do local no Anexo 8.

II – Cidade Estrutural e Chácara Santa Luzia/Estrutural, população atendida pelo Centro de Saúde da Estrutural, Posto de Saúde, Área Especial 01 - Estrutural – Guará, Brasília/DF. É a região administrativa do DF com maior densidade populacional proporcional de crianças, 40% de pessoas entre 0 a 14 anos (a média do DF é de 25% para mesma faixa etária). A área da Chácara Santa Luzia constitui área de aglomerado subnormal com

1,5 mil barracos em locais inadequados, sem coleta de lixo ou saneamento básico adequados. Fotos da localidade no Anexo 7.

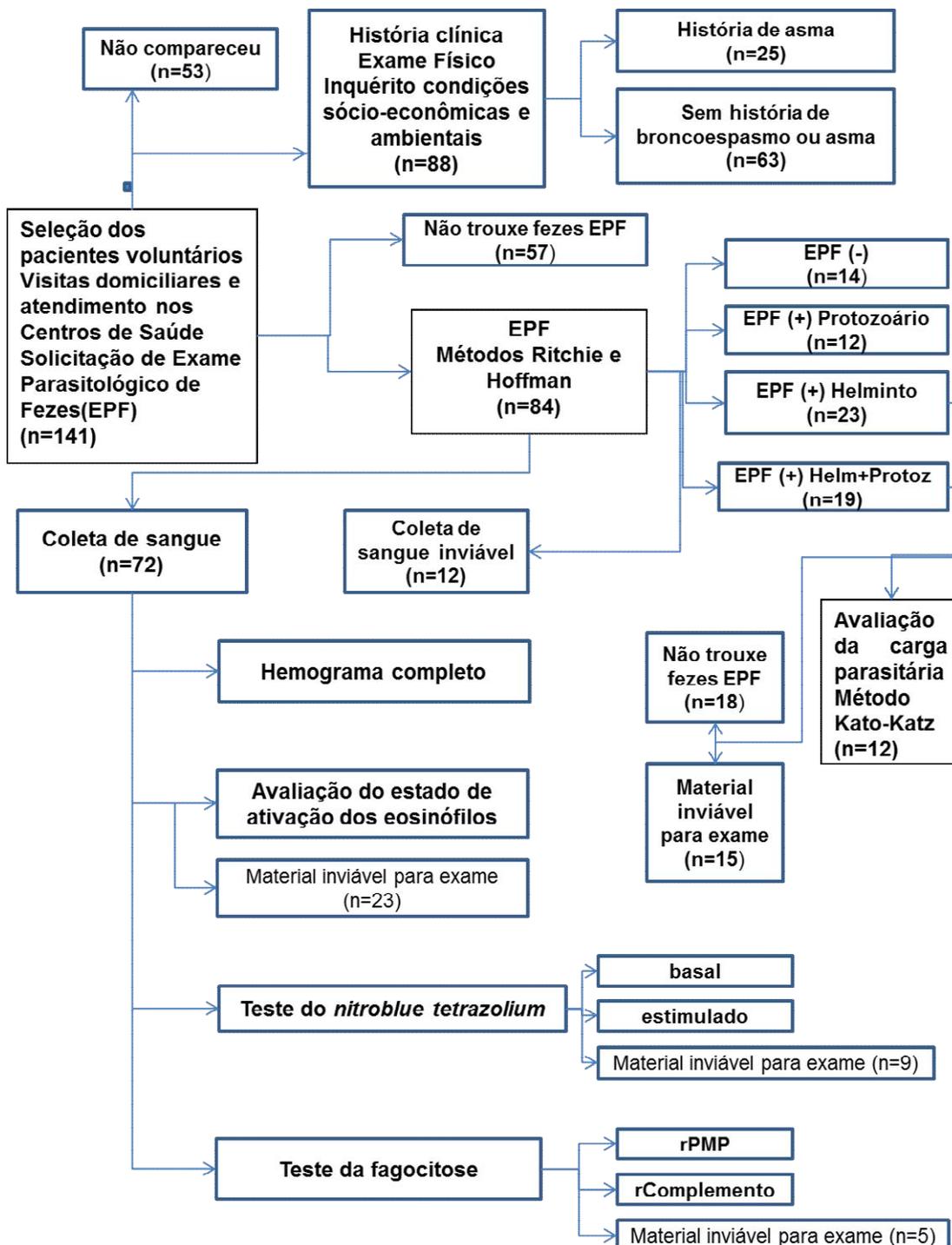
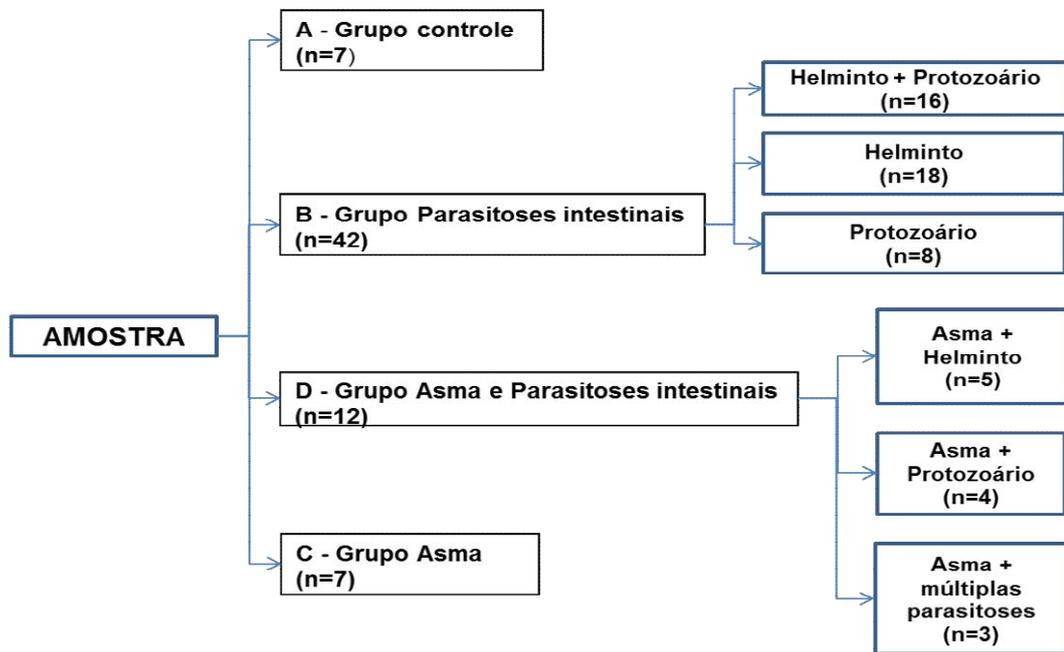


Figura 6: Diagrama de estudo da pesquisa



**Figura 7:** Diagrama da amostra por grupo de pesquisa

### 3.2 Tipo de estudo

Esta pesquisa foi um estudo transversal com 68 crianças provenientes das regiões de catadores de lixo e/ou reciclagem no Riacho Fundo II, área de invasão na Chácara Santa Luzia da Cidade Estrutural, em Brasília no Distrito Federal, que são áreas onde vive uma população com precárias condições socioeconômicas e de baixo nível de escolaridade.

Durante toda a realização desta pesquisa, foram observadas e seguidas as normas éticas para pesquisa científica em seres humanos estabelecidas pela Declaração de Helsinki atualizada (WMA, 2008) e pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2012).

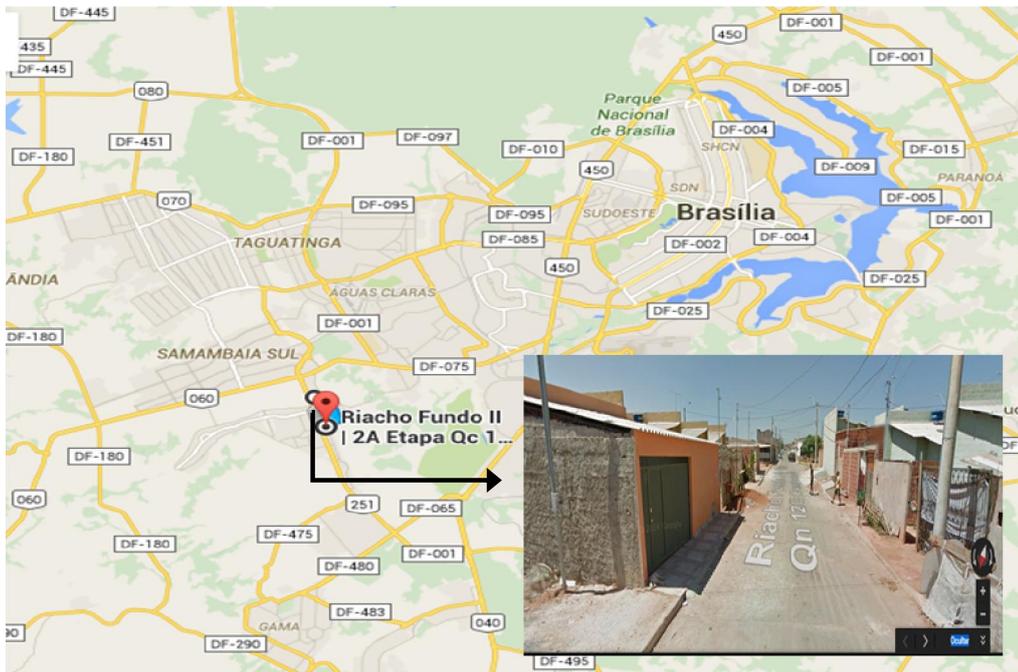
O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da FEPECS - SES/DF conforme Anexo 1. O termo de concordância da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília encontra-se no Anexo 2.

O estudo foi realizado em comunidade atendida pelo SUS, pela Secretaria de Saúde do Distrito Federal nas localizações: Foram estudadas 38 crianças moradores da Quadra 12 C do Riacho Fundo II, população atendida pelo Centro de Saúde nº 04 – Riacho Fundo II. Endereço: QC 06 Conjunto 16 Lote 01/AE 01 – Riacho Fundo II, Brasília/DF (Figura 8); e 30 crianças moradores da Cidade Estrutural e Chácara Santa Luzia/Estrutural, população atendida pelo Posto de Saúde 04 da Cidade Estrutural. Endereço: Área Especial 03 - Setor Central, Vila Estrutural, Guará, Brasilia/DF. (Figura 8)

Nas referidas unidades de saúde, as crianças foram examinadas e o material coletado foi levado para análise respectivamente: o sangue no laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e no laboratório do Hospital da Criança de Brasília José Alencar; já as fezes foram examinadas no laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Para as crianças em que foi necessário a repetição do exame de fezes, a nova coleta foi realizada em suas próprias residências.



**Figura 8:** Mapa do Distrito Federal mostrando a localização das residências dos pacientes estudados provenientes da Cidade Estrutural e Chácara Santa Luzia. Fotos no Anexo 7.



**Figura 9:** Mapa do Distrito Federal mostrando a localização das residências dos pacientes estudados provenientes do Riacho Fundo II. Fotos no Anexo 8.

### **3.3 Grupos de estudo**

Foram selecionadas para participar da pesquisa 141 crianças entre 2 e 13 anos de idade, sendo 71 do sexo masculino e 70 do sexo feminino. Foram critérios de inclusão no estudo crianças entre 2 e 13 anos de idade que apresentaram presença de exame parasitológico de fezes positivo para helmintos e/ou ser portadora de asma, dentre as crianças que moravam na área de estudo. De acordo com os achados na história clínica, exame físico e exame parasitológico de fezes (EPF), foram incluídas no estudo os seguintes grupos de pesquisa: 1) pacientes com EPF negativo e diagnóstico de asma controlada sem tratamento profilático; 2) pacientes com EPF positivo para parasitoses intestinais e ausência de história clínica de asma ou episódios de broncoconstrição; 3) pacientes com EPF positivo para parasitoses intestinais e diagnóstico de asma controlada sem tratamento profilático; 4) crianças sem asma e com EPF negativo, constituíram o grupo controle.

As crianças da amostra portadoras de asma foram diagnosticadas conforme as Diretrizes para Manejo da Asma da Sociedade Brasileira de Pneumologia (SBPT, 2012) e Global Initiative for Asthma (FitzGerald & Reddel, 2015), com presença de um ou mais sintomas como sibilância, tosse, dispneia ou dor torácica, e melhora espontânea ou pelo uso de medicações como broncodilatadores beta-adrenérgicos pela via inalatória e anti-inflamatórios corticosteroides pela via oral. Foram incluídas no estudo as crianças acima de 2 anos de idade para adequar à definição diagnóstica de asma. No momento do presente estudo, nenhuma criança estava com sintomas clínicos de crise asmática e nem em terapêutica medicamentosa para asma.

Foram critérios de exclusão do estudo os pacientes com diagnóstico prévio de doenças ou uso de medicamentos, exceto os para o tratamento da asma nos referidos grupos, que pudessem influenciar o sistema imunológico como: as neoplasias; a diabetes; a síndrome de Down ou outras síndromes genéticas; as doenças de depósitos ou erros inatos do metabolismo; as

doenças da tireoide; a doença celíaca; a fibrose cística; as doenças autoimunes como a artrite reumatoide juvenil, o lúpus eritematoso sistêmico, a dermatomiosite, dentre outras; as doenças de base renal, cardíaca ou hepática; as doenças pulmonares intersticiais, a displasia broncopulmonar; a tuberculose; a síndrome de imunodeficiência humana adquirida; a hipo ou agamaglobulinemia; a doença de Crohn; ou os pacientes em uso de imunossupressores, uso de corticoide a menos de 15 dias, ou qualquer outra situação clínica que os pesquisadores consideraram que pudesse influenciar o resultado da pesquisa.

Houve exclusão na fase experimental de 16 crianças das quais não foi possível realizar a coleta de sangue ou as amostras de fezes necessárias para diagnóstico parasitológico.

### **3.4 Avaliação clínica inicial dos pacientes e coletas de sangue**

Os pacientes pediátricos de áreas de estudo foram recrutados a partir de visitas domiciliares, com explanação da pesquisa aos responsáveis pelas crianças e entrega dos frascos para coleta das fezes para o EPF, para seleção dos pacientes para o estudo, recrutando crianças com presença de parasitoses intestinais para o presente projeto. As amostras de fezes foram examinadas no laboratório de parasitologia da UnB pelos métodos de Ritchie e Hoffman para diagnóstico parasitológico.

Foram obtidos dados clínicos individuais pela história, exame físico e exames laboratoriais, e dos parâmetros socioeconômicos de cada criança que participou no projeto.

Os pacientes foram examinados clinicamente, as medidas antropométricas utilizadas foram peso e estatura. O peso foi aferido por uma balança digital da marca Omron com capacidade mínima de 0,01 Kg e capacidade máxima de 150 Kg. A altura foi mensurada por uma fita métrica, fixada em superfície vertical plana, lisa sem rodapé, onde a criança permaneceu na posição ereta mantendo a cabeça em ângulo reto.

O responsável por cada criança respondeu a um questionário onde foram avaliados dados da criança, conforme os itens do protocolo de pesquisa no Anexo 3, como a idade, as condições de moradia, a origem da água consumida, as condições sanitárias do ambiente onde vive, o número de habitantes e de cômodos na casa, o nível de escolaridade dos pais, a renda salarial familiar e se os pais/responsáveis tinham com algum tipo de emprego ou estavam desempregados, presença de asma e/ou alergias e se em curso de algum tratamento para tais patologias.

A coleta de sangue foi realizada apenas após os pais ou responsáveis pelas crianças estarem cientes dos procedimentos da pesquisa e terem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido e termo de anuência do menor apresentado nos Anexo 4 e Anexo 5. No dia da coleta de sangue, nenhuma criança estava em vigência de processo infeccioso ao exame clínico.

De cada criança foram coletadas inicialmente 3 amostras de fezes para diagnóstico de exame parasitológico de fezes negativo e pelo menos 2 amostras de fezes com diagnóstico de exame parasitológico de fezes positivo para parasitoses intestinais. Os frascos secos sem conservante, foram entregues na primeira avaliação e em cada contato posterior para recolhimento de amostras, em intervalos de 3 a 4 dias, coletada 2 vezes por semana.

Um volume de 5 - 10 ml de sangue venoso foi coletado em sistema a vácuo, com agulha de coleta múltipla, na região da fossa cubital, com material estéril e descartável, em um frasco heparinizado, um com EDTA e outro sem anticoagulante, para cada criança.

Logo após a coleta, o sangue heparinizado foi levado ao Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da UnB para avaliação do estado de ativação dos eosinófilos, realização do teste de fagocitose em lâmina e do teste do NBT.

Os dois frascos, um com o sangue coletado com EDTA e o outro sem anticoagulante foram levados ao Laboratório de Análises Clínicas do HCB para realização respectivamente do hemograma completo pelo método de

impedância em aparelho automatizado e dosagem de IgE sérica total pelo método de nefelometria pelo Kit da Fysmex.

Os critérios para contraindicações da coleta de sangue foram vigência de crise asmática ou uso de corticoide oral nos últimos quinze dias.

Este trabalho foi elaborado e desenvolvido na ausência de conflitos de interesse.

### **3.5 Protocolo para exame parasitológico de fezes**

A coleta de material para a pesquisa foi orientada aos pais e responsáveis para realizar em três amostras em dias diferentes com intervalos de pelo menos 2 a 3 dias.

No período de 24 horas após a coleta, as fezes recolhidas em visitas domiciliares e nas avaliações clínicas foram levadas ao Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina da UnB, protocoladas e acondicionadas em geladeira destinada para essa finalidade, até finalização do processamento.

Cada uma das amostras de fezes foi analisada por pelo menos 2 técnicas diferentes para pesquisa dos parasitos intestinais.

#### **3.5.1 Método de Ritchie**

Método que permite a identificação de ovos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichiurus trichiura*, *Ancylostomidae*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*. E é realizado pela centrifugação em formol-éter.

Foi feita a diluição de uma porção de fezes em 10 volumes de água limpa ou destilada (2 g de fezes em 20 ml de água), suspendendo-as completamente. Em seguida foi filtrada em gaze dobrada com uso de um funil de vidro ou de plástico, sendo o filtrado recolhido em tubo de centrifugação de 15 ml. A centrifugação foi realizada por 1 min e desprezado o líquido sobrenadante. O sedimento foi suspenso em água, completando o

mesmo volume anterior e centrifugado por 1 minuto. A operação foi repetida até se obter um sobrenadante claro. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado ao sedimento 10 ml de uma solução de formalina a 7,5%. Foi deixado em repouso durante 20-30 minutos e adicionado cerca de 3 ml de éter, o tubo foi fechado com rolha de borracha, misturado, e centrifugado a 800 G durante 1 mi. Os detritos superficiais e os da parede do tubo foram removidos com um bastonete de madeira. Foi desprezado o sobrenadante e o sedimento foi agitado até ficar homogeneizado para o exame ao microscópio. Com uma pipeta capilar foram colocadas 2 gotas do sedimento numa lâmina de microscopia, adicionado uma gota de lugol a 2%, misturado, coberto com uma lamínula e examinado ao microscópio óptico com avaliação de três lâminas de cada amostra (Ritchie, 1948).

### **3.5.2 Método de Lutz ou de Hoffmann, Pons e Janer**

Método de sedimentação espontânea que possibilita a detecção de ovos e larvas de helmintos, além de cistos de protozoários.

Foi realizada a diluição de uma porção de fezes em 2,5 volumes de água limpa ou destilada (2 g de fezes em 5 ml de água), dissolvendo-as completamente. Em seguida foi acrescentado 20 ml de água e a diluição foi filtrada em gaze dobrada com uso de um funil de vidro ou de plástico. Os detritos retidos na gaze foram lavados acrescentado-se mais 20 ml de água e o filtrado recolhido em cálice cônico de 200 ml. No cálice, foi completado o volume com água e mantida a suspensão em repouso por 24 horas. Após esse período, foi desprezado o sobrenadante e o sedimento foi agitado até ficar homogeneizado para o exame ao microscópio. Com uma pipeta capilar foram colocadas 2 gotas do sedimento numa lâmina de microscopia, adicionado uma gota de lugol a 2%, misturado, coberto com uma lamínula e examinado ao microscópio óptico com avaliação de três lâminas de cada amostra (Hoffman, Pons & Janer, 1934).

### **3.5.3 Método de Kato-Katz**

Método quantitativo que permite a quantificação do número de ovos dos helmintos *Ascaris*, *Schistosoma*, *Ancilostoma*, *Trichiurus*, *Taenia*, *Hymenolepis*, *Enterobius* e *Strongyloides*.

Foi retirado uma porção de fezes de aproximadamente 100 mg e colocado sobre um papel absorvente. Aplicado a tela metálica sobre a amostra no papel absorvente e raspado as fezes filtradas com espátula. As fezes filtradas foram depositadas no orifício da placa quantificadora, colocada previamente sobre uma lâmina de vidro identificada. Foi retirado o molde e aplicado uma lamínula de celofane embebida em solução de glicerina e verde malaquita sobre o cilindro do material fecal. Invertido a preparação sobre uma superfície lisa e realizado pressão para distribuição da amostra de fezes uniformemente entre a lâmina e lamínula, evitando extravasamento desse material. A preparação foi deixada em repouso durante 1 h à temperatura ambiente e examinada ao microscópio (Katz, Chaves & Pellegrino, 1972).

A identificação dos ovos de ancilostomídeos pode ser observada até 6 horas após a preparação e para os outros helmintos, a conservação se mantém por mais de um ano.

Foi utilizado o Coprokit Kato-Katz produzido por Campinas Medica, Brasil.

### **3.6 Teste da ativação dos eosinófilos em lâmina**

Para avaliar o estado de ativação dos eosinófilos em lâmina por parâmetros morfológicos nos pacientes pediátricos com parasitoses, asma, associação de ambas e grupo controle, foi utilizado o sangue venoso de cada paciente coletado em sistema a vácuo heparinizado.

Foram distribuídos 40 µL de sangue em cada uma das oito escavações com área de 7 mm de diâmetro cada, na lâmina de microscopia limpa. Realizou-se a incubação dessas lâminas em câmara úmida a 37°C

por 45 minutos para possibilitar a aderência dos fagócitos à lâmina. Após esse período, foram retiradas as células não aderentes (as hemácias, plaquetas e linfócitos) por lavagem da lâmina com solução salina tamponada com fosfato (STF) a 37°C, delicadamente.

Após secagem das lâminas, foi realizada a fixação das células aderidas à lâmina com metanol por 1 min.

Foi então realizada a coloração das lâminas com Giemsa a 10%, com o pH do tampão para coloração de 6,8, por 10 min. Neste pH, ficam melhor evidenciados os grânulos alaranjados característicos dos eosinófilos (Marques, 2003).

As lâminas coradas foram analisadas à microscopia óptica quantificando-se em 200 eosinófilos por lâmina os achados morfológicos: eosinófilos normais; eosinófilos emitindo pseudópodes (com diferencial em únicos ou múltiplos); presença de vacúolos citoplasmáticos; eosinófilos liberando grânulos (com diferencial em pequena, média ou grande quantidade); eosinófilos espriados; eosinófilos em degeneração ou morte celular, presença de grânulos livres de eosinófilos e contato entre eosinófilos e outras células (Marques, 2003).

Para avaliação dos grânulos liberados pelos eosinófilos, foi padronizado como pequena liberação de grânulos a visualização de até 10 grânulos no meio extracelular adjacente em um único lado do eosinófilo. Para classificação de média quantidade estabeleceu-se a presença de 20 grânulos liberados e em pelo menos 2 lados. E foi considerado como grande liberação de grânulos a observação de mais de 20 grânulos extracelulares em mais de 2 lados do eosinófilo.

### **3.7 Teste da fagocitose em lâmina**

Para avaliar a capacidade fagocitária dos monócitos e neutrófilos em lâmina nos pacientes pediátricos com parasitoses intestinais, asma, associação de ambas e grupo controle, foi realizado o teste de fagocitose na

presença de soro fetal bovino ou na presença do plasma fresco de cada paciente. Na presença de plasma fresco, os componentes do sistema de complemento e imunoglobulinas, como IgG, se adsorvem à superfície das leveduras funcionando como opsoninas e facilitando a fagocitose. Nesse caso, a fagocitose ocorre pelos receptores para opsoninas (rOps), ou seja, os receptores para os componentes do complemento (rC) e/ou receptores para a porção Fc da IgG (rFcIgG). Na presença do soro fetal bovino(SFB), a fagocitose ocorre pelos receptores para os padrões moleculares de patógenos (rPMP) presentes na superfície das leveduras.

Foram inicialmente distribuídos nas lâminas de microscopia 40 µL do sangue coletado heparinizado, em cada uma das oito escavações com área de 7 mm de diâmetro cada. O restante do sangue no tubo coletor foi centrifugado para separação do plasma.

Realizou-se a incubação das lâminas em câmara úmida a 37°C por 45 min para possibilitar a aderência dos fagócitos à lâmina. Passado esse período, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2, a 37°C, para retirar as células não aderentes (as hemácias, plaquetas e linfócitos).

Sobre os fagócitos aderidos, foram colocados 20 µL da suspensão de *Saccharomyces cerevisiae*, em Hanks-triz (Gibco), nas proporções de 5 ou 20 leveduras por fagócito. Para avaliar a fagocitose pelos rPMP as leveduras foram incubadas com SFB. Para avaliar a fagocitose pelos receptores para opsoninas, as leveduras foram sensibilizadas com o soro do próprio paciente. As lâminas foram então reincubadas em câmara úmida a 37°C, por 30 min. Após esse tempo, foi realizada a lavagem delicada das lâminas com solução salina tamponada com fosfato para retirar as leveduras não aderidas e/ou não fagocitadas. Foi colocado 1 gota de Hanks-triz com soro fetal bovino a 30% sobre todas as preparações e desprezado o excesso. Após secagem com vento quente, as lâminas foram fixadas com metanol por 1 min e coradas com Giemsa a 10% em tampão para coloração, pH 7,2, por 10 min.

A análise foi realizada em microscópio óptico em objetiva de imersão, em campos representativos de toda a lâmina, contando 200 neutrófilos e 200 monócitos por lâmina para determinação do índice fagocitário. Em um mesmo campo todas as células foram analisadas. Para o cálculo do índice fagocitário foi multiplicado a média do número de leveduras fagocitadas por fagócito pela proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose. A avaliação foi discriminada por neutrófilo e por monócito para cada lâmina.

Anteriormente à técnica acima descrita da fagocitose, foi realizado a lavagem e quantificação das leveduras a partir de 50  $\mu$ L de leveduras do estoque, em um microtubo. As leveduras tinham sido já previamente preparadas para facilitar a adsorção da fração C3 do complemento e de imunoglobulinas, conforme técnica descrita por Lachmann & Hobart (1978). Essa suspensão foi lavada com solução salina tamponada com fosfato - STF- (pH 7,2) por centrifugação 3 vezes por 5 min cada, a 200G. Foi desprezado o sobrenadante, realizada a ressuspensão em STF e a suspensão foi homogeneizada no vórtex antes de cada centrifugação. Após a terceira lavagem, foi novamente ressuspensa em 1 mL de solução STF (pH 7,2). Foi retirado 20 $\mu$ L desta suspensão e diluído com 980  $\mu$ L de solução salina tamponada com fosfato para diluição de 1:50.

A contagem em câmara de Neubauer foi feita nos 4 quadrantes da periferia e no quadrante central da área destinada a contagem de eritrócitos e o número de leveduras presentes na solução de 1000  $\mu$ L foi calculado. As suspensões foram preparadas nas proporções de 5 leveduras por fagócitos (contendo 62.500 leveduras em 20  $\mu$ L) e a 20 leveduras por fagócito, com 250.000 leveduras por 20  $\mu$ L. Em padronização prévia no laboratório foi observado que aderem em média 12.500 fagócitos nas lâminas de 7 mm de escavação.

O soro foi obtido para sensibilização das leveduras pela centrifugação de 1mL de sangue de cada criança em microtubo, por 5 min a 200 G. As leveduras foram sensibilizadas pela incubação da suspensão de leveduras com o soro de cada paciente a 10%, durante 30 min em banho Maria a 37°C. As leveduras não sensibilizadas foram obtidas pela incubação da

suspensão de leveduras com soro fetal bovino a 10% durante 30 min em banho Maria a 37°C.

