



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**Avaliação da resposta imune em crianças infectadas com *Giardia lamblia* e com alergias
das vias respiratórias**

ANA LUCIA ARRUDA FONTENELE

**RECIFE – PE
2015**

ANA LÚCIA ARRUDA FONTENELE

Avaliação da resposta imune em crianças infectadas com *Giardia lamblia* e com alergias das vias respiratórias

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^a Dr^a Valdênia Maria Oliveira de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

RECIFE – PE

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

F683a Fontenele, Ana Lúcia Arruda.
Avaliação da resposta imune em crianças infectadas com giardia lamblia e com alergias das vias respiratórias / Ana Lúcia Arruda Fontenele. – Recife: O Autor, 2015.
122 f.: il.; 30 Cm.

Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Giardia lamblia. 2. Citocinas. 3. Anticorpos. 4. Asma. 5. Rinite. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-198)

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO, NO DIA 22 DE JULHO DE 2015.**

Aos 22 (vinte e dois) dias do mês de julho de dois mil e quinze, às 08:20 horas, na Sala Prof. Murillo La Greca – 3º. and. do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), em sessão pública, teve início a defesa da Tese intitulada “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM CRIANÇAS INFECTADAS COM *Giardia lamblia* E COM ALERGIAS DAS VIAS RESPIRATÓRIAS” da aluna Ana Lúcia Arruda Fontenele, na área de concentração Medicina Tropical, sob a orientação da Profa. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza. A doutoranda cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de DOUTORA em Medicina Tropical. A Banca Examinadora foi indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, na sua Reunião ordinária e homologada pela Diretoria de Pós-Graduação, através do Processo Nº 23076.029781/2015-21 em 13/07/2015, composta pelos Professores: Vlandia Maria Assis Costa, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; André de Lima Aires, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Décio Medeiros Peixoto, do Departamento Materno Infantil da UFPE; e Valdênia Maria Oliveira de Souza, do Departamento de Farmácia da UFPE. Após cumpridas as formalidades, o candidato foi convidado a discorrer sobre o conteúdo da Tese. Concluída a explanação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder ao mesmo a menção (Aprovado/Reprovado/Em exigência) Aprovada da referida Tese. E, para constar, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, Secretário(a) de Pós-Graduação, e pelos membros da Banca Examinadora.

Recife, 22 de julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vlandia Maria Assis Costa

Prof. Dr. André de Lima Aires

Profa. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

Prof. Dr. Décio Medeiros Peixoto

Profa. Dra. Valdênia Maria Oliveira De Souza

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Ana Catarina de Souza

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vlaudia Maria Assis Costa

Rejane Pereira Neves

Dedico à

À Deus sentido maior do meu existir.

À memória de meus pais, Regina Helena e Fontenele, a quem devo tudo e com muito amor me ensinaram os valores de um verdadeiro caminho cristão.

Às minhas filhas, Rute e Lia minha fonte de inspiração na busca de novos conhecimentos profissionais, e minha razão de viver.

A toda criança esquecida pelo poder público e excluída ao direito à saúde básica.

AGRADECIMENTOS

A minha amada comunidade católica Obra Lúmen de Evangelização em especial ao Grupo Obra e aos Filhos da Luz e aos sacerdotes Mons. Manfredo Ramos, e Pe. Wagner Frota pelas orações e compreensão à ausência durante a realização deste doutorado o meu muito obrigado.

Agradecimento especial à Prof^a. Dr^a Valdenia Maria Oliveira da Souza pela orientação e pela confiança em mim depositada. Agradeço ao seu profissionalismo e às suas críticas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Dr. José Ajax de Queiroz, Dr^a Geane Matos de Andrade e a Dr^a Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo amigos de longa caminhada por todo incentivo na minha caminhada profissional o meu muito obrigado e eterna gratidão por toda ajuda nesta etapa da minha vida.

Aos professores e secretários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical em especial ao Prof. Ricardo Ximenes e Prof^a. Rosangela Coelho e ao secretário Walter por toda atenção, ajuda e gentileza.

Aos Professores e amigos do Departamento de Parasitologia em especial as Professoras Janaina, Monica e Vláudia meu carinho e amizade.

A todos que fazem parte do Laboratório de Imunologia (LIKA) em especial a Cássia e Érica por toda ajuda na realização dos experimentos o meu muito obrigado.

Aos colegas de curso em especial: Glaydes, Kledoaldo, Ana Paula, Viviane, Joane e Carol por toda cooperação e companheirismo nesta etapa de minha vida, a minha gratidão e amizade.

Aos amigos que ficaram na torcida em especial: Maria Coleta, Eugenia, Ana Kubrusly, Nubia, Ângela, Amália, Roberta, Clícia, Mércia, Fátima, Ligia, Dayse as minhas queridas tias Maria Teresa e Lena e meus irmãos Cristina e Mauricio, a todos os integrantes do Grupo de Profissionais Liberais Cristão em especial Paulo Henrique, Fátima Elias, Lucia Libanês,

Zenilda, Gretchen, Ligia, Mirian, Rosabelle e Sidrin, enfim todas que torceram e me incentivaram o meu obrigado e carinho.

Ao Governo do Estado do Ceará onde sou funcionária pública o meu obrigado pela liberação e todo apoio recebido

A FUNCAP-CE pelo patrocínio de bolsa concedida.

A todos que aceitaram participar desta banca de defesa: Prof. Decio Medeiro o meu muito obrigago por toda colaboração neste trabalho, aos professores do departamento de parasitologia pela ajuda e ensinamento e enriquecimento neste trabalho Prof. Andre Aires , Prof^a Monica Albuquerque e Prof^a Vlaudida Costa e a Prof^a e orientadora Prof^a Valdênia Maria Oliveira de Souza que muito contribuíram para o engradecimento desta tese e as suplentes, Dr^a Virginia Maria Barros Lorena e Dra Patricia d' Emery Alves Santos pela disponibilidades, a todos o meu muito obrigado

Ao amigo e Professor Dr. Marcello Avila Mascarenhas por toda ajuda nesta reta final

Por último um agradecimento mais que especial a minha queridíssima comadre Antônia Wanderlândia (Delane) por ter ficado à frente da minha casa resolvendo e administrando tudo durante a minha ausência minha eterna gratidão e amizade.

Mensagem:

“Aquele, portanto que se tornar pequenino como criança, esse é o maior no reino dos Céus. E aquele que receber uma criança como esta por causa do meu nome recebe a mim” (Mt 18,4-5).

“Nosso ideal não morre quando buscamos as coisas que não passam” (Obra Lumen de Evangelização).

RESUMO

A resposta imune contra *Giardia lamblia* e as alergias, em área endêmica para infecções por helmintos e este protozoário, tem sido estudada. IgE e isotipos IgG anti-*Ascaris lumbricoides* (Asc) podem modular a atopia e a alergia. Neste estudo, avalia-se a presença de anticorpos IgE, IgG1, IgG4 anti Asc e a produção de citocinas Th1 (IL-2/IFN- γ /TNF- α), Th2 (IL-4/IL-10), Th17 (IL-17/IL-6) em crianças infectadas por *G.lamblia*, sem infecção concomitante por helmintos, bem como a frequência de asma e/ou rinite. Para isso, um estudo caso-controle aninhado em um estudo transversal utilizando questionário padrão para a alergia de vias aéreas, análises coproparasitológicas. Realizou-se testes imunoenzimáticos para detecção de anticorpos anti-Asc e cultura de células de sangue para mensuração dos níveis de citocinas em sobrenadante e intracelular. A amostra foi composta por 211 crianças: 53 infectadas / asma/rinite (GA); 39 não infectadas/asma/rinite (A); 62 infectadas / não / asma / rinite (G); 57 não asma/rinite/não infectadas (NA+NG), com idades entre 2-10 anos. Infecção por *G.lamblia* foi acompanhada pelo aumento dos níveis de IgG1, mas não IgE ou IgG4.anti Asc. A produção de IL-6 foi semelhante entre os grupos, mas a produção de IL-2, IL-4 e IFN- γ foi maior em crianças infectadas. TNF- α foi produzido em níveis mais elevados em crianças alérgicas, enquanto que a IL-10 esteve em níveis elevados em crianças infectadas/asma/rinite. Em crianças infectadas com IgG1 anti-Asc positivo houve maior produção do TNF- α e IL-10 e menor frequência de alergia quando comparou com IgG1 anti-Asc negativo (OR = 0,392; IC = ,168-,914; p = 0,02). Para análise do conteúdo de citocinas intracelular, foi observada menor frequência de células CD4+/IFN- γ + e CD4+/IL-17+ no grupo GA, quando comparado com o grupo NG+NA. Não houve diferença na frequência de células CD4+/IL-4+ entre os grupos. A frequência de células CD4+/IL-17+ foi inferior em crianças somente infectadas (G). Em conjunto, um perfil Th1/Th2 foi estimulado nos pacientes infectados, com IgG1 anti-Asc circulante e houve maior produção de IL-10 e TNF- α com frequência de alergia vias aéreas mais baixa. Além disso, estes achados apontam um perfil predominante de Th2 (IL-4 acompanhada de menor nível de IFN- γ) com baixo potencial inflamatório (menos IL-17) em crianças infectadas por *G. lamblia* com asma e/ou rinite. Estes resultados destacam a importância de uma melhor avaliação dos subtipos de IgG em *A. lumbricoides* e *G. lamblia* em áreas endêmicas, especialmente no que diz respeito à estratégia de prevenção ou dessensibilização para reações alérgicas.

Palavra- chave: *Giardia lamblia*. Citocinas. Anticorpos. Asma/Rinite. Crianças

ABSTRACT

Immunity to *Giardia lamblia* and allergies in endemic area for helminths/protozoa infections had been studied. Anti-*Ascaris lumbricoides* (Asc) IgE and IgG isotypes can modulate the atopic and allergy. In this study, we evaluate the presence of anti-Asc IgE, IgG4, IgG1 antibodies and Th1 (IL-2/IFN- γ /TNF- α), Th2 (IL-4/IL-10), Th17 (IL-17/IL-6) cytokine production in *G. lamblia*-infected children, without concomitant helminths infection, as well as asthma and/or rhinitis frequency. For this, a case-control nested in a cross-sectional study was conducted using standard questionnaire for airway allergy, parasitological analyses, immunoassay tests for anti-Asc antibodies and blood cell culture for cytokines measurement in supernatant and intracellular. The sample comprised 211 children (53 allergic/infected (GA); 39 allergic/uninfected (A); 62 non-allergic/infected (G); 57 non-allergic/non-infected (NA+NG) aged 2-10 years. Protozoan infection was accompanied by increased of anti-Asc IgG1 levels, but not IgE or IgG4. There were similar IL-6 production, but IL-2, IL-4 and IFN- γ were higher in infected children. TNF- α was produced in higher levels for allergic children, whereas the IL-10 was high levels in allergic/infected children. For positive anti-Asc IgG1 and allergic/infected children, higher TNF- α and IL-10 production and lower allergy frequency was observed when compared to negative anti-Asc IgG1 (OR=0.392; IC=0.168-0.914; p=0.02). For intracellular cytokine content, was observed lower frequency of IFN- γ +CD4⁺ and IL-17+CD4⁺ cells in the GA group when compared to the NG+NA group. There was no difference in IL-4+CD4⁺ cells frequency among the groups. The IL-17+CD4⁺ cells frequency was lower in infected children only (G). Take together, the a Th1/Th2 profile was stimulated in the infected patients, which with circulating anti-Asc IgG1 the production of IL-10 and TNF- α was strengthened and there was lower frequency airway allergy. Besides of this, the finding point out a predominant Th2 profile (IL-4 accompanied of less IFN- γ) with low inflammatory potential (less IL-17) in *G. lamblia* infected children with asthma and/or rhinitis. These findings highlight the importance of improved evaluation of IgG subtypes in *A. lumbricoides* and *G. lamblia* endemic areas, especially with regard to the prevention strategy or desensitization for allergic reactions.

Key-words: *Giardia lamblia*. Airway allergy. anti-*Ascaris lumbricoides* antibodies. Cytokines. Children

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição dos quatro grupos de estudos.....	34
Figura 2 - Organograma da pesquisa.....	36
Figura 1 - Frequência de Alergia em crianças infectadas por <i>G. lamblia</i> (G) ou sem infecção (UG) com anticorpo IgG1 anti-Asc positivo e negativo (A and D), bem como, IgG1 anti- <i>Ascaris</i> positivo ou negativo para ambos infectados e sem infecção (B and C)...	60
Figura 1 - Frequência de células produtoras citocinas intracelulares.....	69
Figura 2 - Intensidade de fluorescência citocinas intracelulares.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência de <i>Giardia lamblia</i> em cidades brasileiras	20
Tabela 1 - Análise univariada da associação entre alergias respiratória e dados demográficos, socioeconômicos, laboratoriais, história de alergia familiar e infecção por <i>Giardia lamblia</i> em crianças da área urbana no Nordeste do Brasil.	55
Tabela 2 - Anticorpos IgG1, IgG4 e IgE anti-Asc em crianças alérgicas e infectadas por <i>G. lamblia</i>	56
Tabela 3 - Níveis de citocinas em crianças alérgicas e infectadas por <i>G. lamblia</i>	57
Tabela 4 - Produção de citocinas em crianças infectadas por <i>G. lamblia</i> e IgG1 anti Asc (+)	58
Tabela 5 - Níveis de citocinas em crianças infectada por <i>G.lamblia</i> e IgG1 anti-Asc positivo e crianças alérgicas	59

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ELISA: “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*” (Ensaio imunoenzimático).

ICMA-1: moléculas de adesão inter-celular 1.

IFN- γ : Interferon-gamma

Ig: Imunoglobulina

IgE T: Imunoglobulina E Total

IL: Interleucina

ISAAC: *The Inter-national Study of Asthma and Allergy in Childhood* (Comitê Internacional de estudos de asma e alergias em crianças em idade escolar)

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β* (Fator de Transformação do Crescimento- β)

Th1: Linfócitos T “*helper*” tipo 1

Th17: Linfócitos T “*helper*” tipo 17

Th2: Linfócitos T “*helper*” tipo 2

TNF- α : *Tumor Necrosis Factors* (Fator de Necrose Tumoral)

VSP: *Variant Surface Proteins* (Proteínas Variantes de Superfície)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 <i>Giardia lamblia</i> : Aspectos Epidemiológicos e Biológicos	19
2.2 <i>Giardia lamblia</i> : Patogenicidade e Resposta Imune	21
2.3 Alergia das vias aéreas respiratórias: asma e rinite	27
2.3.1 Epidemiologia.....	27
2.3.2 Imunomodulação das alergias das vias aéreas respiratória nas infecções por <i>Giardia lamblia</i> e geo-helminthíases.	29
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos Específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Desenho do estudo.....	34
4.2 População de estudo	35
4.2.1 População alvo.....	35
4.2.2 Critérios de inclusão e exclusão	35
4.3 Operacionalização da Pesquisa.....	35
4.4 Categorização das Variáveis.....	36
4.4.1 Variável Dependente: alergia das vias aéreas respiratórias (Asma/Rinite).....	36
4.4.2 Variável independente: variável biológica, social e laboratorial.....	38
4.5 Padronização das técnicas	40
4.5.1 Parasitológico de Fezes	40

4.5.2 Teste cutâneo de punção de resposta imediata	41
4.5.3 Leucograma	41
4.5.4 Dosagem de IgE anti-alérgeno	41
4.5.5 Dosagem de IgG1, IgG4 anti- <i>Ascaris</i>	42
4.5.6 Dosagem de IgE anti- <i>Ascaris</i>	42
4.5.7 Dosagem de IgE Total	43
4.5.8 Dosagem de IgA Total.....	43
4.5.9 Cultura celular	43
4.5.10 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes de cultura	44
4.5.11 Dosagem de citocinas intracelulares.....	44
4.6 Limitações metodológicas do estudo.....	45
4.6.1 Viés de Seleção.....	45
4.6.2 Viés de informação	45
4.6.3 Viés de Confundimento	45
4.7 Análises dos dados	46
4.8 Consideração Éticas.....	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Perfil de citocinas em crianças alérgicas infectadas por <i>Giardia lamblia</i> e sensibilizadas por <i>Ascaris</i> de área urbana do nordeste brasileiro	47
5.2: Produção de IL-4, IFN- γ e IL-17 em crianças com infecção por <i>G.lamblia</i> e alergias respiratórias da área urbana do Nordeste Brasileiro	65
6 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICES	86

APÊNDICE A - Características da população estudo quanto à alergias e infecções parasitárias	86
APÊNDICE B - ARTIGO 1: Cytokine profile in G. lamblia infected, sensitive to Ascaris and allergic children from urban areas of the Brazilian Northeast.....	89
APÊNDICE C - Artigo 2: IL-4, IFN- γ e IL-17 production, G. lamblia infection and respiratory allergies in children from urban areas of the Brazilian Northeast.....	108
ANEXOS	116
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	116
ANEXO B - Questionário padronizado (ISAAC)	118
ANEXO C - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	121

1 INTRODUÇÃO

A giardíase é uma doença parasitária intestinal causada pela *Giardia lamblia* (NEVES, 2010). A infecção, por *G. lamblia*, pode ocasionar diversas manifestações gastrointestinais como diarreia, esteatorreia, má absorção crônica. Em crianças, a infecção prolongada ocasiona, ainda, retardo no crescimento (FARTHING, 1990).

Estudos em indivíduos alérgicos e parasitados com *Giardia lamblia* mostram que pode haver uma modulação da intensidade da reação alérgica (BAYRAKTAR, 2005). A presença de *G. lamblia* é associada positivamente às manifestações alérgicas cutâneas (GIACOMETTI et al., 2003), porém a inter-relação da infecção por *G. lamblia* e as doenças alérgicas de vias respiratórias é pouco conhecida. No estudo desenvolvido por Di Prisco et al. (1998), verificou-se que 70% dos pacientes infectados (crianças) com *G. lamblia* apresentavam sintomas de alergias – dentre os quais 33% apresentavam rinite, 23% sintomas de asma e 14% alergias cutâneas – em comparação com 43% dos pacientes não parasitados que apresentavam esses mesmos sintomas. Com relação à produção de anticorpos IgE, foi demonstrado que pacientes infectados apresentaram altos títulos de IgE total e específica para antígenos alimentares (leite e proteínas do ovo), além de reatividade cutânea para antígenos ambientais. Contudo, este fato foi observado quando existiu uma coinfeção com helmintos (DI PRISCO et al., 1993; 1998). Em outro estudo, não foram observadas diferenças nos níveis de IgE total entre pacientes infectados e não infectados por *G. lamblia* (GIACOMETTI et al., 2003).

Infecções crônicas de helmintos são propensos a serem associados à presença de níveis IgE total e IgE e IgG4 anti-*Ascaris* podendo apresentar uma reatividade cruzada entre os antígenos de diferentes helmintos parasitas, enquanto os isótipos de IgG, como IgG4 anti-*A. lumbricoides* podem contribuir à supressão do teste cutâneo e reatividade às reações alérgicas sendo um fator de proteção com as alergias (FIGUEREDO et al., 2010). Tem sido demonstrado que a sensibilização prévia com helmintos vem sendo relacionado com importante fator de risco para presença de alergia. De fato, a presença do anticorpo específico IgE anti-*Ascaris* é um fator de risco para alergia respiratória em crianças (ALCANTARA-NEVES et al 2010 MONCAYO et al, 2013). A presença de anticorpo IgG anti-*Ascaris* foi associada positivamente, com atopia e eosinofilia, mas não com asma, entre as crianças de áreas rurais da Áustria, Alemanha e Suíça (KARADAG et al 2006).

Estudos clínicos e epidemiológicos têm sugerido o desenvolvimento de imunidade adquirida em indivíduos previamente infectados com *G. lamblia* (RAPOLLO AC, 2010; HANEVIK et al., 2009; AMORIM et al., 2010), porém não existem dados sob imunidade celular em longo prazo. Em estudo experimental (Munõz-Cruz et al. (2010), sobre a resposta imune frente à infecção com *G. lamblia*, demonstrou a ativação direta de mastócitos pelo protozoário, com liberação de histamina, IL-6 e TNF- α , independente da ação de anticorpos IgE. Têm sido descrito casos de asma grave não associados a um perfil de resposta imune Th2 (IL-4, eosinófilos, mastócitos e IgE), mas sim com a presença de mastócitos, acompanhada de neutrófilos, IL-6, IL-8, IL-17, ou seja, uma injúria dependente que se enquadra em um perfil Th17 (OBOKI et al., 2008).

Estudos com crianças na faixa etária de 2,5 a 15 anos, uma maior produção de IL-6, TNF- α , IL-8 foi detectada em crianças alérgicas portadoras de *G. lamblia*, com níveis elevados de IgE total sugerindo participação na reações alérgicas (BAYRAKTAR et al., 2005). Esses achados demonstram uma ativação do sistema imune nos pacientes alérgicos e infectados, sendo possível, então, que a presença dos sintomas alérgicos esteja ligada à produção de citocinas e mediadores pró-inflamatória por mastócitos, em resposta à presença do protozoário, e não apenas por mecanismos dependente de IgE.

Sabendo o potencial imunomodulatório durante a infecção por *G. lamblia* e que na maioria dos estudos focando nesta inter-relação deste protozoário com processos alérgicos utilizaram pacientes coinfectados por helmintos e a sensibilização prévia aos anticorpos IgE e IgG específico aos antígenos de geo-helmintos não foram avaliados e apenas se detiveram aos sintomas cutâneos, perguntamo-nos, no presente projeto, sobre a associação entre a infecção pela *G. lamblia* e as alergias das vias aéreas respiratórias (asma/rinite), a produção de anticorpos e o perfil de citocinas encontrados nestes pacientes exclusivamente com *G.lamblia* e sem parasitos intestinais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Giardia lamblia*: Aspectos Epidemiológicos e Biológicos

Infecções por parasitos intestinais estão entre as mais comuns em todo o mundo (WHO, 2012). Setenta e três por cento das mortes por doença diarreica ocorrem entre as crianças do mundo em desenvolvimento e está concentrada em apenas 15 países (WHO/UNICEF, 2009). Estima-se que até 60% da população mundial esteja infectada com parasitos intestinais, que podem desempenhar um papel importante na mortalidade por infecções parasitárias intestinais (WHO, 2002). Estudo recente demonstrou a importância do consumo de água potável e o uso de sanitário em seu domicílio, a fim de combater as infecções parasitárias intestinais (NIYIZURUGERO, 2013).

A giardíase, doença parasitária intestinal causada pela *Giardia lamblia*, tem a seguinte sinonímia: *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis* (NEVES, 2010). *G. lamblia* é um protozoário flagelado, parasito do intestino delgado, muito comum no mundo inteiro (WHO, 2004), com uma prevalência estimada, em média, de 2% a 5% nos países desenvolvidos e de 20% a 30% nos países em desenvolvimento, com aproximadamente 280 milhões de infecções por ano (LANE et al., 2002; THOMPSON, 2000, (IGNATIUS, 2012), sendo 2% dos adultos e 6% a 8% das crianças (ROSSIGNOL, 2010). Devido ao impacto no desenvolvimento socioeconômico, a giardíase está incluída entre as doenças classificadas como negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004; SAVIOLI et al., 2006).

No Brasil diversos estudos relatam esta prevalência de crianças e adultos, portadores de *G. lamblia*, em várias cidades do país (tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência de *Giardia lamblia* em cidades brasileiras

Local	Idade	Prevalência	Referência
Araguari- MG	0-5 anos	51,8%(127/254)	Santos et al, 2012
Araras- SP	4-15 anos	96,6%(28/29)	Lima Jr et al, 2013
Cumarim- GO	Todas as idades	33,6% (346/1029)	Borges et al, 2011
Santa Isabel do Rio Negro- AM	Todas as idades (≤5- ≥59anos)	12,3% (57/463)	Valverde et al, 2011
Uberlandia-MG	Crianças pré-escolares	19,2% (26/133)	Gonçalves et al, 2011
Santa Isabel do Rio Negro –AM	6-84 anos	29% (89/307)	Carvalho-Costa et al, 2007
Recife-PE	5-15 anos	45,5% (50/110)	Souza et al, 2012

G. lamblia é um parasito extracelular, monoxeno, de ciclo biológico direto, que adota duas formas evolutivas no seu ciclo biológico: a cística e a trofozoítica. A forma cística é a de resistência do parasito, inativa, e que infecta o homem por meio da ingestão de água e alimentos contaminados, transmissão fecal-oral (NEVES, 2010; SMITH, 1985). A forma trofozoítica, flagelar, é a responsável pelo desenvolvimento da doença.

O processo de infecção se inicia com a ingestão onde no estômago, os cistos sofrem ação dos ácidos e a membrana cística é digerida. O processo de desencistamento é iniciado no estômago e completado no intestino delgado (duodeno e jejuno) onde ocorre a colonização e fixação dos trofozoítas (FARTHING, 1989). Os trofozoítas, em seguida, se multiplicam por divisão binária longitudinal e o ciclo se completa com o encistamento do parasito e sua eliminação para o meio exterior (NEVES, 2010; SMITH, 1985; FARTHING, 1989). O cisto é relativamente inerte, permitindo sobrevivência prolongada em uma variedade de condições ambientais (ADAM, 2001), podendo sobreviver dois meses no meio externo em condições

favorável de temperatura e umidade, entretanto não se tem informação se todos os cistos são infectantes e se há necessidade de um tempo no meio externo para se tornarem infectantes (NEVES 2010)

Os aminoácidos estão se tornando cada vez mais reconhecidos como importante componente do metabolismo energético de *G. lamblia*, ocorre a absorção de aspartato, alanina, arginina na produção energia (ADAM, 2001), outro estudo revela, que o contato de células epiteliais com *G. lamblia* desencadeia a liberação de enzimas metabólicas, o que pode facilitar a colonização eficaz do parasito no intestino delgado humano (RINGQVIST et al., 2008).

Estudos experimentais demonstram que os trofozoítos internalizam o aminoácido L-Arginina (L-Arg) na produção de energia (ATP) e ao mesmo tempo evita a formação de óxido nítrico (NO), o qual possui ação contra os parasitos intestinais (RAPOLO & TOUZ, 2010). O consumo deste aminoácido (Arginina) ocorre através da via Arginina Hidrolase (ADH) e duas enzimas desta via são liberadas: Deiminase Arginina (ADI) e Carbamil Transferase Ornitina (OTC). Estudos indicam que ADI e OCT consome Arginina no meio, evitando a produção de NO (RINGQVIST et al, 2008; STALDELMAN et al, 2012 / 2013)

O mecanismo de invasão da *G. lamblia* aos tecidos não está claro. Estudos histológicos demonstram, claramente, a presença de trofozoítas invadindo a mucosa e correlacionam esse processo com sintomas gastrintestinais e/ou esteatorreia (SAHA et al., 1977). Estudo experimental avaliando o envolvimento das células calciformes (GC) com cachorros infectados por *G. lamblia* observaram que apesar o aumento no número de GC parecer ser um mecanismo de defesa inespecífica contra trofozoítos, foi detectado evidências de apoio que a hiperplasia de GC poderia ser prejudicial à barreira epitelial ocasionando brechas que permitem que o trofozoíto invada pelos tecidos (PONCE-MACOTELA et al, 2008)

2.2 Giardia lamblia: Patogenicidade e Resposta Imune

Os principais mecanismos de patogenicidade da *G. lamblia* incluem as moléculas envolvidas na adesão, encistamento e variação antigênica.