### **3.8 Teste do *nitroblue tetrazolium***

Para analisar a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos nos pacientes pediátricos com parasitoses intestinais, asma, associação de ambas e em crianças do grupo controle foi realizado o teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT). Neste teste é possível verificar indiretamente a produção de ânions superóxido (Nydegger, Anner, Gerebtzoff, *et al.*, 1973), o qual realiza redução do corante, convertendo o NBT de um composto amarelo e solúvel para um material azul e insolúvel, precipitado no citoplasma das células. A quantificação das células com coloração azul, que reduziram o NBT, tem relação direta com a produção dos radicais de oxigênio pelos fagócitos (Campbell & Douglas, 1997).

Para a realização do teste do NBT, foram colocados 40 µL de sangue em cada uma das oito escavações com área de 7 mm de diâmetro cada, em lâmina de microscopia. Procedeu-se a incubação dessas lâminas em câmara úmida a 37°C por 45 min para permitir a aderência dos fagócitos à lâmina. Em seguida, as células não aderentes (as hemácias, plaquetas e linfócitos) foram retiradas por lavagem da lâmina com solução salina tamponada com fosfato pH 7,2 a 37°C, delicadamente. As células aderidas foram incubadas com 20 µL de solução de NBT a 0,05% em Hanks-triz, em cada escavação, por 20 min em câmara úmida a 37°C.

Os fagócitos foram também estimulados com  $6,25 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas com o soro do próprio paciente, com a finalidade de avaliar a produção de radicais de oxigênio após o estímulo. Essas lâminas foram também incubadas lâminas por 20 min em câmara úmida a 37°C. Terminado esse período, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2, a 37°C e após a última lavagem a lâmina foi recoberta com

Hanks-tris com soro fetal bovino a 30%. Após a secagem das lâminas, a fixação das células aderidas foi feita com metanol por 1 min e em seguida foram contra-coradas com safranina a 0,05% por 5 min, para possibilitar a visualização dos núcleos dos fagócitos.

Os fagócitos presentes nas preparações foram analisados por microscopia óptica, quantificando-se em 200 células o percentual que apresentou redução do NBT. Nas escavações nas quais foram colocadas as leveduras foi analisado o percentual de fagócitos que: a) reduziu o NBT, mas não fagocitou as leveduras; b) fagocitou as leveduras e não reduziu o NBT; c) fagocitou as leveduras e reduziu o NBT; e d) não fagocitou as leveduras nem reduziu o NBT.

### **3.9 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* Prism® (GraphPad Software, USA, 2005).

A distribuição normal ou não das variáveis das amostras foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, anteriormente à aplicação dos testes estatísticos, pelo teste de Bartlett para avaliação da variância das amostras. A comparação entre 3 ou mais grupos com variáveis de distribuição normal foi analisada pelo teste ANOVA e a análise de 3 ou mais grupos com distribuição não normal foi pelo teste de Kruskal-Wallis, seguidos respectivamente pelos métodos de Student-Newman-Keuls ou Dunn para múltiplas comparações entre os grupos. A análise comparativa entre dois grupos com distribuição normal foi feita pelo teste *t student* e quando a distribuição dos dados não foi normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Foi considerado estatisticamente significativo os resultados com  $p < 0,05$ .

Os dados foram representados graficamente pela mediana, quartis e extremos, com identificação dos valores *outliers*, para homogeneidade da representação dos dados.

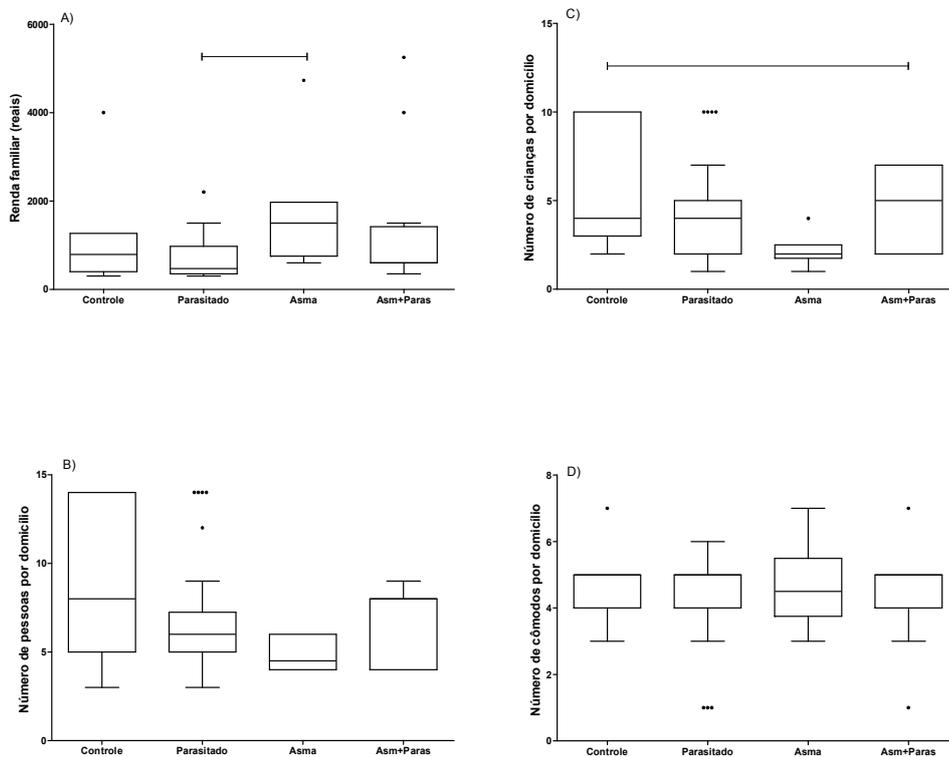
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação socioeconômica das famílias das crianças estudadas.

A renda familiar das crianças parasitadas foi menor do que a renda familiar das crianças asmáticas, sendo as medianas de R\$ 470,00 *versus* R\$ 1.500,00, respectivamente, e as médias de R\$ 691,4 *versus* R\$1.814,00, respectivamente ( $p=0,01$ , teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn, Parasitado < Asma) (Figura 10A).

A diferença entre os grupos no número de crianças por domicílio não mostrou diferença estatística ( $p=0,05$  pelo método de Kruskal-Wallis) (Figura 10C).

O número de pessoas e de cômodos por domicílio não apresentou diferença estatística na análise entre os grupos.



**Figura 10:** Condições socioeconômicas nas famílias das crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses. Em A, renda familiar em reais. Em B, número de pessoas por domicílio. Em C, número de crianças por domicílio. Em D, número de cômodos por domicílio. Em A,  $p=0,01$ , teste de Kruskal-Wallis seguido do método de Dunn. Em B e D,  $p>0,05$ , teste de Kruskal-Wallis. Em C,  $p=0,05$ , teste de Kruskal-Wallis.

Com relação à escolaridade dos pais, no grupo controle haviam 7 (53,8%) pessoas analfabetas, 1 (7,6%) escreve o nome/alfabetizado, 2 (15,3%) tinham o ensino fundamental incompleto, 1 (7,6%) tinha o ensino fundamental completo e 2 (15,3%) tinham o ensino médio incompleto. No grupo parasitado, 19 (24,3%) pessoas eram analfabetas, 8 (10,2%) escrevem o nome/alfabetizados, 42 (53,8%) tinham o ensino fundamental incompleto, 2 (2,5%) tinham o ensino fundamental completo, 6 (7,6%) tinham o ensino médio incompleto e 1 (1,2%) ensino médio completo. No grupo de asma, 2 (16,6%) pessoas tinham o ensino fundamental completo, 3 (25%)

tinham o ensino médio incompleto, 5 (41,6%) tinham o ensino médio completo, 1 (8,3%) tinha o ensino superior incompleto e 1 (8,3%) tinha o ensino superior completo. No grupo de crianças com asma mais parasitoses, 2 (10,5%) pessoas eram analfabetas, 4 (21%) escrevem o nome/alfabetizados, 5 (26,3%) tinham o ensino fundamental incompleto, 1 (5,2%) tinha o ensino fundamental completo, 6 (31,5%) tinham o ensino médio incompleto e 1 (5,2%) tinha o ensino médio completo.

Observamos que o destino das fezes das residências das crianças estudadas foram: a) para o grupo controle: 7 (100%) casas eram providas de esgoto; b) no grupo parasitado: 28 (66,6%) casas eram providas de esgoto, 7 (16,6%) de fossa séptica, 2 (4,7%) de esgoto e evacuações no peridomicílio e 5 (11,9%) de fossa séptica e evacuações no peridomicílio; c) no grupo de crianças com asma: 5 (71,4%) eram providas de esgoto e 2 (28,5%) de fossa séptica; d) no grupo de asma mais parasitoses: 9 (75%) casas eram providas de esgoto, 2 (16,6%) de fossa séptica, 1 (8,3%) de fossa séptica e evacuações no peridomicílio.

Em relação à origem e tratamento da água para ingesta, observamos que: a) no grupo controle, 7 (100%) residências eram providas de água tratada pelo sistema de tratamento de água de Brasília (CAESB), no entanto, não sofriam novo tratamento na própria residência antes de serem utilizadas como água para ingesta; b) no grupo parasitado: em 5 (12,1%) residências a água era proveniente de poço e ingerida sem qualquer tratamento domiciliar, em 32 (76,1%), a água era proveniente da CAESB mas era ingerida sem tratamento domiciliar antes de beber, em 3 (7,3%), a água era proveniente da CAESB e filtrada antes de beber, em 1 (2,4%) a água para uso geral era proveniente da CAESB e água mineral era utilizada para beber; c) no grupo de asma, em 3 (42,8%) residências a água era proveniente da CAESB, mas era utilizada para beber sem qualquer tratamento domiciliar, em 4 (57,1%), a água era proveniente da CAESB e filtrada antes de beber; d) no grupo de asma mais parasitoses: em 9 (75%) a água era da CAESB mas sem ter tratamento domiciliar antes de beber, em 2 (16,6%) a água era da CAESB e

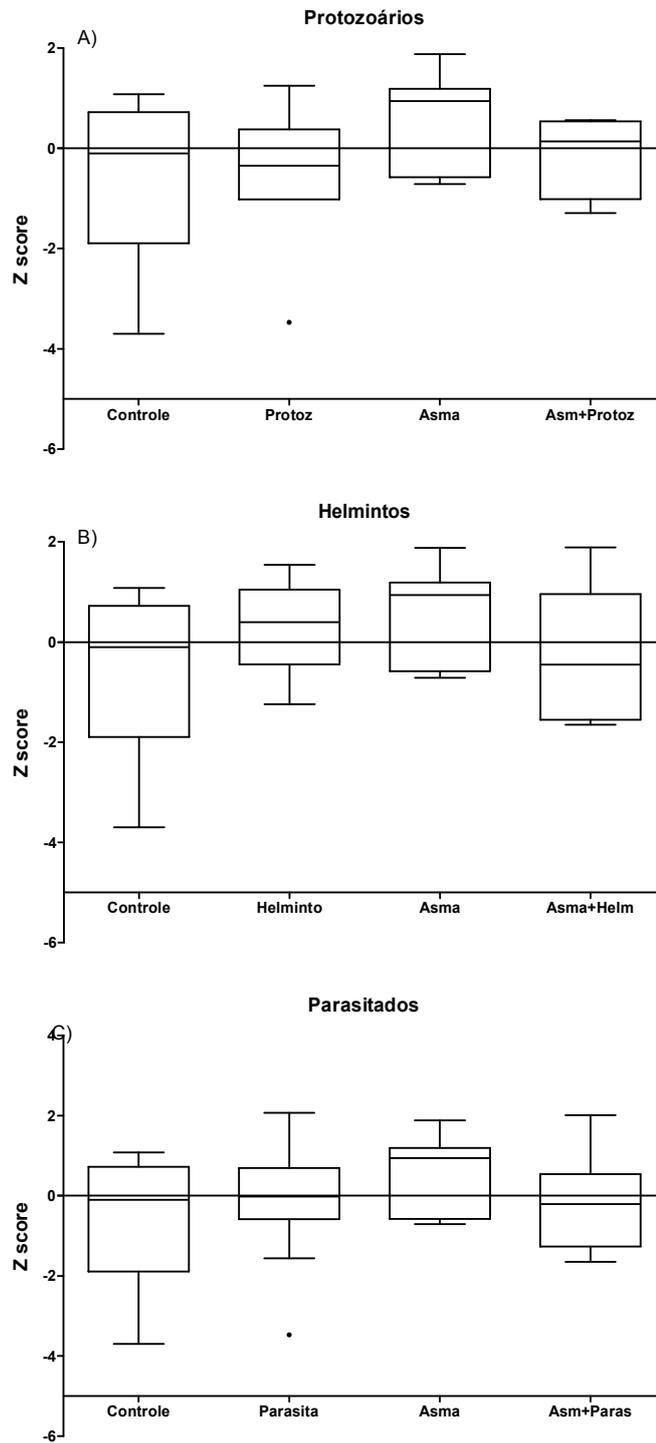
filtrada antes de beber, e em 1 (8,3%), a água era da CAESB e água mineral era utilizada para beber.

## **4.2 Avaliação estado nutricional**

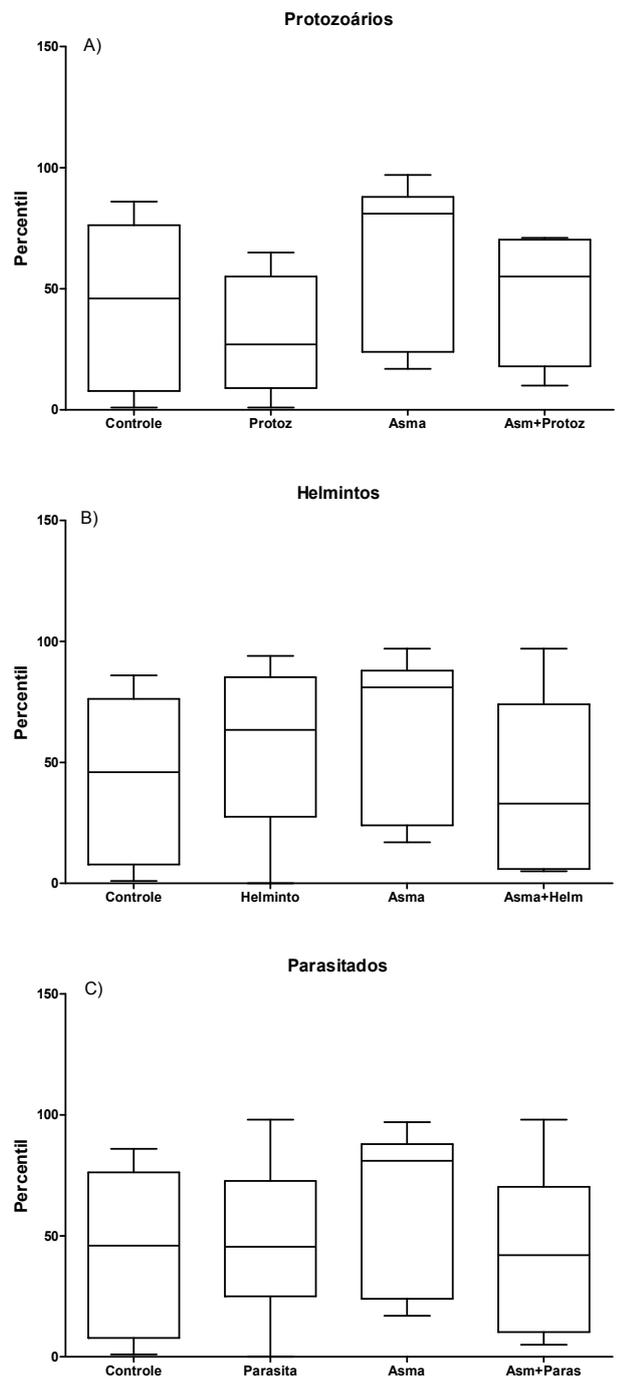
A avaliação do escore Z do IMC para a idade das crianças estudadas nesse trabalho mostrou: a) no grupo controle, a mediana foi de - 0,1; b) no grupo parasitado, a mediana foi de -0,02; c) no grupo parasitado por protozoários, a mediana foi de -0,35; d) no grupo parasitado por helmintos, a mediana foi de +0,4; e) no grupo das crianças asmáticas, a mediana foi de 0,94; f) no grupo de crianças com asma associada a parasitoses intestinais, a mediana foi de -0,2. Apenas 2 crianças apresentaram escore Z abaixo de - 2, sendo 1 no grupo controle e 1 no grupo de crianças parasitadas por protozoários (Figura 11) (W.H.O., 2006).

O percentil do IMC das crianças do estudo mostrou que no grupo controle e grupo parasitado, a mediana estava no percentil 46; no grupo parasitado por protozoários, a mediana estava no percentil 27; no grupo parasitado por helmintos, a mediana estava no percentil 63,5; no grupo de crianças asmáticas, a mediana estava no percentil 81; e no grupo asma e parasitoses intestinais, a mediana do IMC estava no percentil 42 (Figura 12) (W.H.O., 2006).

Não houve diferença estatística na análise do score Z, percentil e IMC entre os grupos estudados.



**Figura 11:** Escore Z das crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas.  $P > 0,05$



**Figura 12:** Percentil do IMC para das crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitoses. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas.  $P > 0,05$ .

### 4.3 Avaliação clínica dos pacientes e exames laboratoriais.

Os parâmetros clínicos e laboratoriais dos grupos amostrais foram avaliados e estão descritos abaixo.

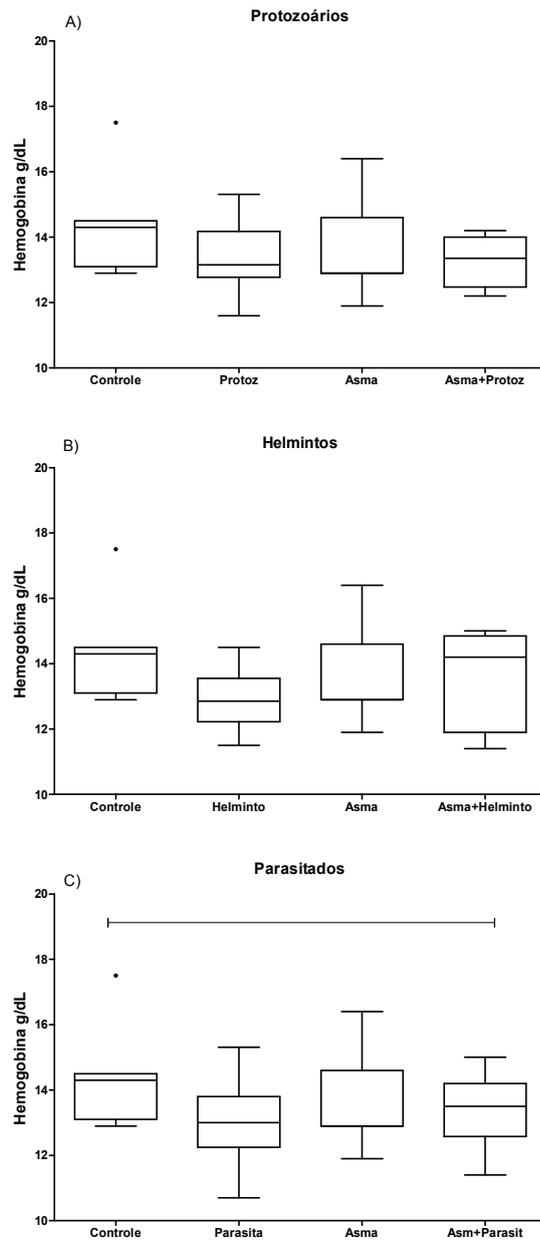
Preencheram todos os critérios de inclusão para participação da pesquisa 68 crianças com idades entre 2 anos e 13 anos com média±DP de 6 anos e 9 meses ± 3 anos e 1 mês, sendo 34 (50%) do sexo masculino e 34 (50%) do sexo feminino.

Destas: A) 7 crianças compuseram o grupo Asma, tiveram o exame parasitológico de fezes negativo e o diagnóstico de asma controlada sem tratamento profilático, sendo 2 (28,5%) do sexo masculino e 5 (71,4%) do sexo feminino, com idades entre 3 a 8 anos, com média ± DP de 4 anos e 10 meses ± 1 ano e 9 meses. B) 42 crianças compuseram o grupo Parasitadas com exame parasitológico de fezes positivo para parasitoses intestinais e ausência de história clínica de asma ou episódios de broncoconstrição, sendo 20 (47,6%) do sexo masculino e 22 (52,3%) do sexo feminino, com idades entre 2 a 13 anos, com média±DP de 6 anos e 11 meses ± 3 anos. C) 12 crianças compuseram o grupo Asma + Parasitadas com exame parasitológico de fezes positivo para parasitoses intestinais e diagnóstico de asma controlada sem tratamento profilático, sendo 7 (58,3%) do sexo masculino e 5 (41,6%) do sexo feminino, com idades entre 2 a 12 anos e média ± DP de 7 anos ± 3 anos e 3 meses. D) 7 crianças compuseram o grupo controle, sendo 5 (71,4%) do sexo masculino e 2 (28,5%) do sexo feminino com faixa etária entre 2 a 12 anos e média ± DP de 7 anos ± 4 anos sem asma ou alergias e com exame parasitológico de fezes negativo.

Encontramos na análise clínica das crianças neste estudo as alterações conforme grupo amostral: das crianças com parasitoses intestinais sem asma (n=42), 4 crianças com dentes em mau estado de conservação (9,5%), 1 criança com *Tinea capitis* (2,3%), 1 criança com história de piodermite de repetição (2,3%) e 1 criança com conjutivite (2,3%); no grupo das crianças asmáticas (n=7) a presença de rinite alérgica associada estava presente em 2 pacientes (28,5%) e dentes em mau estado

de conservação em 1 criança (14,2%); no grupo das crianças com asma associada a alguma parasitose intestinal (n=12), 3 crianças com diagnóstico de rinite alérgica associada (25%) e 1 criança com dentes em mau estado de conservação (8,3%); já nas crianças do grupo controle, 2 crianças apresentavam pediculose (28,5%), 1 criança com dentes em mau estado de conservação (14,2%).

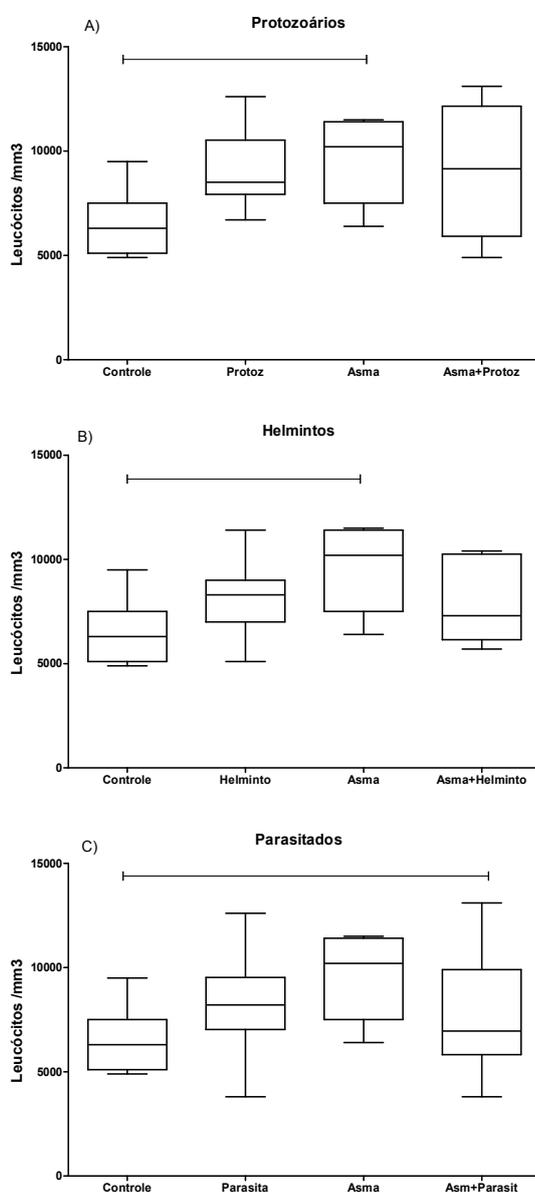
Foi observado anemia no hemograma de 8 (11,7%) das crianças estudadas, 6 (14,2%) no grupo de crianças parasitadas, 1 (14,2%) no grupo de asma e 1 (8,3%) no grupo de asma associada a parasitoses intestinais, mas não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 13). A anemia em crianças menores de cinco anos é revelada com níveis de hemoglobina inferiores a 11 g/dl, nas crianças de 5 a 11 anos quando a hemoglobina é menor que 11,5 g/dl; para adolescentes de 12 a 14 anos abaixo de 12 g/dl (W.H.O., 2001).



**Figura 13:** Hemoglobina sérica dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Em A e B, teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ). Em C, teste de Kruskal-Wallis com  $p = 0,06$ .

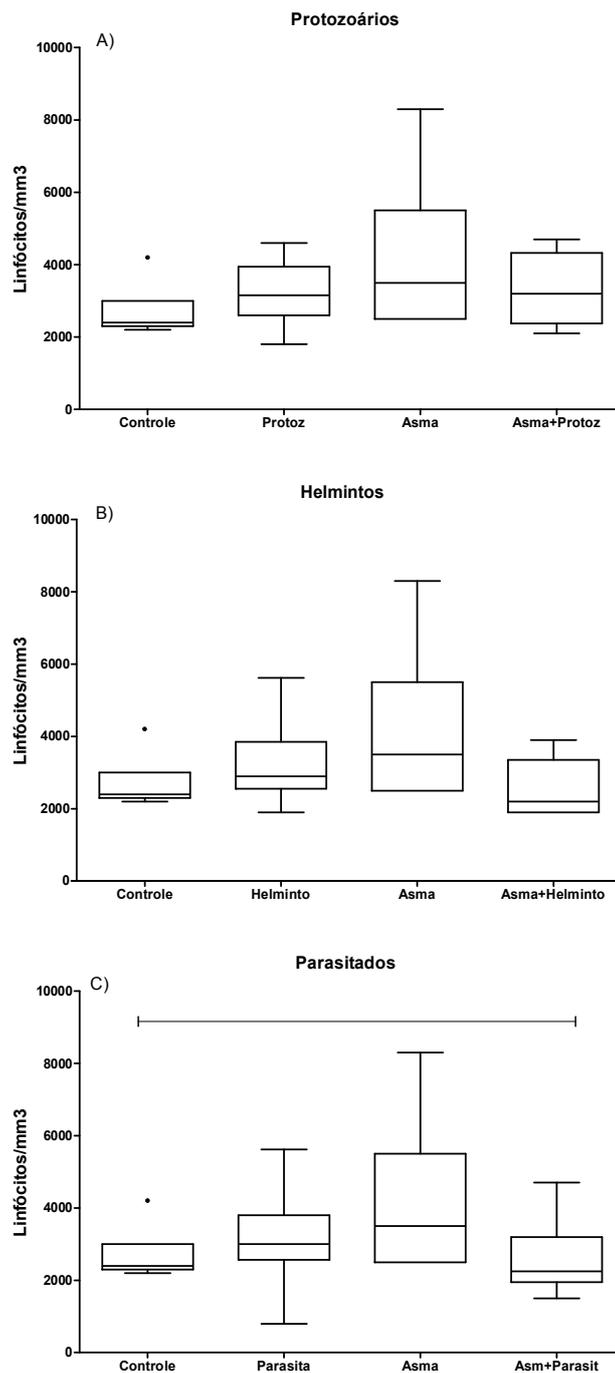
As crianças asmáticas apresentam um maior número de leucócitos séricos totais do que as crianças do grupo controle ( $p = 0,04$ , teste de

Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos) (Figura 14C). As diferenças não foram estatisticamente significante para os outros grupos (Figura 14).



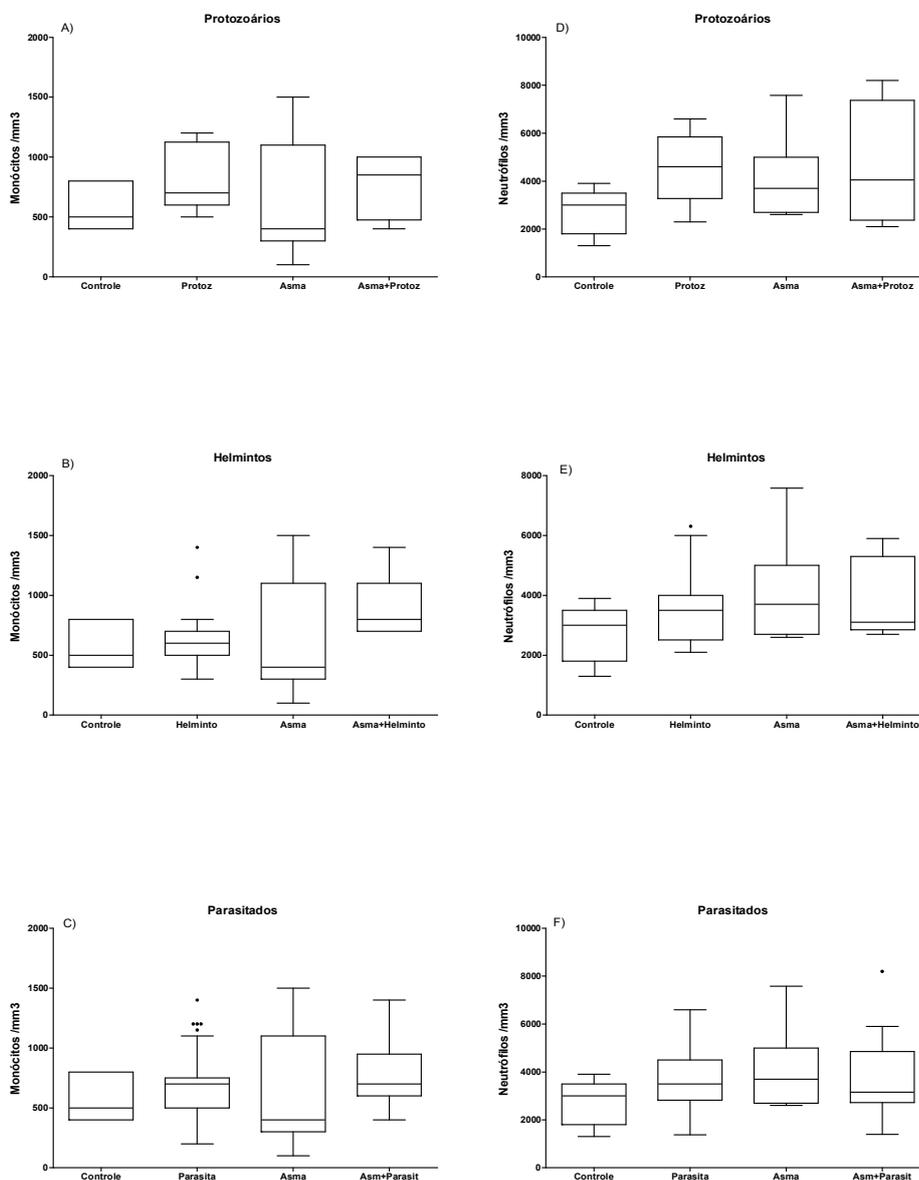
**Figura 14:** Número absoluto de leucócitos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Em B,  $p=0,04$  pelo teste de ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para comparação entre os grupos (Asma>Controle).

A análise do número absoluto de linfócitos séricos nos grupos controle, parasitado, com asma e asma associada a parasitoses revelou  $p=0,05$  pelo teste de Kruskal-Wallis (Figura 16C). Entretanto, quando separamos os grupos das crianças em parasitadas apenas por helmintos ou apenas por protozoários, não houve diferença estatística entre eles. (Figura 15A e B).



**Figura 15:** Número absoluto de linfócitos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Em C, teste de Kruskal-Wallis com  $p=0,05$ .

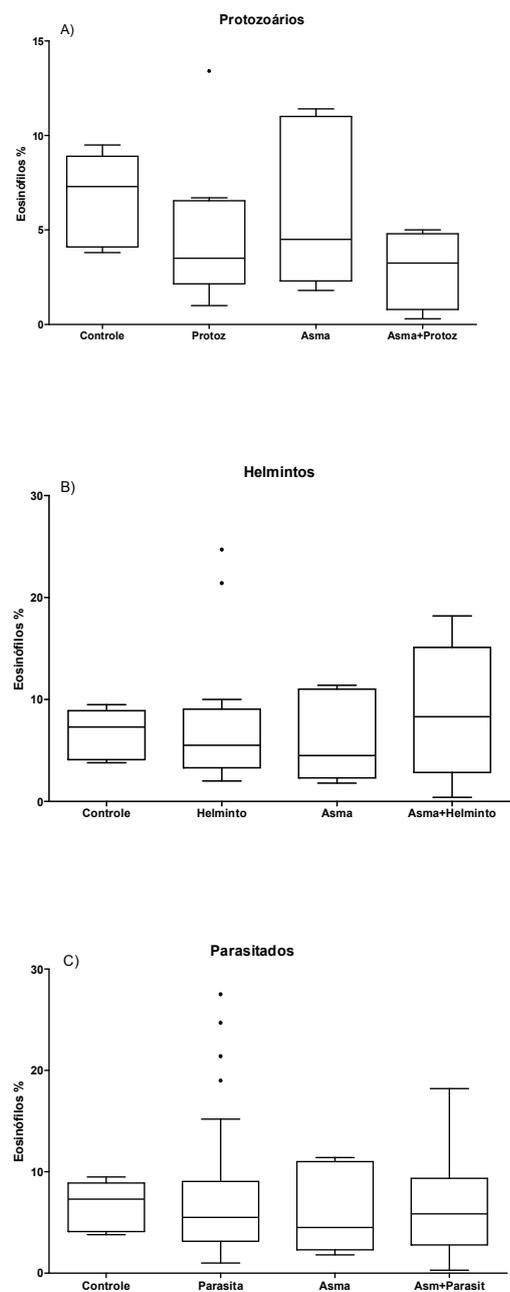
Não houve diferença estatisticamente significativa para o número absoluto de neutrófilos e de monócitos na comparação entre os grupos (Figura 16).



**Figura 16:** Número absoluto de monócitos e neutrófilos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. Em A e D, as crianças parasitadas

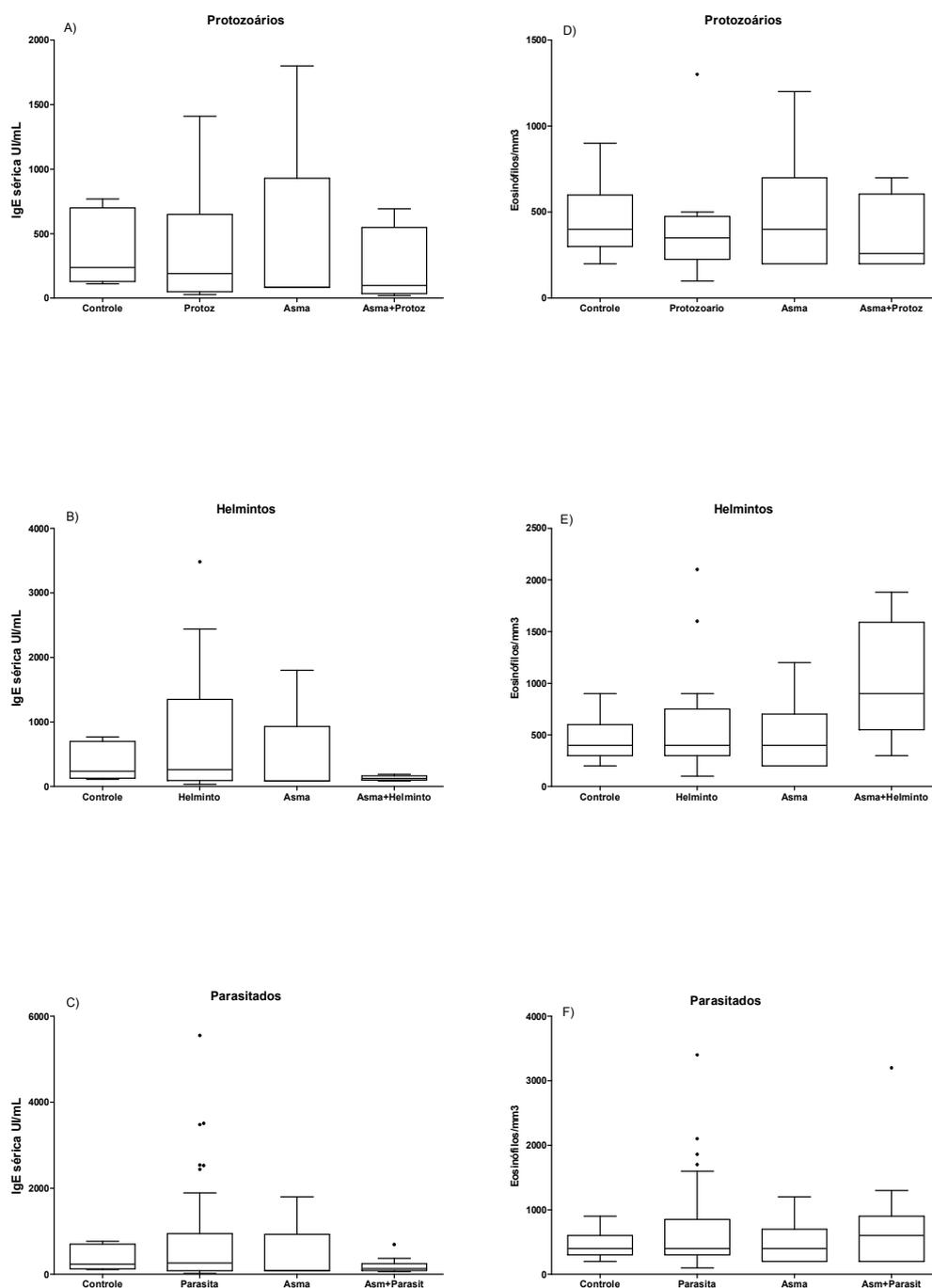
apenas por protozoários. Em B e E, as parasitadas apenas por helmintos. Em C e E, crianças com todas as parasitoses intestinais. Teste de Kruskal-Wallis ( $p>0,05$ ).

O número total de eosinófilos/mm<sup>3</sup> no sangue periférico foi maior que 350 células/mm<sup>3</sup>, sendo que eosinofilia foi encontrado em 59,5% dos pacientes parasitados sem asma (média de 667,3 células/mm<sup>3</sup> e máximo de 3.400 células/mm<sup>3</sup>); em 57,1% das crianças com quadro de asma associado a parasitoses intestinais (média de 800 células/mm<sup>3</sup> e máximo de 3.200 células/mm<sup>3</sup>); em 58,3% das crianças asmáticas sem parasitoses (média de 485,7 células/mm<sup>3</sup> e máximo de 1.200 células/mm<sup>3</sup>); e em 71,4% dos pacientes no grupo controle (média de 471,4 células/mm<sup>3</sup> e máximo de 900 células/mm<sup>3</sup>). Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos (Figura 18). Também não houve diferença estatística no número percentual de eosinófilos na comparação entre os grupos (Figura 17).



**Figura 17:** Número percentual de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Teste de Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ).

Não houve diferença estatística nos níveis séricos de IgE entre os grupos estudados (Figura 18).



**Figura 18:** Dosagem de IgE sérica total e número total absoluto de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes pediátricos dos grupos: controle; com parasitoses

intestinais na ausência de asma; com asma e exame parasitológico de fezes negativo; pacientes com associação de asma e parasitoses intestinais. Em A e D, as crianças parasitadas apenas por protozoários. Em B e E, as parasitadas apenas por helmintos. Em C e E, crianças com todas as parasitoses intestinais. Teste de Kruskal-Wallis ( $p>0,05$ ).

#### **4.4 Caracterização dos grupos de estudo segundo os parasitos encontrados no exame parasitológico de fezes**

Das crianças estudadas, 42 estavam parasitadas por helmintos e 31 crianças estavam parasitadas por *Giardia*. Dentre essas, 19 crianças mostraram associação de helmintos e protozoários (*Giardia intestinalis*).

No grupo de crianças parasitadas sem asma ( $n=42$ ), 8 (19%) crianças estavam monoparasitadas por *Giardia intestinalis*; 18 (42,8%) crianças parasitadas apenas por helmintos e 16 (38%) crianças estavam parasitadas pela associação de helminto mais *Giardia intestinalis*. A distribuição dos parasitos nesse grupo foi: 24 (57%) pacientes com *Giardia intestinalis*, 24 (57%), pacientes com *Ascaris lumbricoides*, 21 (50%) pacientes com *Hymenolepis nana*, 2 (4,7%) pacientes com *Trichuris trichiura*, 2 pacientes com *Ancylostoma duodenalis* e 1 (2,3%) paciente com *Enterobius vermiculares*. Nas crianças que apresentavam associação de parasitos observamos 4 (9,5%) crianças parasitadas com *Ascaris lumbricoide* associado a *Hymenolepis nana*, 1 (2,3%) criança parasitada com *Trichuris trichiura* mais *Ascaris lumbricoides* mais *Ancylostoma duodenalis*, 6 (14,2%) crianças parasitadas com *Giardia intestinalis* mais *Ascaris lumbricoides* mais *Hymenolepis nana*, 5 (11,9%) crianças parasitadas com *Giardia intestinalis* mais *Hymenolepis nana*, 3 (7,1%) crianças parasitadas com *Giardia intestinalis* mais *Ascaris lumbricoides*, 1 (2,3%) criança parasitada com *Giardia intestinalis* mais *Trichuris trichiura* mais *Ancylostoma duodenalis*, 1 (2,3%) criança parasitada com *Giardia intestinalis* mais *Ascaris lumbricoides* mais *Enterobius vermiculares*.

No grupo das crianças asmáticas associado ao diagnóstico de parasitose intestinal ( $n=12$ ), encontramos 4 (33,3%) crianças

monoparasitadas por *Giardia intestinalis*; 5 (41,6%) crianças parasitadas exclusivamente por helmintos e 3 (25%) crianças parasitadas pela associação de helminto mais *Giardia intestinalis*. A distribuição dos parasitos no grupo de pacientes parasitados foi de 7 (58,3%) pacientes com *Giardia intestinalis*, 7 (58,3%) pacientes com *Ascaris lumbricoides*, 3 (25%) pacientes com *Hymenolepis nana*, 1 (8,3%) paciente com *Trichuris trichiura* e 1 (8,3%) paciente com *Enterobius vermiculares*. Nas crianças asmáticas e parasitadas apresentando associação de parasitos (41,6% das 12 crianças selecionadas desse grupo), observamos 1 (8,3%) criança parasitada com *Giardia intestinalis* mais *Ascaris lumbricoides* mais *Hymenolepis nana*, 1 (8,3%) criança parasitada com *Giardia intestinalis* mais *Hymenolepis nana*, 1 (8,3%) criança parasitada com *Giardia intestinalis* mais *Ascaris lumbricoides* mais *Hymenolepis nana*, 1 (8,3%) criança parasitada com *Ascaris lumbricoides* mais *Trichuris trichiura*, 1 (8,3%) criança parasitada com *Hymenolepis nana* mais *Ascaris lumbricoides* mais *Enterobius vermiculares*.

O teste de Kato-Katz foi feito em 12 crianças parasitadas por helmintos, e mostrou carga parasitária leve em 5 (41,6%) crianças; carga parasitária moderada em 4 (33,3%) crianças e carga parasitária alta em 3 (25%) crianças.

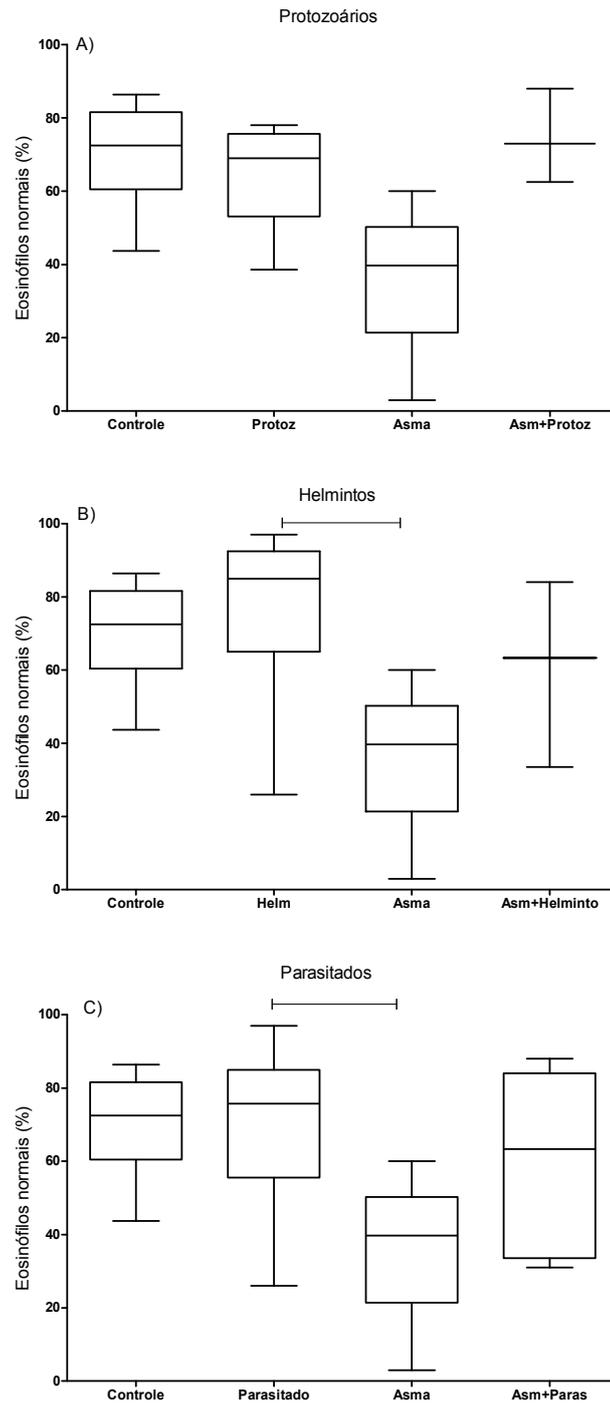
#### **4.5 Ativação dos eosinófilos em crianças parasitadas, asmáticas, asmáticas e parasitadas e controles**

Foram analisadas amostras de 53 crianças quanto aos aspectos morfológicos dos eosinófilos, observados à microscopia óptica com aumento de 1000X, em imersão, após a aderência e coloração dessas células em lâmina.

#### **4.5.1 Eosinófilos normais**

As crianças asmáticas apresentam um menor número de eosinófilos normais do que as crianças parasitadas com helmintos mais protozoários ( $p=0,02$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos) (Figura 19C). Entretanto, quando separamos os grupos das crianças em parasitadas apenas por helmintos ou apenas por protozoários, verificamos que os dados mostraram diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos das crianças parasitadas pelos helmintos e as crianças asmáticas não parasitadas ( $p = 0,03$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos). Interessantemente, o número de eosinófilos normais para as crianças asmáticas e parasitadas foi semelhante ao grupo controle normal (Figura 19).

Embora sem significância estatística, observa-se que a mediana do número de eosinófilos normais foi maior em todos os grupos estudados do que nas crianças asmáticas não parasitadas (Figura 19).



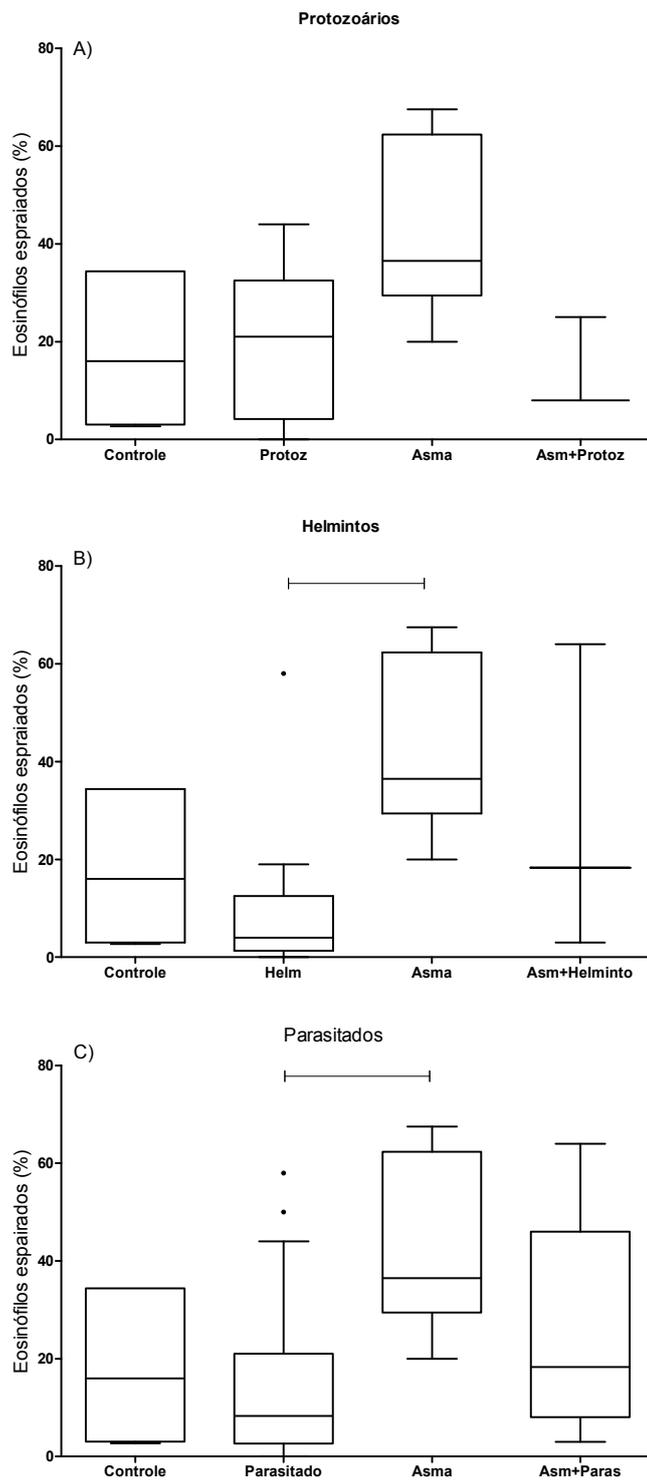
**Figura 19:** Porcentagem de eosinófilos normais em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Em B,  $p=0,03$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações

(Helmintos > Asma). Em C,  $p = 0,02$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Parasitado > Asma)

#### **4.5.2 Eosinófilos espriados**

As crianças asmáticas apresentam um maior número de eosinófilos espriados, que é um parâmetro positivo de ativação dos eosinófilos, do que as crianças parasitadas ( $p=0,03$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos) (Figura 20C). No entanto, quando separamos os grupos das crianças parasitadas apenas por helmintos ou apenas por protozoários, verificamos que o espriamento dos eosinófilos foi estatisticamente maior nas crianças asmáticas do que nas crianças parasitadas pelos helmintos ( $p=0,02$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos) (Figura 20B). Não houve diferença estatística entre os outros grupos (Figura 20).

O grupo de crianças com asma e parasitose, mostrou a porcentagem de eosinófilos espriados semelhante ao grupo controle normal.

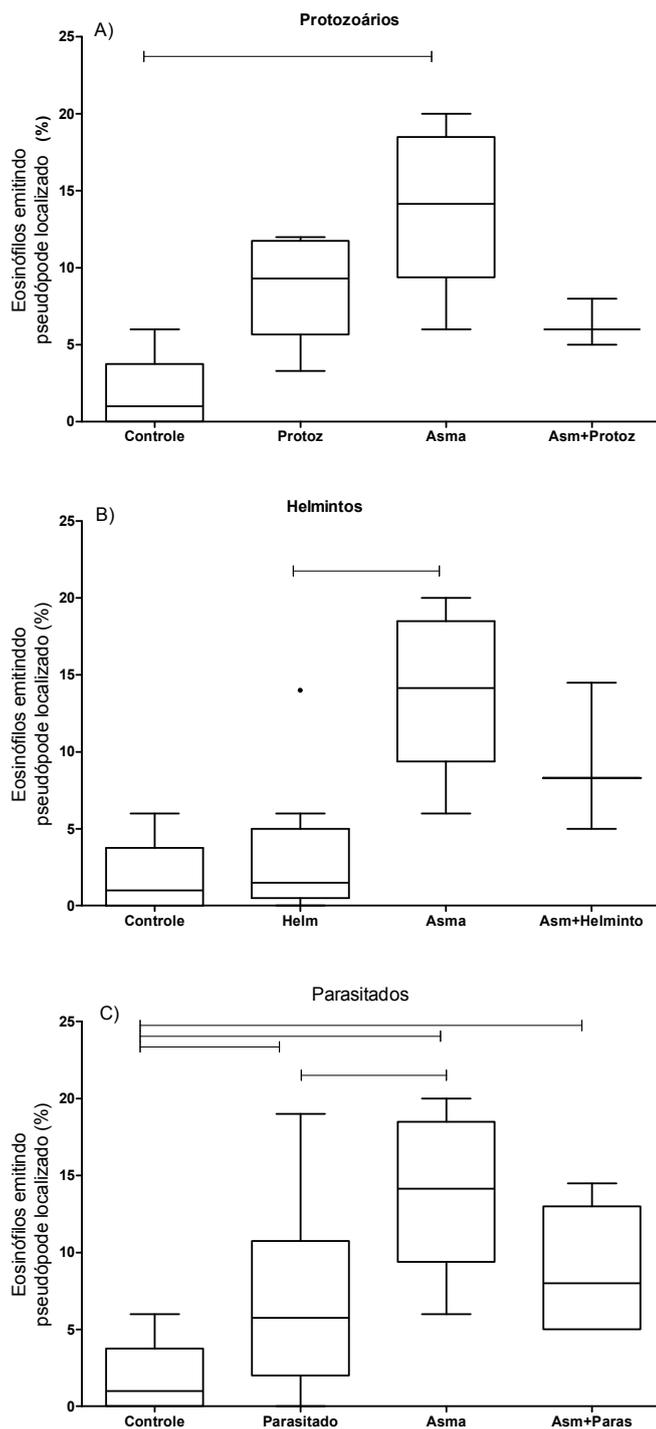


**Figura 20:** Porcentagem de eosinófilos espiroidados em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais.

Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Em B,  $p = 0,02$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações (Asma > Helmintos). Em C,  $p = 0,03$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma > Parasitado)

#### **4.5.3 Eosinófilos apresentando pseudópode localizado**

As crianças do grupo controle apresentaram menor porcentagem de eosinófilos emitindo pseudópode localizado do que todos os outros grupos estudados ( $p=0,001$ , teste de ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação múltipla entre os grupos) (Figura 21A). Além disso, as crianças asmáticas apresentaram um maior número de eosinófilos com emissão de pseudópode localizado em comparação às crianças parasitadas ( $p=0,001$ , teste de ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação múltipla entre os grupos) (Figura 21C). Entretanto, quando analisamos os grupos separadamente, em crianças parasitadas apenas por helmintos ou apenas por protozoários, verificamos que houve diferença estatisticamente significativa apenas entre as crianças parasitadas pelos helmintos em comparação ao grupo de pacientes com asma e EPF negativo ( $p=0,003$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos) (Figura 21B).