A adesão à parede intestinal é multifatorial e envolve a sucção do disco ventral, além de moléculas de superfície, que permitem a ligação com receptores das células epiteliais intestinais do hospedeiro, chamadas de adesinas ou lectinas (RODRIGUEZ-FUENTES et al, 2006, WEILAND et al, 2003). Evidências demonstram que trofozoítos de *G. lamblia* contêm

e/ou liberam enzimas proteolíticas que podem estar envolvidas com a patogenicidade deste parasito (RODRIGUEZ-FUENTES et al, 2006, DE CARVALHO et al, 2008). Sabe-se que liberam enzimas proteolíticas, cisteína-protease, as quais possuem um papel importante na adesão dos trofozoítos às células epiteliais (RODRIGUEZ-FUENTES et al, 2006), além disso outros estudos mostram que giardina alfa-1, é uma proteína altamente imunorreativa dependente de cálcio, e pode desempenhar um papel fundamental na interação parasito-hospedeiro (WEILAND et al, 2003). Isto porque esta proteína está presente na superfície da membrana dos trofozoítos recém desencistados e possui a capacidade de ligar-se a glicosaminoglicanos (GAGs) do intestino. A maioria dos epítomos presentes na giardina alfa-1, são expostos na superfície da membrana, facilitando o acesso para a interação com as células do hospedeiro, além disso, a giardina alfa-1 é abundante em fezes de pacientes com giardíase e estudos demonstram que esta proteína, assim como outras lectinas, causa diminuição das microvilosidades do intestino, contribuindo com a fisiopatologia da giardíase (RINGQVIST, 2008). Com a atrofia das vilosidades após fixar às células epiteliais, *G.lamblia* reduz a capacidade de absorção dos nutrientes no intestino (RODNEY, 2001). Desde 1989, Farthing em seu estudo observou a destruição das microvilosidades da membrana durante o processo de fixação. Outro estudo confirmou a atrofia das vilosidades em crianças com giardíase (KOOT et al, 2009). Sendo assim, este parasito é responsável por diversas manifestações gastrointestinais, inclusive má absorção crônica, ocasionando diarreias crônicas e hipogamaglobulinemia (HANEVIK et al.,2009). Nos adultos, na maioria das vezes, esta parasitose não determina sintomas (SMITH, 1985; ELIA, 2001), porém, na infância, uma infecção prolongada pode acarretar retardo no crescimento (FARTHING, 1990).

A fim de sobreviver dentro do intestino, *G. lamblia* sofre variação antigênica, um processo pelo qual o parasito alterna, de forma contínua, seus antígenos de superfícies, permitindo ao parasito evadir da resposta imune do hospedeiro e estabelecer infecções crônicas e recorrentes (LUGAN, 2011; PRUCCA & LUJAN, 2009). Os antígenos variantes de superfície (VSP) de *G.duodenalis* foram identificados na superfície de trofozoítos, onde a maioria dos VSPs identificados apresentam cisteína em abundância (FAUBERT, 2000 ADAM, 2001). Os antígenos de cistos, em fezes humanas, possuem peso molecular variando entre 21-49kda. (FAUBERT G, 2000). A variação antigênica ocorre durante o processo de encistamento /excistamento bem como durante o crescimento vegetativo (CARRANZA et al,2002), mas não há alteração da sequência de DNA (KULAKOVA et al,2006), os antígenos excretórios e secretórios (E/S), liberados pela *G. lamblia*, são os principais responsáveis pela ativação da resposta imune do hospedeiro, que é frequentemente caracterizada por uma

pequena inflamação na mucosa intestinal, e desempenham papel essencial na resposta de anticorpo e produção de citocinas (JIMENEZ et al., 2007; ABDUL-WAHID e FAUBERT, 2008).

Observações epidemiológicas, clínicas e experimentais têm demonstrado evidências de desenvolvimento de imunidade protetora na giardíase (AMORIM et al., 2010; RAPOLLO AC, 2010). Contudo, ainda não está esclarecido como o hospedeiro responde à infecção por *G. lamblia* e sobre como o parasita sobrevive ao mecanismo de defesa do hospedeiro. Tem sido sugerido o desenvolvimento de resposta imune a partir de evidências como: detecção de anticorpos específicos anti-*Giardia* nos soros de indivíduos infectados; participação de monócitos na modulação da resposta imune; maior suscetibilidade em indivíduos imunocomprometidos à infecção, principalmente os que apresentam hipogamaglobulinemia; menor suscetibilidade dos indivíduos de áreas endêmicas à infecção, quando comparados com os visitantes e ocorrência de infecção crônica em modelos animais atímicos ou tratados com drogas que deprimem a resposta humoral (NEVES 2010; ABDUL-WAHID A & FAUBERT G, 2008).

Destaca-se, ainda, a natureza autolimitante da infecção, por exemplo: infecções com *Giardia lamblia*, comumente, levam a fortes respostas imunes, caracterizadas, principalmente, pela produção de IgA anti-parasita e em que infecções repetidas parecem produzir um estado imune onde seres humanos apresentam sintomas reduzidos da doença, embora parasitos continuem a colonizar e produzir cistos (SOLAYMANI-MOHAMMADI S & SINGER S M, 2010).

Anticorpos IgM, IgG, e IgA α -*G. lamblia* têm sido detectados no soro de indivíduos com giardíase, porém a resposta imune protetora é mediada por anticorpos IgA e linfócitos T CD4+, através de citocinas (SINGER et al., 2000; LANGFORD et al., 2002; NEVES,2010). Além dos anticorpos circulantes, estudos têm relacionado a participação de IgA secretória à imunidade local e ao nível de mucosa intestinal. A função exata da IgA na resposta imune local ainda não é bem conhecida, embora evidências sugiram que esse anticorpo reduz a capacidade de adesão dos trofozoítas às células do epitélio intestinal (MAYER, 2003; NEVES,2010).

Estudos experimentais revelam que quanto maior a produção de IgA secretória, menor o processo de encistamento do trofozoítos e, conseqüentemente, redução da formação de cistos e sua eliminação (AMORIM et al., 2010). O aumento da frequência de giardíase, em indivíduos com alteração na imunidade humoral, particularmente nas deficiências de IgA e

IgG, sugere que essas imunoglobulinas participem da eliminação de *G. lamblia* (VELAZQUEZ et al.,2005).

Anticorpos IgM, IgA e IgG específicos desempenham um papel importante, assim como subconjuntos de células T, os macrófagos e os neutrófilos (FAUBERT G, 2000).

Estudos com adultos portadores de *G. lamblia* (caso) detectaram 75,5% (37/49) dos níveis de IgA sérica elevado em relação ao grupo controle (sem parasito) e a concentração de IgE sérica 70,6% (36/51) dos casos apresentaram na faixa normal. Este dado mostra que níveis de IgA sérica pode correlacionar-se mais estreitamente com a giardíase do que a IgE sérica (ZAREBAVANI et al,2012)

Em 2010, Amorim e seus colaboradores, em seu estudo experimental, observaram a cinética de eliminação dos cistos e a resposta imune humoral sistêmica (IgA, IgG1, IgG2a IgM, IgE), além da resposta imune intestinal secretória *in gerbils*. Foi observado que todos os *gerbils* infectados eram capazes de montar respostas imunes humorais. Quanto maior a carga parasitária, maior a resposta imunitária. A produção de IgA, IgG1, IgM apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,001$) entre os grupos inoculados e controles, uma produção moderada e variável de IgG2a em todos os grupos, porém não foi estatisticamente significante diferente ($p \geq 0,05$) entre os grupos estudados. A produção de IgE também não foi estatisticamente significante diferente ($p \geq 0,05$) entre o grupo controle.

Estudo experimental com camundongos infectados por *G. lamblia* observou que os neutrófilos causam danos na mucosa intestinal durante a colonização e após a eliminação da infecção. Neste estudo a ativação fagocitária foi observada no mesmo período do dano da mucosa, com ativação e números elevados dos neutrófilos na lâmina própria do jejuno do camundongo. O número de neutrófilos da mucosa foi significantemente elevado em camundongos infectados quando comparados ao grupo sem infecção, porém a contagem total dos leucócitos na circulação sanguínea foi menor em camundongos infectados do que os camundongos sem infecção. No entanto a percentagem dos neutrófilos sanguíneos dos camundongos infectados foi duas vezes maior do que os camundongos sem infecção. Este estudo sugere que a infecção por *G. lamblia* pode provocar a infiltração e ativação de neutrófilo na mucosa (CHEN et al,2013), além da infecção por *G. lamblia*, a citocina pró-inflamatória TNF- α produzida pelo macrófago possui entre suas principais funções a ativação de neutrófilo (ABBAS et al, 2012).

Os eosinófilos normalmente representam uma pequena percentagem dos leucócitos no sangue, embora eles em condições especiais podem se apresentar em grande número tanto no sangue periférico como na mucosa do trato gastrointestinal. Eles são importantes nos

processos alérgicos e nas doenças parasitárias, contribuindo para a lesão tecidual quando ativados, mas também exercem um papel importante na defesa da mucosa (ELIAS et al, 2001). Estudos com crianças com doença parasitária na faixa etária de 0-16 anos 32,4% (712/2198) apresentava eosinofilia sanguínea. A frequência de eosinofilia sanguínea entre as 1195 crianças com giardíase intestinal foi de 27,5% (SINGER et al, 2013).

Em estudo experimental, não foi evidenciado que *G.lamblia* possua efeito inibitório sobre a regulação de Células Dendríticas bovinas, derivadas de monócito (MoDC). MoDC, estimuladas pela *G.lamblia*, são funcionalmente ativas e capazes de induzir a proliferação de Célula T, ao produzirem citocinas pró e anti-inflamatórias: IL-6 / TNF- α e TGF- β /IL-10 respectivamente (GRITG et al., 2014).

Estudos demonstraram que níveis elevados de IFN- γ , IL-4 e IL-5, em crianças com infecção de *G. lamblia*, foi associado ao aumento da duração da infecção (ABDUL-WAHID e FAUBERT, 2008; LONG et al.,2010), níveis elevados de IL-8 foram associados à diminuição da duração da infecção e IL-10 desempenha papel de contrabalançar a resposta inflamatória, que pode ser mais forte na infecção sintomática do que nas assintomáticas (LONG et al., 2010) e em outro estudo, com adultos infectados com *G. lamblia*, apresentaram-se níveis elevados de IgE, IL-5, IL-6 e IFN- γ . Os valores foram comparados com um grupo saudável, cujas concentrações de IgE e IL-5 foram duas vezes superior àquelas do grupo saudável, as concentrações de IL-6 apresentaram-se duas vezes e meia superior que o grupo controle e a produção de IFN- γ foi quatro vezes mais elevada que o grupo controle. Estes dados indicam uma imunização no organismo infectado (MATOWICKA-KARNA et al., 2009). Recentemente estudos com crianças portadoras de *G. lamblia* a infecção foi associada com aumento dos níveis de TNF- α (HAGEL et al, 2014)

Jimenez e seus colaboradores observaram, em 2009, que *G. lamblia* pode induzir resposta imune mista, Th1 e Th2. Em seu estudo, camundongos Balb/c, imunizados com proteínas E/S do parasita, apresentaram altos títulos de anticorpos IgG e IgE e a análise *in vitro* de células esplênicas demonstraram altas concentração de IL-4, IL-5, IL-10, mas pequena concentração IFN- γ . Em outro estudo Hagel e seus colaboradores em 2011 com crianças coinfectadas com *A. lumbricoides* indicaram a capacidade de estimular citocinas das células Th1 e Th2 e os anticorpos contra *G. duodenalis* foi associada com uma redução na proporção de indivíduos infectados antes e depois do tratamento antiprotozoário.

Recentemente, em 2014, outro estudo experimental confirmou que *G. lamblia* pode induzir resposta imune mista, Th1 e Th2. Neste estudo camundongos Balb/c, foram infectados com trofozoítas de *G. lamblia* que apresentaram produção de anticorpo IgG1, IgG2, IgA e IgE

contra proteínas excretadas e secretadas pela *G. lamblia*, elevada taxa de proliferação *in vitro* em células do baço e elevada concentração da secreção de IL-4 após estimulação com proteínas secretadas e excretadas e elevada produção de IFN- γ e IL-5 no momento da eliminação do cisto. Um aumento gradual de IL-10 após a infecção indica o efeito regulador na infecção (JIMENEZ et al, 2014) .

IL-5 tem sido identificada como fator importante na diferenciação de células B em plasmócitos secretores de IgA. Estudo *in vitro*, por sua vez, tem demonstrado que IL-5 age, sinergicamente, com IL-2 e IL-4 para promover a secreção de IgA. A IL-5 é distribuída na lâmina própria do intestino, mapeando a distribuição de IgA secretória. Estudos *in vivo* revelam, ainda, que camundongos deficientes de IL-5 (IL-5 $-/-$) têm uma pequena, mas significativa, redução na concentração de IgA intestinal (HUSBAND, 2002).

IL-6 é outra citocina pró-inflamatória cuja principal função é a proliferação de células produtora de anticorpo (ABBAS et al, 2012) estudo demonstra seu envolvimento no controle da giardíase aguda, além de desempenhar um papel fundamental na proteção da mucosa (SARA et al., 2008). Estudos com camundongos infectados pela *G. lamblia* demonstraram que os mastócitos são a principal fonte de IL-6 e que animais deficientes desta célula ou de citocina controlam a infecção de forma mais lenta (ZHOU et al., 2003; LI et al., 2004, SARA et al., 2008).

Estudos experimentais indicam que a IL-6 está envolvida no controle da infecção por *G. lamblia*. ZHOU e seus colaboradores em 2003 observaram níveis elevados de IL-6 em camundongos infectados por *G. lamblia*, em outro estudo camundongos deficientes de IL-6 apresenta um defeito na resposta imune para *G. lamblia* quando comparados com camundongos normais (BIENZ et al, 2003). Além do controle da infecção aguda da giardíase, foi demonstrado que IL-6 também influencia no controle da infecção crônica em camundongos (ZHOU et al., 2003; BIENZ et al., 2003). Zhou e colaboradores, em 2007, demonstraram que, além da IL-6, o TNF α é importante no controle da giardíase aguda.

Kamda e seus colaboradores demonstraram, em 2012, que células derivadas da medula óssea são uma importante fonte de produção de IL-6 e que a produção de IL-6, pelas Células Dendríticas, podendo ser um regulador chave na infecção pela *G.lamblia*.

Estudos recentes com camundongos C57BL / 6 infectados com *Giardia muris* nos revela a importância da produção de IL-17A na depuração de uma infecção pela *G. muris*, juntamente com a indução precoce de Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma alfa (PPAR- α), contudo este mecanismo ainda não está claro (DREESSEN et al., 2014).

2.3 Alergia das vias aéreas respiratórias: asma e rinite

2.3.1 Epidemiologia

As doenças alérgicas, na infância, são um grande problema de saúde e, devido ao estilo de vida ocidental, a prevalência tem aumentado nas últimas décadas, especialmente em países desenvolvidos. A prevalência de doenças alérgicas é relatado por ser muito diferente entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, inclusive entre regiões do mesmo país (HALKEN,2004).

Em estudo recente, realizado entre escolares da área rural e urbana de uma região tropical da América Latina, não foi observada diferença significativa entre os sintomas de sibilos e atopia entre as áreas urbanas e rurais. Neste estudo, a prevalência de sintomas rinite (com coceira nos olhos) foi significativamente maior na área urbana em relação à rural (COOPER et al., 2014). Outro estudo, que apresenta um aumento da prevalência da doença alérgica em crianças na faixa etária de 07-12 anos, aponta. neste estudo a prevalência de alguma vez ter clínica de asma, sibilo sempre e sibilo no último ano foi de 20,8%, 17,7% e 10% respectivamente. Além disso, 25,5% das crianças relataram ter tosse seca à noite (DALCAN et al.,2014).

Asma, rinite e eczema são as doenças crônicas mais comuns da infância em países desenvolvidos. Neste estudo a prevalência de asma, rinoconjutivite alérgica e eczema atópica foi de 4 a 12 vezes superior no países desenvolvidos em relação aos centros menos desenvolvidos (ISAAC,98).

A asma é uma doença inflamatória crônica, caracterizada por uma hiperreponsividade brônquica, que pode levar à tríade clínico patológica de obstrução das vias aéreas, inflamação crônica e hipertrofia das células da musculatura lisa dos brônquios. Acomete, em média, 200 a 300 milhões de indivíduos (FALLON et al., 2007) e é particularmente comum nos países desenvolvidos, onde, em média, 10% a 30% das crianças e dos adultos são acometidos (ASHER et al., 2006; HOPKIN, 2003;). É a doença crônica mais comum entre as crianças (LUGOGO et al., 2006).

Nos países em desenvolvimento, tem sido verificado um aumento significativo no número de casos (ASHER, 2010), com, aproximadamente, 15% a 30% da população apresentando quadros de asma (BRAMAN, 2006). No Brasil, dados do *The Inter-national Study of Asthma and Allergy in Childhood* (ISAAC) demonstram que, aproximadamente, 19% dos adolescentes e 25% das crianças apresentam diagnóstico de asma. O mesmo estudo

verificou, ainda, que os casos de asma grave acometiam 4,7% dos adolescentes e 6,2% das crianças estudadas. As taxas mais elevadas de prevalência de asma foram observadas nos centros das regiões Norte, Nordeste e Sul (SOLE et al., 2006).

Na maioria das crianças, a doença é intermediária e facilmente controlada com a utilização de terapia adequada. No entanto, 5% a 10% dos pacientes pediátricos têm os sintomas persistentes e, frequentemente, exacerbados. Esses pacientes são considerados portadores de quadros “graves”, “dificuldade para controlar” ou “asma difícil” e, usualmente, estão expostos a altas doses de medicações e, portanto, estão sob-risco de efeitos colaterais sistêmicos decorrentes do tratamento (PATON, 2007). As crianças asmáticas graves possuem elevado risco de sofrer episódios recorrentes da doença e os principais motivos que levam a esse quadro podem ser parcialmente explicados pelo tratamento inadequado, pela interação entre os fatores genéticos ou pela exposição ambiental contínua aos alérgenos (PATON, 2007; SPORIK et al., 1992). Asma grave em crianças, de acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS), parece ser rara entre escolares na faixa etária de 12 anos com uma prevalência de 11% (NORDLUND et al., 2014).

A rinite alérgica é definida como uma inflamação da mucosa nasal, induzida pela exposição a alérgenos que, após sensibilização, desencadeiam uma resposta inflamatória mediada pela IgE, que pode resultar em sintomas crônicos ou recorrentes. Os principais sintomas incluem rinorréia aquosa, obstrução/prurido nasais, espirros e sintomas oculares, tais como prurido e hiperemia conjuntival, os quais se resolvem espontaneamente ou através de tratamento (BOUSQUET et al., 2001).

Estudos recentes confirmam que pacientes, com rinite alérgica e conjuntivite, estão associados à alta morbidade e impacto negativo na qualidade de vida (KATELARIS, 2013; STEINSVAAG, 2012) e que fatores genéticos, ambientais e socioeconômicos podem ser importantes no desenvolvimento da doença alérgica em pré-escolares (SCHMITZ et al, 2012; TORRES-BORREGO et al, 2008) Em 2012, Chiang et al avaliaram crianças e adolescente, do ambulatório de alergia respiratória e otorrinolaringologia, com menos de 18 anos, e constataram que a prevalência da rinite aumenta com a idade: somente 2,5% das crianças com rinite alérgica tinham menos de dois anos, sendo mais comum entre as crianças do sexo masculino. A maior prevalência de rinite alérgica está na faixa etária igual ou superior a seis anos: 33% e 18,3% das crianças com rinite apresentaram, concomitantemente, asma e conjuntivite alérgica respectivamente (CHIANG, 2012). Em outro estudo, crianças com pontuação da gravidade da dermatite atópica (SCORAD) elevada e eczema estão associadas a um maior risco de asma aos dez anos de idade, da mesma forma que esse estudo demonstra

que crianças com eczema, e aparecimento precoce de rinoconjutivite alérgica (ACR), parecem indicar uma doença alérgica mais grave e, muitas vezes, conduzem a um desenvolvimento de asma (EKBÄCK, 2014).

Estudos envolvendo a produção de anticorpos apoiam um papel para a IgA sérica, bem como IgG, na supressão de respostas alérgicas aos alergenios alimentares. Em ratos, antígenos de alimentos ingeridos devem ser absorvidos para induzir anafilaxia ou diarreia. Nestes estudos os ratos com alta concentração de IgA total no soro, mas baixos níveis de IgA no lúmen do intestino mostrou um lento desenvolvimento de diarreia alérgica (KUCUK et al, 2012). Assim, enquanto que a IgA secretória atua neutralizando as proteínas dos alimentos no intestino, IgA sérica pode ser crucial para limitar as respostas alérgicas. No mesmo modelo animal, a diarreia alérgica mediada por IgE foi suprimida por IgG1 no soro. Em vez disso foi proposto que o anticorpo IgG1 (como IgA) intercepta o antígeno absorvido impedindo sua ligação aos mastócitos (RUPA & MINE, 2012).

A indução de IgG4 contra alergenios de ácaros (*Blomia tropicalis*) foi associado à uma função protetora pela exposição antigênica naturais prolongado e neutralizando os antígenos ou bloqueio de IgE. Esta proteção e atividade pode ser um mecanismo subjacente significativa para eficácia da imunoterapia. Além disso, os níveis médios de IgG1 específica para *B. tropicalis* pode estar também relacionado com exposição ao alérgeno (PEREIRA et al, 2005)

2.3.2 Imunomodulação das alergias das vias aéreas respiratória nas infecções por *Giardia lamblia* e geo-helminthíases.

As doenças alérgicas são mediadas pela resposta imune tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, eosinofilia, mastocitose, e altos níveis de IgE), em consequência de uma interação complexa entre predisposição genética e o contato constante com proteínas ambientais alergênicas (von MUTIUS, 2002). Estudo publicado sobre a importância da IgA intestinal indica que quando ela está presente em altas concentrações no início da vida, durante uma inflamação intestinal indica uma redução de risco em doença alérgica associada com IgE (KUKKONEN et al, 2010).

A inter-relação entre as doenças alérgicas e enteroparasitoses tem sido foco de muitos estudos, visto que, em indivíduos alérgicos e parasitados, pode haver uma modulação da intensidade da reação alérgica (BAYRAKTAR, 2005).

Estudos revelam que os fatores ambientais e genéticos podem desencadear doenças alérgicas, entre os fatores ambientais as infecções parasitárias são as mais estudadas. As

infecções por helmintos induzem o sistema imunológico do hospedeiro para montar resposta imune com célula Th2 (COOPER, 2004). Apesar das evidências que helmintos protegem seus hospedeiros contra alergia, alguns estudos indicam que a infecção por estes helmintos não afeta a alergia ou atopia (WÖRDEMANN et al, 2008, COOPER et al, 2006), enquanto que outros demonstram uma associação positiva destas infecções com atopia, bem como com asma e rinite (HAGEL, 2007; PEREIRA, 2007). O tempo de exposição nas infecções com geo-helmintos podem ser de importância particular na determinação do efeito de geohelmintos em relação à alergia (COOPER et al, 2006). Estudos recentes com crianças com uma leve carga parasitária de *Ascaris lumbricoides*, o parasito apresenta um fator de proteção contra asma e seus sintomas, porém quando esta carga parasitária é pesada o parasito apresenta um fator de risco contribuindo para a prevalência de asma e seus sintomas entre essas crianças (BRAGAGNOLI, 2014).

Estudos envolvendo a sensibilização *A. lumbricoides* (presença do anticorpo IgE anti-*Ascaris*) como um importante fator de risco à doença alérgica (ALCANTARA-NEVES, 2010; MONCAYO et al, 2013), porém não foi encontrado nenhuma associação entre IgG anti-*A. lumbricoides* e a presença de asma entre crianças de área rural (KARADAG et al, 2006). Os níveis de IgE total, IgE e IgG4 anti-*Ascaris* foram especialmente elevada e com produção espontânea de IL-10 em crianças infectadas com *A. lumbricoides* cronicamente e coinfectadas (FIGUEREDO et al, 2010). Estudo recente, com crianças sem parasito, sugere que anticorpo IgE anti- *A. lumbricoides* pode ser associado com uma resistência com o parasito, além disso, os níveis de IgE específico aos antígenos parasitários ou ao alérgeno não foram prejudicados por IL-10 (SOUZA et al, 2014).

A inter-relação da infecção por *G. lamblia* e as doenças alérgicas de vias respiratórias é pouco conhecida. A infecção pela *Giardia lamblia* pode ocorrer associada à urticária e prurido (PRIETO et al., 2006; NENOFF et al., 2006), uveíte (GELFER et al., 1984), dermatite atópica (HAGEL et al, 2014) e com sensibilização para antígenos alimentares (DI PRISCO et al., 1993; HANEVIK et al., 2009).

Estudo desenvolvido por Di Prisco e colaboradores, em 1998, estudando 125 crianças entre seis e nove anos infectadas, exclusivamente, com *G. lamblia* e coinfectadas com demais parasitos, observou que 70% dos pacientes infectados com *G. lamblia* apresentavam sintomas de alergias, dentre os quais 33% apresentavam rinite, 23% sintomas de asma e 14% alergias cutâneas, em comparação com 43% dos pacientes não parasitados que apresentavam esses mesmos sintomas. Analisados em conjunto, estes dados sugerem que a infecção pela *G.*

lamblia pode realmente estar envolvida com o aumento dos sintomas concomitantes de asma e rinite.

Então, trabalhos realizados destacam a associação entre as infecções por *Giardia* e o aumento da prevalência de sintomas de alergias cutâneas como, por exemplo, urticária e alergias alimentares (DI PRISCO et al., 1993, 1998; GIACOMETTI et al., 2003; BAYRAKTAR et al., 2005; NENOFF et al., 2006). Os autores atribuem o aumento desses parâmetros alérgicos às alterações nas células da mucosa intestinal do hospedeiro infectado, o que pode levar à alérgenos e ao desenvolvimento de alergias (HARDIN et al., 1997; DI PRISCO et al., 1993).

Com relação à produção de anticorpos IgE, foi demonstrado que pacientes infectados *G. lamblia* apresentam altos títulos de IgE total e específica, além de reatividade cutânea para antígenos ambientais. Contudo, este fato foi observado quando existe uma coinfeção com helmintos, estes pacientes também demonstraram reatividade IgE ao leite de vaca e à antígenos de *G. lamblia* (DI PRISCO et al., 1993; 1998). Em outro estudo, não foram observadas diferenças nos níveis de IgE total entre pacientes infectados e não infectados pela *G. lamblia* (GIACOMETTI et al., 2003; SOUZA et al., 2012).

Em 2005, Bayraktar e colaboradores estudaram pacientes infectados, unicamente, por *G. lamblia* e a presença de diferentes citocinas, dentre elas a IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α e o receptor solúvel de IL-2 (rsIL-2). Estes autores verificaram que os níveis do TNF- α e o do rsIL-2 eram significativamente maiores nos casos de giardíase e a IL-1 β , IL-6 e IL-8 apresentavam maiores níveis apenas nos pacientes que apresentavam alergias associadas à infecção. Esses achados demonstram uma ativação intensa do sistema imune nos pacientes alérgicos e infectados.

Estudos experimentais apontam que a IL-6, quando produzida por células da resposta imune inata, é uma importante citocina na expansão de células Th2 efectoras (KUSHWAH R et al., 2011). Além disso, a IL-6 liberada de células dendríticas inibe a função de células T regulatórias, importantes no controle da reação alérgica (DOGANCI et al., 2005). A presença de IL-6 aumentou a liberação de histamina por mastócitos ativados por IgE (KIKUCHI et al., 2002).

Foi demonstrada a ativação direta de mastócitos pela *G. lamblia*, com consequente liberação de triptase, histamina, IL-6 e TNF- α (MUÑOZ-CRUZ et al., 2010). Então, é possível que a presença dos sintomas de alergia durante a infecção com *G. lamblia* esteja

ligada à produção de citocinas e mediadores pró-inflamatória por mastócitos, em resposta à presença do protozoário, e não apenas por mecanismos dependente de IgE.

A IL-6, juntamente com outras citocinas (TGF- β e IL-23), vem tendo destaque na indução de uma nova linhagem de linfócitos Th: as células Th17. Este novo perfil de citocinas Th17 vem sendo observado em modelos de intensa inflamação e injúria tecidual, como as doenças autoimunes (PARK et al., 2005) e, mais recentemente, na asma (OBOKI et al., 2008). Níveis elevados de IL-17 foram associados à severidade da hiper-reatividade aérea em pacientes asmáticos (BARCZYK et al., 2003) e com rinite alérgica (CIPRANDI et al., 2010). Contudo, a IL-17 parece não contribuir para o desenvolvimento ou manutenção do perfil de resposta Th2, já descrito na asma (predominância de eosinófilos, IL-4, IL-5 e altos níveis de IgE). Do contrário, os casos graves de asma relacionados ao perfil Th17 apresentaram IL-6, IL-8 e quimiocinas envolvidas com influxo de neutrófilos, caracterizando asma grave não clássica, além da presença de mastócitos, independente da presença de IgE (AMIN et al., 2008).

Observando a atual situação epidemiológica da infecção por *G. lamblia* na cidade de Recife e seu potencial imunomodulatório durante esta infecção, este trabalho investigou, além da associação com alergia das vias respiratória, o perfil de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ) e a influência dos anticorpos específicos IgE, IgG1 e IgG4 anti-*Ascaris* nas crianças infectadas exclusivamente com *G. lamblia*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a existência de associação entre infecção por *Giardia lamblia* e alergia das vias aéreas respiratórias em crianças, além de comparar os valores de eosinófilos e neutrófilos, o perfil de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ) e os níveis séricos de IgA total, IgE total, IgE anti-alérgeno e IgE, IgG1, IgG4 anti-*Ascaris* nas crianças com e sem alergia das vias respiratórias, com e sem infecção por *G. lamblia*.