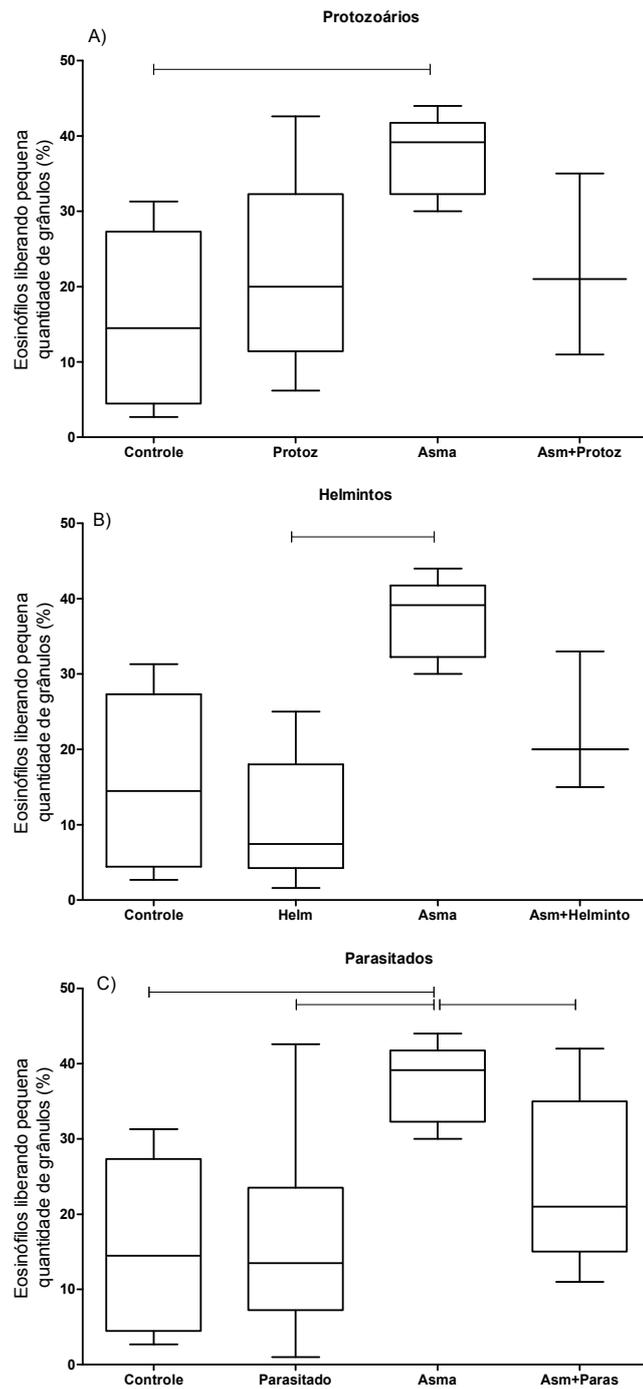


**Figura 21:** Porcentagem de eosinófilos com emissão de pseudópode localizado em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Em A,  $p=0,003$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas

comparações (Asma > Controle). Em B,  $p=0,003$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações (Asma > Helmintos). Em C,  $p=0,001$  pelo teste de ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para comparação entre os grupos (Asma > Controle, Asma > Parasitado, Asma > Asma+Parasitose, Parasitado > Controle, Asma+Parasitado > Controle)

#### **4.5.4 Eosinófilos emitindo grânulos em pequena quantidade**

As crianças asmáticas apresentam uma maior liberação de pequena quantidade de grânulos pelos eosinófilos do que as crianças parasitadas ( $p=0,001$ ; teste de ANOVA, seguido pelo teste de Newman-Keuls para comparação múltipla entre os grupos). Ao separarmos os grupos das crianças parasitadas apenas por helmintos ou apenas por protozoários, observamos que os dados mostraram diferença estatisticamente significativa apenas para as crianças parasitadas pelos helmintos em comparação ao grupo de crianças asmáticas sem parasitoses ( $p=0,002$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos) (Figura 22).



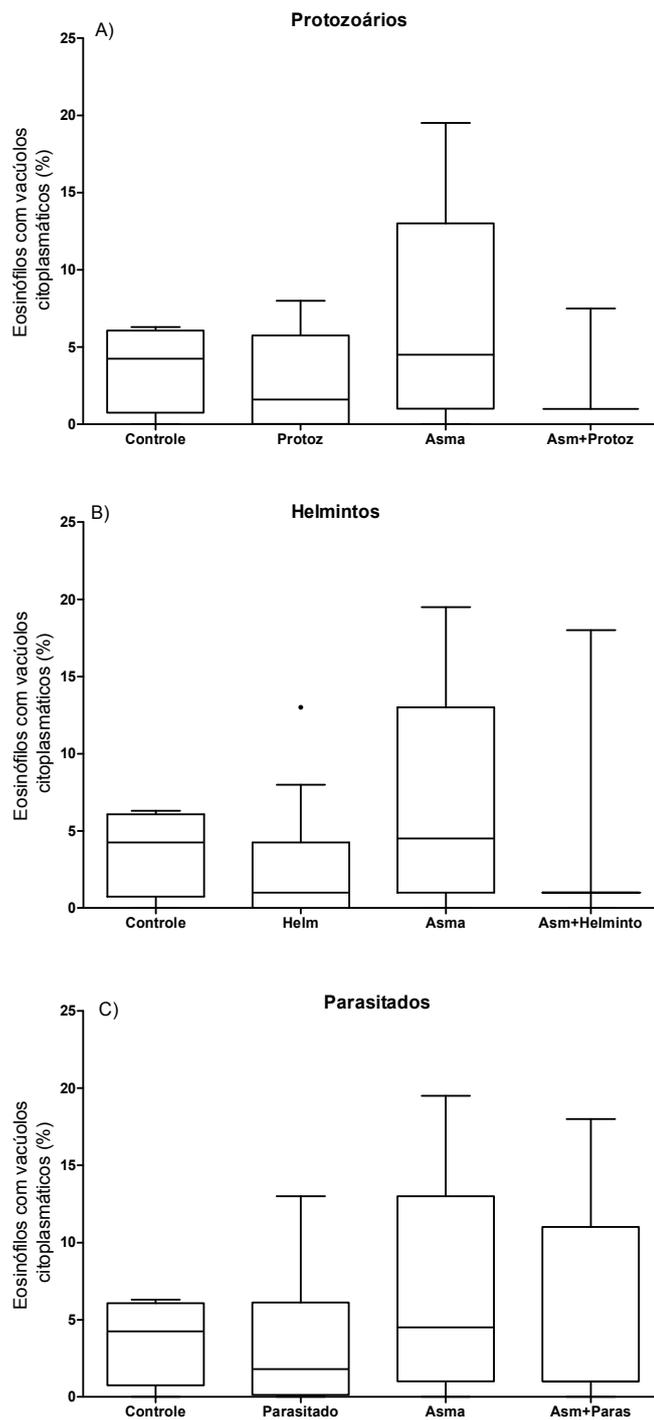
**Figura 22:** Porcentagem de eosinófilos emitindo grânulos em pequena quantidade em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Em A,

p=0,03 pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações (Asma > Controle). Em B, p=0,002 pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para múltiplas comparações (Asma > Helmintos). Em C, p=0,001 pelo teste de ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para comparação entre os grupos (Asma > Parasitado, Asma > Asma+Parasitose, Asma > Controle).

#### **4.5.5 Outros parâmetros de ativação dos eosinófilos**

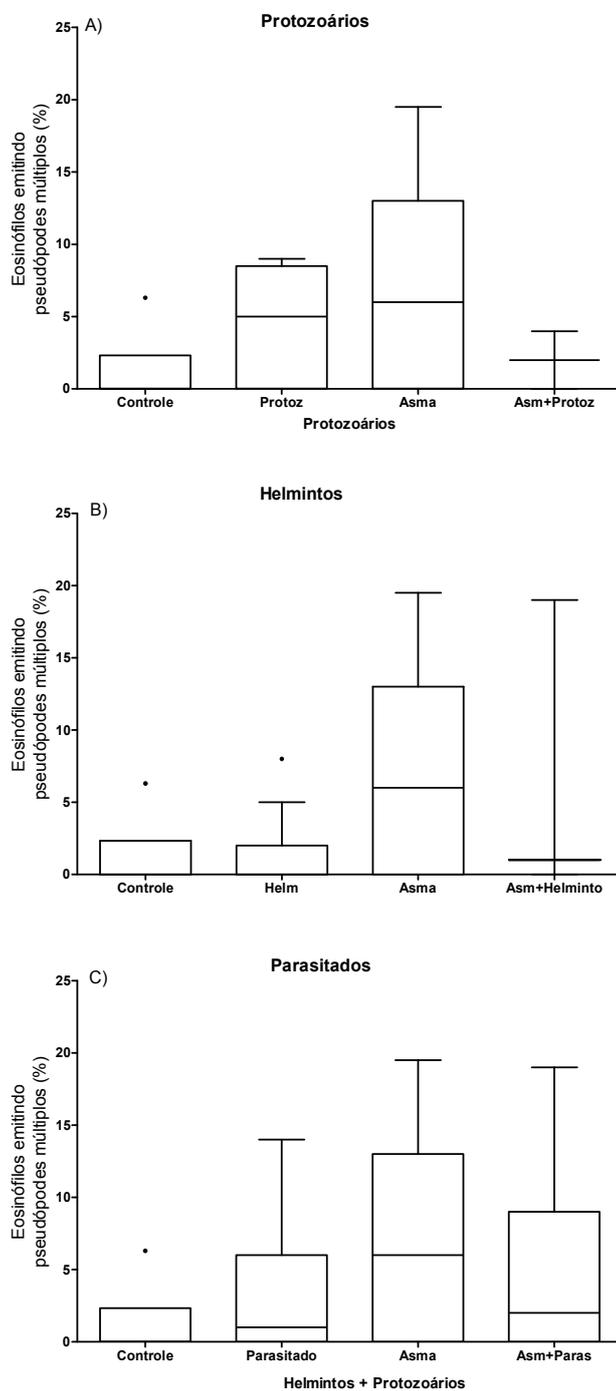
As crianças asmáticas sem parasitoses intestinais, por nós estudadas apresentaram maior ativação dos eosinófilos em relação ao grupo controle nos seguintes parâmetros: eosinófilos espalhados, emissão de pseudópode localizado e liberação de pequena quantidade de grânulos. (Figura 19, Figura 21, Figura 22)

Em relação aos parâmetros de ativação dos eosinófilos: presença de vacúolos, eosinófilos emitindo múltiplos pseudópodes, liberação de grânulos em média e em grande quantidade, presença de degeneração celular, de contato dos eosinófilos com outra célula e de liberação de grânulos eosinofílicos isolados não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Os dados encontram-se representados nas Figuras 23 a 29.



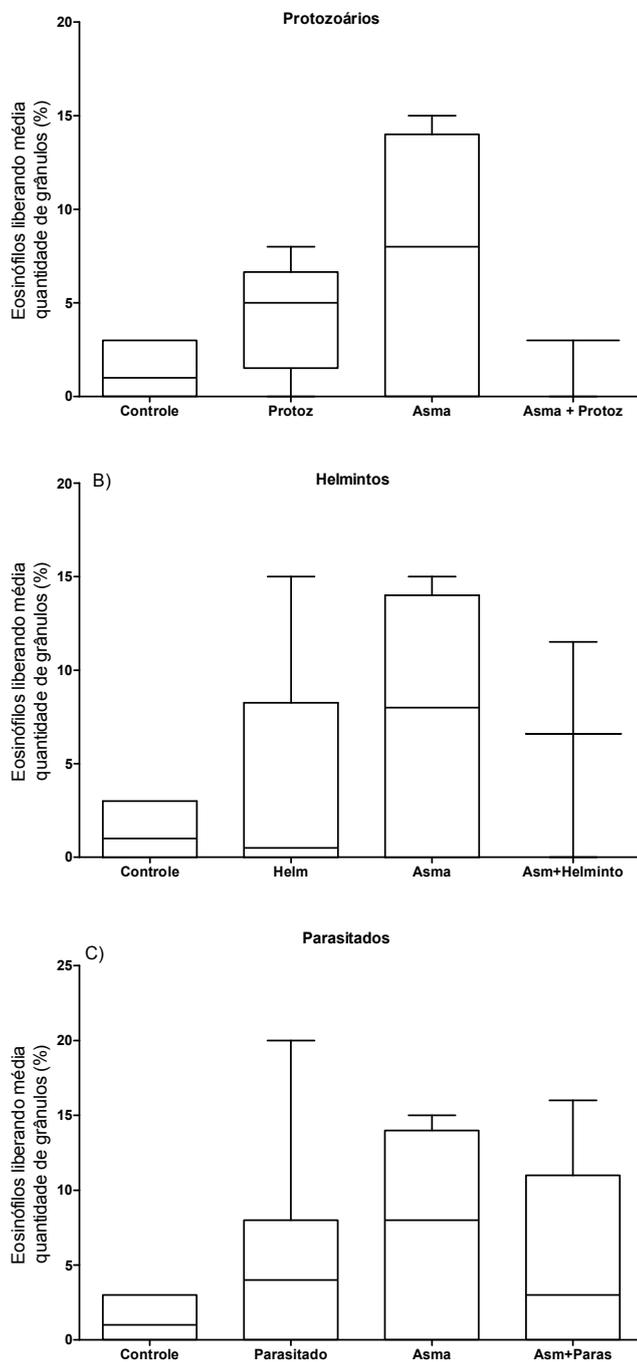
**Figura 23:** Porcentagem de eosinófilos com vacúolos citoplasmáticos em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as

parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Teste de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .



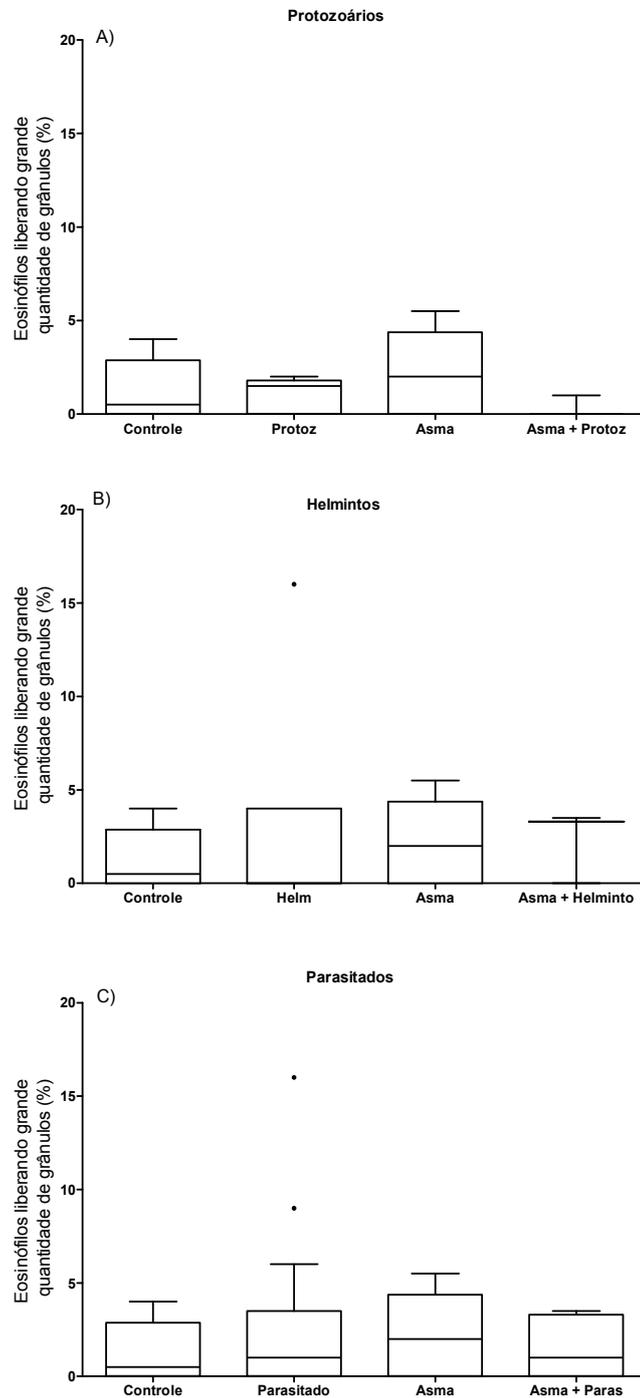
**Figura 24:** Porcentagem de eosinófilos emitindo pseudópodes múltiplos em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e

parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Teste de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .



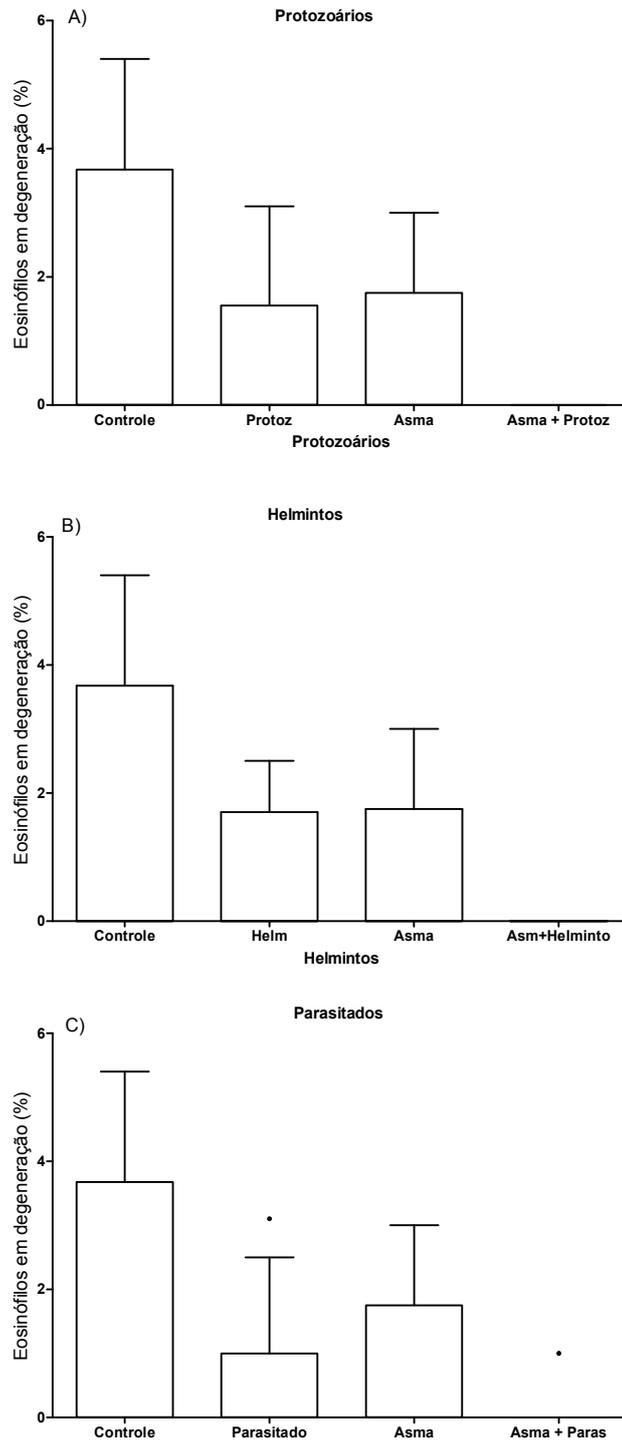
**Figura 25:** Porcentagem de eosinófilos liberando média quantidade de grânulos em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e

parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Teste de Kruskal-Wallis,  $p>0,05$ .



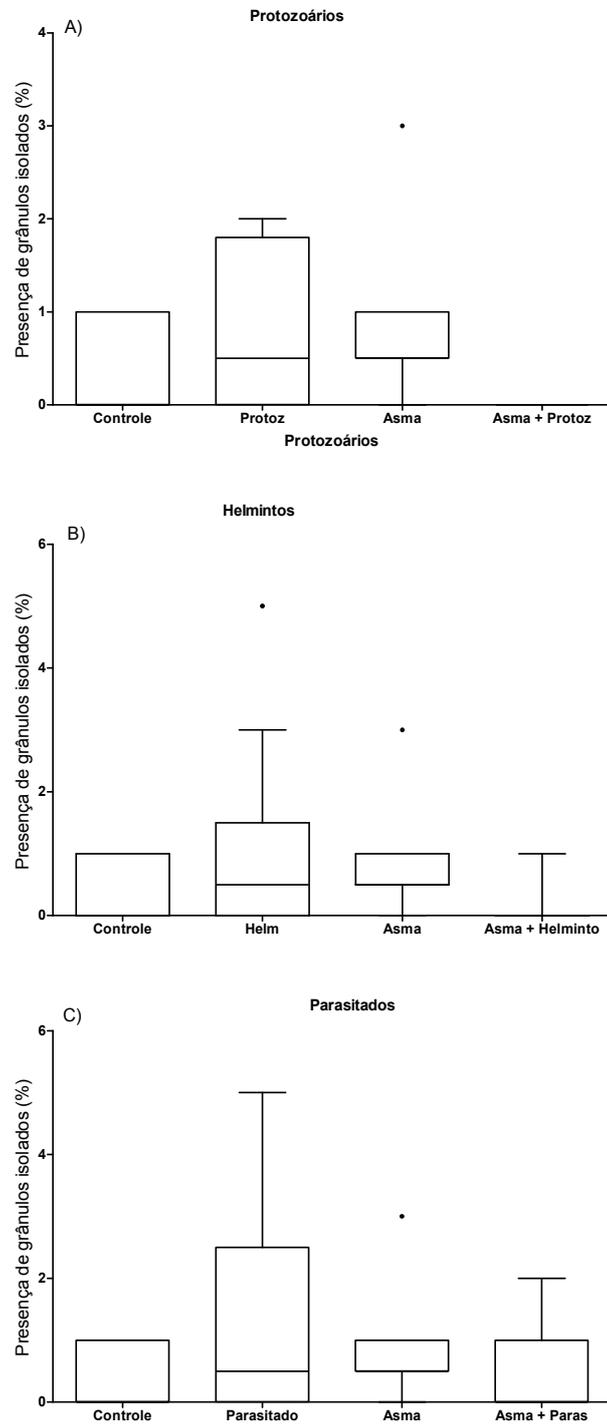
**Figura 26:** Porcentagem de eosinófilos liberando grande quantidade de grânulos em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e

parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Teste de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .



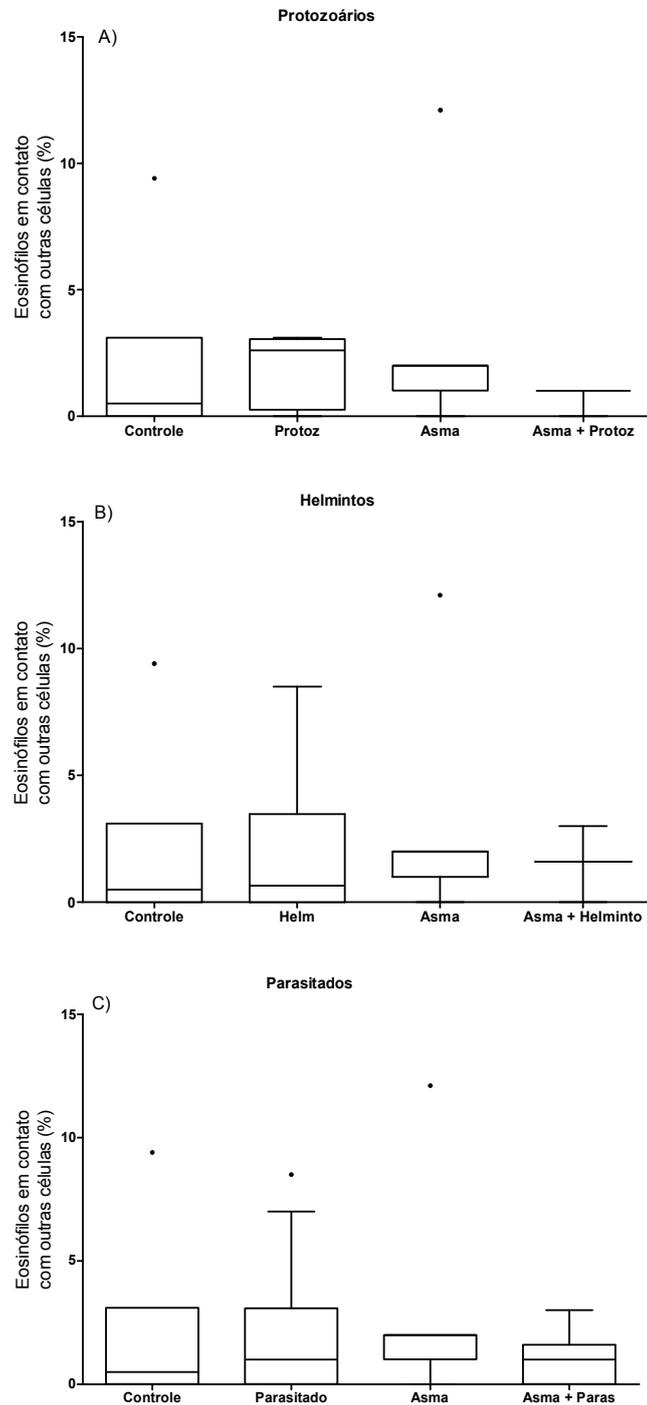
**Figura 27:** Porcentagem de eosinófilos em degeneração nas crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas

apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Teste de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .



**Figura 28:** Porcentagem de eosinófilos com presença de grânulos isolados em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e

parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Teste de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .



**Figura 29:** Porcentagem de eosinófilos em contato com outras células nas crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos

intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Teste de Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ .

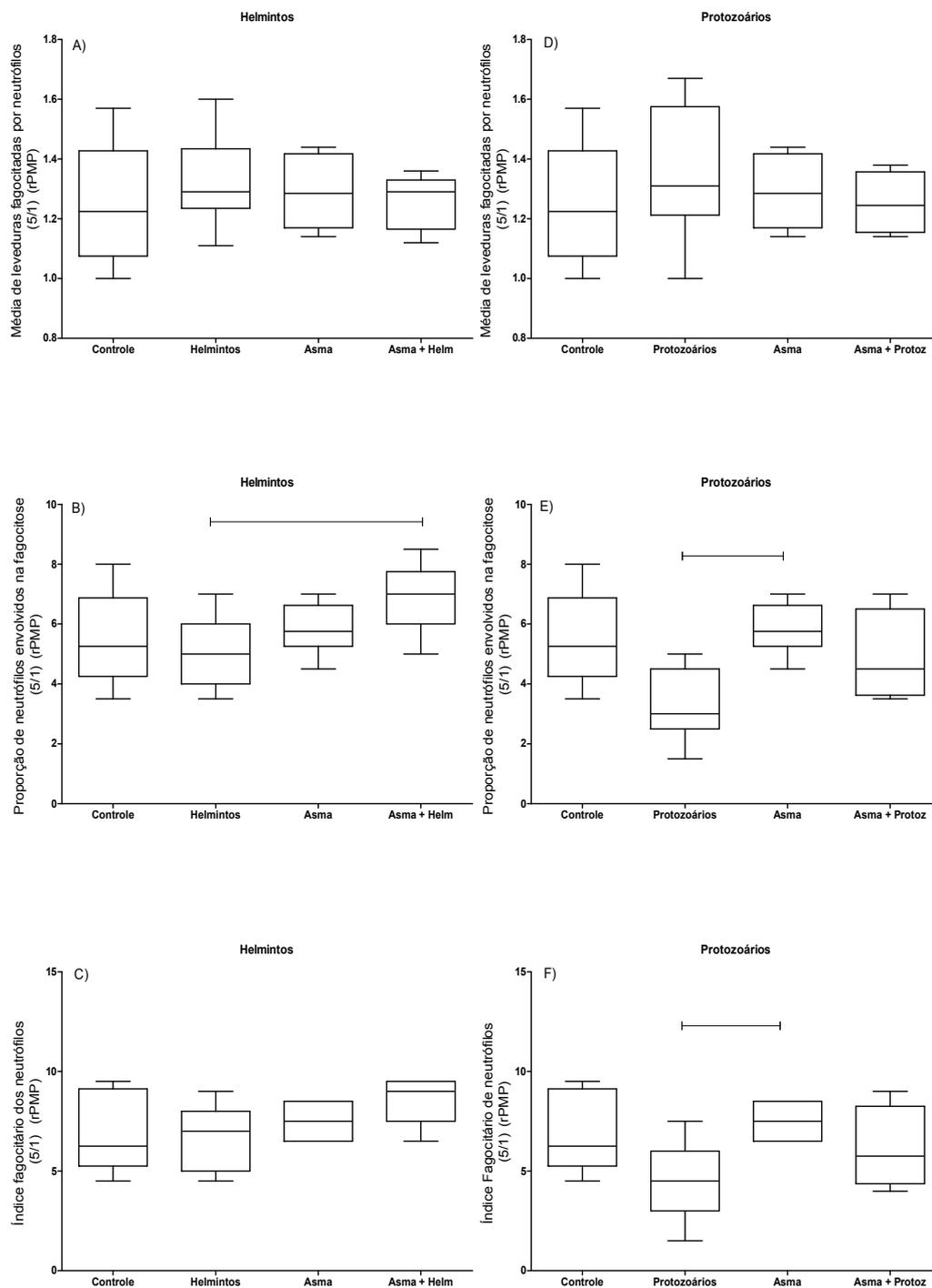
## **4.6 Capacidade fagocitária**

A capacidade fagocitária foi avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos quando os fagócitos foram incubados com as leveduras previamente tratadas com o soro fetal bovino inativado, e pelos receptores para opsoninas quando os fagócitos foram incubados com as leveduras previamente tratadas com soro fresco do paciente. Tal capacidade foi mensurada pelos índice fagocitário, média de leveduras fagocitadas e proporção de fagócitos envolvidas na fagocitose.

### **4.6.1 Fagocitose das leveduras pelos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

Quando analisamos a fagocitose pelos neutrófilos, pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, na proporção de 5 leveduras por fagócito, apenas as crianças parasitadas por protozoários mostraram menor capacidade fagocitária do que as crianças asmáticas ( $p = 0,05$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 30F). Essa menor capacidade fagocitária dos neutrófilos no grupo de crianças parasitadas pelos protozoários deveu-se ao menor envolvimento dos neutrófilos na fagocitose ( $p = 0,01$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 30E).

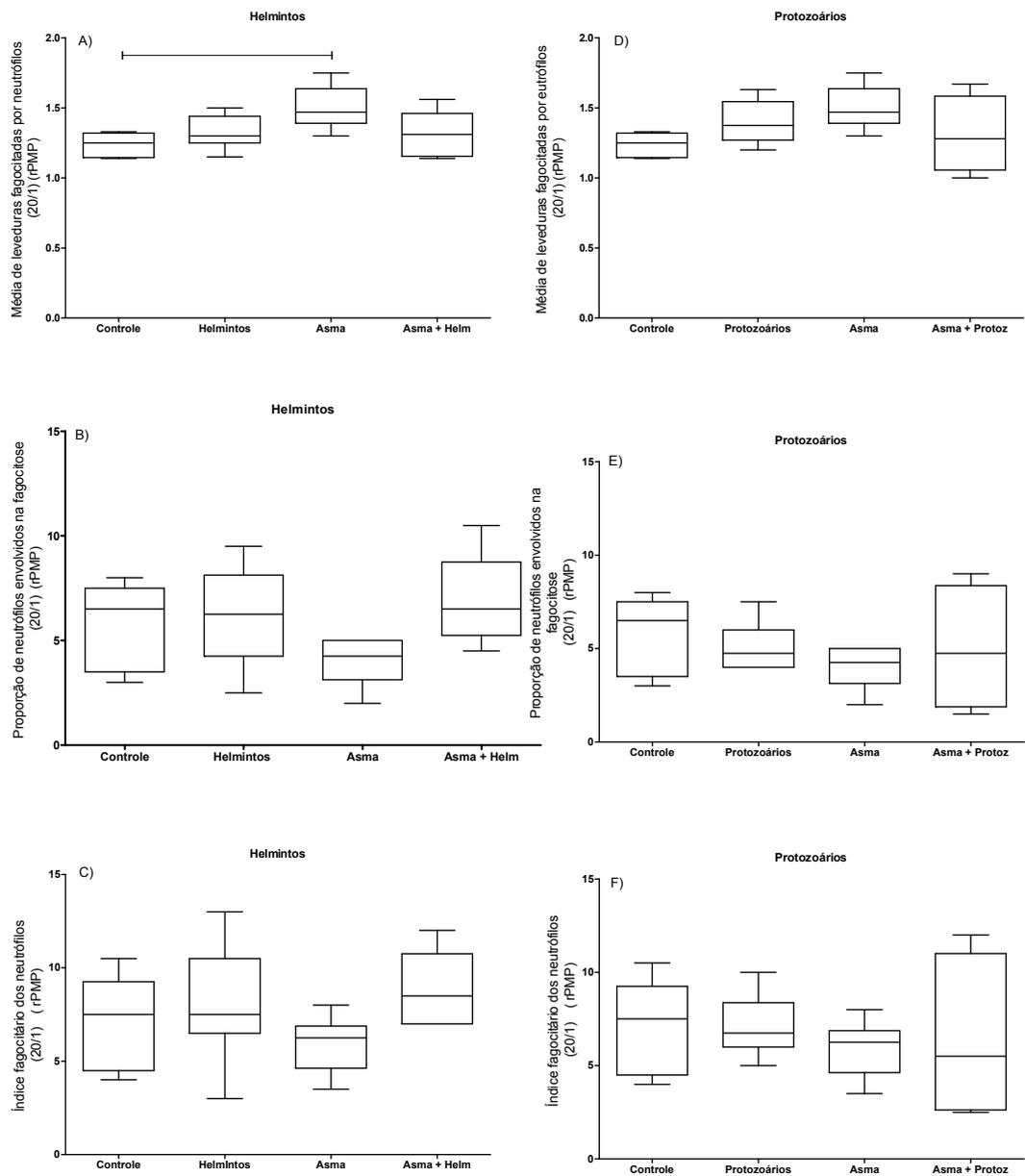
As crianças do grupo asma+helmintos mostraram um maior envolvimento dos neutrófilos na fagocitose ( $p = 0,04$ , teste ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para múltiplas comparações, Asma+Helminto > Helminto) (Figura 30B).



**Figura 30:** Capacidade fagocitária dos neutrófilos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas apenas por helmintos e em D, E e

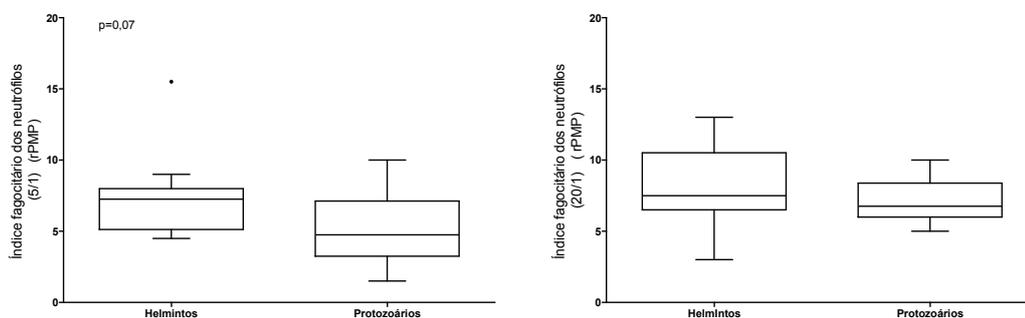
F as parasitadas apenas por protozoários. Em A e D – Média de leveduras fagocitadas; Em B e E – Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; Em C e F – Índice fagocitário. Em B,  $p=0,04$  pelo teste de ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para múltiplas comparações (Asma+Helminto > Helminto). Em E,  $p=0,01$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma > Protozoários) . Em F,  $p=0,05$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma > Protozoários).

Quando a fagocitose pelos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos foi avaliada na proporção de 20 leveduras por fagócito, as crianças do grupo asma mostrou um maior número de leveduras ingeridas do que as crianças do grupo controle (1,25 versus 1,47) ( $p = 0,01$ , teste ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para múltiplas comparações, Asma > Controle) (Figura 31A). Entretanto esse aumento não influenciou o índice fagocitário, pois houve diminuição concomitante do envolvimento dos neutrófilos na fagocitose (Figura 31B e C).



**Figura 31:** Capacidade fagocitária dos neutrófilos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas apenas por helmintos e em D, E e F as parasitadas apenas por protozoários. Em A e D – Média de leveduras fagocitadas; Em B e E – Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; Em C e F – Índice fagocitário. Em A,  $p=0,01$  pelo teste de ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para múltiplas comparações (Asma > Controle).

Houve uma tendência para menor índice fagocitária pelos protozoários do que pelos helmintos (Figura 32).

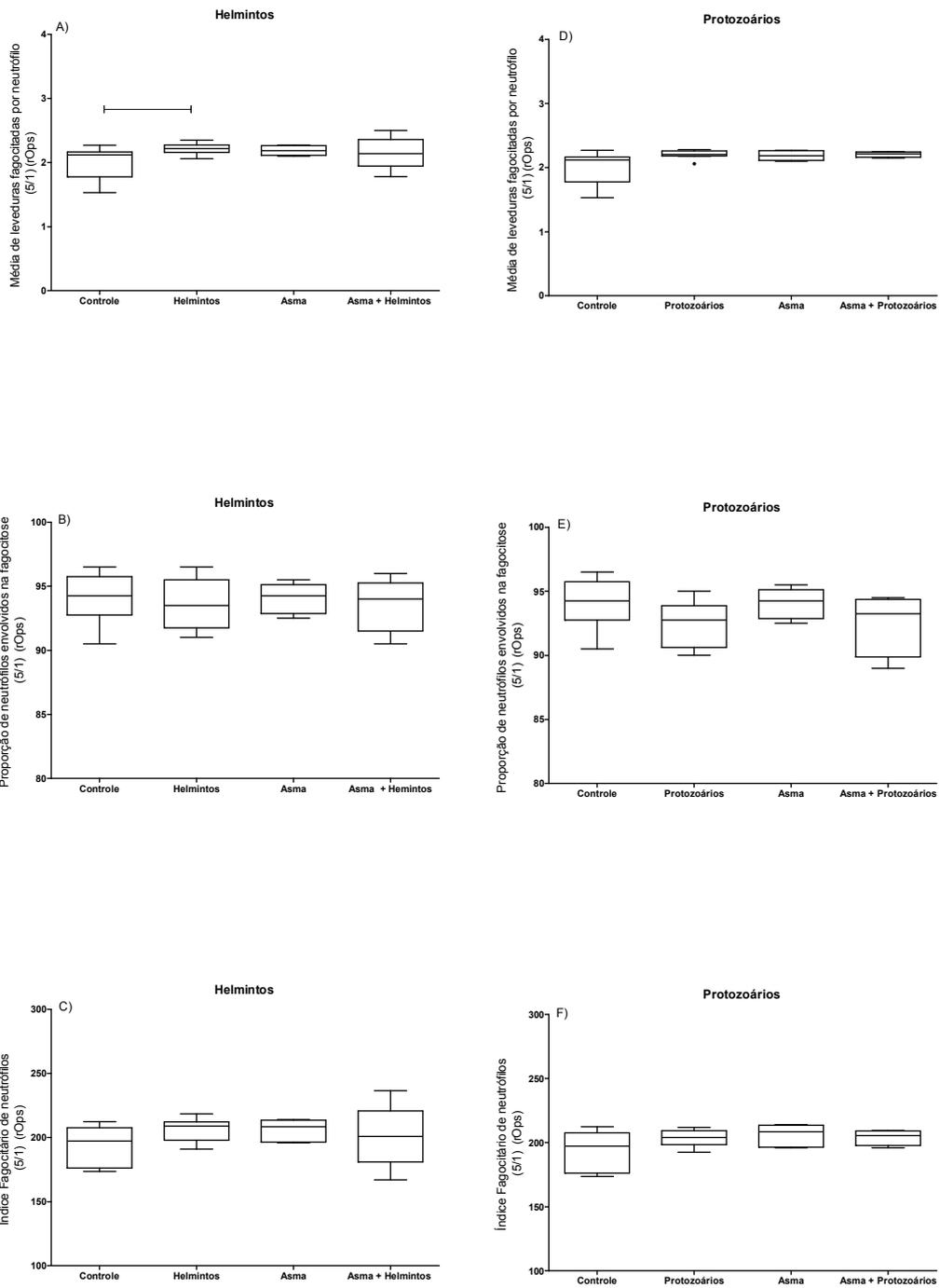


**Figura 32:** Índice fagocitário dos neutrófilos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, em crianças dos grupos parasitadas apenas por helmintos e parasitadas apenas por protozoários na ausência de asma. Em A,  $p=0,07$  pelo teste t, (Helminto > Protozoário).

#### 4.6.2 Fagocitose das leveduras pelos neutrófilos pelos receptores para opsoninas

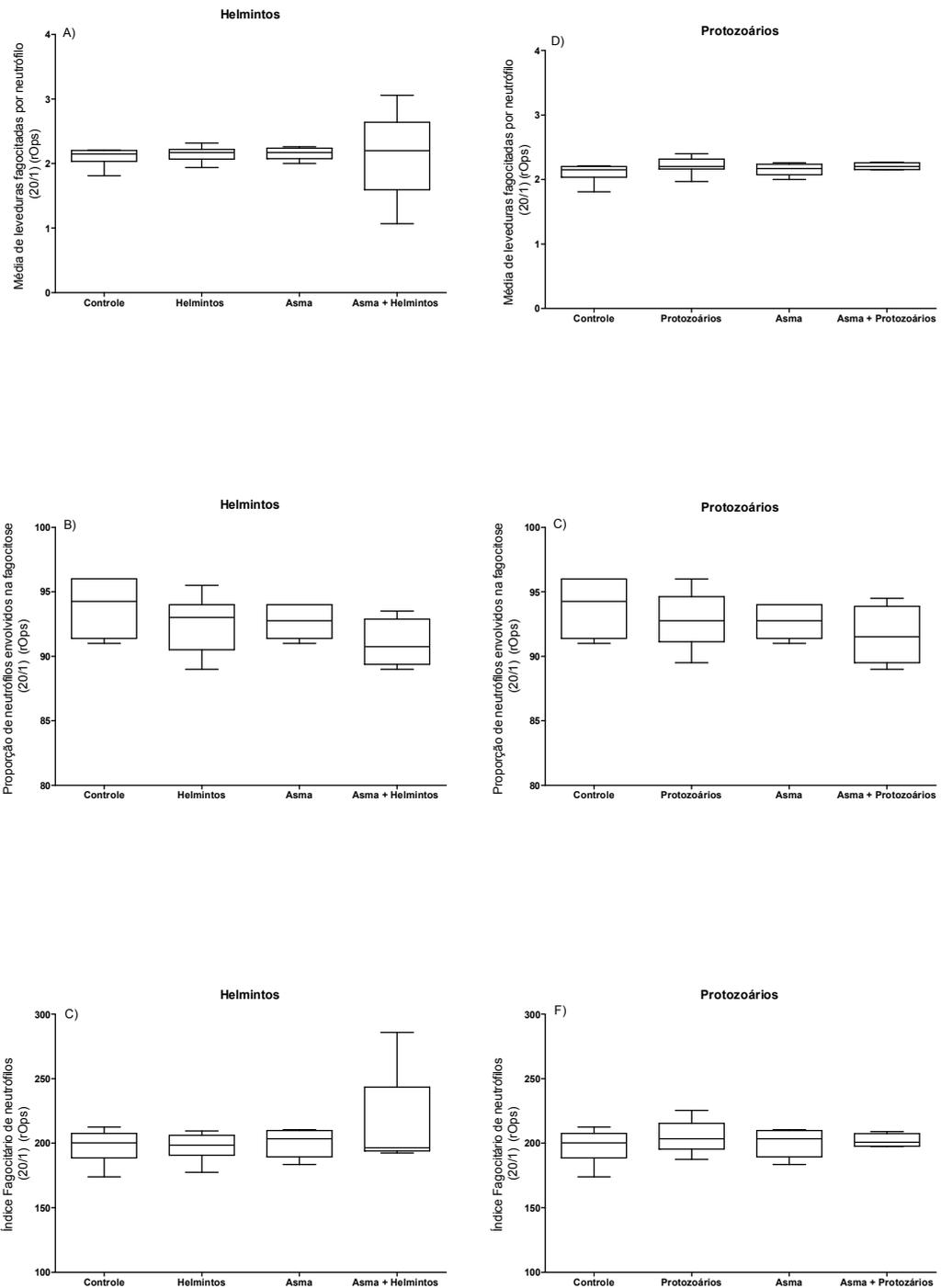
Quando a fagocitose pelos neutrófilos pelos receptores para opsoninas foi avaliado na proporção de 5 leveduras por fagócito, apenas o número de leveduras fagocitadas por neutrófilo foi maior no grupo de crianças parasitadas por helmintos do que o grupo controle, 2,22 versus 2,12 ( $p=0,06$  pelo teste de ANOVA, pelo método de Newman-Keuls,  $p>0,05$ , Helmintos > Controle). (Figura 33A)

Não houve diferença estatística entre todos os outros parâmetros analisados na proporção de 5 leveduras por fagócitos (Figura 33B, C, D, E, F), como também na proporção de 20 leveduras por fagócito (Figura 34).



**Figura 33:** Capacidade fagocitária dos neutrófilos por receptores para opsoninas, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas apenas por helmintos e em D, E e F as parasitadas apenas

por protozoários. Em A e D – Média de leveduras fagocitadas; Em B e E – Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; Em C e F – Índice fagocitário. Em A,  $p=0,06$  pelo teste de ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para múltiplas comparações (Helmintos > Controle).



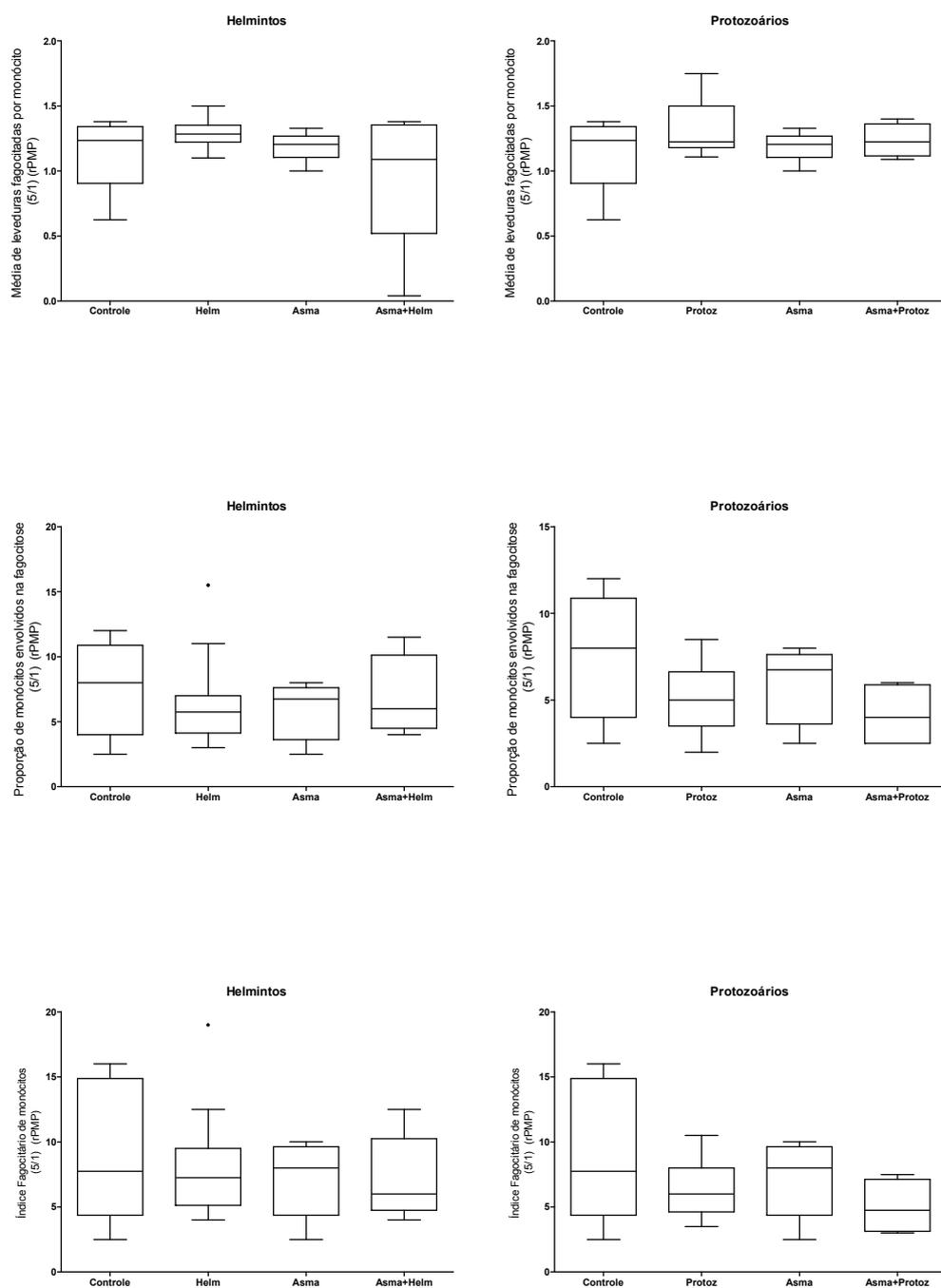
**Figura 34:** Capacidade fagocitária dos neutrófilos por receptores para opsoninas, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas apenas por helmintos e em D, E e F as parasitadas apenas

por protozoários. Em A e D – Média de leveduras fagocitadas; Em B e E – Proporção de neutrófilos envolvidos na fagocitose; Em C e F – Índice fagocitário. Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn ( $p > 0,05$ ).

#### **4.6.3 Fagocitose das leveduras pelos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

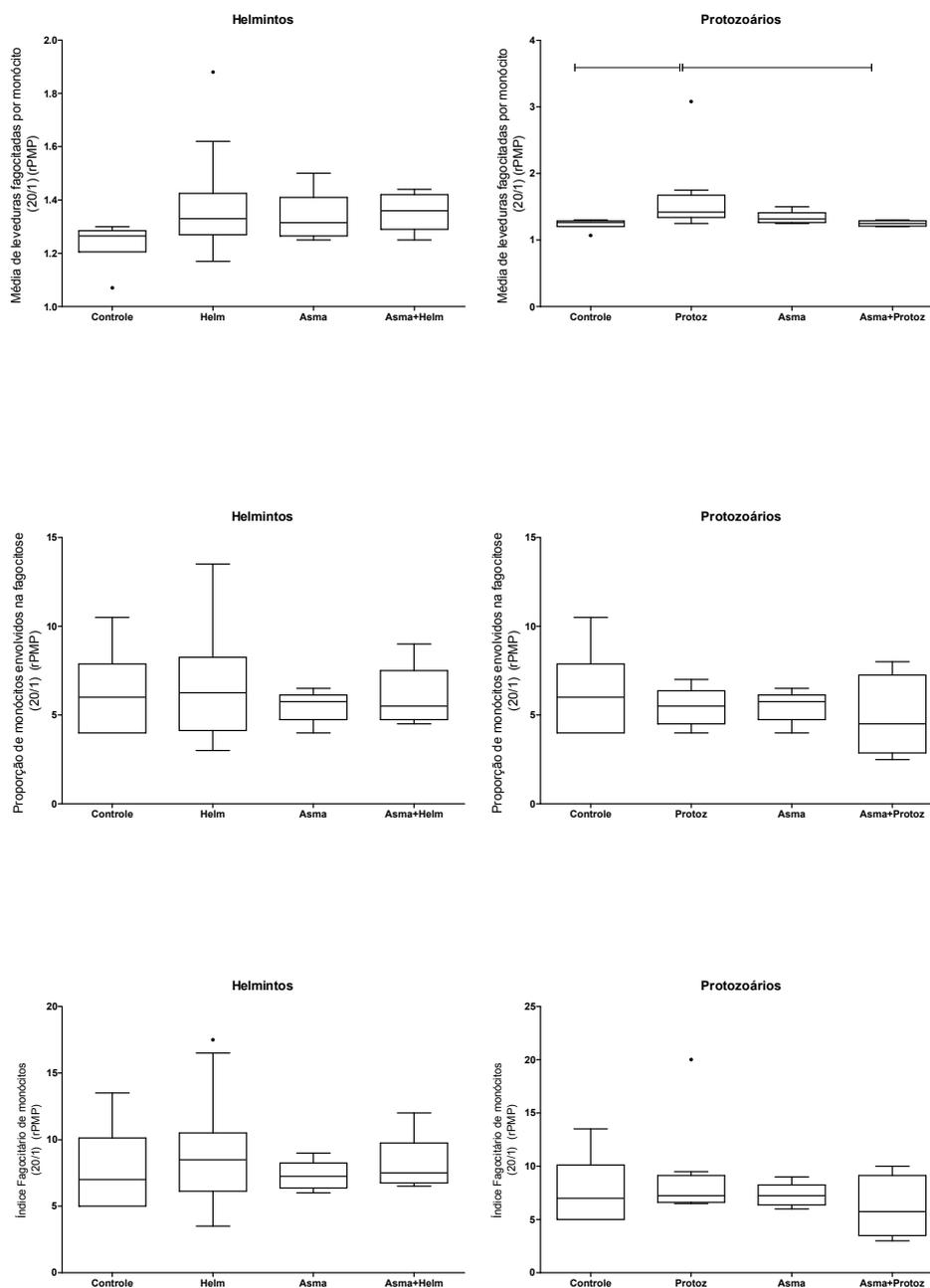
Quando analisamos a fagocitose pelos monócitos, pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, na proporção de 20 leveduras por fagócito, o número de leveduras fagocitadas por monócito foi maior nas crianças parasitadas por protozoários do que as do grupo controle e as portadoras de asma e parasitadas por protozoários (1,42 versus 1,25 versus 1,26, respectivamente) ( $p=0,01$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, Protozoários > Asma+Protoz, Protozoários > Controle). (Figura 36D). Entretanto, essa maior ingestão de partículas pelos monócitos não foi capaz de modificar o índice fagocitário dos monócitos nesses grupos.

Não houve diferença estatística nos outros parâmetros avaliados (Figura 35, Figura 36A, B, C, E, F)



**Figura 35:** Capacidade fagocitária dos monócitos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas apenas por helmintos e em D, E e F as parasitadas apenas por protozoários. Em A e D – Média de leveduras fagocitadas; Em B e E – Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose; Em C e F – Índice fagocitário. Teste de ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls

para múltiplas comparações ou teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn. ( $p > 0,05$ )

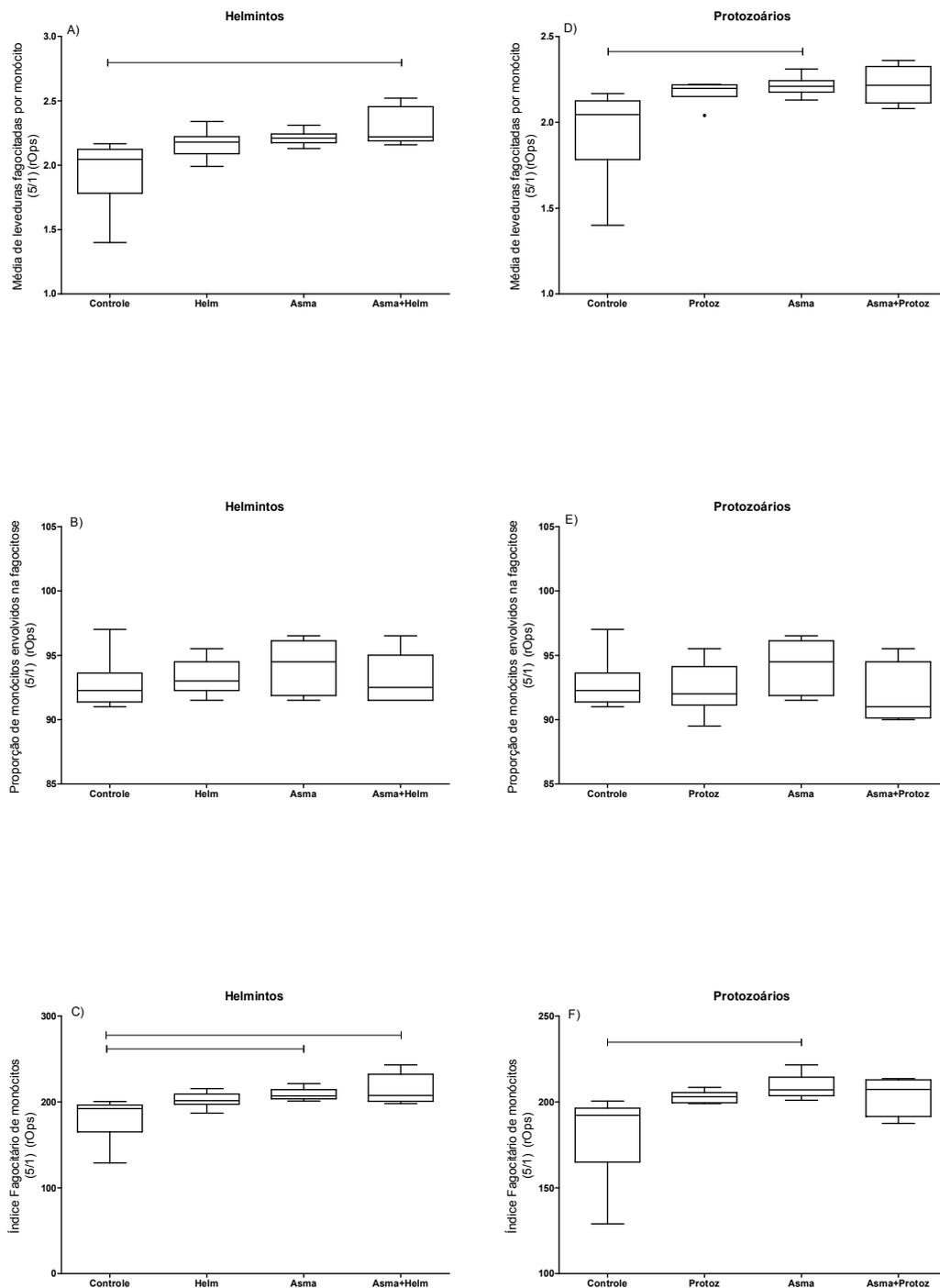


**Figura 36:** Capacidade fagocitária dos monócitos, pelos receptores de padrões moleculares para patógenos, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas apenas por helmintos e em D, E e F as parasitadas apenas por protozoários. Em A e D – Média de leveduras fagocitadas; Em B e E – Proporção de monócitos envolvidos na

fagocitose; Em C e F – Índice fagocitário. Em D,  $p=0,01$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Protozoários > Controle, Protozoários > Asma + Protozoário) .