3.2 Objetivos Específicos

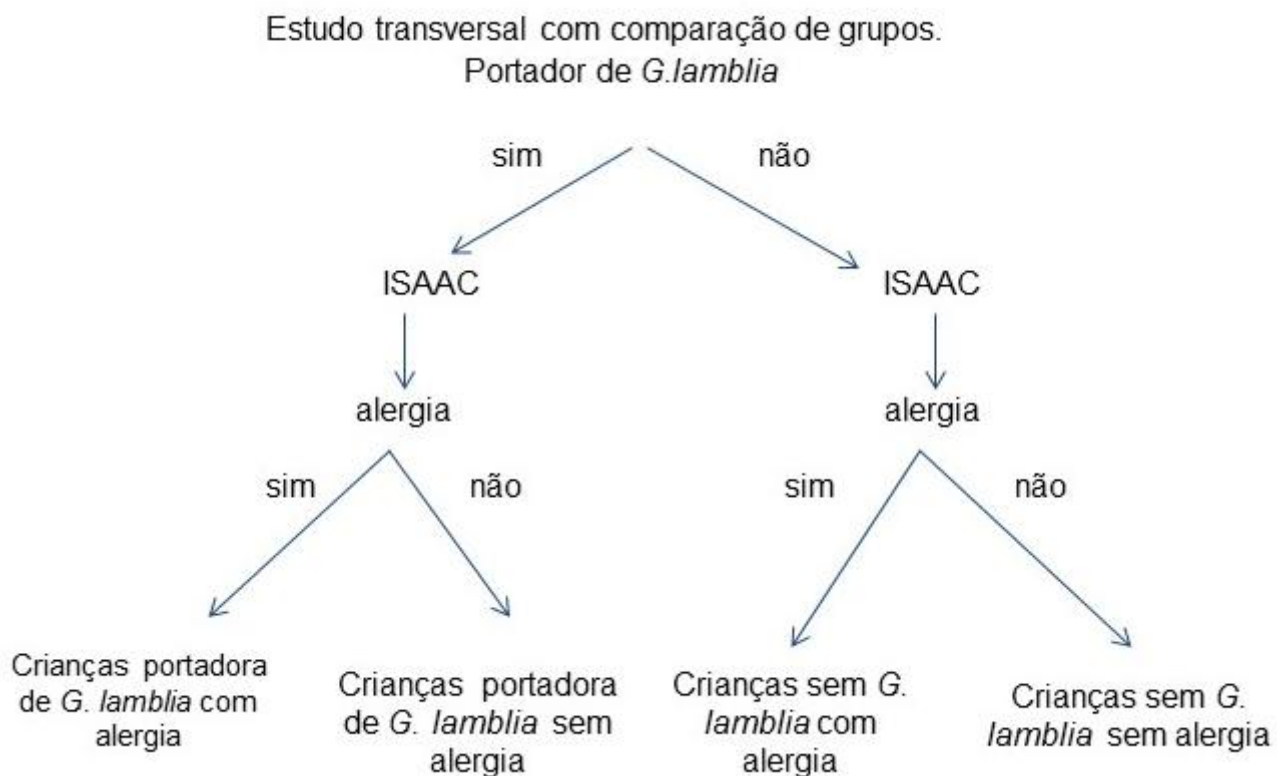
1. Comparar as crianças com / sem alergias das vias aéreas respiratórias quanto à frequência de infecção por *G. lamblia*.
2. Verificar se existe associação entre crianças portadoras de *G. lamblia* e a alergia das vias aéreas respiratórias e a história familiar de alergia (mãe/irmão/pai), sexo, idade, escolaridade materna, tabagismo passivo doméstico e renda familiar);
3. Comparar, em crianças com/sem alergias das vias aéreas respiratórias, infectados ou não por *G. lamblia*, os seguintes parâmetros imunológicos:
 - 3.1 Teste cutâneo puntura contra aeroalérgenos (Prick test).
 - 3.2 Níveis de anticorpos sérico: IgE total e IgA Total;
 - 3.3 Níveis de anticorpo IgE, IgG1 e IgG4 específico para antígeno anti- *Ascaris*;
 - 3.4 Níveis de IgE específico para aeroalérgenos
 - 3.5. Contagem absoluta de eosinófilos e neutrófilos em sangue periférico;
 - 3.6. Níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α .

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo transversal, com comparação entre grupos, que constou de duas etapas. Para a primeira etapa, foram estabelecidos quatro grupos conforme mostra a figura 1 para verificar a associação entre crianças com e sem alergias das vias aéreas respiratórias com crianças portadoras ou não de *Giardia lamblia*. Os quatro grupos foram comparados entre si (crianças com alergia das vias aéreas respiratórias com *G.lamblia*, crianças com alergia das vias aéreas respiratórias sem *G.lamblia*, crianças com ausência de alergia das vias aéreas respiratórias com *G.lamblia* e crianças com ausência de alergia sem *G.lamblia*) e a segunda etapa verificou-se a resposta imunológica entre os quatro grupos estudados (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição dos grupos de estudos.



Fonte: a autora, 2015

4.2 População de estudo

Descrição da população selecionada para o estudo e critérios de inclusão e exclusão.

4.2.1 População alvo:

Foi composta por crianças de 2 a 10 anos de idade, provenientes de creches e escolas públicas da área metropolitana de Recife-PE.

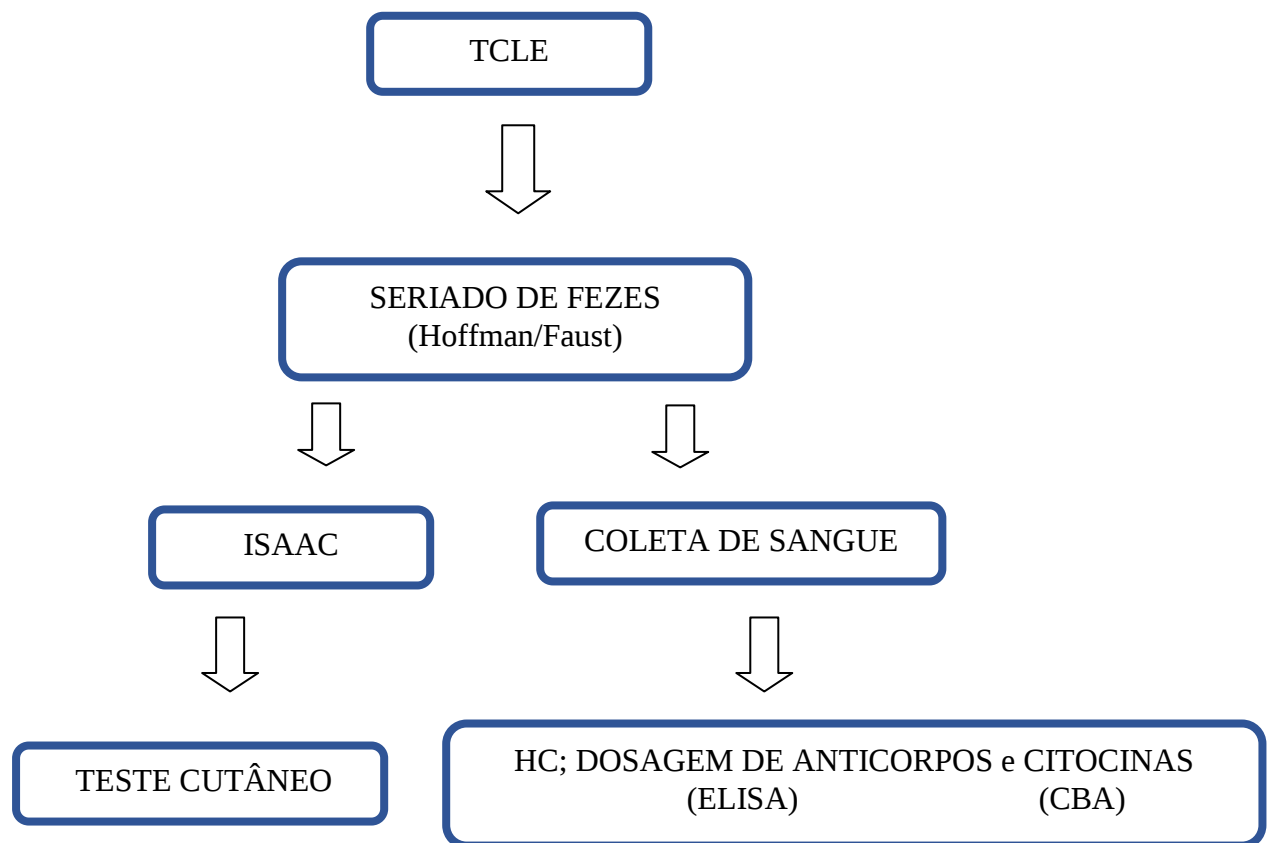
4.2.2 Critérios de inclusão e exclusão:

- a) Critérios de inclusão: Crianças com idade variando entre 2-10 anos, ambos os sexos. Portador de alergia das vias aéreas respiratórias (asma/rinite) ou sem alergia das vias aéreas respiratórias, segundo questionário ISAAC.
- b) Critérios de exclusão: Ser portador de parasitoses com exceção para *G. lamblia*.

4.3 Operacionalização da Pesquisa

Os responsáveis das crianças foram convidados a autorizar a participação das crianças no estudo e, após a explicação, os que aceitaram, assinaram o TCLE (Apêndice A). As crianças iniciaram, em seguida, os exames coproparasitológicos, responderam ao questionário padronizado ISAAC, a fim de avaliar a presença de alergia respiratória das vias aéreas. Após ou durante o seriado de fezes realizaram o teste cutâneo puntura contra aeroalérgenos, e foi coletado o sangue para a realização do hemograma e mensuração de anticorpos e citocinas (Figura 2).

Figura 2 - **Organograma da pesquisa.**



Fonte: a autora, 2015.

4.4 Categorização das Variáveis

Definição e classificação das variáveis estudadas

4.4.1 Variável Dependente: alergia das vias aéreas respiratórias (Asma/Rinite)

A asma tem sido definida pelo conjunto de suas características clínicas, fisiopatológicas e anatomopatológicas. como: dispneia, principalmente noturna, e tosse seca, (FONSECA, J. 2006). Segundo questionário padronizado ISAAC asma é definido quando a crianças apresenta sibilos (cansaço, chiado no peito) principalmente no ultimo ano. (ISAAC 98)

Rinite alérgica é definida como uma inflamação da mucosa nasal, induzida pela exposição a alérgenos que, após sensibilização, desencadeiam uma resposta inflamatória

mediada por imunoglobulina E (IgE), que pode resultar em sintomas crônicos ou recorrentes. (BOUSQUET et al., 2001).

Variável dependente

Variável dependente	Definição teórica	Definição operacionalização	Categorização
Alergia das Vias Aéreas Respiratórias (Asma e Rinite)	A principal característica clínica da asma é a ocorrência de episódios intermitentes de dispneia, principalmente noturna, e tosse, que pode ser manifestação isolada, associada, ou não, à presença de sibilos expiratórios (FONSECA, J. 2006). Os principais sintomas da rinite alérgica incluem: rinorréia aquosa, obstrução/prurido nasais, espirros e sintomas oculares, tais como prurido e hiperemia conjuntival, (BOUSQUET et al., 2001).	Resposta afirmativa questões 2 dos questionários:1(asma) e 2 (rinite).	1: alergia 2: sem alergia

4.4.2 Variável independente: variável biológica, social e laboratorial

a) Variáveis biológicas:

Variável biológica	Definição teórica	Definição operacional	Categorização
Idade	Variável contínua definida pela data de nascimento fornecido pelo responsável, na data do ingresso na pesquisa.	Calculada em anos pela data de nascimento que consta na aplicação do questionário.	1- 2-5anos 2- 6-10 anos
Sexo			1- Masculino 2- Feminino

b) Variáveis Sociais:

Variáveis sociais	Definição teórica	Definição operacional	Categorização
Escol. Materna	Tempo que frequentou a escola em anos	Grau de escolaridade alcançada	0-analfabeta 1-Ens. fund.l incompleto 2- Ens. fundamental 3- Ens. médio incompleto, 4- Ens. médio 5- Ens. superior.
Renda	Renda da família	Remuneração da família em reais no mês anterior a realização do questionário	1-< um (1) salário mínimo (SM), 2- 1 SM 3- > 1 e < que 2 SM. 4- > 2 SM.
Tabagismo passivo doméstico	Fumante no domicílio	Alguém fuma dentro do domicílio?	1- SIM (alguém fuma no domicílio) 2-Não (ninguém fuma no domicílio)
História de alergia familiar (Mãe)	Diagnóstico de: Asma, rinite, urticária, dermatite atópica.	Qualquer manifestação de alergia na mãe (asma, rinite, urticária, dermatite atópica).	1- Sim (Presença de: qualquer tipo de alergia asma, rinite, urticária, dermatite atópica). 2- Não (Ausência).
História de alergia familiar (irmão)	Diagnóstico de: Asma, rinite, urticária, dermatite atópica entre os	Qualquer manifestação de alergia entre o(s) irmão (s) (asma, rinite, urticária,	1- Sim (Presença de: qualquer tipo de alergia asma, rinite, urticária, dermatite atópica).

	irmãos	dermatite atópica).	2- Não (Ausência).
História de alergia (Pai)	Diagnóstico de: Asma, rinite, urticária, dermatite atópica	Qualquer manifestação de alergia entre o(s) irmão (s) (asma, rinite, urticária, dermatite atópica).	- Sim (Presença de: qualquer tipo de alergia asma, rinite, urticária, dermatite atópica). 2- Não (Ausência).

c) Variáveis laboratoriais:

Variáveis laboratoriais	Definição teórica	Definição operacional	Categorização
Infectado por <i>G. lamblia</i>	Presença de cistos / trofozoítos nas fezes	Presença de cistos / trofozoítos em qualquer amostra em um dos exames parasitológicos (Faust e Hoffman)	1:Presença: cistos ou trofozoítas de <i>G.lamblia</i> em um dos exames parasitológicos 2: Ausência (de cistos ou trofozoítas em todos os exames parasitológicos)
Níveis séricos de Anticorpo IgE total	Ac. presente em concentrações anormais nas alergias e parasitoses	Anticorpo mensurado por amostra sanguínea pelo ensaio IMUNOCAP	Valores medianos (mínimo-maximo)
Níveis séricos IgE específica para aeroalérgeno Classe:I,II, III,IV	Anticorpo presente nas alergias das vias aéreas respiratórias	Anticorpo mensurado por amostra sanguínea pelo ensaio IMUNOCAP	1-Reagente (em qualquer das classes): Cl I ($\geq 0,35$ -K U/l); Cl II (0,71-3,5KU/l);Cl III (3,51-17,5KU/l);Cl IV (17,51-50KU/l), Cl V (50,1-100KU/l), Cl VI (>100 KU/l). 2-Não reagente: Classe 0 ($<0,35$ KU/l).
IgE anti- <i>Ascaris</i>	Ac presente nas infecções com <i>A. lumbricoides</i>	Anticorpo mensurado por amostra sanguínea pelo ensaio IMUNOCAP	Valores medianos (mínimo-maximo)
Níveis séricos de Anticorpo IgA Total	Ac. presente em níveis anormais nas alergias e infecções parasitárias.	Anticorpo mensurado por amostra sanguínea com anticoagulante pela técnica de ELISA direto	1- Elevada ($>$ valor mediano) 2- Baixo ($<$ valor mediano)

IgG1 e IgG4 anti-Asc	Anticorpos presente nas infecções com <i>A. lumbricoides</i>	Anticorpo mensurado por amostra sanguínea pela técnica de ELISA indireto	-1 Elevada (> valor mediano) 2- Baixo (< valor mediano)
Eosinófilo	Célula sanguínea elevada nas parasitoses e alergias	Célula sanguínea mensurada no sangue total com anticoagulante em sistema de automação com revisão de lamina	Valores medianos (mínimo-maximo)
Neutrófilo	Célula sanguínea elevada nas infecções agudas.	Célula sanguínea medida no sangue total com a Anticoagulante sistema de automação/revisão de lamina	Valores medianos (mínimo-maximo)
Níveis de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-17)	Citocinas presente na Resposta Imune das alergias e infecções parasitária	Citocinas mensurado por amostra sanguínea com anticoagulante pela técnica de citometria de fluxo: sobrenadante/ dupla marcação de membrana e intracitoplasmática	Variável contínua (pg/ml) Valores medianos (mínimo-maximo)

4.5 Padronização das técnicas

Descrição das técnicas utilizadas nos exames realizados.

4.5.1 Parasitológico de Fezes

O diagnóstico laboratorial foi feito pelo encontro de ovos de helmintos ou cistos de protozoários presentes nas amostras fecais. Foi realizado exames seriados com intervalo entre 3 a 6 dias entre as três amostras Para pesquisa de cisto de protozoário e ovos de helmintos, foram utilizados os métodos de concentração: Faust (Centrifuga-Flutuação em Sulfato de Zinco) e Hoffman, Pons e Janer / Lutz (Sedimentação Espontânea) (DE CARLI, 2001) respectivamente.

4.5.2 Teste cutâneo de puntura de resposta imediata

Para realização do teste cutâneo de puntura, foram utilizados os extratos glicerinados dos aeroalérgenos: *Dermatofaghoide pteronyssius* (ácaro), *Blomia tropicalis* (ácaro), *Aspergillus fimigatus/ Alternaria alternata* (fungos), *Blatella germanica/ Periplaneta americana* (barata), e epitélio de gato. Histamina (1:1000) e salina glicerinada foram usadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Os testes padronizados foram oriundos do mesmo lote do laboratório IPI-ASAC. As reações cutâneas foram lidas em 15 minutos e consideradas positivas quando apresentarem diâmetro maior que 3 mm, em relação à solução salina.

4.5.3 Leucograma

As amostras sanguíneas foram coletadas em tubo estéril à vácuo com anticoagulante. Os sangues foram processados no mesmo dia da coleta, em aparelho de automação (a critério do laboratório) após 30min de homogeneização automatizada, a fim de obter os valores absolutos (VA) dos eosinófilos e neutrófilos. As laminais foram coradas, utilizando técnicas de May-Grunwald-Giemsa, e submetidas à análise e revisão de laminais por microscopia óptica.

4.5.4 Dosagem de IgE anti-alérgeno

Após coleta do sangue venoso, pela punção da veia cubital (1 mL), o plasma foi estocado a -20°C para posterior análise por ensaio imunofluorimétrico (CAP System – UNICAP). À fase sólida, contendo alérgeno de interesse, adicionou-se o plasma de cada paciente seguido de incubação e lavagem. Para revelar a reação, foram adicionados anticorpos de detecção, marcados com enzima, específicos para IgE. Em seguida, após incubação e lavagem, foi adicionado o agente de desenvolvimento e a reação interrompida para determinação da fluorescência no eluato. A quantidade de fluorescência foi proporcional à quantidade de IgE no plasma do paciente. Os resultados foram quantitativos e determinados por curva padrão.

4.5.5 Dosagem de IgG1, IgG4 anti-*Ascaris*

As placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas overnight, 4°C, com, 2,5µg/mL e 60 µg/mL de antígeno solúvel de *Ascaris* diluídos em tampão carbonato bicarbonato para dosagem de IgG1 e IgG4 anti- *Ascaris*, respectivamente. Entre cada etapa as placas foram lavadas com tampão de lavagem PBS-T (PBS 0,01M acrescido de 0,05% de Tween 20) e então bloqueados utilizando PBS-T-BSA (PBS-tween acrescido de 1% de BSA) para IgE ou tampão bloqueador (PBS 0,01M acrescido de leite desnatado 2%) para IgG1 e IgG4. Um novo ciclo de lavagens foi realizado e foram adicionados os plasmas dos pacientes, diluídos 1:10 em PBS 0,01M. Após 1h de incubação a 37°C e lavagem, adicionou-se o anti-IgE humano conjugado a peroxidase, produzidos em cabra (A9667-SIGMA), diluído 1:6000 em PBS-T-BSA, o anti-IgG1 humano-biotinilado produzido em ratos (555869-BD Pharmingen), diluído 1:6000 ou o anti-IgG4 humanobiotinilado- produzido em ratos (555882-BD Pharmingen), diluído 1:1000, em tampão bloqueador. Nas placas de IgG1 e IgG4 foi adicionado a Streptoavidina peroxidase (RPN 4401V-GE Healthcare), diluída 1:8000 em tampão bloqueador. Por fim, foi adicionado o tampão revelador (composto por OPD (Ortho-phenylenediamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvido em tampão tris-citrato 0,1M (pH 5,5) e H₂O₂ 30%). As placas foram lidas em leitor de ELISA (Absorbância de 492 nm) para o cálculo da densidade óptica (DO). Para a classificação dos plasmas dos pacientes (em reagente ou não reagente), foram adicionados controles sabidamente positivos e negativos onde foi estimado o cut-off da reação.

4.5.6 Dosagem de IgE anti-*Ascaris*

Após coleta do sangue venoso, pela punção da veia cubital (1 mL), o plasma foi estocado a -20°C para posterior análise por ensaio imunofluorimétrico (CAP System – UNICAP). À fase sólida, contendo antígeno *Ascaris*, adicionou-se o plasma de cada paciente seguido de incubação e lavagem. Para revelar a reação, foram adicionados anticorpos de detecção, marcados com enzima, específicos para IgE anti- *Ascaris* . Em seguida, após incubação e lavagem, foi adicionado o agente de desenvolvimento e a reação interrompida para determinação da fluorescência no eluato. A quantidade de fluorescência será

proporcional à quantidade de IgE no plasma do paciente. Os resultados foram quantitativos e determinados por curva padrão.

4.5.7 Dosagem de IgE Total

Após coleta do sangue venoso, pela punção da veia cubital (1 mL), o plasma foi estocado a -20°C para posterior análise por ensaio imunofluorimétrico (CAP System – UNICAP). À fase sólida, contendo anti-IgE, adiciona-se o plasma de cada paciente seguido de incubação e lavagem. Após a lavagem adicionou-se anti-IgE* marcado com enzima e realizou-se nova incubação. Em seguida, após incubação realizou-se nova lavagem e o complexo ligado foi incubado com o substrato para determinação da fluorescência no eluato, a reação foi interrompida para determinação da fluorescência no eluato. A quantidade de fluorescência foi diretamente proporcional à concentração de IgE na amostra do paciente.

4.5.8 Dosagem de IgA Total

As placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas overnight, 4°C , com o soro do paciente diluído 1/50, em PBS 0,01M/pH 7,2. Posteriormente, as placas foram lavadas com tampão de lavagem PBS-T (PBS 0,01M acrescido de 0,05% de Tween 20) e então bloqueadas por 3h a 37°C utilizando o tampão bloqueador (PBS 0,01M acrescido de leite desnatado 2%). Um novo ciclo de três lavagens foi realizado, e foi adicionada a anti-IgA humana conjugada a peroxidase, produzida em cabra (A0295-SIGMA), diluída 1:5000 em tampão bloqueador. A placa foi incubada por 1h a 37°C , lavada e foi adicionado o tampão revelador (composto por OPD (Ortho-phenylenediamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvido em tampão tris-citrato 0,1M (pH 5,5) e H_2O_2 30%). As placas foram lidas em leitor de ELISA (Absorbância de 492 nm) para o cálculo da densidade óptica (DO).

4.5.9 Cultura celular

As culturas de sangue total foram realizadas (em todos os pacientes selecionados) em tubos de polipropileno de 14 mL (BD System™). Foram utilizados 500 μL de sangue total em 1 mL de meio RPMI 1640 com glutamina (2mM), gentamicina 50mg/mL (Sigma), 10mM HEPES (Sigma) e 5% soro fetal bovino (Cultilab). As células foram estimuladas separadamente com Phytohaemagglutinin (PHA) ou apenas com meio de cultura e incubadas

por 24 horas, a 37°C em estufa de CO₂. Após esse período, foram coletados os sobrenadantes da cultura para a dosagem das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ).

4.5.10 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes de cultura

As dosagens de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ) presentes no sobrenadante da cultura foram feitas por *Cytometric Bead Array* (CBA), utilizando o “Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD-550749), seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, foi feita a diluição seriada da mistura de citocinas recombinantes para a formação da curva padrão, diluídas em diluente proveniente do kit, e incubadas por 15 minutos. Em seguida, 25 μ L do mix de beads (fluorescentes) de captura foram adicionados a 25 μ L de amostra dos sobrenadantes de cultura. Foi, então, adicionado o cocktail de anticorpos de detecção e a mistura foi incubada por 3 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente os tubos foram lavados, utilizando o Wash buffer (também proveniente do kit) e a aquisição das amostras foi feita em um citômetro de fluxo (FACS Calibur – Becton Dickinson – 4 canais de fluorescência), enquanto a análise dos dados foi através do software FCAP Array V.3. Os resultados foram expressos em valores de concentração, em μ g/ml.

4.5.11 Dosagem de citocinas intracelulares

As suspensões celulares foram lavadas com 8 mL PBS-BSA 0,5% (tampão fosfato pH 7,2 com soro albumina bovina) à 400 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, deixando um volume de aproximadamente 500 μ L. Foram retirados 100 μ L do sangue e colocados em tubos de poliestireno (5mL) (tubos falcon BD System™ N°352059) e acrescentados 2mL de Solução de Lise diluída 1X(2,85% de citrato de sódio, 30% etilenoglicol 54% formaldeído 37%, 0,04% e heparina 100000USP), sob agitação em Vortex, a suspensão foi incubada ao abrigo da luz, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Para bloquear a reação foi adicionado 1 mL de PBS-BSA 0,5% . As suspensões foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. As células lisadas foram lavadas duas vezes com 2ml de PBS-BSA 0,5% à 3 00 x g por 5 minuto e em seguida, fixadas com 500 μ l de BD Cytofix™(BD Catálogo N° 554655) por 20 minutos e depois lavadas duas vezes com PBS-BSA 0,5%.

As células fixadas foram permeabilizadas em 1 ml de BD Perm/Wash™ (BD Catálogo N° 554723) e incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugadas à 300 x g por 10 minutos, removendo-se o sobrenadante. As suspensões celulares foram marcadas com 5 µL da mistura de anticorpos anti-IL17, anti-IFN-γ e anti-IL-4 por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Passado o tempo de incubação as suspensões foram lavadas duas vezes com 1 mL de BD Perm/Wash™ e centrifugadas à 300 x g por 10 minutos. As células foram ressuspensas com 400 µL de BD Cytofix™. Em seguida foi realizada a leitura em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD-Pharmingen, San Diego, CA, EUA), onde a frequência das células marcadas foi determinada através da contagem de pelo menos 10000 por amostra.

4.6 Limitações metodológicas do estudo

Avaliação dos vieses de seleção, informação e confundimento.

4.6.1 Viés de Seleção

- a) A seleção das crianças para este estudo ocorreu de acordo com o aceite do responsável no estudo após a explicação.
- b) Exames parasitológicos falso-negativos, devido a baixa carga parasitária ou período negativo onde não existe eliminação de cistos, que foram minimizados pela análise de um seriado de fezes em três amostras com intervalo de três a seis dias entre cada uma a fim de aumentar a positividade da pesquisa, e analisadas por diferentes tipos de técnicas de exames parasitológicos (Hoffman e Faust).
- c) Erros de classificação em relação ao diagnóstico de alergia das vias aéreas respiratórias. Este erro será reduzido pela utilização de questionário padronizado pelo ISAAC e teste cutâneo contra alérgeno (Prick test). Todas as crianças foram avaliadas por dois observadores de modo independente caso haja discordância será solicitado um terceiro observador.

4.6.2 Viés de informação

- a) Os responsáveis das crianças podem fornecer informações não verdadeiras no questionário. Foi realizado um treinamento aos investigadores a fim de minimizar esta possibilidade.

4.6.3 Viés de Confundimento

Dificuldade em separar os efeitos da exposição principal daqueles produzidos pelos demais fatores ou variáveis de confusão. Para o controle deste viés, foram utilizados modelos estatísticos de regressão logística e análises multivariadas.