#### **4.6.4 Fagocitose das leveduras pelos monócitos pelos receptores para opsoninas**

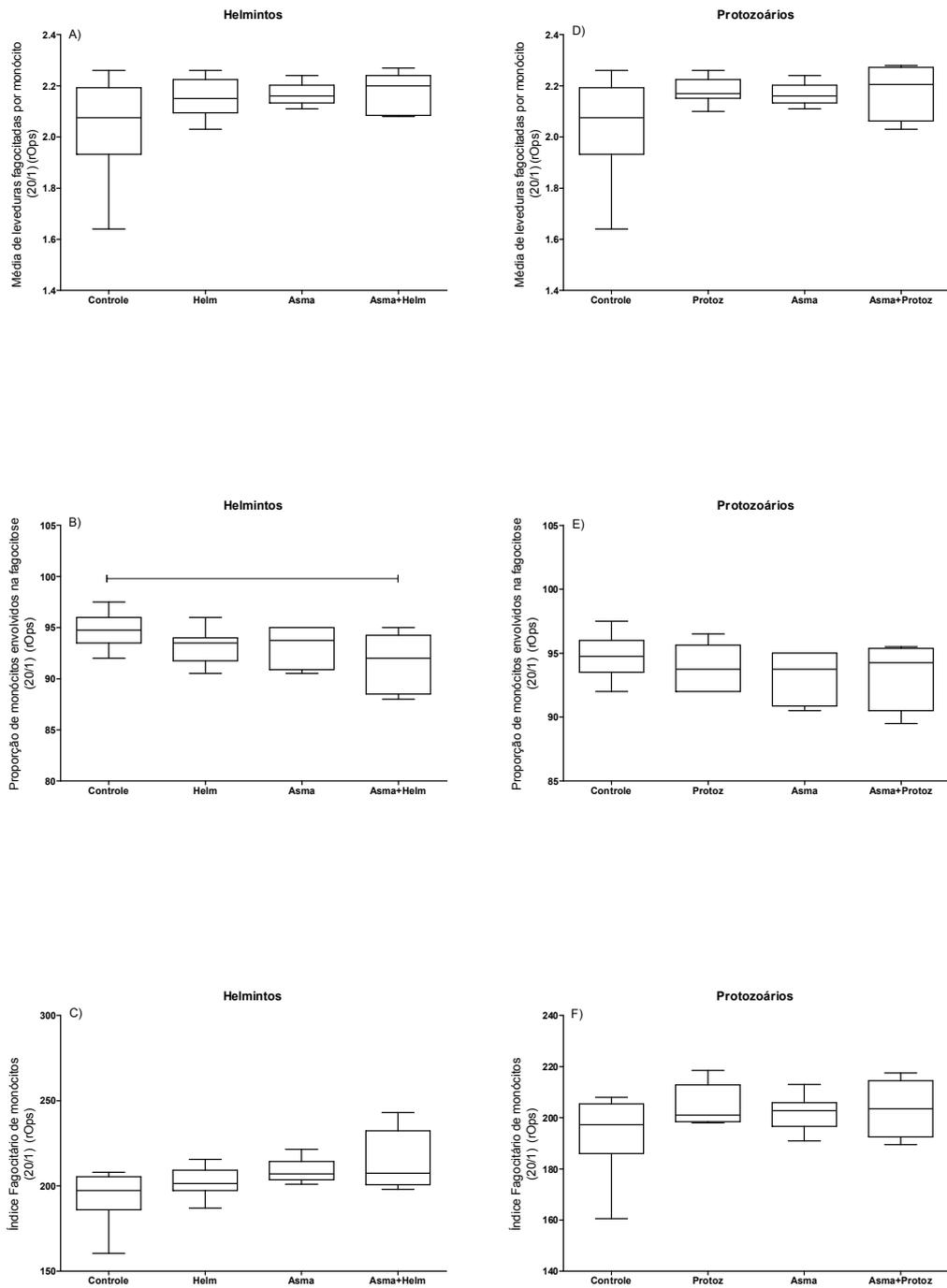
Quando analisamos a fagocitose pelos monócitos pelos receptores para opsoninas, na proporção de 5 leveduras por fagócito, o índice fagocitário dos monócitos das crianças asmáticas e parasitadas pelos helmintos foi maior do que o das crianças controle (207,5 versus 192,3 respectivamente) ( $p=0,004$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) como apresentado na Figura 37C. Esse aumento foi devido à maior ingestão das leveduras pelos monócitos ( $p=0,008$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos, Asma+Helminto > Controle) como mostra a Figura 37A. Além disso, o IF dos monócitos das crianças asmáticas e não parasitadas foi maior do que a dos controles ( $p=0,009$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 37C e F).



**Figura 37:** Capacidade fagocitária dos monócitos por receptores para opsoninas, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas apenas por helmintos e em D, E e F as parasitadas apenas

por protozoários. Em A e D – Média de leveduras fagocitadas; Em B e E – Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose; Em C e F – Índice fagocitário. Em A,  $p=0,008$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma + Helmintos > Controle). Em C,  $p=0,004$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma + Helmintos > Controle, Asma > Controle). Em D,  $p=0,01$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma > Controle). Em F,  $p=0,009$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma > Controle).

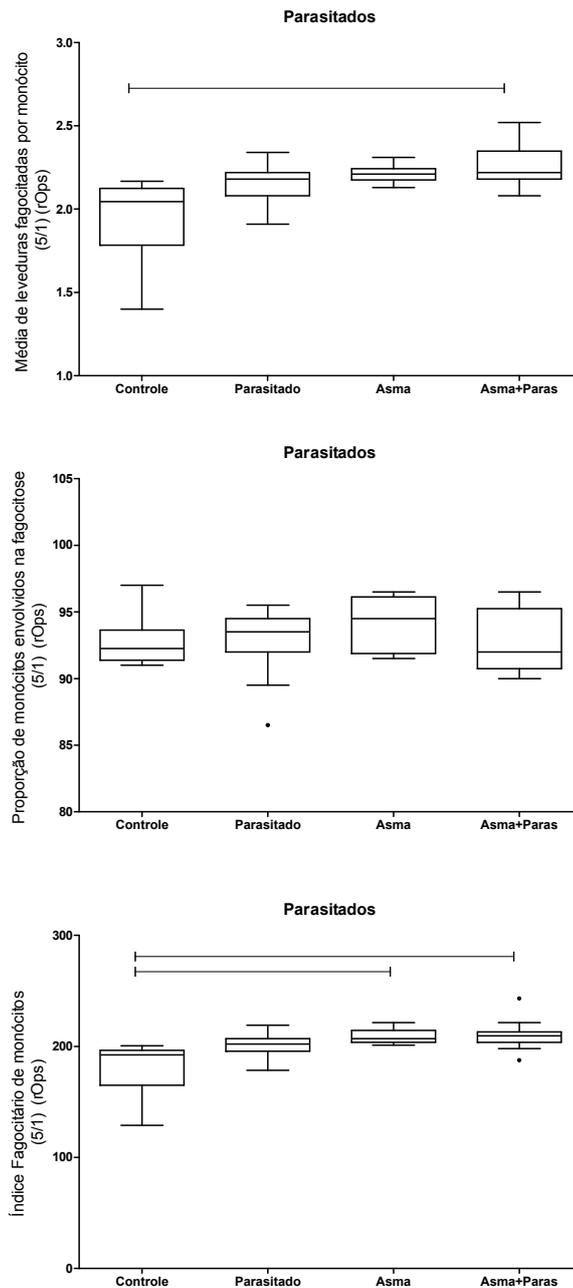
Quando avaliamos a fagocitose pelos monócitos pelos receptores para opsoninas, na proporção de 20 leveduras por fagócito, houve menor envolvimento dos monócitos das crianças com asma + helmintos do que as crianças controle ( $p=0,06$  pelo teste ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para comparação entre os grupos) (Figura 38B). Entretanto, essa deficiência não influenciou o índice fagocitário dos monócitos (Figura 38C).



**Figura 38:** Capacidade fagocitária dos monócitos por receptores para opsoninas, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas apenas por helmintos e em D, E e F as parasitadas apenas por protozoários. Em A e D – Média de leveduras fagocitadas; Em B e E –

Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose; Em C e F – Índice fagocitário. Em B,  $p=0,06$  pelo teste ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls para comparação entre os grupos (Asma + Helmintos < Controle).

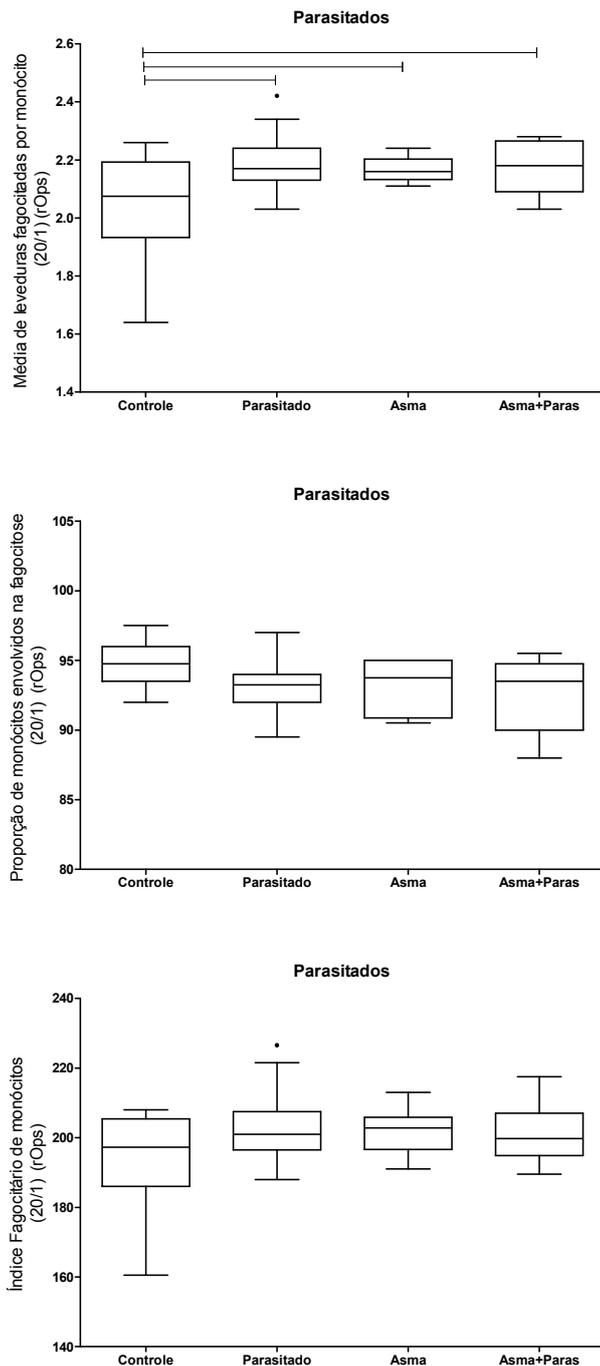
Quando avaliamos a fagocitose pelos monócitos, pelos receptores para opsoninas e utilizando 5 leveduras sensibilizadas por fagócitos, e agrupando todas as crianças parasitadas, observamos que tanto as crianças com asma como as com asma + parasitoses apresentaram maior índice fagocitário do que as crianças do grupo controle ( $p=0,001$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 39C). Essa maior capacidade fagocitária, para as crianças do grupo asma + parasitoses, deveu-se à maior ingestão das leveduras pelos monócitos ( $p=0,002$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 39A).



**Figura 39:** Capacidade fagocitária dos monócitos por receptores para opsoninas, na proporção de 5 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma mais todos os parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas são por associação de helminto e/ou protozoário. Em A, Média de leveduras fagocitadas; Em B, Proporção de monócitos envolvidos na fagocitose; Em C– Índice fagocitário. Em A,  $p=0,002$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma + Parasitose > Controle). Em C,  $p=0,001$  pelo teste de Kruskal-Wallis,

seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma + Parasitose > Controle, Asma > Controle).

Quando a fagocitose dos monócitos pelos receptores para opsoninas foi testada utilizando 20 leveduras/fagócito, todos os grupos (parasitados, asma e asma +parasitados) ingeriram maior número de partículas do que o grupo controle. ( $p=0,02$ , teste ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls) (Figura 40A).



**Figura 40:** Capacidade fagocitária dos monócitos por receptores para opsoninas, na proporção de 20 leveduras por fagócito, em crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma mais todos os parasitos intestinais. Em A, B e C as crianças parasitadas são por associação de helminto e/ou protozoário. Em A, Média de leveduras fagocitadas; Em B, Proporção de monócitos

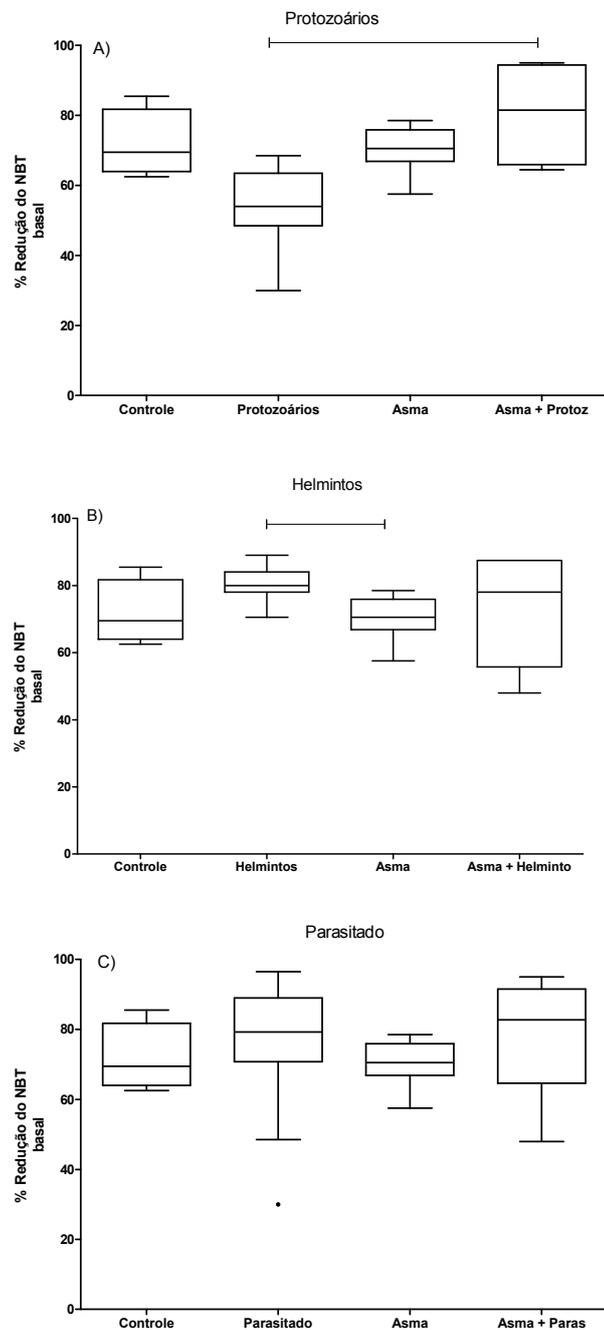
envolvidos na fagocitose; Em C– Índice fagocitário. Em A,  $p=0,02$ , teste ANOVA, seguido pelo método de Newman-Keuls (Parasitado>Controle, Asma>Controle, Asma+Parasito > Controle).

#### **4.7 Produção de ânions superóxido avaliado pelo teste do *nitroblue tetrazolium* - NBT**

Com o teste do NBT avaliamos a capacidade dos fagócitos de produzirem radicais de oxigênio. O corante *nitroblue tetrazolium*, adicionado à lâmina com os fagócitos aderidos, possibilita a identificação do metabolismo oxidativo pela formação de grânulos cor-azul escuro no citoplasma que são visualizados à microscopia óptica.

Observamos menor porcentagem de redução do NBT basal pelos fagócitos das crianças parasitadas por protozoários do que as crianças com asma e parasitadas pelos protozoários ( $p=0,01$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 41A).

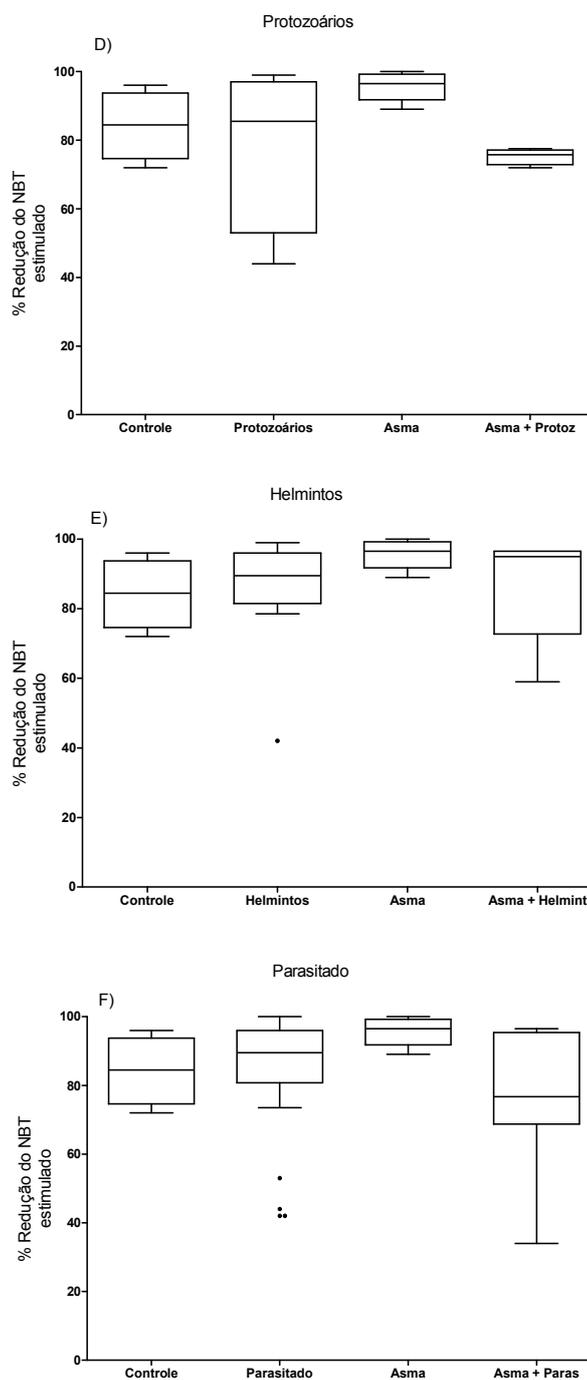
Sendo que resultado oposto foi observado para as crianças parasitadas por helmintos, no qual a porcentagem de redução do corante NBT foi maior nas crianças com helmintíases do que com asma ( $p=0,008$ , teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos) (Figura 41B).



**Figura 41:** Capacidade de oxidação dos fagócitos pelo NBT basal nas crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em A, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em B as parasitadas apenas por helmintos e em C todas as crianças parasitadas. Em A,  $p = 0,01$  pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Asma+Protozoários > Protozoários). Em B,  $p=0,008$  pelo teste de

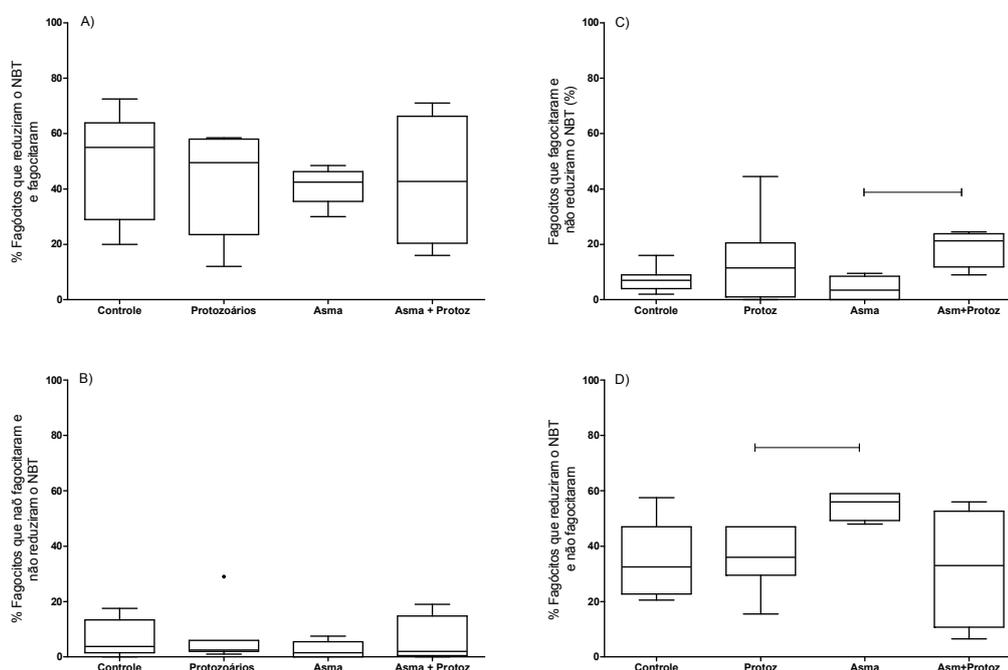
Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn para comparação entre os grupos (Helminto > Asma). Em C, teste de Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ .

Não houve diferença estatística entre os grupos estudados na porcentagem de redução do NBT quando os fagócitos foram estimulados pelas leveduras (Figura 42).



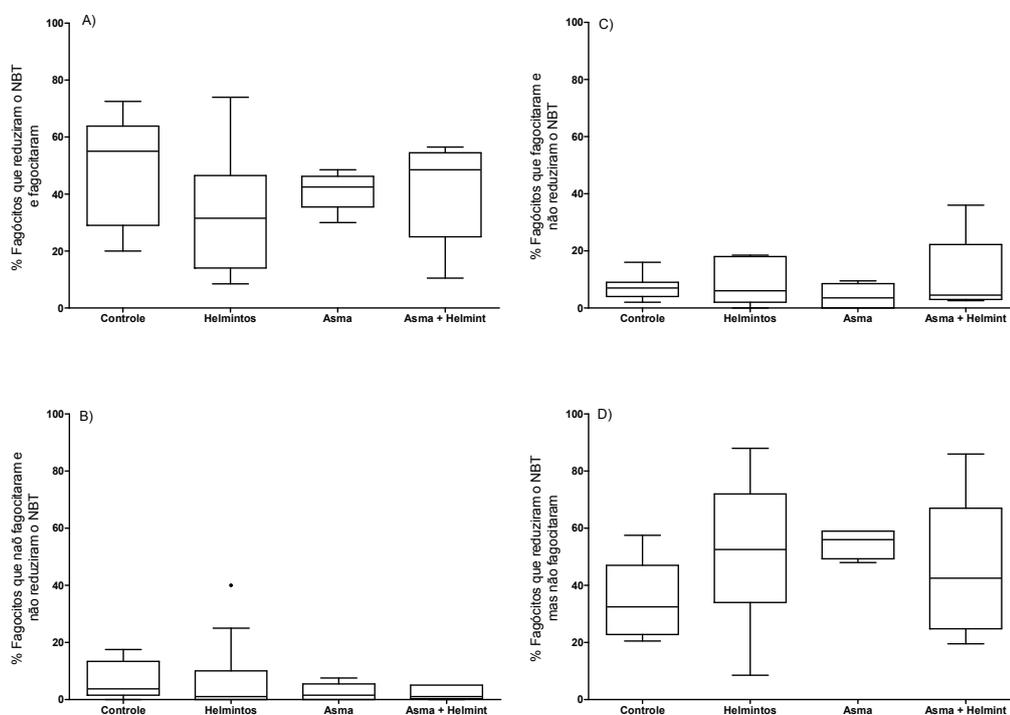
**Figura 42:** Capacidade de oxidação dos fagócitos pelo NBT estimulado nas crianças dos grupos controle, parasitadas, com asma e com associação asma e parasitos intestinais. Em D, as crianças parasitadas apenas por protozoários, em E as parasitadas apenas por helmintos e em F todas as crianças parasitadas. Em D,  $p > 0,05$  pelo teste de Kruskal-Wallis, pelo teste t  $p = 0,01$  (Asma > Asma+Protozoários). Em E e F, teste de Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ .

Quando os parâmetros de avaliação da redução do NBT foram discriminados, apenas para as crianças parasitadas por protozoários foi observado que as crianças asmáticas parasitadas por protozoários tiveram um maior número de fagócitos que estavam fagocitando, mas não reduziram o NBT do que as crianças com asma exclusivamente ( $p=0,06$ , teste ANOVA) (Figura 43C). Enquanto que para os fagócitos que reduziram o NBT mas não fagocitaram, as crianças asmáticas apresentaram uma maior porcentagem de redução do NBT do que as crianças do grupo controle ( $p=0,05$  pelo teste ANOVA) (Figura 43D).

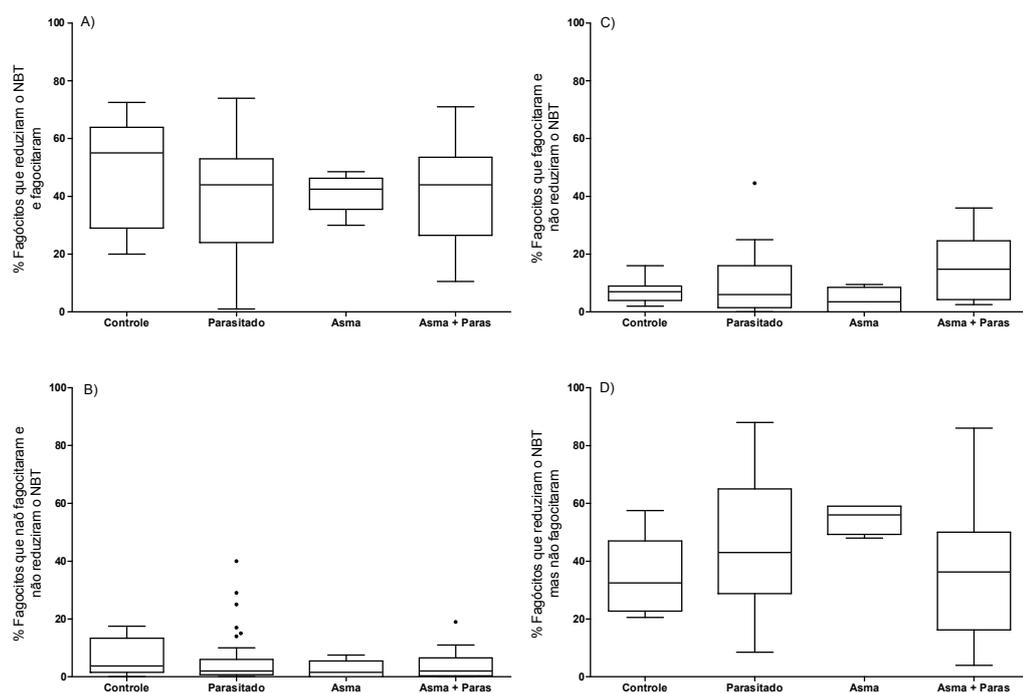


**Figura 43:** Porcentagem de redução do NBT estimulado nas crianças dos grupos controle, parasitadas por protozoário, com asma e com associação asma mais parasitose por protozoário. Em A, porcentagem de células que reduziram o NBT e fagocitaram leveduras; em B, porcentagem de células que não reduziram o NBT nem fagocitaram leveduras; em C, porcentagem de células que não reduziram o NBT mas fagocitaram leveduras e em D, porcentagem de células que reduziram o NBT e não fagocitaram leveduras. Em D,  $p=0,05$  pelo teste ANOVA.

Não houve diferença estatística entre os grupos estudados pelo teste NBT com os fagócitos estimulados pelas leveduras conforme Figura 44 e Figura 45.



**Figura 44:** Porcentagem de redução do NBT estimulado nas crianças dos grupos controle, parasitadas por helminto, com asma e com associação asma e parasitose por helminto. Em A, porcentagem de células que reduziram o NBT e fagocitaram leveduras; em B, porcentagem de células que não reduziram o NBT nem fagocitaram leveduras; em C, porcentagem de células que não reduziram o NBT mas fagocitaram leveduras e em D, porcentagem de células que reduziram o NBT e não fagocitaram leveduras. Em A, teste ANOVA  $p > 0,05$ . Em B, C e D, teste de Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ .



**Figura 45:** Porcentagem de redução do NBT estimulado nas crianças dos grupos controle, parasitado, asma e com associação asma e parasitoses. Em A, porcentagem de células que reduziram o NBT e fagocitaram leveduras; em B, porcentagem de células que não reduziram o NBT nem fagocitaram leveduras; em C, porcentagem de células que não reduziram o NBT mas fagocitaram leveduras e em D, porcentagem de células que reduziram o NBT e não fagocitaram leveduras. Em A, teste ANOVA com  $p=0,06$ . Em B, teste de Kruskal-Wallis ( $p>0,05$ ). Em C, teste de Kruskal-Wallis com  $p=0,08$ . Em D, teste ANOVA,  $p>0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

As enteroparasitoses são capazes de desencadear várias alterações no organismo dependentes no hospedeiro de sua genética, seu estado nutricional e sua capacidade de resposta imune; e dependentes do parasito como da carga parasitária e da patogenicidade e virulência do helminto ou protozoário. As parasitoses intestinais apresentam uma alta prevalência em todo o mundo principalmente em locais de baixas condições sanitárias, socioeconômicas, de educação e higiene. As parasitoses contribuem com o ciclo improdutivo social do indivíduo, devido ao baixo rendimento orgânico, intelectual e laboral, associado às condições adversas a que já estão sujeitos pelas reduzidas condições sociais já referidas (Araújo, Santos, Neiva, *et al.*, 2009; Seixas, Souza, Souza, *et al.*, 2011).

A mediana da renda familiar das famílias no grupo parasitado foi de R\$470,00, valor muito abaixo do salário-mínimo (no valor de R\$ 788,00 à época do inquérito; a saber, o dolar americano comercial no referido período estava no valor de R\$ 2,70) no Brasil, revelando o inadequado poder aquisitivo para manutenção das necessidades de uma unidade familiar em centro urbano neste país. Há dados semelhantes no estudo de Fonseca, Teixeira, Barreto *et al.* (2010) sobre prevalência e fatores associados às geohelmintíases em crianças de áreas carentes do Norte e Nordeste, onde foi relatado que 75% das famílias analisadas apresentavam renda mensal igual ou inferior a 1 salário mínimo.

Com relação à escolaridade, vimos que mais de 53% dos pais eram pessoas analfabetas no grupo controle. No grupo parasitado mais de 34% dos pais eram analfabetos ou não sabiam ler, apenas sabiam escrever seus nomes, totalizando mais de 88% com grau de instrução menor que o ensino fundamental completo. Fonseca *et al.* (2010) também registrou que as mães tinham tempo médio de escolaridade em anos de  $3,2 \pm 1,5$ , correspondendo a um grau de instrução inferior ao ensino fundamental completo.

A desnutrição pode estar relacionada tanto ao erro nutricional quanto ao baixo poder aquisitivo associado à falta de condições e educação para saúde e uma alimentação saudável. Estudos no Brasil mostram uma taxa de desnutrição de 40% nas crianças na região Nordeste e 30,7% em todo o Brasil (Ferreira, Assunção, Vasconcelos, *et al.*, 2002). Encontramos no grupo de crianças parasitadas apenas por *Giardia lamblia*, a menor mediana do percentil do IMC em comparação com o grupo de crianças parasitadas apenas por helmintos. Achados semelhantes no trabalho de Muniz-Junqueira & Queiroz (2002) revelaram que as crianças monoparasitas com *Giardia lamblia* apresentavam menor escore Z para o peso em comparação com as crianças infectadas por *Ascaris lumbricoides*, mostrando os efeitos deletérios sobre o estado nutricional do indivíduo durante enteroparasitose por esse protozoário.

O nível de escolaridade dos pais nas famílias das crianças neste trabalho foi inferior ao ensino fundamental completo em mais de 76% dos pais das crianças do grupo controle, mais de 88% no grupo parasitado e mais de 57,8% no grupo com asma e enteroparasitoses, corroborando com o baixo poder aquisitivo e qualificação para o trabalho.

Nas visitas domiciliares na Chácara Santa Luzia da Cidade Estrutural, foi possível visualizar o destino do lixo domiciliar em ruas sem acondicionamento ou periodicidade da coleta adequados, despejados à céu aberto com infestação de moscas nos resíduos alimentares expostos, como foi registrado nas imagens do anexo 7. Como agravante para transmissão das enteroparasitoses, constatamos hábitos de evacuação no meio ambiente no peridomicílio em 11,9% das crianças do grupo parasitado e 8,3% das crianças do grupo asma e parasitoses intestinais.

A análise do tratamento da água para a ingestão revelou nenhuma prática de filtração, fervura ou qualquer procedimento de tratamento da água em domicílio em 100% das famílias do grupo controle, 88% do grupo parasitado, 42,8% do grupo de asma e 75% do grupo asma associada a parasitoses intestinais.

A anemia estava presente em 11,7% das crianças estudadas, sendo a frequência por grupo de 14,2% entre as crianças no grupo parasitado e as crianças no grupo de asma. Muniz-Junqueira & Queiroz (2002) mostraram anemia em 16,5% das crianças estudadas em outra área de invasão do DF.

Com relação às parasitoses intestinais, no grupo parasitado 57% das crianças estavam parasitadas por *Giardia intestinalis*, também 57% estavam parasitadas por *Ascaris lumbricoides* e 50% por *Hymelopsis nana*, além das associações. A associação protozoário e helmintos estava presente em 38% das crianças nesse grupo. Já no grupo das crianças asmáticas e com enteroparasitoses, parasitado, 58,3% das crianças estavam parasitadas por *Giardia intestinalis* e também 58,3% estavam parasitadas por *Ascaris lumbricoides* e 25% por *Hymelopsis nana*, além de outras associações.

A resposta de defesa antiparasitária no indivíduo é iniciada pelos mecanismos de barreira da mucosa intestinal, seguida pela resposta imune inata, que detecta a invasão do indivíduo pelo patógeno pelos receptores de reconhecimento de padrões de patógenos, como receptores para manose, receptores semelhantes ao Toll, CD36, receptores de limpeza (*scavenger*) presentes em células do sistema imunitário inato e que se ligarão em padrões moleculares conservados presentes nos parasitos, como também por receptores para as frações do sistema do complemento. A resposta imune adaptativa é então desencadeada e ocorre a resposta de linfócitos T e B, com formação de imunoglobulinas, idealmente específicas e de alta afinidade, contra o patógeno, pelos linfócitos B e com formação de células T e B de memória.

Durante a infecção por parasitos intestinais os três mecanismos de resposta de defesa do hospedeiro são estimuladas e contribuem para a imunidade e imunoagressão. Na asma, o tipo de resposta do indivíduo, a susceptibilidade genética e as influências do ambiente e outros fatores determinam as manifestações da asma, podendo ocorrer resposta imune desequilibrada do tipo Ta2, Ta1 e Treg, que culmina na agressão ao próprio organismo.

O presente estudo avaliou, tanto nas parasitoses intestinais quanto na asma, a ativação dos eosinófilos e a capacidade fagocitária dos monócitos e dos neutrófilos, que são 3 células atuantes com diferentes papéis e ações no processo inflamatório e no processo de defesa do organismo, e suas ações desencadeiam processos que participam das apresentações clínicas de cada uma dessas doenças. Os pacientes com asma incluídos neste estudo foram pacientes com asma leve intermitente sem necessidade de medicação profilática para controle e fora do estado de exacerbação ou crise.

Uma quantidade maior de eosinófilos normais, sem ativação celular, foi observada no grupo controle e em todos os grupos com parasitose(s) intestinal(is) em comparação ao grupo de crianças asmáticas sem enteroparasitoses. O percentual elevado de eosinófilos ativados, que nesse trabalho foi quantificado pelos parâmetros morfológicos, nos pacientes com diagnóstico de asma em comparação ao grupo controle, também foi demonstrado nos trabalhos de Gonçalves (2010), Martins (2013) e (Muniz-Junqueira, Barbosa-Marques & Junqueira, 2013). O grupo de crianças que tinham asma associada à presença de parasitose intestinal (helmintos e protozoários) apresentou maior quantidade de eosinófilos normais, mostrando que os eosinófilos dessas crianças estavam em menor estado de ativação, em comparação ao grupo de pacientes com asma sem enteroparasitoses (Figura 19). Não encontramos dados na literatura que tivessem avaliado o estado de ativação dos eosinófilos em crianças com parasitoses intestinais.

Observamos que apenas os parâmetros porcentagem de eosinófilos espalhados, a emissão de pseudópodes localizados e a emissão de grânulos em pequena quantidade estavam aumentados nas crianças asmáticas. Esses parâmetros sugerem que esses eosinófilos se encontravam moderadamente ativados nas crianças asmáticas, possivelmente pelo fato do quadro asmático estar no período intercrítico da doença, em um estado de controle relativo da doença, pois as crianças não estavam necessitando utilizar nenhum medicamento específico ou profilático. Mesmo esses parâmetros não estavam aumentados nas crianças parasitadas por

helmintos ou protozoários, sugerindo que os eosinófilos do sangue periférico não estão ativados nas infecções por esses parasitos.

Esses dados indicam que o sangue periférico dos pacientes parasitados com helmintos e/ou protozoários apresentam menor quantidade de eosinófilos ativados circulantes. E, apesar de a eosinofilia estar presente em ambas as doenças, na asma e nas parasitoses intestinais, devem existir fatores do sistema imune nos indivíduos com parasitose(s) intestinal(is) que atuam inibindo a ativação dos eosinófilos conforme observado pelos parâmetros morfológicos de ausência de ativação celular, espriamento, emissão de pseudópode localizado e liberação de pequena quantidade de grânulos pelos eosinófilos nas crianças parasitadas. Essa hipótese fica reforçada pelo fato de que crianças asmáticas apresentando concomitantemente parasitoses intestinais, apresentaram um perfil de ativação dos eosinófilos mais semelhante ao das crianças parasitadas do que o das crianças asmáticas.

A ativação de eosinófilos e a eosinofilia nas vias aéreas apresentam correlação com a gravidade do quadro asmático (Muniz-Junqueira, Barbosa-Marques & Junqueira, 2013) e com a hiperresponsividade das vias aéreas (Alam & Busse, 2004). Os eosinófilos são células importantes nas doenças alérgicas, na asma, nas infecções parasitárias e em outras doenças. Sua produção, maturação, recrutamento e quimiotaxia pelo estímulo das citocinas, moléculas de adesão, imunoglobulinas, leucotrienos, prostaglandinas e receptores específicos possibilitam que o eosinófilo alcance seu território de atuação. O aspecto morfológico do eosinófilo revela o seu estado de ativação no sangue circulante e se correlaciona com o aumento de algumas alterações que sugerem a gravidade da asma; esses parâmetros morfológicos possibilitaram a análise do papel inibitório das parasitoses intestinais sobre essa ativação.

Tanto as variações na ativação dos eosinófilos e na eosinofilia, quanto nos quadros clínicos da asma e das parasitoses, envolvem mecanismos celulares e moleculares distintos, que regulam as funções dos eosinófilos, dependendo dos diferentes órgãos/locais de atuação e recrutamento, além

do fator desencadeador, e do estímulo para a produção e ativação dessas células.

A desgranulação dos eosinófilos e liberação de proteínas dos grânulos são importantes mecanismos pró-inflamatórios na asma, causando danos e disfunção tecidual no pulmão, correlacionando com a gravidade e exacerbação do quadro de asma (Kim, 2013; Persson & Erjefält, 2000). A neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) e a proteína básica principal (MBP) constituem biomarcadores resultantes da liberação de grânulos eosinofílicos, as quais estão sendo quantificadas para o diagnóstico e a monitorização do quadro de asma (Kim, 2013). Em pacientes com parasitoses intestinais também foi descrito aumento da proteína catiônica eosinofílica (EPC) sérica, e os níveis séricos dessa proteína também mostraram correlação positiva com o número de eosinófilos (Rodrigues, Arruda, Rodrigues, *et al.*, 2008).

Pelo estudo dos parâmetros morfológicos dos eosinófilos analisados à microscopia óptica - técnica simples e de baixo custo - também foi possível mostrar correlação positiva entre o aumento das complicações clínicas na asma e a desgranulação eosinofílica em média e grande quantidade, além do espraiamento, emissão de pseudópode isolado ou de pseudópodes múltiplos, presença de vacúolos citoplasmáticos e degeneração celular (Muniz-Junqueira, Barbosa-Marques & Junqueira, 2013; Gonçalves, 2010). Essas alterações se devem possivelmente à maior liberação de citocinas e proteínas mediadoras da resposta inflamatória no sangue periférico, particularmente nas exacerbações da asma e em seus quadros com maior gravidade. No presente trabalho não observamos semelhança de tais alterações nas crianças apresentando parasitoses intestinais. É importante considerar que as crianças por nós estudadas apresentavam asma leve intermitente, sem necessidade de medicação profilática e se encontravam no período intercrítico da doença. Embora os eosinófilos tenham apresentado certo grau de ativação, o estado de ativação dessas células, foi menor, comparativamente ao das crianças em fase de exacerbação aguda da doença, o que também foi observado por Muniz-Junqueira *et al.* (2013) para as crianças no período intercrítico da doença.

Como a ação dos eosinófilos contra os helmintos ocorre no local onde se encontra o parasito para o combate ao verme, e principalmente suas larvas, a ativação celular do eosinófilo parece ocorrer principalmente no órgão parasitado, pelo estímulo local decorrente do parasito e das células do sistema imune atuantes localmente, justificando a ausência de ativação significativa dos eosinófilos ao nível periférico como foi observado nesse trabalho. Entretanto, precisa ser considerada também a possibilidade de produção pelos parasitos de moléculas imunomoduladoras negativas que atuariam sobre as funções do sistema imunitário, e que poderiam estar impedindo a ativação dos eosinófilos no sangue periférico. A favor dessa hipótese, tem sido mostrado que o *Schistosoma mansoni*, que é um helminto, pode deprimir a produção de anticorpos, as funções dos linfócitos T e a capacidade fagocitária dos monócitos em pacientes com esquistossomose mansoni e em modelo experimental murino da esquistossomose (Muniz-Junqueira, Tosta & Prata, 1990; Muniz-Junqueira, Tavares-Neto, Ataíde, *et al.*, 1991; Muniz-Junqueira, Prata & Tosta, 1992; Muniz-Junqueira, Tavares-Neto, Prata, *et al.*, 1996; Muniz-Junqueira, Prata & Tosta, 1997; Muniz-Junqueira, Eduardo & Prata, 2009; Weinstock & Elliott, 2013; Hayes, Bancroft & Grencis, 2004).

Também favorecendo essa última hipótese, tem sido mostrado que a infecção intestinal por helmintos pode diminuir a resposta alérgica, as respostas auto-inflamatórias e autoimunes sistêmicas. Além da resposta imune contra os helmintos, ocorre uma resposta imunorreguladora que é desencadeada pelos produtos secretados e excretados (SE) pelos helmintos que podem atuar via sistema linfático na redução da ativação de células dendríticas com supressão na regulação de moléculas coestimulatórias e citocinas, levando à redução das células Ta2, aumento na produção de IL10 e de TGF- $\beta$  e estímulo para células T regulatórias. Em adição, em experimentos com modelos animais, observa-se que: a) as proteínas SE liberadas pelos helmintos podem inibir a liberação da IL-33, interleucina associada a polarização para resposta tipo Ta2; b) a supressão da IL5 não bloqueia os sintomas da asma; c) a inoculação de helmintos *H. polygyrus* em

murinos previne a diabetes do tipo I em cobaias não obesas, e em camundongos, previne eficazmente a inflamação atópica induzida das vias aéreas; d) o produto secretado excretado 62 (ES62) derivado de helmintos tem potente efeito anti-inflamatório em tratamentos experimentais na asma e na artrite. Pesquisas também mostram o papel das parasitoses intestinais por helmintos influenciando a composição da flora bacteriana intestinal comensal e com produção de muco local protetor via IL22. O uso do *Trichuris suis ova* (TSO), parasita habitual de porcos com ciclo apenas intestinal e que apenas transitoriamente parasita seres humanos, mostrou na fase experimental do estudo o sucesso no tratamento de pacientes com Doença de Crohn ou esclerose múltipla enquanto na vigência da infecção. Os estudos revelam que múltiplos fatores atuam de forma redundante ou sinérgica para determinar efeitos imunorregulatórios sistêmicos decorrente da infecção pelos helmintos associada aos seus produtos. O desenvolvimento de terapias com produtos dessa associação podem atuar no tratamento das respostas inflamatórias (Mishra, Palma, Bleich, *et al.*, 2014; Maizels, Mcorley & Smyth, 2014; Weinstock & Elliott, 2013; Hayes, Bancroft & Grencis, 2004).

Nos pacientes dos diferentes grupos deste trabalho foi realizada a avaliação da função dos fagócitos por meio da análise da capacidade dos monócitos e neutrófilos de fagocitarem a levedura *S. cerevisiae* – pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos (rPMPs) e pelos receptores para opsoninas – e pela capacidade dos fagócitos de produzirem ânions superóxido avaliada pelo teste do NBT. Como os fagócitos monócitos e neutrófilos são importantes células da primeira linha de defesa contra patógenos, análises foram realizadas com a finalidade de esclarecer se a presença das parasitoses intestinais no organismo altera a capacidade funcional dessas células na circulação sanguínea periférica em comparação e na associação com a asma. A avaliação da fagocitose foi feita pela quantificação da interiorização das leveduras pelos receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos, como a manose na superfície da levedura ou por meio de receptores para opsoninas, como os

receptores CR1, CR3 e FcR nos neutrófilos e monócitos que se ligam às frações do sistema do complemento e às imunoglobulinas G, respectivamente (Muniz-Junqueira, Peçanha, da Silva-Filho, *et al.*, 2003).

Os próprios macrófagos, após contato com o patógeno, estimulam uma resposta imune do tipo Th1 ou Th2, aumentando sua capacidade de combate ao patógeno invasor, ou podem produzir o TGF- $\beta$ 1 suficiente para regular negativamente seu estado de ativação (Mills, Kincaid, Alt, *et al.*, 2000).

Neste trabalho, observamos menor capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos no grupo das crianças parasitadas por protozoários em relação às crianças asmáticas sem parasitoses. Esse fato foi decorrente do menor envolvimento dos neutrófilos na fagocitose. Uma possível explicação para esse fenômeno seria a menor mobilidade dos neutrófilos das crianças parasitadas por protozoários, e particularmente pela *Giardia intestinalis*, determinada por fatores relacionados com a infecção parasitária agindo sobre as células do sangue. De fato, tem sido mostrado que uma protease produzida pela *Giardia intestinalis*, a cisteína protease catépsina B, mostrou diminuir a quimiotaxia de células polimorfonucleares estimuladas pela quimiocina IL-8/CXCL8, diminuindo o acúmulo dessas células e a infiltração de neutrófilos no tecido. Tendo sido mostrado que a infecção pela *Giardia* pode atenuar o acúmulo de PMN por diminuir a expressão de mediadores responsáveis pelo seu recrutamento (Cotton, Bhargava, Ferraz, *et al.*, 2014; Cotton, Motta, Schenck, *et al.*, 2014). Sugerindo, portanto, que a menor capacidade fagocitária por nós observada foi consequência da ação dessas substâncias sobre os neutrófilos no sangue circulante, diminuindo sua capacidade de migração.

Os monócitos de crianças parasitadas por protozoários, principalmente *Giardia intestinalis*, mostraram uma maior capacidade de ingerir as leveduras. Possivelmente isso ocorreu porque na defesa contra protozoários, o padrão de resposta imune desencadeada é principalmente do tipo Th1, ativando macrófagos M1, com liberação de INF- $\gamma$  e forte

estímulo celular capacitando a função dos monócitos na fagocitose das Giardias, sendo esta uma possível explicação para a maior ingestão das leveduras, pela resposta ao estímulo pelas citocinas, produzidas pelos macrófagos M1, como o IFN- $\gamma$  (Mills, Kincaid, Alt, *et al.*, 2000; Martinez & Gordon, 2014).

No presente estudo, diferentemente do encontrado em outras artigos sobre fagocitose em pacientes asmáticos, um maior índice fagocitário dos monócitos foi observado quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para opsoninas nas crianças asmáticas em relação ao grupo controle. Essa ação também pode ser resultante do desvio para a resposta Th2 na asma, com maior capacidade de produção de imunoglobulinas, opsoninas, que facilitam a fagocitose. Nos demais parâmetros não encontramos diferença na capacidade fagocitária entre as crianças asmáticas com a doença controlada e sem necessidade de qualquer terapêutica profilática, na ausência de parasitoses intestinais, e as crianças do grupo controle. O trabalho da Silva-Martis, Couto, Muniz-Junkeira *et al.* (2013) mostrou que a capacidade fagocitária tanto dos monócitos quanto dos neutrófilos por ambos receptores de padrões moleculares de patógenos e receptores de opsoninas (via complemento e/ou imunoglobulinas), nos pacientes com asma não controlada em necessidade de medicação terapêutica profilática, se encontrava reduzida em comparação à dos indivíduos do grupo controle. Também foi observado por Marques (2003) no período intercrise em crianças asmáticas, o déficit na fagocitose pelos monócitos e neutrófilos via receptores de padrões moleculares para patógenos e via receptores para opsoninas. Possivelmente essa diferença nos resultados é decorrente dos mediadores, das células e das citocinas do sistema imune envolvidos nos casos de exacerbações e maior gravidade de asma, que estão intensamente ativados e presentes nesses casos.

A produção de ânions superóxido pelos fagócitos foi menor nas crianças parasitadas por protozoários. A produção desse radical de oxigênio pelos fagócitos foi mais elevada nas crianças que estavam parasitadas por helmintos. Um padrão de respostas opostas se relaciona com a ativação dos

linfócitos e macrófagos nessas parasitoses. Helminthos estimulam uma resposta imune do padrão Ta2, com aumento da produção de IL4. Contrariamente, as infecções por protozoários desencadeiam ativação de células e mediadores determinando uma resposta imune do padrão Ta1, com elevada produção de INF- $\gamma$  (Martinez & Gordon, 2014). Quando ocorreu a associação da parasitose por protozoário com a asma, houve um incremento na capacidade de produção de ânions superóxido. A resposta imune na asma e nas alergias ocorre predominantemente pelo padrão de macrófagos M2 e estímulo à resposta imune Ta2 (Mills *et al.* 2000; Martinez & Gordon, 2014).

Na análise do NBT após o estímulo com leveduras foi possível verificar que as crianças asmáticas apresentaram uma maior capacidade de redução do NBT do que o grupo controle, pois houve aumento da % redução do NBT pelos fagócitos que reduziram o corante, mais não fagocitaram leveduras, mostrando que a produção dos ânions superóxido ocorreu mesmo sem o estímulo da ingestão da partícula. Dado semelhante foi encontrado por Marques (2003), e sugere que a produção de radicais do oxigênio está exacerbada e sem foco definido nas crianças asmáticas e poderia contribuir para a lesão celular pulmonar e posterior remodelamento das vias aéreas. Já, pela análise dos fagócitos que fagocitaram mais não realizaram a redução do NBT, ou seja, não produziram os radicais livres, foi possível verificar que no grupo de crianças asmáticas e parasitadas por protozoários, esse parâmetro foi mais elevado do que no grupo com asma isolada, sugerindo que a parasitose por protozoário, embora não interferindo na ingestão das partículas, pode ter causado dificuldade na produção dos radicais livres, possivelmente pelo desequilíbrio da resposta Ta1.

Entre as limitações do nosso estudo, a amostra estudada foi de conveniência e foi baixa adesão das pessoas convidadas a participarem desse trabalho, não tendo sido possível realizar um inquérito epidemiológico/parasitológico mais amplo nas localidades. Isso determinou um número reduzido de crianças em alguns dos grupos de estudo.

Entre as perspectivas para continuidade desse trabalho, seria importante a análise das citocinas e das células regulatórias, e esclarecer quais os fatores que estão modulando as respostas dos eosinófilos, dos monócitos e dos neutrófilos nesses pacientes, particularmente os fatores relacionados com os parasitos. Como também, avaliar o efeito do tratamento antiparasitário nas funções dessas células.

Em conclusão, nossos dados mostraram que a infecção parasitária e o quadro de asma tiveram efeitos opostos sobre as diversas funções da imunidade inata estudada. Além disso, o tipo de resposta dependeu do tipo de parasito e helmintos e protozoários determinaram repostas opostas: enquanto os protozoários, particularmente a *Giardia intestinalis*, diminuíram a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, os helmintos estimularam a fagocitose pelos monócitos pelos receptores para opsoninas. Em adição, enquanto no quadro de asma observamos certo grau de ativação dos eosinófilos, nas crianças parasitadas essa ativação dos eosinófilos no sangue periférico não ocorreu, possivelmente determinada por fatores supressores produzidos pelos parasitos. Tais achados podem contribuir para o esclarecimento sobre a resposta imune inata aos parasitos e suas repercussões no indivíduo, auxiliando na abordagem das parasitoses e no desenvolvimento de novas terapêuticas para tratamento da asma e atopias.

## 6 CONCLUSÕES

A ativação dos eosinófilos avaliada por parâmetros morfológicos foi menor nas crianças com parasitoses intestinais, em relação ao percentual de eosinófilos normais, espriamento, liberação de pequenas quantidades de grânulos e emissão de pseudópode único em comparação às crianças asmáticas.

A capacidade fagocitária dos neutrófilos das crianças parasitadas exclusivamente por protozoários foi menor do que as crianças asmáticas, quando avaliada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. Entretanto, quando avaliado pelos receptores para opsoninas, embora tenha havido maior ingestão das leveduras pelos neutrófilos nas crianças parasitadas por helmintos em relação às crianças normais, esse aumento não repercutiu na capacidade fagocitária dos neutrófilos.

Quando a fagocitose foi avaliada pelos receptores para opsoninas, a capacidade fagocitária dos monócitos das crianças asmáticas e também parasitadas foi maior do que a das crianças controle, pela maior ingestão de leveduras pelos monócitos.

A produção de ânions superóxido pelos fagócitos foi menor nas crianças parasitadas por protozoários do que nas crianças asmáticas e parasitadas por protozoários. Entretanto, a produção dos ânions superóxidos foi maior quando as crianças estavam parasitadas por helmintos do que nas crianças asmáticas.

Nossos dados mostraram que a infecção parasitária e o quadro de asma tiveram efeitos opostos sobre as diversas funções da imunidade inata, e que as repostas foram dependentes do tipo de parasito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, R. & Busse, W.W. The eosinophil—quo vadis? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2004; 113(1): 38–42.
- Araújo, B.S., Santos, J.F., Neiva, T. da S., Magalhães-Filho, R.R., et al. Associação das parasitoses intestinais com anemia e eosinofilia em escolares do Povoado de Matinha dos Pretos, Feira de Santana, Bahia, Brasil. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*. 2009; 93–7.
- Arruda, L.K., Vailes, L.D., Virginia, P., Ferriani, L., et al. Cockroach allergens and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001; 107(3): 419–428.
- Bartelt, L. a. & Sartor, R.B. Advances in understanding Giardia: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000Prime Reports*. 2015; 7(May): 1–14.
- Bateman, E.D., Hurd, S.S., Barnes, P.J., Bousquet, J., et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *European Respiratory Journal*. 2008; 31(1): 143–178.
- Betson, M., Nejsun, P., Bendall, R.P., Deb, R.M., et al. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. *The Journal of infectious diseases*. 2014; 210(6): 932–941.
- Bragatti, J.A., Chaves, M.L.F., Ferreira, M.A.P., Krug, B.C., et al. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas*. 2013; 233–264.
- BRASIL Resolução 466/2012/CNS/MS/CONEP. *Diário Oficial da União*. 2012.p.59.
- Brown, M. Intestinal helminths. *Medicine*. 2005; 33(8): 54–57.
- Campbell, D. & Douglas, S. Phagocytic cell functions. I. Oxidation and chemotaxis. In: *Rose NR, de Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds) Manual of Clinical Laboratory Immunology, 5th edition American Society for Microbiology, Washington*. pp. 320–328.
- Cardoso, L.S., Costa, D.M., Almeida, M.C.F., Souza, R.P., et al. Risk factors for asthma in a Helminth endemic area in Bahia, Brazil. *Journal of Parasitology Research*. 2012; 2012:16–20.
- Carvalho, E.M., Bastos, L.S. & Araújo, M.I. *Worms and allergy*. 2006; (December 2005): 525–534.
- Cooper, P.J. The potential impact of early exposures to geohelminth infections on the development of atopy. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2004; 26(1): 5–14.