4.7 Análises dos dados

Foi realizada uma análise descritiva para apresentação das informações coletadas, onde foram analisadas as frequências das crianças portadoras de *G.lamblia* e suas respectivas variáveis sociais com os casos de alergia das vias aéreas respiratórias observadas na população de estudo. Na comparação entre os grupos, foi analisada a associação entre crianças portadoras de *G. lamblia* com alergia das vias aéreas respiratórias, e realizado uma análise, onde foram calculados os “odds ratio” e seus respectivos intervalos de confiança, desta associação.

As dosagens das imunoglobulinas e de citocinas, e os valores dos eosinófilos e neutrófilos foram expressas como medianas. Para análise comparativa destas variáveis contínuas entre grupos, foi utilizado o Kruskal-Wallis. Os casos em que a análise se mostrou significativamente diferente procederam-se a comparação utilizando-se o teste de Mann-Whitney, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. Na interpretação dos testes estatísticos, todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%. O software utilizado foi o Epi Info versão 7 “for Windows”.

4.8 Consideração Éticas

Esse estudo teve aprovação do Comitê de Ética (Anexo B) envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE (CAAE: 01486912.5.0000.5208 / Número do parecer: 31639). Os procedimentos utilizados obedeceram à resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Sua realização não acarretou em danos a saúde das crianças envolvidas e apresentou um modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Foi assegurado o sigilo quanto das informações obtidas. Foi assegurada aos pacientes a autonomia para recusar a participação no projeto, sem prejuízo de seu atendimento nos locais de estudo. Os pesquisadores se comprometem a garantir a qualidade dos exames laboratoriais, tratamento e acompanhamento de todos os envolvidos na pesquisa.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil de citocinas em crianças alérgicas infectadas por *Giardia lamblia* e sensibilizadas por *Ascaris* de área urbana do nordeste brasileiro

INTRODUÇÃO

Giardia lamblia é um protozoário flagelado, parasito do intestino delgado, muito comum no mundo inteiro.¹ A giardíase é considerada como doença negligenciada pela Organização Mundial de Saúde.^{1,2} A prevalência estimada é de 2%-5% nos países desenvolvidos e de 20%-30% nos países em desenvolvimento, com aproximadamente 280 milhões de infecções por ano,^{3,4} sendo 2% dos adultos e 6% a 8% das crianças.⁵ Embora, a infecção pela *G. lamblia* possa ocasionar diversas manifestações gastrointestinais (diarreia, esteatorreia, má absorção crônica em crianças),⁶ a forma trofozoíta do protozoário alberga o intestino delgado do adulto, vivendo de modo comensal, na maioria dos casos (60-80%).⁷

Antígenos excretórios e secretórios (E/S), liberados pela *G. lamblia*, são indutores da resposta imune do hospedeiro, caracterizada por pequena inflamação na mucosa intestinal, produção de anticorpos, principalmente a Imunoglobulina A (IgA) secretória, e produção de citocinas por linfócitos T CD4+.⁸⁻¹⁰ De fato, em crianças com infecção de *G. lamblia*, níveis elevados de IFN- γ , IL-4 e IL-5 foram associados a maior duração da infecção.^{8,11} Do contrário, IL-8 e IL-10 foram associados à diminuição da duração da infecção e controle da resposta inflamatória, respectivamente.¹¹

As doenças alérgicas são mediadas pela resposta imune tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, eosinofilia, mastocitose e altos níveis de IgE), em consequência de uma interação complexa entre predisposição genética e o contato constante com proteínas ambientais alergênicas^{12,13}. Devido às alterações nas células da mucosa intestinal do hospedeiro, a *G. lamblia* tem sido associada com alterações na absorção de alérgenos e no desenvolvimento de alergias.^{14,15} Além disso, durante a infecção com *G. lamblia* foi observado eosinofilia.^{16,17} Os antígenos secretórios e excretórios do protozoário apresentaram características semelhantes aos alérgenos e induziram desvio de resposta para perfil Th2.¹⁸ Na infecção por *G. lamblia* houve maior ativação da resposta imune em pacientes alérgicos,¹⁹ bem como, prevalência de alergia cutânea (prurido e urticaria) e alergia alimentar.^{15,20,21} A respeito das alergias respiratórias, asma/rinite, os achados são controversos. Foi observado aumento da hiperreatividade cutânea a

antígenos

ambientais e sintomas asma/rinite, bem como, elevada concentração de IgE total e específica.^{15,20,21} Diferentemente, não foi observado diferenças nos níveis de IgE total e IgE alérgeno-específico entre pacientes infectados e não infectados por *G. lamblia*, bem como, nos sintomas de asma/rinite em pacientes livres de infecção ativa por helmintos.²² Então, a controvérsia entre os estudos vem sendo explicada pela concomitante infecção por helmintos, que sabidamente pode modular a reação alérgica.^{23,24}

Contudo, a IgE anti-*Ascaris* tem sido considerada como um factor de risco para a doença atópica e como um possível marcador para propensão de doenças alérgicas.²⁵⁻²⁷ Por outro lado, alguns estudos têm utilizado o isotipo IgG4 anti-*Ascaris* como um marcador para infecções crônicas e de proteção para reação atópica.²⁸ Enquanto que não foi observado nenhuma associação entre IgG anti-*Ascaris* e asma.²⁹ Contudo, outro estudo revela que a positividade de IgE e IgG4 anti-*Ascaris* é frequentemente associado com níveis elevados de IgE total em pacientes com alergia respiratória.³⁰ Então, é possível que em infecções por *G. lamblia*, anticorpos anti-*Ascaris* seja o fator interveniente para as reações alérgicas nestes pacientes

Neste estudo, foram avaliadas a produção de anticorpos IgE, IgG4 e IgG1 anti-*Ascaris* e de citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-17/IL-6 em crianças infectadas com *G. lamblia*, sem infecção concomitantes com helmintos, bem como, a presença de asma/rinite. Os resultados sugerem que a presença do protozoário em pacientes sensibilizados para geohelmintos (infecção pregressa) podem interferir na resposta imune do hospedeiro e na proteção das alergias das vias respiratórias.

METODOLOGIA

Desenho de estudo e população

Este estudo foi realizado em áreas de baixo nível socioeconômico das cidades de Recife e Itamaracá, em Pernambuco, Brasil. Este estudo foi um caso-controle aninhado em um estudo transversal, onde os casos foram crianças com alergias respiratórias (asma e/ou rinite) e controle crianças não alérgicas. Crianças infectadas por *G. lamblia* (G) e crianças não infectadas foram (NG), bem como, anticorpos isotipos anti-Asc positivo ou negativo foram utilizados para realizar uma análise comparativa dos pacientes. O estudo começou em abril de 2012 e foi desenvolvido até agosto de 2014. O cálculo do tamanho da amostra foi baseado em estimativas “a priori” onde a probabilidade de infecção por *G. lamblia* foi um mínimo de 15% da amostra do estudo e a prevalência de alergia respiratória (asma e/ou rinite) foi de cerca de

30%, com base em dados para Recife a partir do Estudo Internacional de asma e Alergias na Infância (ISAAC).

Inicialmente, 978 crianças foram recrutadas e 433 cadastradas no estudo. Destas 211 realizaram os testes para a infecção por *G. lamblia*. Pais ou responsáveis das crianças assinaram o termo de consentimento e de todos os procedimentos do estudo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE (CAAE: 01486912.5.0000.5208/Número do protocolo 31639). A estratégia de seleção foi procurar ativamente crianças da comunidade que tiveram em algum momento sido visto pela atenção primária, mas eram dependentes dos responsáveis que forneceram as amostras fecais para os ensaios de parasitos nos dias definidos no protocolo de pesquisa. Amostras de fezes foram analisadas em dias alternados por métodos de Faust e Hoffman.

As respostas afirmativas às perguntas 1,6 e principalmente a 2 do questionário padronizado ISAAC-1 foram definidos indicando como asma e uma resposta afirmativa às questão 2 do questionário padronizado 2 foi definido indicando rinite³¹. O diagnóstico foi confirmado pela anamnese e exame clínico, e complementado com os resultados dos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos. Indivíduos com os resultados dos testes normais e sem história prévia de doença respiratória crônica foram utilizados como controle.

A amostra do estudo caso-controle foi composta de 211 crianças que seus responsáveis responderam ao questionário ISAAC e completaram o exame parasitológico (3 amostras). Os dados demográficos e socioeconômicos foram coletados: sexo, idade, escolaridade da mãe, renda familiar, fumante passivo e informações sobre história familiar de alergia passivo (Tabela 1). Das 211 crianças, 183 (80/ alérgica e 103/ não-alérgica) realizaram os testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para uma variedade de extratos de alérgenos respiratórios ambientais – (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Periplaneta americana*, *Blatella germanica*), Fungos and epitélio de gato– provided by Group ASAC Pharma (IPI-ASAC).

Granulócitos do sangue periférico e análise de anticorpos

As amostras de sangue foram analisadas automaticamente (Sysmex XS-1000) a fim de se obter os valores absolutos de neutrófilos e eosinófilos. O plasma de 176 pacientes foram testados os anticorpos IgG1, IgG4 e IgE anti-Asc, bem como, anticorpos de IgE e IgA total. Para a detecção do IgE total e IgE anti-Ascaris o plasma de cada paciente foi submetido a

ensaios automatizados imunofluorométrico (ImmunoCAP sistema - Phadia Diagnóstico) com um “cut off” de 0,35 kUA / L e 400 UI, respectivamente. IgG1 e IgG4 anti-*Ascaris* foram testados usando placas (96 poços) revestidas com antígeno *Ascaris*- (20 ug / ml) (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Dinamarca) e anti-IgG1 e IgG4 humano biotinilados produzido em ratos (Sigma-Aldrich). A amostra (1:10) foram adicionados em duplicado. As reações foram reveladas com um conjugado de estreptavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich). Para a detecção de IgA total, que foram utilizados soro do paciente (1:50) -Revestido as placas de 96 poços com anti-IgA humana conjugada a peroxidase produzida em cabra (Sigma A0295). As reacções foram desenvolvidas com uma solução de OPD em tampão 0,1 M Tirs-citrato mais H_2O_2 . As placas foram lidas a 450 nm num leitor ELISA. Os resultados foram expressos pela mediana da densidade óptica (DO) de cada grupo. Não houve diferença estatística em anti-IgE alérgico ou a produção de IgE total e IgA para todos comparação (dados não demonstrados).

Medição de citocinas após estimulação *in vitro*

A partir de uma subpopulação (37 pacientes infectados e 59 não infectados) foram cultivadas sangue total (500ul) em tubos de polipropileno (BD Falcon System™) em meio RPMI 1640 suplementado (Sigma) adicionado de soro de bovino fetal (5%) após estimulação mitogénio (fito-hemaglutinina; 5 ug/ml), ou não estimuladas, durante 24 horas. O sobrenadante de cultura foram colhidas para a medição de citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ por Citometria de fluxo (CBA) (BD Biosciences). A detecção de citocinas com mitogénio foi maior do que as condições não-estimulação (data não mostrados)

.

As análises estatísticas

Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 e SPSS versão 17.0.0 para a análise estatística. Foi utilizado o teste exato de Fisher para comparar as frequências de, resultados de testes positivos de pele alérgicas para pacientes infectados por *G. lamblia* ou crianças não infectadas para ambos alérgica e não-alérgica. Foi calculada a mediana de DO para anticorpos totais e específicos, os níveis de citocinas e granulócitos foi calculada e comparada usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados foram estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

Crianças alérgicas e infectadas por *G. lamblia* apresentaram altos níveis de IgG1 anti-*Ascaris* e menor número de eosinófilos.

Os dados demográficos e socioeconômicos foram coletados: sexo, idade, escolaridade da mãe, renda familiar, fumante passivo e informações sobre história de alergia familiar (Tabela 1). Observou-se a frequência semelhante entre os sexos, mas as alergias foram mais prevalentes em crianças com menos de 5 anos e naquelas com história de alergia na família. Em relação aos granulócitos de sangue periférico, houve significativamente menor número de eosinófilos no grupo alérgico infectados do que não-alérgico infectado. Quando comparado infectados e não-infectados em crianças não alérgicas, o número de eosinófilos foram maiores neste primeiro grupo. Não houve diferença estatística para o número de neutrófilos (Tabela 1).

Avaliamos o contato prévio com o antígeno helmintos por meio de dosagem de IgG1 IgG4 e IgE anti-*Ascaris*, no plasma de crianças infectadas por *G. lamblia* e crianças não infectadas (Tabela 2). Foram estatisticamente mais elevados os níveis de igG1 anti-Asc em crianças infectadas por *G. lamblia* do que em crianças não infectadas (0,086 vs 0,026 / $p = 0,04$). Observou-se que as crianças infectados alérgicas mostraram níveis significativamente mais baixos de IgG1 anti-Asc quando comparado com crianças infectada não alérgica (0,034 vs 0,086 / $p = 0,04$) e superior, quando comparado com o grupo não infectado alérgica (0,034 vs 0,008 / $p = 0,01$). Não houve diferenças estatísticas de IgE e IgG4 anti-Asc entre os grupos

Produção de citocinas em crianças infectadas por *G. lamblia* e crianças alérgicas

A amostra de sangue a partir de crianças infectadas por *G. lamblia* foram cultivadas após estimulação mitogénica e os sobrenadantes foram recolhidos para quantificação da produção de citocina. Como grupo controle, a cultura de sangue de crianças não infectadas também foi realizada. Os níveis de citocinas em crianças alérgicas foram avaliadas de acordo com a infecção por *G. lamblia* (Tabela 3). Houve níveis estatisticamente semelhantes de IL-6 nos grupos. A citocina TNF- α foi produzida em níveis mais elevados no grupo alérgico do que não alérgica em ambos grupos infectados e não infectados por *G. lamblia*. No que diz respeito ao IL-10, os níveis mais elevados foram observados no grupo infectado por *G. lamblia* independente as crianças apresentarem alergia ou não. A produção de IL-2, IL-4 e IFN- γ

foram maiores nas crianças infectadas do que os não-infectados, mas não houve diferença estatística para infectada alérgica e não-alérgica. IL-17 não foi detectadas em nenhum dos grupos.

Aumento de níveis de TNF- α e IL-10 em crianças infectadas por *G. lamblia* e IgG1 anti-Asc positivos

Devido aos elevados níveis de IgG1 anti-Asc em crianças infectadas, nos perguntamos sobre o perfil de citocinas em crianças infectadas por *G. lamblia* e sensibilizadas por Ascaris. Comparamos crianças infectadas por *G. lamblia* ou não infectadas e foi possível observar níveis elevados de IL-2, IL-4 e IFN- γ no primeiro grupo, tanto para crianças reagentes e não reagentes para IgG1 anti-Asc. Diferentemente, os níveis de TNF- α e IL-10 foram apenas significativamente mais elevados em crianças infectadas com este anticorpo no plasma. Não houve diferença para a produção de IL-6 nos grupos de estudo (Tabela 4).

Baixa frequência de crianças alérgicas infectadas por *G. lamblia* e positivos para IgG1 anti-Asc

A figura 1 representa a frequência da alergia em crianças alérgica e infectadas por *G. lamblia* com ou sem IgG1 anti-Asc, comparadas com não-infectadas. Foi significativamente menor frequência de alergia, 41% (18/44), em crianças infectadas quando anti-Asc IgG1 positivo do que IgG1 anti-Asc negativo 64% (30/47) (OR = 0,392; IC = ,168-0,914; p = . 0,02) (Fig 1A), mas não foi observada diferença estatística quando comparado com crianças sem infecção com IgG1 anti-Asc positiva 46% (11/24) (OR = 0,818; IC = 0,300-2,230; p = 0,69) (Fig. 1B). Não houve diferenças estatísticas na frequência de alergia em entre não infectado e IgG1 anti-Asc e negativo 46% (28/61) em relação ao grupo infectado por *G. lamblia* e IgG1 anti-Asc negativo 64% (30/47) (OR = 2,080; IC = 0,954-4,535; p = 0,06) (Fig 1C), bem como, e grupo não infectados IgG1 anti-Asc positivo 46% (11/24) (OR = 0,997; IC = 0,386-2,573; p = 0,99) (Fig. 1D).

Níveis elevados de TNF- α e IL-10 mas não de IL-6, em crianças alérgicas infectadas por *G. lamblia*, e reagentes para anticorpo IgG1anti-Asc

As citocinas TNF- α , IL-10 e IL-6 foram avaliadas em crianças infectadas alérgica ou não alérgica, quando separados de acordo com a presença ou ausência de IgG1 anti-Asc. Para os

grupos de IgG1 anti-*Ascaris* positivos, verificou-se níveis significativamente mais elevados de TNF- α e IL-10 em infectada e alérgica do que em crianças não-alérgicas. Nestas condições, não houve diferença entre os grupos não infectados alérgicas ou não-alérgicos (Tabela 5). Para os grupos de IgG1 anti-*Ascaris* negativos, não houve diferença estatística na produção de citocinas em alérgica ou não alérgica, tanto para crianças infectadas e não-infectadas. Similar nível de IL-6 foram detectados em todas as comparações.

DISCUSSÃO

A resposta imune induzida pela *G. lamblia* tem sido estudada nos últimos anos,⁸⁻¹¹ bem como, a inter-relação com a prevalência de alergias cutânea e das vias aéreas respiratórias, na presença ou não de infecções helmínticas.⁹⁻²² No presente estudo, crianças infectadas apenas por *G. lamblia* apresentaram um perfil de citocinas misto (Th1/Th2), que na presença de anticorpos IgG1 anti-*Ascaris* circulantes a produção de IL-10 e TNF- α foi ressaltada, e ao mesmo tempo, houve menor frequência de pacientes asmáticos.

O estudo contou com 211 crianças vivendo em baixa condição socioeconômica, na qual *G. lamblia* foi a infecção mais prevalente (54,5%) em crianças menores de 5 anos, como esperado dentro da variação da população brasileira.^{21,32} A baixa prevalência de infecções com geohelmintos, como *Ascaris lumbricoides*, pode ser devido à estratégia do Ministério da Saúde brasileiro em realizar tratamento em massa nas crianças de escolas públicas e comunidades carentes. Sendo assim, a população estudada não apresentou infecção helmíntica concomitante à *G. lamblia*, mas foi sensibilizada por antígenos de helmintos. Pôde ser observado que a infecção pelo protozoário foi acompanhada de níveis elevados de IgG1 anti-*Ascaris*, mas não de IgE e IgG4. Crianças infectadas com *G. lamblia* e alérgicas também apresentaram altos níveis de IgG1 anti-Asc em relação à aquelas apenas alérgicas. O isótipo IgG4 anti-Asc foi utilizando como marcador para infecções crônicas/reinfecções,²⁸ enquanto que os nossos resultados apontam a IgG1 anti-Asc como um marcador de contato prévio com o helminto. Nestas condições a análise da produção de citocinas e a presença de asma/rinite foram realizadas.

A análise dos níveis de citocinas mostrou que em crianças a *G. lamblia* levou a maior produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10. Realmente, estudos com animais ou humanos demonstraram a indução de um perfil misto de citocinas Th1/Th2,^{8,11,18} acompanhado de níveis aumentados de IL-6.^{33,34} Contudo, aqui, não houve produção elevada de IL-6. Esta

discordância, pode está relacionada aos estudos envolvendo adultos com sintomas de giardíases.^{33,34}

Estudos recentes demonstraram que a *G. lamblia* é capaz de causar eosinofilia^{16,17} e pode conter antígenos secretórios e excretorios com características semelhantes aos alérgenos¹⁸. Aqui, embora os indivíduos portadores do protozoário tivessem mais eosinófilos circulantes (Table 1; $p=0.03$) e estivessem numa faixa etária com maior relato de alergia (2-5 anos), em indivíduos alérgicos e parasitados o número de eosinófilos foi menor. Além disso, semelhante a outros estudos²⁰⁻²² a presença de asma/rinite, teste cutâneo de puntura imediata, bem como, os parâmetros laboratoriais IgE total, IgE anti-alérgeno não estiveram elevados na população infectada com *G. lamblia*. O perfil de citocinas nos pacientes infectados e alérgicos mostra que a produção de TNF- α foi relacionada com presença de asma/rinite, enquanto o aumento de IL-10 foi devido à infecção pelo protozoário. A presença de IL-10 durante a infecção por *G. lamblia* foi relacionada ao controle da resposta inflamatória¹¹ e pode está envolvida com o baixo número de eosinófilos.

Níveis mais elevados de TNF- α e IL-10 em pacientes infectados foi dependente da presença de IgG1 anti-Ascaris. Além disso, menor prevalência de relatos de alergia nos indivíduos infectados foi observada apenas naqueles com IgG1 anti-Asc (~4 vezes mais proteção. OR= 0.39) e nestes indivíduos as citocinas TNF- α e IL-10 estiveram também em níveis maiores. Apesar dos grupos de estudos pequenos para fornecer uma forte evidência, estes resultados apontam um importante papel do isótipo IgG1.

A relação entre os isótipos IgG, em particular o subtipo IgG1, e a modulação através de citocinas não está bem esclarecida. De modo geral, os anticorpos IgG podem levar à formação de imunocomplexos, em posterior contato com o antígeno, e induzir a explosão oxidativa e produção de citocinas pro-inflamatórias por macrófagos.^{35,36} Imunocomplexos podem aumentar significativamente a apresentação de antígenos por células dendríticas, via FC γ R, à células T específicas, causando amplificação da resposta inflamatória alérgica.³⁷ Então, é possível que a IgG anti-Asc amplifique a produção de TNF- α e, como efeito de feedback, para controlar a reação inflamatória a produção de IL-10 seja estimulada, a qual é melhorada pela presença da *G. lamblia*.^{11,34} Esta hipótese merece maior investigação, com ensaios *in vitro* para avaliar a secreção de citocinas pro-inflamatórias e de IL-10 na presença de IgG1 anti-Asc e antígenos da *G. lamblia*

Os nossos achados trazem à tona a importância de avaliar melhor os subtipos de IgG, em áreas endêmicas para *A. lumbricoides* e *G. lamblia*, pensando nas estratégias de prevenção ou dessensibilização das reações alérgicas.

Tabela 1. Análise univariada da associação entre alergias respiratória e dados demográficos, socioeconômicos, laboratoriais, história de alergia familiar e infecção por *Giardia lamblia* em crianças da área urbana no Nordeste do Brasil

	Alergia n(%) 92 (43.6)	Sem alergia n(%) 119 (56.4)	Total 211 (100)	OR (IC 95%)	p
Sexo					
Masc.	49 (48.0)	53 (52.0)	102 (48.3)	1.419 (0.822– 2.450)	0.132
Fem.	43 (39.4)	66 (60.6)	109 (51.7)		
Idade					
2 a 5	61 (49.6)	62 (50.4)	123 (58.3)	1.809 (1.031 – 3.175)	0.026*
>5 a 10	31 (35.2)	57 (64.8)	88 (41.7)		
Esc Materna[#]					
Educação I [§]	49 (38.6)	78 (61.4)	127 (61.6)	0.613 (0.347 – 1.080)	0.112
Educação II [§]	40 (50.6)	39 (49.4)	79 (38.4)		
Renda familiar[#]					
≤1 SM	77 (44.8)	95 (55.2)	172 (81.9)#	1.389 (0.673 – 2.867)	0.469
>1 SM	14 (36.8)	24 (63.2)	38 (18.1)#		
Tabagismo passivo[#]					
Sim	43 (52.4)	39 (47.6)	82 (39.6)#	1.768 (1.006 – 3.107)	0.062
Não	48 (38.4)	77 (61.6)	125 (60.4)#		
Alergia (Mãe)					
Sim	30 (65.2)	16 (34.8)	46 (21.8)	3.115 (1.572 – 6.171)	0.001*
Não	62 (37.6)	103 (62.4)	165 (78.2)		
Alergia (Pai)[#]					
Sim	16 (72.7)	6 (27.3)	22 (11.2)#	4.299 (1.603 – 11.528)	0.003*
Não	67 (38.3)	108 (61.7)	175 (88.8)#		
Alergia (irmão) #					
Sim	41 (57.7)	30 (42.3)	71 (35.7)#	2.355 (1.303 – 4.259)	0.005*
Não	47 (36.7)	81 (63.3)	128 (64.3)#		
<i>G. lamblia</i>					
Positivo	53 (46.1)	62 (53.9)	115 (54.5)	1.249 (0.722 – 2.161)	0.256
Negativo	39 (40.6)	57 (59.4)	96 (45.5)		
Eosinófilo	Valor Absoluto (min-max)	Valor Absoluto (min-max)			
<i>G. lamblia</i> (+)	248(40-967)	375(78-1232)**	-	-	0.001*
<i>G. lamblia</i> (-)	180(47-800)	233(50-800)	-	-	0.118
Neutrófilo					
<i>G. lamblia</i> (+)	3993(1960-6584)	3088(1600-7296)		-	0.386
<i>G. lamblia</i> (-)	3400(1084-7252)	3573(1880-6500)		-	0.305

#Informações perdidas (algumas pessoas não souberam informar). §Educação I: analfabeta até ensino fundamental completo; Educação II: Ensino médio incompleto ao ensino superior completo. *p<0.05 foi comparado entre crianças alérgicas e não -alérgica (qui quadrado e teste de Fisher). **p<0.05 foi comparado entre crianças infectada / não alérgica e crianças sem infecção / não-alérgica(Mann-Whitney).

Tabela 2 - Anticorpos IgG1, IgG4 e IgE anti-Asc em crianças alérgicas e infectadas por *G. lamblia*.

Anticorpo anti-Asc	Infectada por <i>G. lamblia</i>			Sem infecção		
	Alergia (n=48)	Sem-alergia (n=43)	<i>p</i>	Alergia (n=39)	Sem-alergia (n=46)	<i>p</i>
	(Min-Max)	(Min-Max)		(Min-Max)	(Min-Max)	
IgG1[#]	0.034**	0.086***	0.04*	0.01	0.026	0.36
	0-0.31	0-0.47		0-0.45	0-0.374	
IgG4[#]	0.006	0.002	0.17	0.0	0.002	0.48
	0-2.67	0-1.42		0-1.94	0-2.54	
IgE[§]	0.13	0.15	0.57	0.07	0.10	0.76
	0-50.1	0-67.1		0-21.3	0-18.6	

Mediana dos níveis da DO de IgG1e IgG4 no soro foi mensurado por ELISA.

§ Mediana da concentração de IgE (kUA/L) mensurado por ImmunoCAP * $p < 0.05$ foi comparado entre alérgico e não alérgico. ** $p < 0.05$. *** $p < 0.05$ foi comparado em crianças não alérgica infectada e sem infecção. 16,6% (35/211) das crianças que ingressaram no estudo não coletaram o sangue para realização das pesquisas imunológicas

Tabela 3 - Níveis de Citocinas em crianças alérgicas e infectadas por *G. lamblia*

Citocinas [#]	Infectada por <i>G. lamblia</i>			Sem infecção		
	Alergia (n=22) (Min-Max)	S/-alergia (n=15) (Min-Max)	<i>p</i>	Allergia (n=25) (Min-Max)	S/-alergia (n=25) (Min-Max)	<i>P</i>
IL-6	49.29 (9.47-1538)	34.80 (8.84-211.8)	0.458	80.54 (0-520.5)	43.78 (0-638.5)	0.386
TNF-α	14.48 (6.43-57.7)	8.26** (5.1-29.34)	0.030*	10.94 (0-56.97)	4.54 (0-32.38)	0.028*
IL-10	6.48 (5.48-9,10)	5.95** (5.27-8.60)	0.009*	0.0 (0-16.17)	0.0 (0-7.08)	0.397
IL-2	6.19 (5.66-6.76)	6.28** (5.08-6.76)	0.975	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	-
IL-4	4.96 (0-5.31)	5.08** (0-5.43)	0.891	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	-
IFN-γ	4.12 (3.67)	4.06** (6.91)	0.619	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	-

Foi realizado uma sub-amostra da população de estudo onde foi calculada a mediana de citocinas (pg/mL) no sobrenadante da cultura do sangue periférico sob estímulo com PHA, mensurado por CBA. * $p < 0.05$ foi comparado crianças alérgicas e não alérgicas. ** $p < 0.05$ foi comparado crianças infectadas e não infectada sem alergia.