- Cotton, J. a., Beatty, J.K. & Buret, A.G. Host parasite interactions and pathophysiology in Giardia infections. *International Journal for Parasitology*. 2011; 41(9): 925–933.
- Cotton, J.A., Bhargava, A., Ferraz, J.G., Yates, R.M., et al. Giardia duodenalis cathepsin B proteases degrade intestinal epithelial interleukin-8 and attenuate interleukin-8-induced neutrophil chemotaxis. *Infection and immunity*. 2014; 82(7): 2772–2787.
- Cotton, J.A., Motta, J.-P., Schenck, L.P., Hirota, S.A., et al. Giardia duodenalis infection reduces granulocyte infiltration in an in vivo model of bacterial toxin-induced colitis and attenuates inflammation in human intestinal tissue. *PLoS one*. 2014; 9(10): e109087.
- Farthing, M.J.G. Intestinal parasites. *Baillière's Clinical Gastroenterology*. 1993; 7(2): 333–364.
- Ferreira, H.D.S., Assunção, M.L. De, Vasconcelos, V.S. De, Melo, F.P. De, et al. Saúde de populações marginalizadas: desnutrição, anemia e enteroparasitoses em crianças de uma favela do 'Movimento dos Sem Teto', Maceió, Alagoas. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2002; 2(2): 177–185.
- FitzGerald, J.M. & Reddel, H.K. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2015 update)*. 2015.
- Fonseca, E.O.L., Teixeira, M.G., Barreto, M.L., Carmo, E.H., et al. Prevalência e fatores associados às geo-helmintíases em crianças residentes em municípios com baixo IDH no Norte e Nordeste brasileiros. *Cadernos de Saúde Pública*. 2010; 26(1): 143–152.
- Gonçalves, V.B. *Influência do montelucaste sobre o estado de ativação dos eosinófilos e função dos fagócitos em crianças asmáticas*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília. 2010.
- Hams, E. & Fallon, P.G. Innate type 2 cells and asthma. *Current Opinion in Pharmacology*. 2012; 12(4): 503–509.
- Hayes, K.S., Bancroft, A.J. & Grencis, R.K. Immune-mediated regulation of chronic intestinal nematode infection. *Immunological Reviews*. 2004; 20175–88.
- Hill, D.R. & Pearson, R.D. Ingestion of Giardia lamblia trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infection and immunity*. 1987; 55(12): 3155–3161.
- Hoffman, W., Pons, J. & Janer, J. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J Publ Hlth*. 1934; 9281–298.
- Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clinical and*

- experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2008; 38(5): 709–750.
- Hopkin, J. Immune and genetic aspects of asthma, allergy and parasitic worm infections: Evolutionary links. *Parasite Immunology*. 2009; 31(5): 267–273.
- Katz, N., Chaves, A. & Pellegrino, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1972; 14(6): 397–400.
- Kim, C.-K. Eosinophil-derived neurotoxin: a novel biomarker for diagnosis and monitoring of asthma. *Korean Journal of Pediatrics*. 2013; 56(1): 8–12.
- Kohli, A., Bushen, O.Y., Pinkerton, R.C., Houpt, E., et al. Giardia duodenalis assemblage, clinical presentation and markers of intestinal inflammation in Brazilian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008; 102(7): 718–725.
- Lachmann, P.J. & Hobart, M.J. Complement technology. Editor. Weir DM (ed.). *Handbook of experimental immunology*. 1978; 1A – 5.
- Lambrecht, B.N. & Hammad, H. Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014; 134(3): 499–507.
- Lebwohl, B., Deckelbaum, R.J. & Green, P.H.R. Giardiasis. *Gastrointestinal endoscopy*. 2003; 57(7): 906–913.
- Li, B.W.S. & Hendriks, R.W. Group 2 innate lymphoid cells in lung inflammation. *Immunology*. 2013; 140(3): 281–287.
- Looss, A. The anatomy and life history of Ancylostoma duodenale, Dubini. *Records of the School of Medicine. Egypt Ministry of Education, Cairo*. 1911; 4531–536.
- Lustigman, S., Prichard, R.K., Gazzinelli, A., Grant, W.N., et al. *A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: The Problem of Helminthiasis*. 2012; 6(4).
- Lynch, N.R., Hagel, I. a., Palenque, M.E., Di Prisco, M.C., et al. Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998; 101(2 1): 217–221.
- Maizels, R.M., Mcsorley, H.J. & Smyth, D.J. Helminths in the hygiene hypothesis: Sooner or later? *Clinical and Experimental Immunology*. 2014; 177(1): 38–46.
- Marques, S.M.B. *Estado de Ativação dos Eosinófilos e Função Fagocitária de Neutrófilos e Monócitos em Crianças Asmáticas*. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília. 2003.

- Martinez, F.O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*. 2014; 6(March): 1–13.
- Martins, C.L.F. da S. *Influência do Tratamento com Corticóide Inalatório na Ativação dos Eosinófilos e Função Fagocitária em Crianças e Adolescentes com Asma*. Tese de Doutorado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília. 2013.
- Masure, D., Vlamincx, J., Wang, T., Chiers, K., et al. A Role for Eosinophils in the Intestinal Immunity against Infective *Ascaris suum* Larvae Edward Mitre (ed.). *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013; 7(3): e2138.
- McSorley, H.J., Blair, N.F., Smith, K.A., McKenzie, A.N.J., et al. Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. *Mucosal Immunology*. 2014; 7(5): 1068–1078.
- Melo-Reis, P.R., Diniz-Filho, J.A.F., Dias- Penna, K.G.B., Costa, S.H.N., et al. Correlação entre eosinofilia e protozoose por *Giardia lamblia* em crianças. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 2007; 39(3): 237–239.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., et al. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*. 2000; 164(12): 6166–6173.
- Mishra, P.K., Palma, M., Bleich, D., Loke, P., et al. Systemic impact of intestinal helminth infections. *Mucosal immunology*. 2014; 7(4): 753–762.
- Moreau, E. & Chauvin, A. Immunity against helminths: Interactions with the host and the intercurrent infections. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010; 2010.
- Muniz-Junqueira, M.I., Barbosa-Marques, S.M. & Junqueira, L.F. Morphological changes in eosinophils are reliable markers of the severity of an acute asthma exacerbation in children. *Allergy*. 2013; 68(7): 911–920.
- Muniz-junqueira, M.I., Eduardo, C. & Prata, A. Salmonelose septicêmica prolongada associada à esquistossomose : evolução do conhecimento e mecanismos imunopatogênicos *Schistosoma* (Associated chronic septicemic salmonellosis: evolution of knowledge and immunopathogenic mechanisms). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009; 42(4): 436–445.
- Muniz-Junqueira, M.I., Peçanha, L.M.F., da Silva-Filho, V.L., de Almeida Cardoso, M.C., et al. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2003; 10(6): 1096–1102.
- Muniz-Junqueira, M.I., Prata, a. & Tosta, C.E. Factors influencing phagocytosis of *Salmonella typhimurium* by macrophages in murine

- schistosomiasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997; 30(2): 101–106.
- Muniz-Junqueira, M.I., Prata, a. & Tosta, C.E. Phagocytic and bactericidal function of mouse macrophages to *Salmonella typhimurium* in schistosomiasis mansoni. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992; 46(2): 132–136.
- Muniz-Junqueira, M.I. & Queiroz, E.F.O. Relationship between protein-energy malnutrition, vitamin A, and parasitoses in living in Brasília. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002; 35(2): 133–141.
- Muniz-Junqueira, M.I., Tavares-Neto, J., Ataíde, M., Prata, A., et al. Specific treatment of hepatosplenic schistosomiasis can increase T-lymphocyte reactivity. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1991; 24(2): 97–99.
- Muniz-Junqueira, M.I., Tavares-Neto, J., Prata, A. & Tosta, C.E. Antibody response to *Salmonella typhi* in human schistosomiasis mansoni. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996; 29(5): 441–445.
- Muniz-Junqueira, M.I., Tosta, C.E. & Prata, A. T cell-dependent immunodepression in vivo in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1990; 23(1): 27–31.
- Neves, D.P., de Melo, A.L., Linardi, P.M. & Vitor, R.W.A. *Parasitologia humana*. Biblioteca biomédica. 12a. Edicã. Atheneu. 2011.
- Nydegger, U.E., Anner, R.M., Gerebtzoff, A., Lambert, P.H., et al. Polymorphonuclear leukocyte stimulation by immune complexes. Assessment by nitroblue tetrazolium dye reduction. *European Journal of Immunology*. 1973; 3(8): 465–470.
- Persson, C.G.A. & Erjefält, J.S. Pulmonary Perspective New Aspects of Degranulation and Fates of Airway. *Critical Care Medicine*. 2000; 1612074–2085.
- Ponte, E.V., Rizzo, J.Â. & Cruz, Á.A. Inter-relação entre asma, atopia e infecções helmínticas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2007; 33(3): 335–342.
- Ritchie, L.S. An Ether Sedimentation Technique for Routine Stool Examinations. *Bulletin of U. S. Army Medical Department*. 1948; 8(4): 326.
- Rodrigues, C.E.F.B., Arruda, L.K.P., Rodrigues, M.A.G., Araujo, M.M.E., et al. Níveis séricos de proteína catiônica eosinofílica e contagem de eosinófilos em crianças enteroparasitadas, residentes em área de baixo nível sócio-econômico na cidade de Natal, RN, Brasil. *Rev. bras. anal. clin.* 2008; 40(4): 289–292.

- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D. & Foster, P.S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature reviews. Immunology*. 2013; 13(1): 9–22.
- Salgame, P., Yap, G.S. & Gause, W.C. Effect of helminth-induced immunity on infections with microbial pathogens. *Nature immunology*. 2013; 14(11): 1118–1126.
- SBPT Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - 2012. *Jornal Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia*. 2012; 38(suplemento 1): S1–S46.
- Seixas, M.T.L., Souza, J.N., Souza, R. da P., Teixeira, M.C.A., et al. Avaliação da frequência de parasitos intestinais e do estado nutricional em escolares de uma área periurbana de Salvador, Bahia, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. 2011; 40(4): 304–314.
- Shamri, R., Xenakis, J.J. & Spencer, L.A. Eosinophils in innate immunity: An evolving story. *Cell and Tissue Research*. 2011.343 (1) pp.57–83.
- da Silva-Martins, C.L.F., Couto, S.C., Muniz-Junqueira, M.I. & Livia, C. Inhaled corticosteroid treatment for 6 months was not sufficient to normalize phagocytosis in asthmatic children. *Clinical and translational allergy*. 2013; 3(1): 28.
- Solaymani-Mohammadi, S. & Singer, S.M. Giardia duodenalis: The Double-edged Sword of Immune Responses in Giardiasis. *Exp Parasitol*. 2010; 126(3): 292–297.
- Stark, D., Barratt, J.L.N., Van Hal, S., Marriott, D., et al. Clinical significance of enteric protozoa in the immunosuppressed human population. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009; 22(4): 634–650.
- Takeda, K., Shiraishi, Y., Ashino, S., Han, J., et al. Eosinophils contribute to the resolution of lung-allergic responses following repeated allergen challenge. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015; 135(2): 451–460.e5.
- Traub, R.J. Ancylostoma ceylanicum, a re-emerging but neglected parasitic zoonosis. *International Journal for Parasitology*. 2013; 43(12-13): 1009–1015.
- Trivedi, S.G. & Lloyd, C.M. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007; 64(10): 1269–1289.
- W.H.O. *Child growth standards*. World Health Organization (ed.). 2006.
- W.H.O. *Iron Deficiency Anaemia: Assessment, Prevention, and Control. A guide for programme managers*. World Health Organization (ed.). 2001.
- Weinstock, J. V. & Elliott, D.E. Translatability of helminth therapy in inflammatory bowel diseases. *International Journal for Parasitology*. 2013; 43(3-4): 245–251.



# ANEXOS

## Anexo 1 – Protocolo de avaliação clínica

Universidade de Brasília. Núcleo de Medicina Tropical  
Mestrado em Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias  
PROJETO DE PESQUISA: Avaliação dos eosinófilos na asma, na ascariíase e na associação de ambas em crianças.  
RESPONSÁVEIS: Dra. Helene Ribeiro; Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

**1. Identificação: Nome:**

Registro no Projeto:

Registro no Ambulatório/Unidade de Saúde:

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_. Idade: \_\_\_\_\_. Gênero: Feminino ( ) Masculino ( )

Filiação: Pai -  
Mãe -

Nº de Cômodos / Nº pessoas no domicílio / Nº crianças:

Endereço e telefone:

Renda familiar:

Escolaridade dos pais e ou responsável (e se empregado):

Destino dos dejetos:

Tratamento da água para ingestão:

**2. Critérios de Inclusão:**

- Crianças acima de dois anos e adolescentes até 18 anos, sadios com EPF negativo ou com exame parasitológico de fezes positivo para *Ascaris lumbricoide* e/ou portadores de asma, conforme distribuição amostral, atendidos nos Ambulatórios de Pediatria ou de Alergia e Imunologia Pediátrica da SES/DF e HUB.
- Concordância dos pais ou responsáveis em participar da pesquisa, após leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**3. Critérios de Exclusão:** Neoplasias; Diabetes; Síndrome de Down ou outras síndromes genéticas; Doenças de depósitos ou Erros inatos do metabolismo; Doenças da Tireóide; Doença Celíaca; Fibrose Cística; Doenças auto-imunes (ARJ, LES, Dermatomiosite, etc.); Doenças de Base: renal, cardíaca, hepática); Outras doenças pulmonares: intersticiais, displasia broncopulmonar; Tuberculose; AIDS; Hipo/Agamaglobulinemia; Doença de Crohn; Uso de imunossupressor.

**4. Alergias Associadas:**

a) Dermatite atópica: \_\_\_ Sim \_\_\_ Não. Tratamento:

b) Rinite alérgica: \_\_\_ Sim \_\_\_ Não. Tratamento:

c) Conjuntivite alérgica: \_\_\_ Sim \_\_\_ Não. Tratamento:

d) Alergia alimentar: \_\_\_ Sim \_\_\_ Não. Alimento:

e) Tratamento e dieta (restrição):

Anotações extras (Item 04):

**5. Diagnóstico de asma:** \_\_\_ Sim \_\_\_ Não. (Relato de episódios recorrentes de broncoconstrição com tosse, dispneia, dor torácica, sibilos ou não e necessidade de NBZ com berotec ou salbutamol + prednisolona oral)

**5.1. Classificação da Asma**

- Controlada
- Parcialmente controlada
- Não controlada

Sintomas diurnos: \_\_\_ nenhum ou ≤ 2X por semana; \_\_\_ 3 ou +por semana  
Despertares noturnos: \_\_\_ nenhum; \_\_\_ qualquer

Sintomas:
Idade de início:
Duração da crise / Nº de crises por ano:

Necessidade de medicação de alívio: \_\_ nenhum ou ≤ 2X por semana; \_\_ 3 ou +por semana  
Limitação atividades: \_\_ nenhuma; \_\_ qualquer  
VEF1 ou PFE: \_\_ normal; \_\_ ≤80% predito ou do melhor prévio  
Tempo de doença: \_\_ < 1 ano; \_\_ 1 a 5 anos; \_\_ 6 a 10 anos; \_\_ > 10 anos.  
Número de crises no último ano: \_\_ 0 a 3; \_\_ 4 a 7; \_\_ 8 a 11; \_\_ >11  
Atendimento no PS no último ano: \_\_ nenhum; \_\_ 1 a 3; \_\_ 4 a 7; \_\_ 8 a 11; \_\_ >11  
Internação no último ano: \_\_ nenhuma; \_\_ 1; \_\_ 2; \_\_ 3; \_\_ >4  
Faltas escolares no último ano: \_\_ nenhuma; \_\_ 1 a 5; \_\_ 6 a 10; \_\_ 11 a 20; \_\_ >20  
A asma hoje interfere no seu dia-a-dia: \_\_ muito; \_\_ pouco; \_\_ nada  
Teve crise desde a última consulta: \_\_ não; \_\_ 1; \_\_ 2; \_\_ 3; \_\_ 4 ou mais  
Procurou PS desde a última consulta: \_\_ não; \_\_ 1; \_\_ 2; \_\_ 3; \_\_ 4 ou mais  
Internação desde última consulta: \_\_ não; \_\_ 1; \_\_ 2; \_\_ 3; \_\_ 4 ou mais  
Absentéismo escolar desde última consulta: \_\_ nenhuma; \_\_ 1 a 2; \_\_ 3 a 4; \_\_ 5 a 6; \_\_ > 6  
Percentual de melhora: \_\_ nenhum; \_\_ 10 a 40%; \_\_ 40 a 60%; \_\_ 60 a 80%; \_\_ 80 a 90%; \_\_ > 90%; \_\_ ou piora

**8. Tratamento profilático em uso:** \_\_ nenhum; \_\_ corticóide inalado; \_\_ LABA-Associação; \_\_ Imunoterapia

**9. Contra-indicações gerais para o dia da coleta:** processo infeccioso febril agudo; estar em crise de asma; uso de corticóide oral nos últimos quinze dias; uso de gamaglobulina nos últimos trinta dias, vacinas nos últimos quinze dias.

**10. Exame físico:** Peso= (percentil= ); Estatura= (percentil= ). PFE=

Ectoscopia:

ACV:

AP:

Abdome:

Amígdalas:

Rinoscopia:

Ouvidos:

Olhos:

Membros:

**Hipótese diagnóstica:**

- Peso/estatura:

-Asma:

-Alergias:

**-Responsável pelo preenchimento:**

## Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Universidade de Brasília, Núcleo de Medicina Tropical  
Mestrado em Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias  
Projeto de Pesquisa: Avaliação dos eosinófilos na asma, na ascariíase e na associação de ambas em crianças.  
RESPONSÁVEIS: Dra. Helene Ribeiro e Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) Sr(a) está sendo convidado(a) a autorizar a participação do(a) seu filho(a) menor de idade no projeto de pesquisa "Avaliação dos eosinófilos na asma, na ascariíase e na associação de ambas em crianças". Esclarecemos que este projeto vai verificar o funcionamento de algumas células do sangue do seu filho(a) para podermos entender melhor a sua doença. Este estudo trará benefícios para os pacientes, uma vez que o esclarecimento deste funcionamento permitirá uma melhor avaliação, seguimento e possibilidade terapêutica para os pacientes.

Concordo que seja retirado 5 a 10mL de sangue de uma veia do braço do meu filho(a) e o material utilizado para retirada do seu sangue será estéril e descartável. Fui esclarecido que se o meu filho(a) estiver parasitado por lombriga, o sangue será retirado duas vezes. Uma antes do tratamento e outra 15 dias depois do tratamento para o verme. Fui esclarecido(a) que os possíveis medicamentos utilizados pelo meu filho(a) são os mesmos que ele utilizaria no atendimento normal de suas doenças, independentemente desta pesquisa.

Não haverá nenhuma complicação para o(a) seu filho(a) a não ser uma pequena vermelhidão no local onde for coletado o sangue.

Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado (a) sobre o resultado do exame que será feito no sangue de meu filho(a). Após finalização da pesquisa, o paciente retornará ao ambulatório de origem.

Fui esclarecido que o nome dele(a) não será divulgado. As informações obtidas são confidenciais e serão publicadas anonimamente. Os nomes dos participantes serão mantidos em absoluto sigilo, não acarretando, assim, prejuízos à privacidade dos mesmos.

A participação neste estudo é voluntária e a qualquer momento este consentimento poderá ser retirado pelo(a) pai/mãe ou responsável pela criança. Fui esclarecido que se eu não quiser autorizar a participação do meu filho (a) neste projeto, ele continuará o seu tratamento neste Serviço sem prejuízo à sua assistência e saúde.

Em caso de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, o(a) senhor(a) deve procurar o pesquisador responsável pelo número de telefone abaixo, a fim de saná-las. Em caso de dúvidas poderei entrar em contato com:

- a) Dra. Helene Ribeiro - telefone celular: (61) 9676-0055
- b) Ambulatório de Alergia do HCB – (61) 3025-8350
- c) Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FEPECS telefone: (61) 33254955

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da FEPECS. Quaisquer dúvidas sobre a ética da pesquisa pode ser esclarecidas pelo contato com CEP/FEPECS telefone: (61) 33254955

Este documento foi elaborado em duas vias uma ficará com o pesquisador e a outra com o responsável pelo sujeito da pesquisa.

Brasília, ..... de ..... de 201.....

\_\_\_\_\_  
Voluntário (nome-assinatura ou impressão dactiloscópica)

\_\_\_\_\_  
Nome e Assinatura do pesquisador

**OBS: Com cópia para os Pais ou Responsável**

## Anexo 3 – Termo de anuência do menor

Universidade de Brasília, Núcleo de Medicina Tropical  
Mestrado em Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias  
**Projeto de Pesquisa: Avaliação dos eosinófilos na asma, na ascariíase e na associação de ambas em crianças.**  
**RESPONSÁVEIS:** Dra. Helane Ribeiro e Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira.

### TERMO DE ANUÊNCIA (MENOR DE IDADE-ADOLESCENTE)

Eu,....., abaixo assinado, .....anos, declaro ter lido ou ouvido o presente documento, e compreendido o seu significado, que informa o seguinte:

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “**Avaliação dos eosinófilos na asma, na ascariíase e na associação de ambas em crianças.**”. Esclarecemos que este projeto vai verificar o funcionamento de algumas células do seu organismo para podermos entender melhor a sua doença. Este estudo poderá trazer benefícios para os pacientes, uma vez que o esclarecimento deste funcionamento permitirá uma melhor avaliação, seguimento e possibilidade terapêutica para os pacientes.

Concordo que seja retirado de 1 a 10 mL de sangue de uma veia do meu braço. Fui esclarecido (a) que o material utilizado para retirada do meu sangue será estéril e descartável. Fui esclarecido (a) que os possíveis medicamentos utilizados por mim são os mesmos que eu utilizaria no atendimento normal de minha doença, independentemente desta pesquisa. Uma possível complicação que pode ocorrer é o desconforto da coleta de sangue e uma pequena vermelhidão no local onde for coletado o sangue.

Posteriormente, se eu desejar, poderei ser informado (a) sobre o resultado dos exames que serão feitos no meu sangue.

Fui esclarecido que o meu nome não será divulgado. As informações obtidas são confidenciais e serão publicadas anonimamente. Os nomes dos participantes serão mantidos em absoluto sigilo, não acarretando, assim, prejuízos à privacidade da sua família.

A participação neste estudo é *voluntária* e a qualquer momento este consentimento poderá ser retirado por mim. Fui esclarecido que se eu não quiser participar nesta pesquisa não haverá nenhum prejuízo para o tratamento e acompanhamento da minha doença.

Em caso de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, você deve procurar o pesquisador responsável pelo número de telefone abaixo, a fim de saná-las. Em caso de dúvidas poderá entrar em contato com:

- a) Dra. Helane Ribeiro - telefone celular: (61) 9676-0055
- b) Ambulatório de Alergia do HCB – (61) 3025-8350
- c) Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FEPECS telefone: (61) 33254955

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da FEPECS. Quaisquer dúvidas sobre a ética da pesquisa pode ser esclarecidas pelo contato com CEP/FEPECS telefone: (61) 33254955

Brasília,..... de ..... de 201.....

\_\_\_\_\_  
Voluntário (nome-assinatura ou impressão dactiloscópica)

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura dos Pais ou responsáveis

\_\_\_\_\_  
Nome e assinatura da testemunha

\_\_\_\_\_  
Nome e Assinatura do pesquisador

**OBS: Com cópia para os Pais ou Responsável**

## Anexo 4 – Termo de concordância de Faculdade de Medicina da UNB



Universidade de Brasília  
Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina

---

### TERMO DE CONCORDÂNCIA

O Prof. Dr. Paulo César de Jesus, Diretor da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, está de acordo com a realização, neste Setor, da pesquisa "Avaliação dos eosinófilos na asma, na ascariíase e na associação de ambas.", de responsabilidade das pesquisadoras Mestranda Helene Catarine Dantas do Nascimento Ribeiro e Orientadora Profa. Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SBS/DF, Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS).

O estudo envolve realização de entrevistas, exames clínicos e exames laboratoriais em pacientes conforme Projeto em anexo. Tem duração de 1 ano, com previsão de início para agosto de 2014.

Brasília, 03 de Julho de 2014

Diretor responsável do Hospital/ Faculdade:

Paulo César de Jesus  
Diretor  
Faculdade de Medicina-UNB

Assinatura/Carimbo

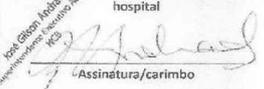
Pesquisador Responsável pelo protocolo de pesquisa: Helene CD do Nascimento Ribeiro  
Assinatura

Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira

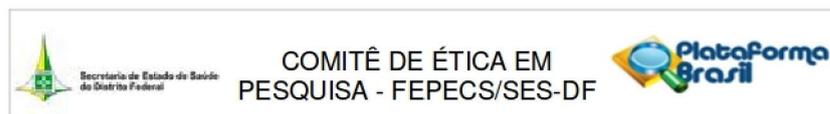
---

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte - CEP 70910-900 - Brasília, DF - Tel.: (61) 3107-1918, cepfm@unb.br

## Anexo 5 – Termo de concordância do Hospital da Criança de Brasília José de Alencar

		Governo do Distrito Federal Secretaria de Estado de Saúde Hospital da Criança de Brasília José Alencar	
TERMO DE CONCORDÂNCIA			
AÇÃO	<p>O Superintendente Executivo do Hospital da Criança de Brasília José Alencar, Dr Renilson Rehem, está de acordo com a realização, no setor de alergia e imunologia, da pesquisa "Avaliação dos eosinófilos na asma, na ascaridíase e na associação de ambas", de responsabilidade das pesquisadoras Mestranda Dra Helena Catarine Dantas do Nascimento Ribeiro e Orientadora Profa Dra Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, para análise e parecer quanto a realização do estudo neste hospital, após aprovação pelo Colegiado Gestor do Hospital da Criança de Brasília José Alencar.</p>		
PESQUISA	<p>O estudo envolve realização de entrevistas, exames clínicos, exames laboratoriais em pacientes do em Hospital da Criança de Brasília José Alencar, conforme projeto em anexo. Tem duração de 1 ano, com previsão de início para agosto de 2014.</p>		
Aprovação	Superintendente Executivo responsável do hospital  Assinatura/carimbo	Chefia responsável pela Unidade Clínica  Assinatura/carimbo	Pesquisador Responsável pelo protocolo de pesquisa  Assinatura/carimbo
Brasília, 11 de agosto de 2014.			
Página 1 de 1			
<small>Hospital da Criança de Brasília José Alencar - NCE sob o patrocínio do Instituto do Câncer Infantil e Pediatria Especializada (ICPEI)          SAUVIC - R. Pista Norte - CEP 70.671-900 Brasília/DF (61) 3221-8350 www.hcb.org.br</small>			

## Anexo 6 – Aprovação do Comitê de Ética



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos eosinófilos na asma, na ascariíase e na associação de ambas em crianças.

**Pesquisador:** Helene Cataríne Dantas do Nascimento Ribeiro

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 37060314.8.0000.5553

**Instituição Proponente:** Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal / FEPECS/ SES/ DF

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 864.615

**Data da Relatoria:** 09/11/2014

**Apresentação do Projeto:**

Sem alterações,

**Objetivo da Pesquisa:**

Sem alterações,

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Sem alterações,

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem alterações,

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

A pesquisadora atendeu as pendências de forma adequada,

**Recomendações:**

Enviar Relatório de acordo com o desenvolvimento do projeto.

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

Projeto aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS  
**Bairro:** ASA NORTE **CEP:** 70.710-904  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA - FEPECS/SES-DF



Continuação do Parecer: 864.615

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

BRASILIA, 10 de Novembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**LUIZ FERNANDO GALVÃO SALINAS**  
(Coordenador)

**Endereço:** SMHN 2 Od 501 BLOCO A - FEPECS

**Bairro:** ASA NORTE

**CEP:** 70.710-904

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3325-4955

**Fax:** (33)3325-4955

**E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com

## Anexo 7 – Fotos da Chácara Santa Luzia na Cidade Estrutural, Guará, Brasília

A Chácara Santa Luzia na Cidade Estrutural, um dos locais da pesquisa, fica localizado em Brasília/DF com distância de 17 Km do Palácio do Planalto.











As fotos a seguir são de áreas internas em casa na localidade.





## Anexo 8 – Fotos do Riacho Fundo II, Brasília

O Riacho Fundo II, um dos locais da pesquisa, fica localizado em Brasília/DF com distância de 25,6Km do Palácio do Planalto.