Tabela 4 - Produção de citocinas em crianças infectadas por *G. lamblia* e IgG1 anti Asc (+)

Citocinas [#]	IgG1anti-Asc (+)			IgG1anti-Ascaris (-)		
	G (n=17) (Min-Max)	SG(n=13) (Min-Max)	<i>p</i>	G (n=20) (Min-Max)	SG (n=46) (Min-Max)	<i>P</i>
IL-6	68.77	38.41	0.769	32.08	46.19	0.516
	8.84-1538	2.57-343.5		9.47-427.1	0-638.5	
TNF-α	13.96	4.06	0.010*	10.90	8.23	0.126
	5.27-29.34	0-31.04		5.12-57.7	0-56.97	
IL-10	6.35	0.0	0.0001*	6.12	8.23	0.277
	5.27-8.60	0-7.08		5.58-9.10	0-56.97	
IL-2	6.16	0.0	0.0001	6.31	0.0	0.0001
	5.93-6.45	0-0		5.66-6.76	0-0	
IL-4	0.0	0.0	0.0001	5.02	0.0	0.0001
	0-5.31	0-0		0-5.43	0-0	
IFN-γ	4.12	0.0	0.0001	4.0	0,0	0.0001
	3.67-8.12	0-0		3.7-6.91	0-0	

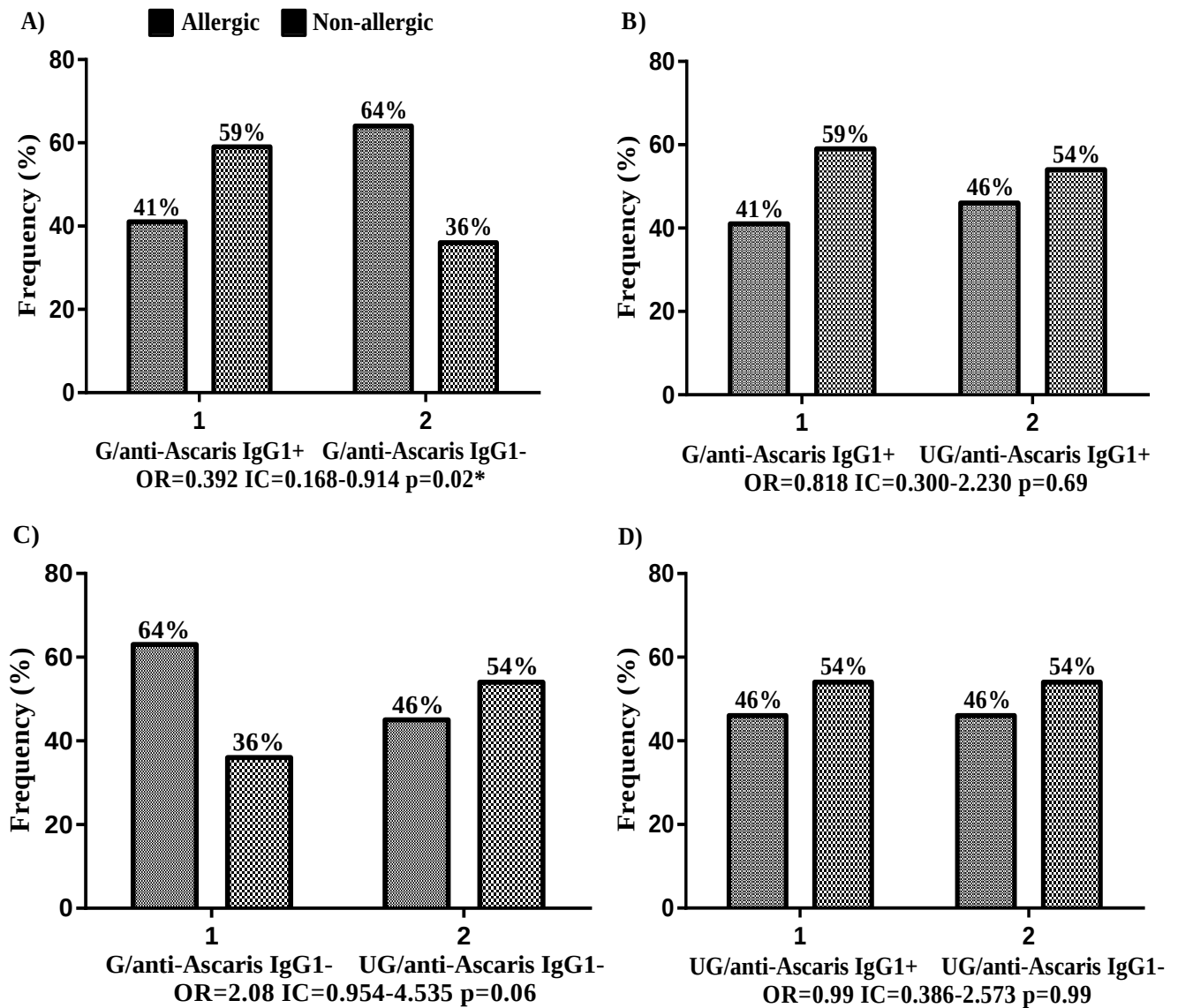
#Mediana de citocinas (pg/ml) no sobrenadante da cultura do sangue periférico sob estímulo PHA, mensurado por CBA. * $p < 0.05$ foi comparado crianças infectadas por *G. lamblia* e sem infecção.

Tabela 5 - Níveis de Citocinas em crianças infectadas por *G. lamblia*, e IgG1 anti-Ascaris positivo e crianças alérgicas

Citocina [#]	IgG1anti-Asc(+)					
	infectada por <i>G. lamblia</i>			Sem infecção		
	Alergia (n=7) (Min-Max)	Sem-alergia (n=10) (Min-Max)	<i>p</i>	Alergia (n=4) (Min.-Max)	Sem-alergia (n=9) (Min.-Max)	<i>p</i>
IL-6	61.37 (13.71-1538)	83.30 (8.84-211.8)	0.6691	126.6 (38.41-342.5)	34.17 (2.57-249.5)	0.1063
TNF-α	21.64 (12.42-26.58)	7.72 (5.27-29.34)	0.04*	10.07 (0-31.04)	3.97 (0-15.40)	0.2339
IL-10	6.61 (6.3-7.1)	5.85 (5.27-8.6)	0.04*	0.0 (0-0)	0.0 (0-7.08)	0.6171
Citocina [#]	IgG1anti-Asc(-)					
	Infectada por <i>G. lamblia</i>			Sem infecção		
	Alergia (n=15) (Min-Max)	Sem-alergia (n=5) (Min-Max)	<i>p</i>	Alergia (n=21) (Min-Max)	Sem-alergi (n=25) (Min-Max)	<i>P</i>
IL-6	45.3 (9.47-427.1)	29.36 (21.28-42.84)	0.4578	77.91 (0-520.5)	45.95 (0-638.5)	0.8427
TNF-α	10.75 (6.43-57.72)	11.05 (5.12-19.62)	0.4068	10.94 (0-56.97)	6.07 (0-32.38)	0.1002
IL-10	6.15 (5.31-9.1)	5.95 (5.58-6.3)	0.1886	0.0 (0-16.17)	0.0 (0-0)	0.1263

#Mediana de citocinas (pg/mL) no sobrenadante da cultura do sangue periférico sob estímulo PHA; mensurado por CBA. **p* <0.05 foi comparado crianças alérgicas e não alérgicas.

Figure 1. Frequência de Alergia em crianças infectadas por *G. lamblia* (G) ou sem infecção (UG) com anticorpo IgG1 anti-Asc positivo e negativo (A e D), bem como, IgG1 anti-*Ascaris* positivo ou negativo para ambos infectados e sem infecção (B e C).



Teste qui-quadrado foi usado para comparar as frequências. *p<0.05 para OR (odds ration) e IC-95% (intervalo confiança).

REFERENCIAS

1. World Health Organization (WHO) guidelines for drinking water quality launched in 2004. Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3/en/
2. Savioli L, Smith T, Thompson A. Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. Trends Parasitol. 2006; 22:203-08.
3. Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite Giardia. Crit Rev Microbiol. 2002; 28:123-47.
4. Thompson R. Giardiasis as a reemerging infectious disease and its zoonotic potential. Int J Parasitol. 2000; 30:1259-67.
5. Rossignol JF. Cryptosporidium and Giardia: Treatment options and prospects for new drugs. Exp. Parasitol. 2010; 124:45-53.
6. Hanevik K, Dizdar V, Langeland N, Hausken T. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. BMC Gastroenterol. 2009; 21:9-27.
7. Smith P. Pathophysiology and Immunology of Giardiasis. Ann. Rev. 1985; 36:295-307.
8. Abdul-Wahid A, Faubert G. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. International Journal for Parasitology. 2008; 38:691-703.
9. Singer SM, Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. Infect. Immun. 2000; 68:70-75.
10. Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. Infect. Immun. 2002; 70:11-8.

11. Long KZ, Rosado JL, Santos JI, Haas M, Mamun AI, Dupont HL, et al. Associations between Mucosal Innate and Adaptive Immune Responses and Resolution of Diarrheal Pathogen Infections. *Infection and Immunity*. 2010; 78:1221-8.
12. Von Mutius E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:525-32.
13. Royer PJ, Emara M, Yang C, Al-Ghouleh A, Tighe P, Jones N, et al. The Mannose Receptor Mediates the Uptake of Diverse Native Allergens by Dendritic Cells and Determines Allergen-Induced T Cell Polarization through Modulation of IDO. Activity. *J Immunol*. 2010;185:1522-31.
14. Hardin JA, Buret AG, Olson ME, Kimm MH, Gall DG. Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. *J. Parasitol*. 1997;83:908-12.
15. Di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, Barrios RM, Alvarez N, López R. Possible relationship between allergic disease and infection by *Giardia lamblia*. *Ann Allergy*. 1993;70:210-3.
16. Singer C, Stancu P, Coşoveanu S, Botu A, Cristea C, Baciuc D. Study on the Frequency and Values of Sanguine Eosinophilia in Children Admitted with Parasitary Diseases. *Current Health Sciences Journal*. 2013;39:93-6.
17. Soriano JM, Domènech G, Martínez MC, Mañes J, Soriano F. Intestinal parasitic infections in hosted Saharawi children. *Tropical Biomedicine*. 2011; 28:557-562.
18. Jiménez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-Cas E, Capron M. Systemic and Mucosal Responses to Oral Administration of Excretory and Secretory Antigens from *Giardia intestinalis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004; 11:152-160.
19. Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R. Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. *Acta Trop*. 2005; 95:116-22.

20. Di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, Jimenez JC, Rojas R, Gil M, et al. Association between giardiasis and allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1998; 81:261-65.
21. Giacometti A, Cirioni O, Antonicelli L, D'Amato G, Silvestric C, Del Prete MS, et al. Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. *J. Parasitol.* 2003; 89:490-92.
22. Souza VMO, Sales IRS, Peixoto DM, Costa VMA, Rizzo JÁ, Silva AR, et al. *Giardia lamblia* and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a high incidence of protozoan infections. *J Pediatr (Rio J).* 2012; 88:233-8.
23. Hagel I, Cabrera M, Hurtado MA, Sanchez P, Puccio F, Di Prisco MC, et al. Infection by *Ascaris lumbricoides* and bronchial hyperreactivity: An outstanding association in Venezuelan school children from endemic areas. *Acta Tropica.* 2007;103: 231-41.
24. Pereira MU, Pitrez PM, Jones MH, Escouto D, Dias ACO, Weiland S K, et al. Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J.* 2007; 29:1154-60.
25. Arruda LK, Santos AB. Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005; 5: 399-402.
26. Takeuchi H, Zaman K, Takahashi J, Yunus M, Chowdhury HR, Arifeen SE. High titre of anti-*Ascaris* immunoglobulin E associated with bronchial asthma symptoms in 5-year-old rural Bangladeshi children. *Clin Exp Allergy.* 2008; 38:276-82.
27. Levin ME, Le Souef PN, Motala C. Total IgE in urban Black South African teenagers: the influence of atopy and helminth infection. *Pediatr Allergy Immunol.* 2008; 19:449-54.
28. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:995-1000

29. Karadag B, Ege M, Bradley JE, Braun-Fahrlander C, Riedler J, Nowak D et al The role of parasitic infections in atopic diseases in rural schoolchildren. *Allergy*. 2006; 61: 996-1001.
30. Sarinho ES, Medeiros D, Silva A, Rizzo JA. Specific IgE Anti-Ascaris in Brazilian Children and Adolescents. *World Allergy Organ J*. 2010; 3:53-6.
31. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998; 351:1225-32.
32. Santos CKS, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, et al Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012; 106: 473-79.
33. Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemon H. IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with *Giardia intestinalis*. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009; 47:93-7.
34. Boef AGC, May L, van Bodegom D, van Lieshout L, Verweij JJ, Maier AB, et al. Parasitic infections and immune function: Effect of helminth infections in a malaria endemic area. *Immunobiology* 2013; 218:706-11.
35. Gómez-Guerrero C, López-Armada MJ, González E, Egido J. Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF- α and IL-6, and proliferation. *J. Immunol*. 1994; 153:5247-55.
36. Franchini AM, Hunt D, Melendez JA, Drake JR. Fc γ R-driven Release of IL-6 by Macrophages Requires NOX2-dependent Production of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288:25098-108.
37. Hartwig C, Mazzega M, Constabel H, Krishnaswamy JK, Gessner JE, Braun A, et al. Fc γ receptor-mediated antigen uptake by lung DC contributes to allergic airway hyper-responsiveness and inflammation. *Eur. J. Immunol*. 2010; 40:1284-95.

5.2 Produção de IL-4, IFN- γ e IL-17 em crianças com infecção por *G.lamblia* e alergias respiratórias da área urbana do Nordeste Brasileiro

INTRODUÇÃO

É bem conhecido que as alergias de vias respiratórias são classicamente mediadas por imunidade tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, eosinofilia, ativação de mastócitos e altos níveis de IgE)(von MUTIUS 2002). Contudo, a presença de IL-4, IL-5 e IL-13 pode ser acompanhada de citocinas pró-inflamatórias IL-8, IL-6, TNF- α , IL-18, IL-12 (Wong *et al.* 2001; Matsunaga *et al.* 2006), sendo a predominância de IL-1 β , neutrófilos e IL-17 considerada como asma não-alérgica ou não-clássica (Oboki *et al.* 2008; Raedler *et al.* 2015). *Giardia lamblia* é um protozoário que alberga o intestino delgado, podendo alterar a absorção de alérgenos (Hanevik *et al.* 1985; Hardin *et al.* 1997). Devido a isto, a inter-relação da infecção pela *G. lamblia* e as alergias tem sido estudada (Di Prisco *et al.* 1998; Giacometti *et al.* 2003; Bayraktar *et al.*, 2005; Souza *et al.* 2012) e o perfil de citocinas do hospedeiro alérgico ainda não está esclarecido.

Antígenos secretórios e excretorios do protozoário apresentam características semelhantes aos alérgenos e desviam resposta para um perfil Th2 (Jiménez *et al.* 2004) Contudo, diferentes estudos, em crianças infectadas pela *G. lamblia*, sugerem um perfil de resposta imune misto Th2/Th1: eosinofilia, níveis elevados de IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α e rsIL-2 (Ebert. 1999; Singer & Nash 2000; Abdul-Wahid & Faubert 2008; Long *et al.* 2010; Soriano *et al.* 2011; Singer *et al.* 2013). Além disso, citocinas pro-inflamatória IL-1 β , IL-6 e IL-8 estiveram elevadas apenas em pacientes que tiveram alergia associada à presença de *Giardia lamblia* (Bayraktar *et al.* 2005).

Neste estudo, foi investigada a produção das citocinas IL-4(Th2), IFN- γ (Th1) e a citocina pró-inflamatória IL-17(Th17) em crianças parasitadas por *Giardia lamblia* e com alergias das vias respiratórias (asma e/ou rinite).

METODOLOGIA

Este estudo foi realizado em áreas de baixo nível socioeconômico da cidade de Recife e Itamaracá, em Pernambuco, Brasil, onde foi observada uma alta prevalência de infecção por *G. lamblia*. Todos os pais ou responsáveis pelas crianças (com idade entre 2 a 10 anos), depois de fornecer consentimento por escrito para participar do estudo, foram questionados sobre sintomas de asma/rinite através do questionário do Estudo Internacional de Asma e

Alergias na Infância (ISAAC 98; Dalkan et al. 2014). Dados clínicos e seriado de fezes (em dias alternados pelos métodos de Hoffman e Faust) foram coletados entre abril de 2012 até agosto de 2014. Este foi um estudo transversal, com cinquenta e cinco crianças selecionadas depois de terem cumprido as condições clínicas e parasitológicas, foi estabelecido os seguintes grupos: crianças infectadas por *G. lamblia* (G, n=10); crianças asma/rinite e infectadas por *G. lamblia* (GA, n=17); crianças asma/rinite (A, n=18); e o grupo controle (crianças não infectadas e não- asma/rinite (NG + NA, n=10). Pacientes infectados com helmintos ou outros protozoários foram excluídos. Sangue periférico total (500 mL) foi cultivado em tubos de polipropileno (Falcon BD - 352.059) em meio RPMI 1640 (Sigma) foi adicionado 5% de soro fetal bovino fetal sobre a estimulação mitogénio (Phytohaemagglutinin; 10 ug / ml) durante 24 horas. Dupla marcação foi realizada em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) (1×10^6) de cada uma das crianças após a incubação com os anticorpos monoclonais conjugado a fluorocromo: anti-CD4 PerCP-Cy5.5 mais anti-IFN- γ FITC, anti-IL-17A PE ou anti-IL-4 APC (Human Th1/Th2/Th17 fenotipagem de cocktail, BD Pharmingen -. 560.751), durante 30 min, à temperatura ambiente. Depois da lavagem, as PBMC foram analisadas num citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD-Pharmingen, San Diego, CA, EUA) coletando 10.000 eventos. A frequência de células duplo-positivas foram analisados utilizando o programa Cell Quest na região de linfócitos, determinada utilizando granularidade (SSC) e tamanho do fluxo (FSC) . Limites para os marcadores do quadrante foram definidos com base em populações negativas. A Media da intensidade de fluorescência (em linfócitos CD4 +) foram expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre grupos foram avaliadas por meio do teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney pós-teste. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (01486912.5.0000.5208).

RESULTADOS

Não houve diferença em relação à idade ($4,5 \pm 0,36$ anos) e sexo entre os grupos. Houve frequência mais baixa de células IFN- γ +/CD4+(Figura 1A) e IL-17+/CD4+ (Figura 1B) em crianças infectadas e alérgicas (GA) quando comparado com o grupo de controle (NG + NA). A Figura 1B mostra que a frequência de células CD4+ produtoras de IL-17 foi significativamente inferior em crianças somente infectadas (G). Não havia nenhuma diferença na frequência nos níveis de células IL-4+/CD4+ entre os grupos. A Figura 2 mostra a intensidade de fluorescência dentro das células CD4+, a qual foi maior para o IFN- γ (Figura 2A) em ambos os grupos de crianças infectadas e alérgicas

DISCUSSÃO

A hipótese de higiene aponta menor prevalência das alergias das vias aéreas e sintomas amenizados em países em desenvolvimento, onde as infecções helmintos e protozoários se apresentam em infecções concorrentes, devido a uma rede de interações celulares mediadas por citocinas em respostas a estes parasitas (Finlay *et al* 2014). No nosso estudo, indivíduos infectados pela *G. lamblia* junto com asma/rinite não tiveram alterados a produção de IL-4, porém houve menor produção de IL-17 e IFN- γ .

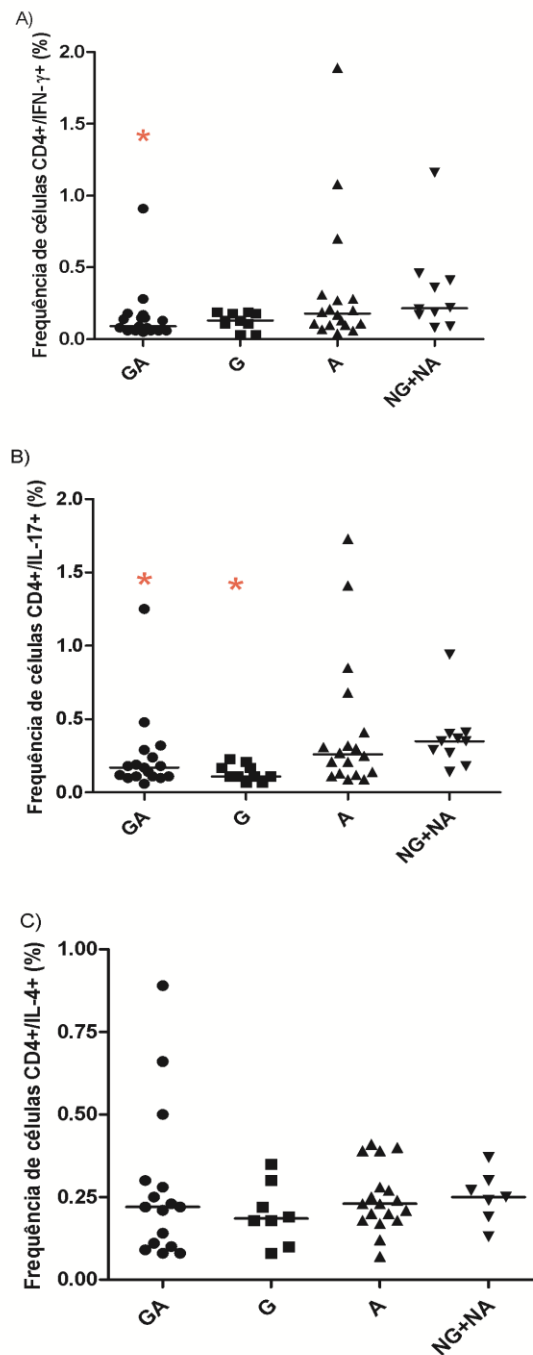
Houve diminuição de IFN- γ nas crianças com asma e/ou rinite. Os resultados referentes à quantidade, não apenas a presença, desta citocina dentro dos linfócitos T (figura 2A) aponta uma necessidade conjunta da infecção para menor produção de IFN- γ no paciente com a alergia das vias aéreas. Realmente, pôde ser notada mais IFN- γ em crianças com asma e/ou rinite, separadamente. O IFN- γ é a citocina efetora que marca a resposta Th1, a qual tem efeito antagônico/inibidor ao perfil Th2, indutor da resposta alérgica nos quadros de asma/rinite (Finlay *et al* 2014), porém os níveis de IL-4 foram semelhantes entre os grupos. Desta forma, os dados sugerem uma predominância da IL-4 em relação aos baixos níveis de IFN- γ , que confirma a predominância de resposta Th2 nos pacientes infectados com asma e/ou rinite.

Contudo, a diminuição da citocina IL-17 sugere uma proteção nos indivíduos infectados e alérgicos. Os níveis de IL-17 foram associados à forma grave da doença e ao perfil de asma não-clássica /neutrofílica (Barczyk, 2003; Oboki *et al.* 2008; Raedler *et al.*, 2015). Sob a ação da IL-17, houve estimulação de IL-6, IL-8, IL-11, quimiocinas pró-inflamatórias e produção de proteínas do muco por diferentes células dos brônquios (fibroblastos, células epiteliais e de musculatura lisa) (Oboki *et al.* 2008). Estes mediadores contribuem também para amplificação do perfil de asma clássica/eosinofílica. Neste estudo, não houve diferença no número de eosinófilos e neutrófilos no sangue periférico entre os pacientes (dados não mostrados). Sendo assim, a menor ação da IL-17 pode refletir melhora no quadro clínico de ambos os tipos de asma. Apesar disto, estamos cientes da necessidade de acompanhamento dos pacientes e da dosagem de outros fatores imunológicos, a fim de avaliar a gravidade da asma/rinite.

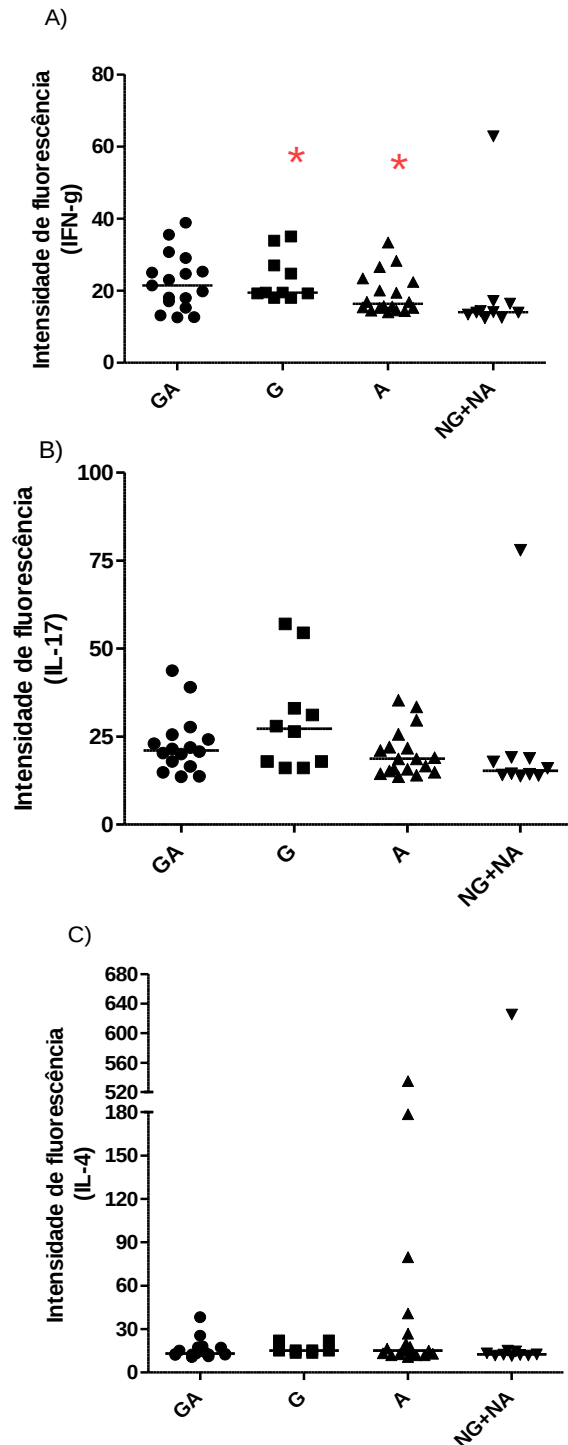
Um perfil misto Th1/Th2 vem sendo relatado nas infecções pela *G. lamblia* (Singer *et al.*, 2000). A produção de IL-17 tem sido detectada em estudos experimentais animais (Grit *et*

al, 2001, Solaymani-Mohammadi & Singer, 2011; Dreesen et al, 2014), enquanto que os estudos em humanos são escassos (Boef *et al*, 2013). No nosso estudo, foi observado o perfil misto, presença de IL-4 e maior quantidade de IFN- γ , acompanhado de menor produção de IL-17 nos pacientes apenas infectados com o protozoário.

Em conjunto, os achados encontrados apontam um perfil predominante Th2, porém com um menor potencial inflamatório em indivíduos alérgicos e infectados e refletem a importância de mais estudos envolvendo os mecanismos imunomodulatórios durante a infecção com *G. lamblia*.

Figure 1-Frequência de células produtoras de citocinas intracelulares

Frequência de células do sangue periférico produtoras de IFN- γ + /CD4+(A), IL-17- γ + /CD4+(B) and IL-4 γ + /CD4+(C) de crianças infectadas por *G. lamblia* (G), infectadas por *G. lamblia*-e asmáticas e/ou rinites (GA), somente asmáticas e/ou rinite (A) e não infectada / não alérgica (NG+NA).As células foram marcadas com Anticorpo monoclonal APC anti-CD4 PerCP-Cy5.5 mais anti-IFN- γ FITC, anti-IL-17 PE ou anti-IL-4 e analisado por citometria de fluxo. Os resultados correspondem a percentagem de células duplamente marcadas positivo *p < 0.05 comparado com o grupo NG+NA

Figure 2- Intensidade de fluorescência citocinas intracelulares

Intensidade de fluorescência para IFN-γ (A), IL-17 (B) e IL-4 (C) em células CD4 +do sangue periférico de criança infectada por *G. lamblia* (G).criança infectada por *G. lamblia* e asmática e / ou rinite (GA), criança somente asmático e / ou rinite (A) e criança não-infectada e não-alérgico (NG + NA). As células foram marcadas com anticorpos monoclonais APC anti-CD4 PerCP-Cy5.5 mais anti-IFN-γ FITC, anti-IL-17 PE ou anti-IL-4 e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados correspondem à média ± SEM * p <0,05 em comparação com o grupo NG + NA

REFERENCIAS

- Abdul-Wahid A, Faubert G (2008) Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. *International Journal for Parasitology* **38**, 691-703.
- Barczyk A, Pierzchala W, Sozański E (2003) Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respiratory Medicine* **97**, 726-733.
- Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R (2005) Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. *Acta Tropica* **95**, 116-122.
- Boef AG, May L, van Bodegom D, et al. (2013) Parasitic infections and immune function: effect of helminth infections in a malaria endemic area. *Immunobiology* **218**, 706-711.
- Di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, et al. (1998) Association between giardiasis and allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **81**, 261-265.
- Dreesen L, De Bosscher K, Grit G, et al. (2014) *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective IL-17A response and induction of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *Infection and Immunity* **82**, 3333-3340.
- Ebert EC (1999) *Giardia* induces proliferation and interferon gamma production by intestinal lymphocytes. *Gut* **44**, 342-346.
- Finlay CM, Walsh KP, Mills KHG (2014) Induction of regulatory cells by helminth Parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunological Reviews* **259**, 206-230.
- Giacometti A, Cirioni O, Antonicelli L, et al. (2003) Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. *Journal of Parasitology* **89**, 490-492.

Grit GH, Geurden T, Dreesen L, et al. (2014) Evaluation of cellular and humoral systemic immune response against *Giardia duodenalis* infection in cattle. *Veterinary Parasitology* **202**, 145-155.

Hanevik K, Dizdar V, Langeland et al. (2009) Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterology* **21**, 9-27.

Hardin JA, Buret AG, Olson ME, et al. (1997) Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. *Journal of Parasitology* **83**, 908-912.

ISAAC (1998) Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* **351**, 1225-1232.

Jiménez JC, Fontaine J, Grzych JM, et al. (2004) Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **11**, 152-60.

Long KZ, Rosado JL, Santos JJ, et al. (2010) Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infection and Immunity* **78**, 1221-1228.

Matsunaga K, Yanagisawa S, Ichikawa T, et al. (2006) Airway cytokine expression measured by means of protein array in exhaled breath condensate: correlation with physiologic properties in asthmatic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **118**, 84-90.

Oboki K, Ohno T, Saito H, et al. (2008) Th17 and Allergy. *Allergology International* **57**, 121-134.

Raedler D, Ballenberger N, Klucker E, et al. (2015) Identification of novel immune phenotypes for allergic and nonallergic childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **135**, 81-91.

Singer C, Stancu P, Coşoveanu S, et al. (2013) Study on the frequency and values of sanguine eosinophilia in children admitted with parasitary Diseases. *Current Health Sciences Journal* **39**, 93-96.

Singer SM, Nash TE (2000) T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. *Infection and Immunity* **68**, 70-75.

Solaymani-Mohammadi S, Singer SM (2011) Host immunity and pathogen strain contribute to intestinal disaccharidase impairment following gut infection. *The Journal of Immunology* **187**, 3769-3775.

Soriano JM, Domènech G, Martínez MC (2011) Intestinal parasitic infections in hosted Saharawi children. *Tropical Biomedicine* **28**, 557-562.

Souza VMO, Sales IRS, Peixoto DM, et al. (2012) *Giardia lamblia* and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a high incidence of protozoan infections. *Jornal de Pediatria (Rio J)* **88**, 233-238.

Von Mutius E. (2002) Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *Jornal of Allergy and Clinical Immunology* **109**; 525-32

Wong CK, Ho CY, Ko FWS, et al. (2001) Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical & Experimental Immunology* **125**, 177-183.

6 CONCLUSÃO

1. A infecção por *G. lamblia* não alterou a frequência de asma/rinite, os testes cutâneos imediatos, e os parâmetros laboratoriais de IgE total e anti-IgE alérgeno, porém houve menor número de eosinófilos circulante e menor produção de IL-17 em indivíduos com asma/rinite e parasitados.
2. As crianças infectadas apenas por *G. lamblia* apresentaram um perfil de citocinas misto do tipo Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α) e tipo Th2 (IL-4, IL-10), com maior do numero de eosinófilo, acompanhado de menor produção de IL-17.
3. A infecção pelo protozoário foi acompanhado pelo aumento nos níveis IgG1 de anti-Ascaris, mas não de IgE e IgG4. Na presença dos anticorpos anti-IgG1 anti-Ascaris circulantes, a produção de IL-10 e TNF- α foi aumentada e houve um risco de proteção das alergias das vias respiratórias.

Os achados encontrados apontam um menor potencial inflamatório em indivíduos alérgicos e infectados com *G. lamblia* devido à maior produção de IL-10, menor produção de IL-17 e menor número de eosinófilos circulantes. Além disso, os resultados ressaltam a importância da IgG1 anti-Asc como fator de proteção das doenças alérgicas das vias respiratórias no indivíduos infectados. Estes resultados refletem a importancia de mais estudos envolvendo mecanismos imunomodulatórios durante a infecção com este protozoário.

REFERÊNCIAS

- ABBAS A, LICHTMAN A, PILLAI S *Imunologia Celular e Molecular* 7a Ed. 2012.
- ABDUL-WAHID, A.; FAUBERT, G. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis *Int. J Parasitology*: 38(6): 691-703. 2008.
- ALCÂNTARA-NEVES N, BADARO SJ, SANTOS MCA, CARVALHO LP, BARRETO ML. The presence of serum anti-*Ascaris lumbricoides* IgE antibodies and *Trichuris trichiura* infection are risk factors for wheezing and / or atopy in preschool-age Brazilian children. *Respir Res* 2010 Aug 23; 11:114.
- AMIN K, LUDVIKSDOTTIR D, JANSON C . Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000 (162):2295-2301.
- AMORIM RMR, SILVA DAO, TAKETOMI EA, MORATO MGVA, MUNDIM MJS, RIBEIRO DP, et al. *Giardia duodenalis*: Kinetics of cyst elimination and the systemic humoral and intestinal secretory immune responses in gerbils (*Meriones unguiculatus*) experimentally infected *Experimental Parasitology* 2010 125: 297–303.
- ASHER, MI. Recent perspectives on global epidemiology of asthma in childhood. *Allergol Immunopathol, Madri*, 2010 v. 38 (2): 83-87.
- ASHER MI, MONTEFORT S, BJÖRKSTEN B, LAI CKW, STACHAN DP, WERLAND SK, et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC phases one and three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*. 2006 (368): 733–743.
- BAYRAKTAR MR, MEHMET N, DURMAZ R. Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. *Acta Trop.* 2005 (95):116–22.
- BIENZ M, DAI WJ, WELLE M, GOTTSTEIN B, MÜLLER N. Inter-leukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Giardia lamblia* infection but exhibit normal intestinal immunoglobulin A responses against the parasite. *Infect Immun.* 2003 Mar; 71 (3):1569-73.

BORGES WF, MARCIANO FM, OLIVEIRA HB Parasitos Intestinais: elevada prevalência de Giardia lamblia em pacientes atendidos pelo serviço público de saúde da região sudeste de Goiás, Brasil Revista de Patologia Tropical 2011 abr-jun Vol. 40 (2): 149-157.

BOUSQUET J, VAN CAUWENBERGE P, KHALTAEV N, ARIA Workshop Group; World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. J Allergy Clin Immunol. 2001;108(5 Suppl):S147-S334. [[Links](#)]

BRAGAGNOLI G, SILVA MTN. Ascaris lumbricoides infection and parasite load are associated with asthma in children. J Infect Dev Ctries 2014; 8(7):891-897.

CARVALHO-COSTA FA; GONÇALVES AQ, LASSANCE SL, DA SILVA NETO LM; SALMAZO CAA, BÓIA MN Giardia lamblia and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon 2007 Rev. Inst. Med. Trop. SP vol.49 no.3 São Paulo May/June.

CHEN TL, CHEN S, WU HW, LEE TC, LU YZ , WU LL, et al. Persistent gut barrier damage and commensal bacterial influx following eradication of Giardia infection in mice. Gut Pathogens 2013, 5:26.

CHIANG WC, CHEN YC, TAN HTT, BALAKRISHNAN A, LIEW WL, LIM HH, et al. Allergic Rhinitis and Non-Allergic Rhinitis in Children in the Tropics: Prevalence and Risk Associations Pediatric Pulmonology 2012 47:1026–1033.

CIPRANDI G, FILACI G, BATTAGLIA F, FENOGLIO D. Peripheral Th-17 cells in allergic rhinitis: New evidence Inter-national Immunopharmacology 2010 (10): 226–229.

COOPER PJ: Intestinal worms and human allergy. Parasite immunol 2004, 26:455-67.

COOPER PJ, BARRETO ML, RODRIGUES LC Human allergy and geohelminth infections: a review of the literature and a proposed conceptual model to guide the investigation of possible causal associations British Medical Bulletin 2006; 79 - 80: 203–218

COOPER PJ, CHICO ME, VACA MG, MONCAYO AL, BLAND JM, MAFLA E, et al Effect of albendazole treatments on the prevalence of atopy in children living in communities endemic for geohelminth parasites: a cluster-randomised trial Lancet 2006; 367: 1598–603.

COOPER PJ, VACA MG, RODRIGUEZ A, CHICO ME, SANTOS DN, RODRIGUES LC, et al. Hygiene, atopy and wheeze–eczema–rhinitis symptoms in schoolchildren from urban and rural Ecuador. Thorax. Mar 2014; 69(3): 232–239.

DALKAN C, GALIP N, TEKGUC H, COBANOGLU N, BAHCECILER N. High prevalence of allergy in North Cypriot children . Paediatrics and Inter-national Child Health 2014 vol. 34 (1)

DE CARLI GA Parasitologia Clínica Ed. Atheneu, 2001: 52-59.

DE CARVALHO T, DAVID E, CORADI S, GUIMARAES S. Protease activity in extracellular products secreted in vitro by trophozoites of *Giardia duodenalis*. Parasitol Res. 2008;104:185-90.

DI PRISCO MC, HAGEL I, LYNCH NR, BARRIOS RM, ALVAREZ N, LÓPEZ R. Possible relationship between allergic disease and infection by *Giardia lamblia*. Ann Allergy.1993 (70): 210-3.

DI PRISCO MC, HAGEL I, LYNCH NR, JIMENEZ BSC, ROJAS R, GIL M. Association between giardiasis and allergy. Ann. Allergy. Asthma Immunol.1998 (81):.261–65.

DOGANCI A; SAUER K; KARWOT R; FINOTTO,S. Pathological Role of IL-6 in the Experimental Allergic Bronchial Asthma in Mice. Clinical Reviews in Allergy and Immunology, 2005 Jun; 28(3):257-70.

DREESEN L, DE BOSSCHER K, GRIT G, STAELS B, LUBBERTS E, BAUGE E, GELDHOF P *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective IL-17A response and induction of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. Infect. Immun 27 May 2014.

EKBÄCK M, TEDNER M, DEVENNEY I, OLDAEUS G, NORRMAN G, STRÖMBERG L, FÄLTH-MAGNUSSON K. Severe Eczema in Infancy Can Predict Asthma Development. A Prospective Study to the Age of 10 Years Plos/one 2014,june 10.

ELIA CCS. SOUZA HSP Imunologia da Mucosa Intestinal Ed Atheneu 2001pag 137-140.

FALLON, PG, MANGAN NE. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. Nature. 2007(7): 220-230.

FARTHING M.JG. Immunopathology of Giardiasis. Springer Semin Immunopathology 1990 (12): 269-282

FARTHING MJG. Host-Parasite Inter-action in Human Giardiasis. Quarterly Journal of Medicine, New Series 1989 70 (263): 191-204.

FAUBERT G, Immune Response to *Giardia duodenalis*. Clin Microbiol 2000 January; 13 (1): 35-54.

FIGUEIREDO CA, BARRETO ML, RODRIGUES LC, COOPER PJ, SILVA NB, AMORIM LD, et al. Chronic Intestinal Helminth Infections Are Associated with Immune Hyporesponsiveness and Induction of a Regulatory Network Infection and Immunity, July 2010, p. 3160–3167.

FONSECA, JÁ, BOTELHO. Asma grave: definição. Rev Bras. Alergia e Imunopatologia 2006 29 (2):70-76.

GELFER S, SCHARF J, ZONIS S, MERTZBACH D. Acute uveitis associated with Giardia lamblia infection. Harefuah.1984 (107): 75–6.

GIACOMETTI A, CIRIONI O, ANTONICELLI L, D'AMATO G, SILVESTRIC C, DEL PRETE MS et al. Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. J. Parasitol. 2003 (89): 490–92.

GONÇALVES ALR, BELIZÁRIO TL, PIMENTEL JB, PENATTI MPA, PEDROSO RS. Prevalence of intestinal parasites in preschool children in the region of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil Rev Soc Bras Med Trop. 2011 Mar-Apr;44(2):191-3.

GRITG H, DEVRIENDT B, VAN COPPERNOLLE S, GEURDEN T, HOPE J, VERCRUYSSSE J, et al. Giardia duodenalis stimulates partial maturation of bovine dendritic cells associated with altered cytokine secretion and induction of T-cell proliferation Parasite Immunology, 2014, 36, 157–169.

HAGEL I, CABRERA M, HURTADO MA, SANCHEZ P, PUCCIO F, DI PRISCO MC, et al. Infection by Ascaris lumbricoides and bronchial hyper reactivity: An outstanding association in Venezuelan school children from endemic áreas. Acta Tropica 2007 (103): 231–241.

HAGEL I, CABRERA M, PUCCIO F, SANTAELLA C, BUVAT E, INFANTE B, et al. Co-infection with Ascaris lumbricoides modulates protective immune responses against Giardia duodenalis in school Venezuelan rural children. Acta Tropica 2011 (117): 189–195.

HAGEL I, PUCCIO F, LOPEZ E, LUGO D, CABRERA M, DI PRISCO MC. Intestinal parasitic infections and atopic dermatitis among Venezuelan Warao Amerindian pre- school children Pediatric Allergy and Immunology 25 (2014) 276–282.

HALKEN S. Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. Pediatr Allergy Immunol 2004; 15 (Suppl. 16): 9–32.

- HANEVIK K, DIZDAR V, LANGE LAND N, HAUSKEN T. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. BMC Gastroenterol. 2009 (21):9-27.
- HARDIN JA, BURET AG, OLSON ME, KIMM MH, GALL DG. Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. J. Parasitol. 1997(83): 908-12.
- HOPKIN, J. Mechanisms of asthma. In: Principles of asthma. Medicine 2003 :(41-44).
- HUSBAND AJ Mucosal memory- maintenance and recruitment. Veterinary Immunopathology 2002 (87): 131-136.
- IGNATIUS R, GAHUTU JB, KLOTZ C, STEININGER C, SHYIRAMBERE C, LYNG M, et al. High Prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B Infection and Association with Underweight in Rwandan Children Plos Negl Trop Dis 2012 , jun 6(6):e1677.
- ISAAC (The Inter-national Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee*) Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC The Lancet 1998 Vol. 351 • April 25.
- JIMÉNEZ JC, FONTAINE J, GRZYCH JM, DEI-CAS E, CAPRON M. Systemic and Mucosal Responses to Oral Administration of Excretory and Secretory Antigens from *Giardia intestinalis*. Clinical and diagnostic laboratory immunology 2004, Jan vol. 11 (1):152–160.
- JIMENEZ JC, MORELLE W, MICHASKY JC DEI-CAS E Excreted/ secreted glycoproteins of *Giardia intestinalis* play an essential role in the antibody response. Parasitology Res 2007 100(4): 715-720.
- JIMENEZ JC, FONTAINE J, GRZYCH JM, CAPRON M, DEI-CAS E. Antibody and cytokine responses in Balb/C mice immunized with the excreted/secreted proteínas of *Giardia intestinalis*: The role of cysteine proteases. Ann Trop. Med Parasitology. 2009 103(8):693-703.
- KAMDA JD, NASH TE, SINGER SM *Giardia duodenalis*: Dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection Experimental Parasitology 2012 (130): 288–291.
- KARADAG B, EGE M, BRADLEY JE, BRAUN-FAHRLINDER C, RIEDLER J, NOWAK D, et al. The role of parasitic infections in atopic diseases in rural schoolchildren. Allergy 2006: 61: 996–1001.

KATELARIS CH, SACKS R, THERON PN. Allergic rhinoconjunctivitis in the Australian population: Burden of disease and attitudes to intranasal corticosteroid treatment *Am J Rhinol Allergy*. 2013 Nov-Dec; 27(6): 506–509.

KOOT BGP, FIEBO JW, JUFFRIE M, ROSALINA I, JAN JAM, TAMINIAU JJAM, et al. Does *Giardia lamblia* Cause Villous Atrophy in Children?: A Retrospective Cohort Study of the Histological Abnormalities in Giardiasis *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2009 49:304–308.

KUKKONEN K, KUITUNEN M, HAAHTELA T, KORPELA R, POUSSA T, SAVILAHTI E. High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010 Feb; 21(1 Pt 1):67-73

KIKUCHI T, ISHIDA S, KINOSHITA T, SAKUMA S, SUGAWARA N, YAMASHITA TI, et al. IL-6 enhances IgE-dependent histamine release from human peripheral blood-derived cultured mast cells *Cytokine* 2002 v. 20(7): 200–209.

KUCUK ZYRS, KHODOUN MV, MAHLER A, HOGAN S, FINKELMAN FD. Induction and suppression of allergic diarrhea and systemic anaphylaxis in a murine model of food allergy *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1343-8.

KUSHWAH R, OLIVER JR, WU J, CHANG Z, HU J Elf3 Regulates Allergic Airway Inflammation by Controlling Dendritic Cell-Driven T Cell Differentiation *J Immunology* 2011 187: 4639-4653.

LANE S, LLOYD D. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. *Crit Rev Microbiol*. 2002 (28): 123–47.

LANGFORD TD, HOUSLEY MP, BOES M, CHEN J, KAGNOFF MF, GILLIN FD. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infect. Immun*. 2002 (70): 11–18.

LI E, ZHOU P, PETRIN Z, SINGER SM. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun*.2004 (72): 6642–49.

LIMA JR. OA, KAISER J, CATISTI R High occurrence of giardiasis in children living on a 'landless farm workers' settlement in Araras, São Paulo, Brazil *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2013, May-June 55(3):185-188.

LONG KZ, ROSADO JL, SANTOS JI, HAAS M, MAMUN AI, DUPONT HL, et al. Associations between Mucosal Innate and Adaptive Immune Responses and Resolution of Diarrheal Pathogen Infections. *Infection And Immunity*, 2010 Mar, Vol. 78 (3): 1221–1228.

LUGAN HD. Mechanisms of adaptation in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Essays Biochem*. 2011 out 24; 51:177-91.

LUGOGO NL, KRAFT M. Epidemiology of Asthma. *Clin Chest Med*. 2006 (27): 1-15.

MAHMOUD, MS, SALEM AA, RIFAAT MM. Human Giardiasis as an etiology of skim allergy: the role of adhesion molecular and Inter-leukin -6. *J. Egypt Soc Parasitology* 2004 Dec; 34 (3): 723-737.

MATOWICKA-KARNA J.; DYMICKA-PIEKARSKA V, KEMONA H. IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with *Giardia intestinalis* *FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA* 2009 vol 47 (1): 93-07.

MAYER, L. Mucosal Immunity. *Pediatrics* 2003 vol. 111 (6): 1595-1600.

MAHMOUD, MS, SALEM A.A, RIFAAT MM. Human Giardiasis as an etiology of skim allergy: the role of adhesion molecular and Inter-leukin -6. *J. Egypt Soc Parasitology* 2004 Dec; 34 (3): 723-737.

MONCAYO AL, VACA M, OVIEDO G, WORKMAN LJ, CHICO ME, PLATTS-MILLS TA, et al. Effects of geohelminth infection and age on the associations between allergen-specific IgE, skin test reactivity and wheeze: a case-control study. *Clin Exp Allergy*. 2013 Jan; 43 (1):60-72

MUÑOZ-CRUZ S, GÓMEZ-GARCÍA A, MILLÁN-IBARRA J, GIONO-CEREZO S, YÉPEZ-MULIA L. *Giardia lamblia*: Inter-leukin 6 and tumor necrosis factor-alpha release from mast cells induced through an Ig-independent pathway. *Exp Parasitol*. 2010 Nov;126(3):298-303.

NENOFF P, DOMULA E, WILLING U, HERRMANN J. *Giardia lamblia*--cause of urticaria and pruritus or accidental association? *Hautarzt*. 2006 Jun; 57(6):518-20, 521-2.+

NEVES, DP. et al *Parasitologia humana* 11ª Ed. 2010 pag. 121-126.

NIYIZURUGERO E, NDAYANZE JB, BERNARD K. Prevalence of intestinal parasitic infections and associated risk factors among Kigali Institute of education students in Kigali, Rwanda *Tropical Biomedicine* 2013 30(4): 718–726.

NORDLUND B, MELÉN E, GRONLUND H, HEDLIN G, KULL I. Prevalence of severe childhood asthma according to the WHO. *Respiratory Medicine* (2014) xx, 1-4 Received 4 February 2014; accepted 26 May

OBOKI K, OHNO T, SAITO H, NAKAE S. Th17 and Allergy. *Allergology International*.2008 (57): 121-134.

PARK H, LIZ, YANG XO, CHANG SH, NURIEVA R, WANG YH. A distinct lineage of CD4T cells regulates tissue inflammation by producing inter-leukin 17. *Nat Immunol*, 2005 (6): 1133–1141.

PATON, JY. Severe asthma in children. *Paediatrics and child health*. 2007 v.17 (5): 180-187.

PEREIRA MU, PITREZ PM, JONES MHD. ESCOUTO D, DIAS ACO, WEILAND SK, et al. Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J* 2007; 29: 1154–1160.

PEREIRA EAL, SILVA DAO, CUNHA-JUNIOR JP, ALMEIDA KC, ALVES R, SUNG SJ et al. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. *Allergy* 2005: 60: 401–406.

PONCE-MACOTELA M, GONZÁLEZ-MACIEL A, REYNOSO-ROBLES R, MARTÍNEZ-GORDILLO MN Goblet cells: are they an unspecific barrier against *Giardia intestinalis* or a gate? *Parasitol Res*. 2008 Feb; 102(3):509-13.

PRIETO LL, PÉREZ PA, GONZÁLEZ SLA, IGLESIAS CA. Chronic urticaria and angioedema in *Giardia lamblia* infection. *Med. Clin*. 2006; 126:358–9.

PRUCCA CG., LUJAN, HD. Antigenic variation in *Giardia lamblia* *Cellular Microbiology* 2009 11(12): 1706–1715.

RINGQVIST E, PALM JE, SKARIN H , HEHL AB, WEILAND M, GILLIN FD, et al. Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to inter-action with intestinal epithelial cells *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Jun; 159 (2):85-91.

RODNEY DA. Biology of *Giardia lamblia* *Clin Microbiol Rev*. 2001 July; 14(3): 447–475.

RODRIGUEZ-FUENTES GB, CEDILLO-RIVERA R, FONSECA-LINAN R, GUELLO-GARCIA R, MUNOZ, ORTEGA-PIERRES G, et al. *Giardia duodenalis*: analysis of secreted proteases upon trophozoite epithelial cell interaction in vitro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2006; 101:693-6.

RÓPOLO AS, TOUZ MC. A Lesson in Survival, by *Giardia lamblia*. The Scientific World Journal. 2010 (10): 2019–2031.

ROSSIGNOL JF. *Cryptosporidium* and *Giardia*: Treatment options and prospects for new drugs. Exp Parasitol. 2010. (124): 45–53.

RUPA P & MINE Y Oral immunotherapy with immunodominant T-cell epitopepeptides alleviates allergic reactions in a Balb/c mouse model of egg allergy. Allergy 2012; 67: 74–82.

SAHA TK. and GHOSH TK. - Invasion of small intestinal mucosa by *Giardia lamblia* in man. Gastroenterology 1977 (72):402-405.

SANTOS CKS, GRAMA DF, LIMONGI JE, COSTA FC, COUTO TR, SOARES RM, et al. Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2012 (106): 473– 479.

SARA MD, MARTINA ES, DUSTIN CH, MITSUTOSHI I, KOJI H, LARS LE et al. IL-6-Dependent Mucosal Protection Prevents Establishment of a Microbial Niche for Attaching/Effacing Lesion-Forming Enteric Bacterial Pathogens J. Immunol. 2008 may 15: 180(10):6816-26.

SAVIOLI L, SMITH H, THOMPSON A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. Trends Parasitol. 2006 (22):203–08.

SINGER SM, NASH TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. Infect. Immun 2000 (68): 70–75.

SINGER C, STANCU P, COȘOVEANU S, BOTU A, CRISTEA C, BACIU D Study on the Frequency and Values of Sanguine Eosinophilia in Children Admitted with Parasitary Diseases. Current Health Sciences Journal 2013 Vol. 39, (2):93-96.

SMITH, PD. Pathophysiology and Immunology of Giardiasis. Ann. Rev. 1985 (36): 295-307.

SOLAYMANI-MOHAMMADI S, SINGER S M- *Giardia duodenalis*: The Double-edged Sword of Immune Responses in Giardiasis Exp Parasitol. 2010 Nov; 126(3): 292–297.

SOLÉ D, WANDALSEN GF, CAMELO-NUNES IC, NASPITZ CK; ISAAC-Grupo Brasileiro. Prevalência de sintomas de asma, rinite e eczema atópico entre crianças e adolescentes brasileiros identificados pelo Inter-national Study of Asthma and Allergies (ISAAC) Fase 3. Jornal de Pediatria – 2006 v. 82 (5): 341-346.

SPORIK R, CHAPMAN MD, PLATTS-MILLS TAE. House dust mite exposure as cause of asthma. *Clin. Exp. Allergy* 1992 (22): 897-906.

SORIANO JM, DOMÈNECH G, MARTÍNEZ MC, MAÑES J, SORIANO F. Intestinal parasitic infections in hosted Saharawi children. *Tropical Biomedicine* 28(3): 557–562 (2011).

SOUZA V, MEDEIROS D, SALES I, COSTA V, SILVA A, RIZZO J, et al. *Ascaris lumbricoides* infection in urban schoolchildren: specific IgE and IL-10 production. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2014 May-Jun;42 (3):206-11.

SOUZA VMO, SALES IRS, PEIXOTO DM, COSTA VMA, RIZZO JÁ, SILVA AR, et al *Giardia lamblia* and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a high incidence of protozoan infections. *J Pediatr (Rio J)*. 2012; 88(3): 233-8.

STADELMANN B, MERINO MC, PERSSON L, SVÄRD SG. Arginine Consumption by the Intestinal Parasite *Giardia intestinalis* Reduces Proliferation of Intestinal Epithelial Cells *PLOS ONE* 2012 Set(7): 9.

STADELMANN B, HANEVIK K, ANDERSSON MK, BRUSERUD O, SVÄRD SG The role of arginine and arginine-metabolizing enzymes during *Giardia* – host cell interactions in vitro *BMC Microbiology* 2013, 13:256.

STEINSVAAG S K Allergic Rhinitis: An Updated Overview *Curr Allergy Asthma Rep* 2012 12:99–103.

THOMPSON RCA. Giardiasis as a reemerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int J Parasitol* 2000 (30): 1259-67.

VALVERDE JG, GOMES-SILVA A, DE CARVALHO MOREIRA CJ, LELES DE SOUZA D, JAEGER LH, MARTINS PP, et al. Prevalence and epidemiology of intestinal parasitism, as revealed by three distinct techniques in an endemic area in the Brazilian Amazon. *Ann Trop Med Parasitol* 2011 Sep;105(6):413-24.

VELAZQUEZ C, BELTRAN M, ONTIVEROS N, RASCON L, FIGUEROA DC, GRANADOS AJ, HERNANDEZ-MARTINEZ J et al. *Giardia lamblia* infection induces different secretory and systemic antibody responses in mice. *Parasite Immunol*. 2005 Sep; 27 (9):351-6.

VON MUTIUS E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 (109):525-32.

WEILAND MEL, PALM JED, GRIFFITHS WJ, MCCAFFERY JM, SVARD SG. Characterisation of alpha-1 giardin: an immunodominant *Giardia lamblia* annexin with glycosaminoglycanbinding activity. Int J Parasitol. 2003; 33:1341-51.

WHO. Prevention and control of intestinal parasite infection WHO Technical Report Series 2002 serie 749 Geneva.: 28 January -- 1 February .

WHO/UNICEF Diarrhoea: why children are still dying and what can be done WHO/UNICEF Report; 2009: 1-16.

WÖRDEMANN M, DIAZ RJ, HEREDIA LM, MADURGA AMC, ESPINOSA AR, PRADO RC, et al. Association of atopy, asthma, allergic rhinoconjunctivitis, atopic dermatitis and intestinal helminth infections in Cuban Children. Tropical Medicine and International Health 2008 february vol. 13 (2): 180–186.

World Health Organization (WHO). Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases, 2012. A roadmap for implementation. Geneva. 37p.

World Health Organization. WHO guidelines for drinking water quality launched in 2004. Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3/en/.

ZAREBAVANI M, DARGAHI D, EINOLLAHI N, DASHTI N, MOHEBALI M, REZAEIAN M. Serum Levels of Zinc, Copper, Vitamin B12, Folate and Immunoglobulins in Individuals with Giardiasis. Iran J Public Health. 2012; 41(12): 47–53.

ZHOU P, LI E, SHEA-DONOHUE T, SINGER SM. Tumor Necrosis Factor α Contributes to Protection Against *Giardia lamblia* Infection in Mice. Parasite Immunol . 2007 July; 29(7): 367–37.

ZHOU P, LI E, ZHU N, ROBERTSON J, NASH T, SINGER SM. Role of inter-leukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. Infect. Immun. 2003 (71): 1566–68.

APENDICES

APENDICE A - Características da população estudo quanto à alergias e infecções parasitárias

Caracterização Geral da População

Durante o período de estudo foram convidadas a participar 978 responsáveis das crianças. A faixa etária das crianças estavam entre 2 e 10 anos, e eram oriundas e creche e escola da rede pública. Destas 55,3% (541/978) foram cadastradas no estudo, porém 61% (330/541) foram excluídas: 32,7% (330/541) não realizaram os exames coproparasitológicos, 53% apresentaram os exames incompletos, 7% (23/330) eram portadores de helmintos e 7,3% (24 /330) outros protozoários, com exceção *G.lamblia*. 39% (211/541) ingressaram no estudo destas 54,5% (115/211) eram portadoras de *G.lamblia* e 45,5% (96/211) sem parasitos intestinais. Das crianças que ingressaram no estudo alguns dados foram perdidos, pois além dos responsáveis não souberem informar: escolaridade materna, renda familiar tabagismo passivo doméstica, e história de alergia do pai e irmão, 16,6% (35/211) das crianças não coletaram o sangue sendo 11,4% (24/211) infectadas por *G.lamblia* e 5,2% (11/211) sem parasitos intestinais.

As crianças pesquisadas 51,7% (109/ 211) eram do sexo feminino e a média da idade foi de 5,46 anos e a faixa etária mais frequente se encontrou entre 2 e 5 anos 58,3%(123/211). A renda mensal $\leq$ 1 salário mínimo foi detectada em 81,9% (172/210) das famílias. Quanto à escolaridade a maioria das mães (61,6% 127/206) tinham o nível fundamental incompleto e 60,4% (125/207) das famílias não apresentaram tabagismo passivo domiciliar. Com relação à presença de histórico de alergia respiratória familiar, a mãe, o pai e o irmão 78,2% (165/211), 88,8% (175/197) e 64,3% (128/199) respectivamente não apresentaram alergia respiratória.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa quanto ao sexo masculino e feminino ($p= 0,132$), escolaridade materna ($p=0,112$), renda familiar ($p=0,469$), tabagismo passivo doméstico ($p=0,062$), porém foi observada diferença estatisticamente significativa entre a faixa etária ($p=0,026$) e a história de alergia familiar: mãe, pai e irmão ($p=0,001$; 0,003; 0,005) respectivamente.

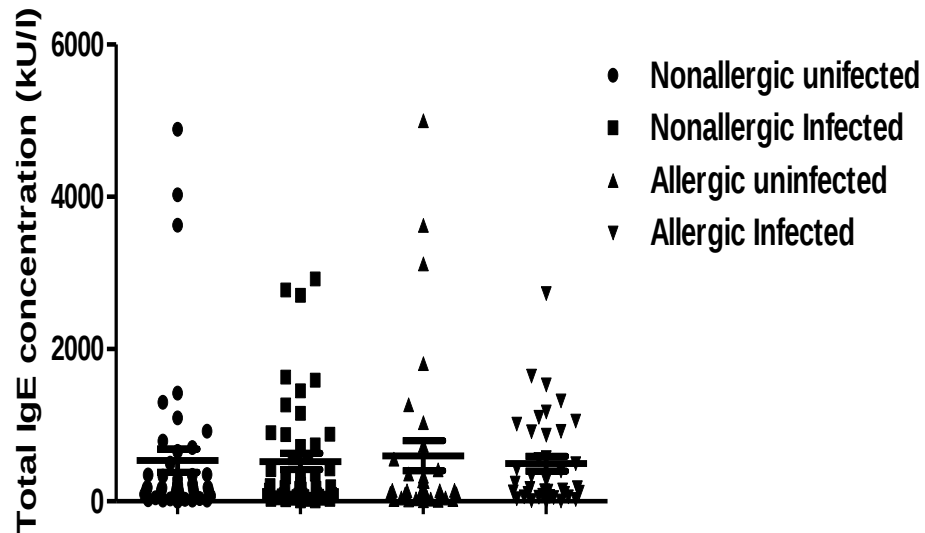
A presença de *G. lamblia* não foi observada associação estatisticamente significativa com a alergia das vias aéreas respiratórias ($p=0,256$), 86,7% (183/211) realizou o teste cutâneo de punpura de resposta imediata onde não foi observada diferença estatística como observamos os dados na tabela abaixo,

Relação entre a positividade para o teste cutâneo e asma em crianças de 2 a 10 anos infectadas por *Giardia lamblia*.

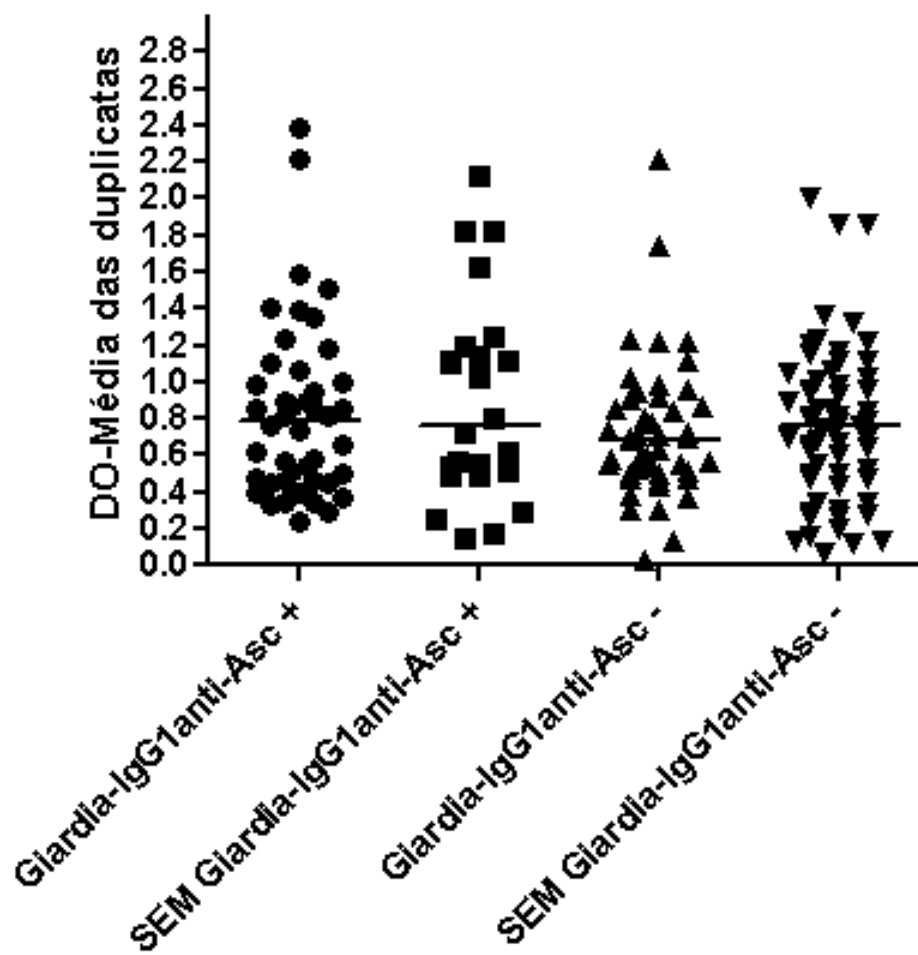
		Alergias respiratórias			OR (IC 95%)	Valor de p [#]
		n (%)				
<i>Giardia lamblia</i>	Teste Cutâneo	Alérgico	Não alérgico	Total		
		80 (43,7)	103 (56,3)	183 (100)		
Infectado	Positivo	10 (47,6)	11 (52,4)	21 (21,4)	1.035	0.569
	Negativo	36 (46,8)	41 (53,2)	77 (78,6)	(0.394 – 2.721)	
TOTAL		46 (46,9)	52 (53,1)	98 (100)		
Não Infectado	Positivo	12 (60,0)	8 (40,0)	20 (23,5)	2.932	0.066
	Negativo	22 (33,8)	43 (66,2)	65 (76,5)	(1.045 – 8.226)	
TOTAL		34 (40,0)	51 (60,0)	85 (100)		

Análise estática pelo método do qui quadrado e Teste exato de Fisher. Diferença significativa quando $p < 0,05$.

Concentração de Anticorpos IgE e IgA Total entre os grupos estudados



IgA TOTAL-Giardia x SemGiardia



Apendice B: artigo submetido

Título: Cytokine profile in *G. lamblia* infected, sensitive to *Ascaris* and allergic children from urban areas of the Brazilian Northeast

A. Fontenele^a, W. Nascimento^{a,b}, C. Nóbrega^a, E. Fernandes^a, V. Lorena^b, D. Medeiros^c, E. Sarinho^c, D. Solé^d, M. Albuquerque^a, C. Barbosa^b, V. Souza^{a,*}

^aKeizo Asami Laboratory of Immunopathology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

^bCenter of Research Aggeu Magalhães (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil.

^cResearch Center for Allergy and Clinical Immunology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

^dDivision of Allergy, Clinical Immunology and Rheumatology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil.

* Corresponding author. E-mail address: valdenia.souza@gmail.com

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo no. 404413/2012-9) .

The authors declare that the procedures of the study were approved by the Health Sciences Research Ethics Committee at UFPE(CEP/CCS/UFPE) and applicable local regulations; assent and written informed consent were obtained from each parent or legal guardian before study procedure was initiated. The author for correspondence is in possession of this document. The authors declare that they have followed the protocols of their work centre on the publication of patient data.

ABSTRACT

Background: Immunity to *Giardia lamblia* and allergies in endemic area for helminths/protozoa infections had been studied. Anti-*Ascaris lumbricoides* (Asc) IgE and IgG isotypes can modulate the atopic and allergy. **Objective:** To evaluate the presence of anti-Asc IgE, IgG4, IgG1 antibodies and Th1 (IL-2/IFN- γ /TNF- α), Th2 (IL-4/IL-10), Th17 (IL-17/IL-6) cytokine production in *G. lamblia*-infected children, without concomitant helminths infection, as well as asthma and/or rhinitis frequency. **Methods:** A case-control nested in a cross-sectional study was conducted using standard questionnaire for airway allergy, parasitological analyses, immunoassay tests for anti-Asc antibodies and blood cell culture for cytokines measurement. **Results:** The sample comprised 211 children (53 allergic/infected; 39 allergic/uninfected; 62 non-allergic/infected; 57 non-allergic/non-infected) aged 2-10 years. Protozoan infection was accompanied by increased of anti-Asc IgG1 levels, but not IgE or IgG4. There were similar IL-6 production, but IL-2, IL-4 and IFN- γ were higher in infected children. IL-17 was not detected. TNF- α was produced in higher levels for allergic children, whereas the IL-10 was high levels in allergic/infected children. For positive anti-Asc IgG1 and allergic/infected children, higher TNF- α and IL-10 production and lower allergy frequency was observed when compared to negative anti-Asc IgG1 (OR=0.392; IC=0.168-0.914; p=0.02). **Conclusions:** Th1/Th2 profile was stimulated in the infected patients, which with circulating anti-Asc IgG1 the production of IL-10 and TNF- α was strengthened and there was lower frequency airway allergy. These findings highlight the importance of improved evaluation of IgG subtypes in *A. lumbricoides* and *G. lamblia* endemic areas, especially with regard to the prevention strategy or desensitization for allergic reactions.

Key-words: *Giardia lamblia*; Airway allergy; Anti-*Ascaris lumbricoides* antibodies; Cytokines; Children

INTRODUCTION

Giardia lamblia is a flagellate protozoan parasite of the small intestine that is extremely common throughout the world.¹ The World Health Organization considers Giardiasis a neglected disease,^{1,2} whose prevalence is estimated as 2%-5% in developed countries and 20%-30% in developing countries, with approximately 280 million infections per year,^{3,4} of whom 2% are adults and 6% to 8% are children.⁵ While *G. lamblia* infection can result in various gastrointestinal symptoms (such as diarrhea, steatorrhea, chronic malabsorption in children),⁶ in the majority of cases the trophozoite form of the parasite is harbored in the adult small intestine and has a commensal mode of life (60-80%).⁷

Excretory and secretory antigens (E/S), freed by *G. lamblia*, induce a host immune response characterized by a small inflammation in the intestinal mucosa, the production of antibodies, particularly secretory Immunoglobulin A (IgA), and cytokine production by T CD4⁺ lymphocytes.⁸⁻¹⁰ In children infected by *G. lamblia*, high levels of IFN- γ , IL-4 and IL-5 are associated with a longer infection period.^{8,11} In contrast, IL-8 and IL-10 were associated with a reduced infection period and control of inflammatory response, respectively.¹¹

Allergic diseases are mediated by Th2 type immune response (IL-4, IL-5, IL-13, eosinophilia, mastocytosis and high levels of IgE), as a result of a complex interaction between genetic predisposition and constant contact with environmentally allergenic proteins^{12,13}. Due to alterations in the cells of the intestinal mucosa of the host, *G. lamblia* has been associated with alterations in the absorption of allergens that it could induce development of allergies.^{14,15} Additionally, eosinophilia has been observed during *G. Lamblia* infection.^{16,17} The secretory and excretory antigens of the parasite have characteristics similar to allergens and shifted the response for the Th2 profile.¹⁸ *G. lamblia* infection has resulted in increased immune response activation in allergic patients,¹⁹ as well as an increase of prevalence of skin (itching and hives) and food allergies.^{15,20,21} Findings regarding respiratory allergies, asthma/rhinitis, in infected patients are controversial. An increase in cutaneous hyperactivity in response to environmental antigens and symptomatology in patients with chronic respiratory allergy has been observed, as well as high levels of total and specific IgE.^{15,20,21} In contrast, no differences have been observed in the total IgE and allergen-specific IgE levels of patients infected or uninfected by *G. lamblia*, or in the symptoms of asthma/rhinitis in patients free of active infection by helminths.²² The differences between studies have been explained by concomitant helminth infection, which is known to modulate allergic reaction.^{23,24}

However, anti-*Ascaris lumbricoides* (Asc) IgE has been considered a risk factor for atopic disease and a possible marker for the propensity of allergic diseases.²⁵⁻²⁷ In contrast, the anti-Asc IgG4 isotype was used as marker for chronic infections and protection against atopic reaction²⁸, but there was no association between anti-Asc IgG and asthma.²⁹ Another study revealed that anti-*Ascaris* IgE and IgG4 positivity is often associated with high levels of total IgE in patients with a respiratory allergy.³⁰ It is therefore possible that in *G. lamblia* infection, the presence of anti-*Ascaris* antibodies is the intervening factor for allergic reactions in these patients.

Therefore, the present study analyzed the presence of anti-*Ascaris* IgE, IgG4, IgG1 antibodies and cytokines production of the Th1, Th2 and Th17 profile in children infected with *G. lamblia*, without concomitant infection with helminths, as well as the presence of asthma and/or rhinitis. The results suggest that the presence of the protozoa, in patients sensitized to helminths (past infection) may interfere with the immune response of the host and in the airway allergies protection.

MATERIALS AND METHODS

Study design and population

This study was performed in areas of low socioeconomic level from the City of Recife and Itamaraca, in Pernambuco, Brazil. This was a case-control nested in a cross sectional study, which the cases were children with respiratory allergic diseases (asthma and/or allergic rhinitis) and controls were not allergic children. *Giardia lamblia* infection (G) or uninfected (UG) children, as well as, positive or negative anti-Asc antibodies were used to establish a comparative analysis of the patients. The study began in April 2012 and ran until August 2014. The sample size calculation was based on a priori estimates that the probability of *G. lamblia* infection was a minimum of 15% of the study sample and the prevalence of respiratory allergy (asthma and/or rhinitis) was around 30%, based on data for Recife from the *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (ISAAC).³¹

Initially, 978 children were registered and submit to tests for *G. lamblia* infection. Children's parents or guardians signed consent forms and all of the procedures of the study were approved by the Research Ethics Committee at the Federal University of Pernambuco Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE (CAAE: 01486912.5.0000.5208 / Número do parecer: 31639). The selection strategy was to actively seek out children from the community who had at some time been seen for primary care, but was dependent

on subjects providing specimens for the parasite tests on the days defined in the research protocol. Fecal samples were analyzed on alternate days by Hoffman's and Ritch's methods.

Affirmative responses to questions 1, 6 and especially 2 from the standardized ISAAC questionnaire were defined as indicating asthma and/or allergic rhinitis and an affirmative response to question 1 and 2 was defined as indicating rhinitis³¹. After ISAAC positive patient, the diagnosis were confirmed by directed history-taking and clinical examination, and supplemented with the results of immediate hypersensitivity skin tests for aeroallergens. Individuals with all normal test results and no previous history of chronic respiratory disease were used as control.

The case-control study sample comprised 211 patients who answered the ISAAC questionnaire and completed the diagnosis and parasitological examination. Demographic and socioeconomic data were collected whereby sex, age, mother's education, family income, passive smoker and information about family history of allergy (Table 1). From 211 patients, 183 (80 allergic and 103 non-allergic) had immediate hypersensitivity skin tests for a range of respiratory environmental allergens extracts – *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blomia tropicalis*, *Periplaneta americana*, *Blatella germanica*), mold, and cat epithelium – provided by Group ASAC Pharma (IPI-ASAC). The presence of papules with diameter equal or greater than 3mm, for at least one allergen, was defined as a positive reaction. The *G. lamblia* infection did not change the frequency of prick test results (data not shown).

Peripheral blood granulocytes and antibodies analysis

Blood samples were automatically analyzed (Sysmex XS-1000) to obtain the absolute values of eosinophils and neutrophils. Plasma from 176 patients was tested for anti-Ascaris IgG1, IgG4, IgE, as well as, total IgE and IgA antibodies. For the detection of total and anti-Ascaris IgE the plasma of each patient was submitted to automated immunofluorometric assays (ImmunoCAP System – Phadia Diagnosis) with a cut-off of 0.35 kUA/l and 400 IU, respectively. Anti-Ascaris IgG1 and IgG4 were tested using Ascaris antigen-coated (20 µg/ml) 96-well plates (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) and biotinylated rat anti-human IgG1 or IgG4 (Sigma-Aldrich) were used. The sample (1:10) were added in duplicated. The reactions were developed with a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich). For total IgA detection, it were used patient serum (1:50)-coated 96-well plates and peroxidase-conjugated goat anti-human IgA (Sigma A0295). The reactions were developed with an OPD solution in 0.1 M Tris-citrate buffer plus H₂O₂. The plates were read at 492nm on an ELISA reader. The results were expressed by median of the

optical densities (OD) from each group. There was no difference statistical in anti-allergen IgE or total IgE and IgA production for all comparison (date not shown).

***In vitro* cytokine stimulation and measurement**

Total blood (500 µL) from a subpopulation (37 patients infected and 59 uninfected) were cultured in polypropylene tubes (BD System™ Falcon - 352059) in supplemented RPMI 1640 medium (Sigma) added of fetal bovine serum (5%) upon mitogen stimulation (Phytohemagglutinin; 10µg/mL), or non-stimulated, for 24 hours. The supernatant of culture were harvested for IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α and IFN- γ cytokine measurement by Citometric Beads Assay (CBA) (BD Biosciences). The detection of cytokines with mitogen was greater than non-stimulation conditions (date not showed), because of this it was showed only the former.

Statistical analyses

We used the software GraphPad Prism 5.0 and SPSS version 17.0.0 for the statistical analysis. Chi-square test was used to compare the frequencies of allergic for *G. lamblia* infected patients or uninfected subjects for both positive and negative anti-Asc antibodies. Median of OD for total and specific antibodies, cytokine levels and granulocytes was calculated and compared using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney nonparametric test. The results were statistically significant for $p < 0.05$.

RESULTS

***G. lamblia* infected and allergic children showed high levels of anti-Ascaris IgG1 and less eosinophils**

The study began with 978 children were registered and performed tests to *G. lamblia* infection. Following the exclusion criteria the case-control study sample comprised 211 patients. It was observed similar frequency between the sexes, but the allergies were more prevalent in children less than 5 years and in those with history of allergy in the family (Table 1). In regard to peripheral blood granulocytes, there was significantly less eosinophils in infected allergic than infected non-allergic group. When compared infected and non-infected non-allergic children, the number of eosinophil were higher in this former. There was no difference statistical for number of neutrophil (Table 1).

We evaluated the previous contact with helminth antigen through of anti-*Ascaris* IgE, IgG4 and IgG1 antibodies in the plasma from *G. lamblia* infected and uninfected children (Table 2). There were statistically higher levels of anti-Asc IgG1 in *G. lamblia* infected children than in uninfected one (0.086 vs 0.026/ $p=0.04$). It was observed that allergic infected patients showed significantly lower levels of anti-Asc IgG1 when compared to infected non-allergic (0.034 vs 0.086/ $p=0.04$) and higher when compared to allergic uninfected group (0.034 vs 0.008/ $p=0.01$). There were no statistical differences for anti-Asc IgE and IgG4 among the groups.

Cytokines production in *G. lamblia* infected and allergic children

Blood sample from *G. lamblia* infected children were cultured upon mitogenic stimulation and the supernatants were collected to quantify cytokine content. As control group, the blood culture from uninfected children was also conducted. The cytokine levels in allergic children were evaluated in according to *G. lamblia* infection (Table 3). There were statistically similar IL-6 levels in the groups. The TNF- α cytokine was produced in higher levels for allergic than non-allergic in both *G. lamblia* infected and non-infected groups. In regards to IL-10, higher levels were observed in the allergic than non-allergic children in the *G. lamblia* infection group, but there was not statistical difference non-infected group. IL-2, IL-4 and IFN- γ production were higher in infected children than non-infected one, but there was not statistical difference for infected allergic and non-allergic. IL-17 was not detected in any group.

Increasing of TNF- α and IL-10 levels *G. lamblia* infected and positive anti-Asc IgG1 children

Because of high levels of anti-Asc IgG1 in infected children, we wonder about the cytokine profile in *G. lamblia* infected and *Ascaris* sensitized children. When to compare *G. lamblia* infected or non-infected children was possible to observe high levels of IL-2, IL-4 and IFN- γ in this former for both positive and negative anti-Asc IgG1 children. Differently, the TNF- α and IL-10 levels were only significantly higher in infected children with this antibody in the plasma. There was no difference for IL-6 production in the study groups (Table 4).

Low frequency of allergic in *G. lamblia* infected and positive anti-Asc IgG1 children

The figure 1 depicts the frequency of the allergy in *G. lamblia* infected children, with or without anti-Asc IgG1, as well as, in those non-infected. There was significantly lower allergy frequency in infected children when positive anti-Asc IgG1 (18/44; 41%) than negative anti-Asc

IgG1 (30/47; 64%) (OR=0.392; IC=0.168-0.914; $p=0.02$) (Fig. 1A), but it was not observed statistical difference when compared to uninfected and positive anti-Asc IgG1 (11/24; 46%) (OR=0.818; IC=0.300-2.230; $p=0.69$) (Fig. 1B). There were not statistical differences among in the allergy frequency in uninfected and negative anti-Asc IgG1 (28/61; 46%) group in relation to *G. lamblia* infected and negative anti-Asc IgG1 (30/47; 64%) (OR=2.080; IC=0.954-4.535; $p=0.06$) (Fig. 1C), as well as, uninfected and positive anti-Asc IgG1 group (11/24; 46%) (OR=0.997; IC=0.386-2.573; $p=0.99$) (Fig. 1D).

High levels of the IL-10 and TNF- α , but not IL-6, in *G. lamblia* infected, allergic and positive for anti-Asc IgG1 antibodies children

The cytokine TNF- α , IL-10 and IL-6 were evaluated in allergic or non-allergic infected children when separated in according anti-Asc IgG1 presence or absence. For positive anti-Ascaris IgG1 groups, it was verified significantly higher levels of TNF- α and IL-10 in infected and allergic than in non-allergic children. In these conditions, there was no difference between allergic or non-allergic uninfected groups (Table 5). For negative anti-Ascaris IgG1 groups, there was no statistical difference in the cytokines production in allergic or non-allergic for both infected and non-infected children. The similar IL-6 levels were detected in all the comparisons.

DISCUSSION

The immune response induced by *G. lamblia* has been widely studied in recent years,⁸⁻¹¹ as has its inter-relationship with the prevalence of allergies of the skin and airways in the presence or absence of helminth infections.^{15,19-22} In the present study, children infected only by *G. lamblia* had a mixed cytokine profile (Th1 and Th2), and in these patients the presence of circulating anti-*Ascaris* IgG1 antibodies, production of IL-10 and TNF- α was strengthened, at the same time there was a lower frequency of patients with airway allergies (asthma and/or rhinitis).

The present study included 211 children from disadvantaged socioeconomic backgrounds, where *G. lamblia* is the most prevalent infection (54.5%) in children under 5 years of age, as is expected within the population of Brazil.^{21,32} There was a low prevalence of geohelminth infections, such as *Ascaris lumbricoides*, may be due to the Brazilian Ministry of Health's strategy of carrying out mass treatment of children from public schools and disadvantaged communities. These patients were excluded and the study population did not present helminth infection concomitant with *G.*

lamblia, but was sensitized to helminth antigens. It was possible to observe that protozoan infection was accompanied by increased levels of anti-*Ascaris* IgG1, but not of IgE and IgG4. Children infected with *G. lamblia* who were allergic also had high levels of anti-*Ascaris* IgG1 compared to those who were allergic only. While anti-*Ascaris* IgG4 isotype has been used as a marker for chronic infection,²⁸ the results of the present study suggest that anti-*Ascaris* IgG1 is a marker of previous contact with the helminth. In this context, analysis of cytokine production and the presence of asthma/rhinitis were performed.

Analysis of cytokine levels showed that *G. lamblia* led to increased production of TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 among children. Indeed, both animal and human studies have demonstrated the induction of a mixed profile of Th1/Th2 cytokines,^{8,11,18} accompanied by increased IL-6 levels.^{33,34} However, no increase in the production of IL-6 was observed in the present study. This disagreement may be related to studies in adults with symptoms of giardiasis.

Similar to other studies,²⁰⁻²² the presence of asthma/rhinitis, immediate skin prick test results, and the laboratory parameters for total IgE and anti-allergen IgE were not increased in individuals infected with *G. lamblia* (data not shown). Recent studies have demonstrated that *G. lamblia* is capable of causing eosinophilia^{16,17} and may contain secretory and excretory antigens with similar characteristics to allergens¹⁸. In the present study, while individuals carrying the parasite had more circulating eosinophils (Table 1, $p = 0.03$) and were in the age group with the greatest reports of allergies (2-5 years), in allergic and infected individuals the number of eosinophils was lower. The profile of cytokines in allergic infected patients suggests that TNF- α production is related to the presence of asthma/rhinitis, whereas IL-10 increased due to protozoa infection. The presence of IL-10 during *G. lamblia* infection was related to inflammatory response control¹¹ and could be involved with low number of eosinophils.

However, the higher levels of TNF- α and IL-10 in infected patients were dependent on the presence of anti-*Ascaris* IgG1. In addition, reports of allergies in infected individuals were lower only in individuals positive for anti-ASC IgG1 (~4 fold the protection risk. OR=0.39) that also showed high levels of TNF- α and IL-10. Despite the fact that the study groups were small in terms of providing strong evidence, these results prompt an important role for IgG1 isotype in the allergic and infected children.

The relationship between IgG isotypes, particularly the IgG1 subtype, and modulation by cytokines is not fully understood. In general, IgG antibodies can lead to the formation of immune complexes, which subsequently come into contact with the antigen, and induce oxidative burst and the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages.^{37,38} Immune complexes can significantly enhance the presentation of antigens by dendritic cells, via FC γ R, expressed on

specific T cells, causing amplification of the inflammatory allergic response.³⁹ Therefore it is possible that the anti-*Ascaris* IgG amplifies TNF- α production and, as a negative feedback effect, is stimulated IL-10 production, which is enhanced by the presence of *G. lamblia*.^{11,34} This hypothesis requires further investigation, with *in vitro* assays to assess the secretion of pro-inflammatory cytokines and IL-10 in the presence of anti-*Ascaris* IgG1 and antigens of *G. lamblia*.

Therefore, the findings of the present study highlight the importance of improved evaluation of IgG subtypes in *Ascaris* and *G. lamblia* endemic areas, especially with regard to the prevention strategy or desensitization for allergic reactions.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO) guidelines for drinking water quality launched in 2004. Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3/en/
2. Savioli L, Smith T, Thompson A. Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. Trends Parasitol. 2006;22:203-08.
3. Lane S, Lloyd D. Current trends in research into the waterborne parasite Giardia. Crit Rev Microbiol. 2002;28:123-47.
4. Thompson R. Giardiasis as a reemerging infectious disease and its zoonotic potential. Int J Parasitol. 2000;30:1259-67.
5. Rossignol JF. Cryptosporidium and Giardia: Treatment options and prospects for new drugs. Exp. Parasitol. 2010;124:45-53.
6. Hanevik K, Dizdar V, Langeland N, Hausken T. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. BMC Gastroenterol. 2009;21:9-27.
7. Smith P. Pathophysiology and Immunology of Giardiasis. Ann. Rev. 1985;36:295-307.
8. Abdul-Wahid A, Faubert G. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. International Journal for Parasitology. 2008;38:691-703.
9. Singer SM, Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia* infections in mice. Infect. Immun. 2000;68:70-75.
10. Langford TD, Housley MP, Boes M, Chen J, Kagnoff MF, Gillin FD. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. Infect. Immun. 2002;70:11-8.

11. Long KZ, Rosado JL, Santos JI, Haas M, Mamun AI, Dupont HL, et al. Associations between Mucosal Innate and Adaptive Immune Responses and Resolution of Diarrheal Pathogen Infections. *Infection and Immunity*. 2010;78:1221-8.
12. Von Mutius E. Environmental factors influencing the development and progression of pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:525-32.
13. Royer PJ, Emara M, Yang C, Al-Ghoulh A, Tighe P, Jones N, et al. The Mannose Receptor Mediates the Uptake of Diverse Native Allergens by Dendritic Cells and Determines Allergen-Induced T Cell Polarization through Modulation of IDO. *Activity. J Immunol*. 2010;185:1522-31.
14. Hardin JA, Buret AG, Olson ME, Kimm MH, Gall DG. Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. *J. Parasitol*. 1997;83:908-12.
15. Di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, Barrios RM, Alvarez N, López R. Possible relationship between allergic disease and infection by *Giardia lamblia*. *Ann Allergy*. 1993;70:210-3.
16. Singer C, Stancu P, Coşoveanu S, Botu A, Cristea C, Baciú D. Study on the Frequency and Values of Sanguine Eosinophilia in Children Admitted with Parasitary Diseases. *Current Health Sciences Journal*. 2013;39:93-6.
17. Soriano JM, Domènech G, Martínez MC, Mañes J, Soriano F. Intestinal parasitic infections in hosted Saharawi children. *Tropical Biomedicine*. 2011;28:557-562.
18. Jiménez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-Cas E, Capron M. Systemic and Mucosal Responses to Oral Administration of Excretory and Secretory Antigens from *Giardia intestinalis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004;11:152-160.
19. Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R. Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. *Acta Trop*. 2005;95:116-22.
20. Di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, Jimenez JC, Rojas R, Gil M, et al. Association between giardiasis and allergy. *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 1998;81:261-65.
21. Giacometti A, Cirioni O, Antonicelli L, D'Amato G, Silvestric C, Del Prete MS, et al. Prevalence of intestinal parasites among individuals with allergic skin diseases. *J. Parasitol*. 2003;89:490-92.
22. Souza VMO, Sales IRS, Peixoto DM, Costa VMA, Rizzo JÁ, Silva AR, et al *Giardia lamblia* and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a high incidence of protozoan infections. *J Pediatr (Rio J)*. 2012;88:233-8.

23. Hagel I, Cabrera M, Hurtado MA, Sanchez P, Puccio F, Di Prisco MC, et al. Infection by *Ascaris lumbricoides* and bronchial hyperreactivity: An outstanding association in Venezuelan school children from endemic areas. *Acta Tropica*. 2007;103:231-41.
24. Pereira MU, Pitrez PM, Jones MH, Escouto D, Dias ACO, Weiland S K, et al. Nonatopic asthma is associated with helminth infections and bronchiolitis in poor children. *Eur Respir J*. 2007;29:1154-60.
25. Arruda LK, Santos AB. Immunologic responses to common antigens in helminthic infections and allergic disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5:399-402.
26. Takeuchi H, Zaman K, Takahashi J, Yunus M, Chowdhury HR, Arifeen SE. High titre of anti-*Ascaris* immunoglobulin E associated with bronchial asthma symptoms in 5-year-old rural Bangladeshi children. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:276-82.
27. Levin ME, Le Souef PN, Motala C. Total IgE in urban Black South African teenagers: the influence of atopy and helminth infection. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008;19:449-54.
28. Cooper PJ, Chico ME, Rodrigues LC, Ordonez M, Strachan D, Griffin GE, et al. Reduced risk of atopy among school-age children infected with geohelminth parasites in a rural area of the tropics *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:995-1000
29. Karadag B, Ege M, Bradley JE, Braun-Fahrlander C, Riedler J, Nowak D et al The role of parasitic infections in atopic diseases in rural schoolchildren. *Allergy*. 2006;61:996-1001.
30. Sarinho ES, Medeiros D, Silva A Rizzo JA. Specific IgE Anti-*Ascaris* in Brazilian Children and Adolescents. *World Allergy Organ J*. 2010;3:53-6.
31. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 1998;351:1225-32.
32. Santos CKS, Grama DF, Limongi JE, Costa FC, Couto TR, Soares RM, et al Epidemiological, parasitological and molecular aspects of *Giardia duodenalis* infection in children attending public daycare centers in southeastern Brazil *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;106:473-79.
33. Matowicka-Karna J, Dymicka-Piekarska V, Kemonia H. IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with *Giardia intestinalis*. *Folia Histochem Cytobiol*. 2009;47:93-7.
34. Boef AGC, May L, van Bodegom D, van Lieshout L, Verweij JJ, Maier AB, et al. Parasitic infections and immune function: Effect of helminth infections in a malaria endemic area. *Immunobiology* 2013;218:706-11.

35. Gómez-Guerrero C, López-Armada MJ, González E, Egido J. Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF- α and IL-6, and proliferation. *J. Immunol.* 1994;153:5247-55.
36. Franchini AM, Hunt D, Melendez JA, Drake JR. Fc_R-driven Release of IL-6 by Macrophages Requires NOX2-dependent Production of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Biological Chemistry.* 2013; 288:25098-108.
37. Hartwig C, Mazzega M, Constabel H, Krishnaswamy JK, Gessner JE, Braun A, et al. Fc γ receptor-mediated antigen uptake by lung DC contributes to allergic airway hyper-responsiveness and inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2010;40:1284-95.
38. 38 Franchini AM, Hunt D, Melendez JA, Drake JR. Fc_R-driven Release of IL-6 by Macrophages Requires NOX2-dependent Production of Reactive Oxygen Species. *The Journal of Biological Chemistry.* 2013; 288 (35): 25098–25108.
39. Hartwig C, Mazzega M, Constabel H, Krishnaswamy JK, Gessner JE, Braun A, et al. Fc γ receptor-mediated antigen uptake by lung DC contributes to allergic airway hyper-responsiveness and inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2010; 40: 1284–1295.

Table 1. Univariate analysis of associations between respiratory allergies and demographic, socioeconomic, laboratory data, family history of allergy and *Giardia lamblia* infection in children from urban area in the Northeast of Brazil

	Allergic n(%) 92 (43.6)	Non-allergic n(%) 119 (56.4)	Total 211 (100)	OR (IC 95%)	p
Gender					
Male	49 (48.0)	53 (52.0)	102 (48.3)	1.419 (0.822 – 2.450)	0.132
Female	43 (39.4)	66 (60.6)	109 (51.7)		
Age					
2 a 5	61 (49.6)	62 (50.4)	123 (58.3)	1.809 (1.031 – 3.175)	0.026*
>5 a 10	31 (35.2)	57 (64.8)	88 (41.7)		
Maternal education#					
Education I [§]	49 (38.6)	78 (61.4)	127 (61.6)	0.613 (0.347 – 1.080)	0.112
Education II [§]	40 (50.6)	39 (49.4)	79 (38.4)		
Family income#					
Up to 1 minimum wage	77 (44.8)	95 (55.2)	172 (81.9)#	1.389 (0.673 – 2.867)	0.469
>1 minimum wage	14 (36.8)	24 (63.2)	38 (18.1)#		
Passive smoker#					
Yes	43 (52.4)	39 (47.6)	82 (39.6)#	1.768 (1.006 – 3.107)	0.062
No	48 (38.4)	77 (61.6)	125 (60.4)#		
Allergy Mother					
Yes	30 (65.2)	16 (34.8)	46 (21.8)	3.115 (1.572 – 6.171)	0.001*
No	62 (37.6)	103 (62.4)	165 (78.2)		
Allergy# Father					
Yes	16 (72.7)	6 (27.3)	22 (11.2)#	4.299 (1.603 – 11.528)	0.003*
No	67 (38.3)	108 (61.7)	175 (88.8)#		
Allergy# Brother#					
Yes	41 (57.7)	30 (42.3)	71 (35.7)#	2.355 (1.303 – 4.259)	0.005*
No	47 (36.7)	81 (63.3)	128 (64.3)#		
G. lamblia					
Positive	53 (46.1)	62 (53.9)	115 (54.5)	1.249 (0.722 – 2.161)	0.256
Negative	39 (40.6)	57 (59.4)	96 (45.5)		
Eosinophil	Absolute value (min-max)	Absolute value (min-max)			
G. lamblia (+)	248(40-967)	375(78-1232)**	-	-	0.001*
G. lamblia (-)	180(47-800)	233(50-800)	-	-	0.118
Neutrophil					
G. lamblia (+)	3993(1960-6584)	3088(1600-7296)		-	0.386
G. lamblia (-)	3400(1084-7252)	3573(1880-6500)		-	0.305

#Lost information (some people did not know to inform). §Education I: Illiterate until complete primary education; Education II: Incomplete high-school until complete graduation. *p<0.05 when compared allergic and non-allergic children (qui square and Fisher's test). **p<0.05 when compared infected non-allergic and uninfected in non-allergic children (Mann-Whitney).

Tabel 2- Anti-Ascaris IgG1, IgG4 and IgE antibodies in *G. lamblia* infected allergic children from urban area in the Northeast of Brazil

Anti-Asc antibodies	<i>G. lamblia</i> infected			Uninfected		
	Allergic (n=48)	Non-allergic (n=43)	<i>p</i>	Allergic (n=39)	Non-allergic (n=46)	<i>p</i>
	(Min-Max)	(Min-Max)		(Min-Max)	(Min-Max)	
IgG1[#]	0.034**	0.086***	0.04*	0.01	0.026	0.36
	0-0.31	0-0.47		0-0.45	0-0.374	
IgG4[#]	0.006	0.002	0.17	0.0	0.002	0.48
	0-2.67	0-1.42		0-1.94	0-2.54	
IgE[§]	0.13	0.15	0.57	0.07	0.10	0.76
	0-50.1	0-67.1		0-21.3	0-18.6	

Median of the O.D.of IgG1 and IgG4 levels in serum measured by ELISA. § Median of concentration of IgE (kUA/L) measured by ImmunoCAP. * $p < 0.05$ when compared allergic and non-allergic. ** $p < 0.05$. *** $p < 0.05$ when compared infected and uninfected in non-allergic children.

Tabela 3- Cytokine levels in allergic and *G. lamblia* infected allergic children from urban area in the Northeast of Brazil

Cytokines [#]	<i>G. lamblia</i> infected			Uninfected		
	Allergic (n=22) (Min-Max)	Non-allergic (n=15) (Min-Max)	<i>p</i>	Allergic (n=25) (Min-Max)	Non-allergic (n=25) (Min-Max)	<i>p</i>
IL-6	49.29 (9.47-1538)	34.80 (8.84-211.8)	0.458	80.54 (0-520.5)	43.78 (0-638.5)	0.386
TNF- α	14.48 (6.43-57.7)	8.26** (5.1-29.34)	0.030*	10.94 (0-56.97)	4.54 (0-32.38)	0.028*
IL-10	6.48 (5.48-9,10)	5.95** (5.27-8.60)	0.009*	0.0 (0-16.17)	0.0 (0-7.08)	0.397
IL-2	6.19 (5.66-6.76)	6.28** (5.08-6.76)	0.975	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	-
IL-4	4.96 (0-5.31)	5.08** (0-5.43)	0.891	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	-
IFN- γ	4.12 (3.67)	4.06** (6.91)	0.619	0.0 (0-0)	0.0 (0-0)	-

#Median of cytokines (pg/mL) in the supernatant of peripheral blood culture upon PHA stimulus, measured by CBA. * $p < 0.05$ when compared allergic and non-allergic children.

** $p < 0.05$ when compared infected and non-infected in non-allergic children

Table 4. Cytokine production in *G. lamblia* infected and positive anti-Ascaris IgG1 children

Cytokine [#]	anti-Ascaris IgG1(+)			anti-Ascaris IgG1 (-)		
	G (n=17) (Min-Max)	UG(n=13) (Min-Max)	<i>p</i>	G (n=20) (Min-Max)	UG (n=46) (Min-Max)	<i>P</i>
IL-6	68.77	38.41	0.769	32.08	46.19	0.516
	8.84-1538	2.57-343.5		9.47-427.1	0-638.5	
TNF-α	13.96	4.06	0.010*	10.90	8.23	0.126
	5.27-29.34	0-31.04		5.12-57.7	0-56.97	
IL-10	6.35	0.0	0.0001*	6.12	8.23	0.277
	5.27-8.60	0-7.08		5.58-9.10	0-56.97	
IL-2	6.16	0.0	0.0001	6.31	0.0	0.0001
	5.93-6.45	0-0		5.66-6.76	0-0	
IL-4	0.0	0.0	0.0001	5.02	0.0	0.0001
	0-5.31	0-0		0-5.43	0-0	
IFN-γ	4.12	0.0	0.0001	4.0	0,0	0.0001
	3.67-8.12	0-0		3.7-6.91	0-0	

#Median of cytokines (pg/mL) in the supernatant of peripheral blood culture upon PHA stimulus, measured by CBA. * $p < 0.05$ when compared *G. lamblia* infected and uninfected children

Table 5-Cytokine levels in *G. lamblia* infected, positive anti-Ascaris IgG1 and allergic children

Cytokine [#]	anti-Ascaris IgG1(+)					
	<i>G. lamblia</i> infected			Uninfected		
	Allergic (n=7) (Min-Max)	Non-allergic (n=10) (Min-Max)	<i>p</i>	Allergic (n=4) (Min.-Max)	Non-allergic (n=9) (Min.-Max)	<i>p</i>
IL-6	61.37 (13.71-1538)	83.30 (8.84-211.8)	0.6691	126.6 (38.41-342.5)	34.17 (2.57-249.5)	0.1063
TNF-α	21.64 (12.42-26.58)	7.72 (5.27-29.34)	0.04*	10.07 (0-31.04)	3.97 (0-15.40)	0.2339
IL-10	6.61 (6.3-7.1)	5.85 (5.27-8.6)	0.04*	0.0 (0-0)	0.0 (0-7.08)	0.6171

Cytokine [#]	anti-Ascaris IgG1(-)					
	<i>G. lamblia</i> infected			Uninfected		
	Allergic (n=15) (Min-Max)	Non-allergic (n=5) (Min-Max)	<i>p</i>	Allergic (n=21) (Min-Max)	Non-allergic (n=25) (Min-Max)	<i>p</i>
IL-6	45.3 (9.47-427.1)	29.36 (21.28-42.84)	0.4578	77.91 (0-520.5)	45.95 (0-638.5)	0.8427
TNF-α	10.75 (6.43-57.72)	11.05 (5.12-19.62)	0.4068	10.94 (0-56.97)	6.07 (0-32.38)	0.1002
IL-10	6.15 (5.31-9.1)	5.95 (5.58-6.3)	0.1886	0.0 (0-16.17)	0.0 (0-0)	0.1263

#Median of cytokines (pg/mL) in the supernatant of peripheral blood culture upon PHA stimulus, measured by CBA. * $p < 0.05$ when compared allergic and non-allergic children

LEGEND

Figure 1. Allergy frequency in *G. lamblia* infected (G) or uninfected (UG) children for both positive and negative anti-Asc IgG1 children (A and D), as well, positive or negative anti-Ascaris IgG1 for both infected and uninfected one (B and C). Chi-square test was used to compare the frequencies. * $p < 0.05$ for OR (odds ration) and IC-95% (confidence interval).

Dear Dr. Ana Lucia Fontenele, You have been listed as a Co-Author of the following submission: Journal: Allergologia et Immunopathologia

Corresponding Author: Emanuel Sarinho Co-Authors: Ana Lucia Fontenele; Cassia Nóbrega; Wheverton Nascimento; Erica Fernandes; Virginia Lorena; Decio Medeiros; Monica Albuquerque; Constança Barbosa; Dirceu Solé; Valdenia Souza.

Title: Cytokine profile in *Giardia lamblia* infected, sensibilized to *Ascaris lumbricoides* and airway allergic children from urban areas of the Brazilian Northeast

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at emanuel.sarinho@gmail.com; do not follow the link below. An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated. To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it: <http://ees.elsevier.com/ai/l.asp?i=24626&l=PEE7EGYI> More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs. Thank you,
Allergologia et Immunopathologia

APENDICE C: Artigo submetido

Título: IL-4, IFN- γ e IL-17 production, *G. lamblia* infection and respiratory allergies in children from urban areas of the Brazilian Northeast

A. Fontenele^a, C. Nóbrega^a, W. Nascimento^{a,b}, E. Fernandes^a, V. Lorena^b, D. Medeiros^c, E. Sarinho^c, D. Solé^d, V. Costa^a, M. Albuquerque^a, C. Barbosa^b, V. Souza^{a,*}

^aKeizo Asami Laboratory of Immunopathology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

^bCenter of Research Aggeu Magalhães (CPqAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil.

^cResearch Center for Allergy and Clinical Immunology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil.

^dDivision of Allergy, Clinical Immunology and Rheumatology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil.

* Corresponding author. E-mail address: valdenia.souza@gmail.com

ABSTRACT

Immune response to *Giardia lamblia* and interrelationship to allergies has been studied, but the cytokines production in allergic host is not yet clear. In this study, it was evaluated the Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17) cytokine production in *G. lamblia*-infected children with asthma and/or rhinitis. For this, a cross-sectional study selected fifty-five children (aged 2-10 years, after standard questionnaire for airway allergy and parasitological test) and four groups were obtained: *G. lamblia*-infected children (G, n=10); *G. lamblia*-infected children with asthma and/or rhinitis (GA, n=17); children with asthma and/or rhinitis (A, n=18); and the control group of non-infected and non-allergic children (NG+NA, n=10). Children infected by helminths or others protozoa were excluded of study. Total blood was cultured with mitogen (Phytohemagglutinin). Double labeling was performed in blood cell culture with fluorochrome-conjugated antibodies (anti-CD4 plus anti-IFN- γ , anti-IL-17 or anti-IL-4 APC) and analyzed in a flow cytometer. It was observed lower frequency of IFN- γ +CD4+ and IL-17+CD4+ cells in the GA group when compared to the NG+NA group. There was no difference in IL-4+CD4+ cells frequency among the groups. The IL-17+CD4+ cells frequency was lower in infected children only (G). Therefore, the findings point out a predominant Th2 profile (IL-4 accompanied of less IFN- γ) with low inflammatory potential (less IL-17) in *G. lamblia* infected children with asthma and/or rhinitis.

Key-words: *Giardia lamblia*. Airway allergy. IL-4. IFN- γ , IL-17; Children

1. INTRODUCTION

It is well known that allergies of the airways are typically mediated by Th2 type immunity (IL-4, IL-5, IL-13, eosinophilia, activation of mast cells and high levels of IgE) [1]. However, the Th2 cytokine may be accompanied by the proinflammatory cytokines, with the predominance of IL-1 β , IL-17 and neutrophils considered as non-allergic or non-classic asthma [1,2]. *Giardia lamblia* is a protozoan that lives in the small intestine and can modify the absorption of allergens [3,4]. As a result, the interrelationship of infection by *G. lamblia* and allergies has been studied [5-7], although the profile of the cytokines of the allergic host is not yet clear. Secretory and excretory antigens of the parasite have characteristics similar to those of allergens and induced Th2 immune response [8]. However, different studies showed in *G. lamblia* infected children a mixed Th2/Th1 immune response profile, with eosinophilia and elevated levels of IL-4, IL-5, IFN- γ , TNF- α and rsIL-2 [9, 10]. Furthermore, pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-8 were elevated only in patients who suffered from an allergy associated with the infection by *G. lamblia* [6]. The present study investigated the production of the cytokines IL-4 (Th2), IFN- γ (Th1) and the proinflammatory cytokine IL-17 (Th17) in *G. lamblia* infected children and with airway allergies (asthma and/or rhinitis).

2. MATERIAL AND METODHS

This study was performed in areas of low socioeconomic level from the City of Recife and Itamaraca, in Pernambuco, Brazil, where a high prevalence of *G. lamblia* infection has been observed [7]. All parents or guardians of the children (aged 2 to 10 years), after providing written consent to take part in the study, it were asked about asthma/rhinitis symptoms through the questionnaire of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) [11]. Clinical data and feces samples were collected in April 2012 and ran until April 2013. Feces were collected on alternate days and submitted to Hoffman and Ritch methods. This was a cross-sectional study with fifty-five children selected after they had fulfilled the clinical and parasitological conditions of the established groups: *G. lamblia*infected children (G, n=10); *G. lamblia*-infected children with asthma and/or rhinitis (GA, n=17); children with asthma and/or rhinitis (A, n=18); and the control group of non-

infected and non-allergic children (NG+NA, n=10). Children infected by helminths or others protozoa were excluded of study. Total blood (500 μ L) was cultured in polypropylene tubes (Falcon BD - 352059) in supplemented RPMI 1640 medium (Sigma) added of fetal bovine serum (5%) upon mitogen stimulation (Phytohemagglutinin; 10 μ g/mL) for 24 hours. Double labeling was performed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (1x10⁶) from each child after

incubation with fluorochrome-conjugated antibodies: anti-CD4 PerCP-Cy5.5 plus anti-IFN- γ FITC, anti-IL-17 PE or anti-IL-4 APC (*Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Cocktail*, BD Pharmingen – 560751), for 30min, at room temperature. After washing, the PBMC were analyzed in a flow cytometer (FACSCalibur, BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA) by collecting a minimum of 10,000 events per sample. The frequency of double-positive cells was analyzed using the program Cell Quest in the lymphocyte region, determined using granularity (SSC) and size (FSC) plot. Limits for the quadrant markers were set based on negative populations. The fluorescence intensity (inside CD4⁺ lymphocytes) was expressed as median with interquartile interval. Statistical difference ($p < 0.05$) between groups were assessed using Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney post-test. The study was approved by the Research Ethics Committee at the Federal University of Pernambuco (CAAE: 01486912.5.0000.5208/Protocol number: 31639).

3. RESULTS

There was no difference regarding age (4 ± 0.36 years) and gender among groups.

There were lower frequency of IFN- γ +CD4⁺ (Figure 1A) and IL-17+CD4⁺ (Figure 1B) cells in infected and asthma and/or rhinitis (GA) children when compared to the control group (NG+NA). The Fig. 1B shows that the IL-17+CD4⁺ cell frequency was significantly lower in infected children only (G). There was no difference in IL-4+CD4⁺ cells frequency among the groups (Figure 1C). The Figure 2 depicts the intensity of fluorescence inside of the CD4⁺ cells, which it was higher for IFN- γ (Figure 2A) in both the groups of infected (G) and asthma and/or rhinitis (A) children.

4. DISCUSSION

The hygiene hypothesis suggests that there is a lower prevalence of allergies of the airways and reduced symptoms in developing countries, where helminth and protozoa

infections appear in concurrent infections, due to a network of cellular interactions mediated by cytokines in response to these parasites [12]. In the present study, individuals infected by *G. lamblia* and who suffered from asthma/rhinitis did not display altered IL-4 production, although they did have lower production of IL-17 and IFN- γ than uninfected and not allergic children. Importantly, these findings were not affected by gender, age or concomitant helminth infection. There was a decrease of IFN- γ in infected and allergic children, accompanied by the presence of the IL-4. Therefore, the data suggested a predominance of IL-4/Th2 response in these patients. The quantity, and not solely the presence of this cytokine in T lymphocytes (Figure 2A), showed a need together with infection by protozoan for lower production of IFN- γ in airway allergy children. However, the reduction in the IL-17 cytokine suggests a protection mechanism in infected and allergic individuals. High levels of the IL-17 were associated with the severe form of the disease and neutrophilic asthma profile. Under the influence of IL-17 action there was stimulation of IL-6, IL-8, IL-11, proinflammatory chemokines and production of mucus proteins in different bronchial cells (fibroblasts, epithelial cells and smooth muscle) [2]. These mediators also contribute to the amplification of the profile of eosinophilic asthma. In the present study, the smallest IL-17 action may reflect cases of the asthma less severe. Although, we are aware it is important to follow up these children for evaluation of clinical data and measurement of other immunological factors. A mixed Th1/Th2 profile has been described for *G. lamblia* infections [9, 10]. The production of IL-17 during infection has been detected in experimental studies [13, 14], whereas the human studies are scarce [15]. The present study identified a mixed profile, with the presence of IL-4 and a greater quantity of IFN- γ , accompanied by reduced production of IL-17 in the patients who were only *G. lamblia* infected. Together, these findings suggest a predominantly Th2 profile in individuals with asthma and/or rhinitis when infected with *G. lamblia*, but with lower inflammatory potential. These results reflect the importance of further studies into the immunomodulatory mechanisms due to infection by this protozoan.

5. ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Process Number: 478508/2012-3). Ana Lucia Fontenelle was in receipt of a Doctoral Fellowship from the FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

6. REFERENCES

- [1] Wong CK, Ho CY, Ko FW, Chan CH, Ho AS, Hui DS, et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 2001;125: 177-83.
- [2] Oboki K, Ohno T, Saito H, Nakae S. Th17 and Allergy. *Allergol Int* 2008;57: 121-34.
- [3] Hardin JA, Buret AG, Olson ME, Kimm MH, Gall DG. Mast cell hyperplasia and increased macromolecular uptake in an animal model of giardiasis. *J Parasitol* 1997;83:908-12.
- [4] Hanevik K, Dizdar V, Langeland N, Hausken T. Development of functional gastrointestinal disorders after *Giardia lamblia* infection. *BMC Gastroenterol* 2009; 21:9-27.
- [5] Di Prisco MC, Hagel I, Lynch NR, Jiménez JC, Rojas R, Gil M, Mata E, et al. Association between giardiasis and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998; 81:261-5.
- [6] Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R. Serum cytokine changes in Turkish children infected with *Giardia lamblia* with and without allergy: Effect of metronidazole treatment. *Acta Trop* 2005; 95:116-22.
- [7] Souza VMO, Sales IRS, Peixoto DM, Costa VM, Rizzo JA, Silva AR, et al. *Giardia lamblia* and respiratory allergies: a study of children from an urban area with a high incidence of protozoan infections. *J Pediatr (Rio J)* 2012; 88:233-8.
- [8] Jiménez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-Cas E, Capron M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:152-60.
- [9] Long KZ, Rosado JL, Santos JJ, Haas M, Al Mamun A, DuPont HL et al. Associations between mucosal innate and adaptive immune responses and resolution of diarrheal pathogen infections. *Infect Immun* 2010;78: 1221-8.

- [10] Singer C, Stancu P, Coşoveanu S, Botu A, Cristea C, Baci D. Study on the frequency and values of sanguine eosinophilia in children admitted with parasitary diseases. *Curr Health Sci J* 2013; 39:93-6.
- [11] ISAAC Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet* 1998; 351:1225-32.
- [12] Finlay CM, Walsh KP, Mills KHG. Induction of regulatory cells by helminth Parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. *Immunol Rev* 2014; 259:206-30.
- [13] Grit GH, Geurden T, Dreesen L, Geurden T, Dreesen L, Hope J, et al. Evaluation of cellular and humoral systemic immune response against *Giardia duodenalis* infection in cattle. *Vet Parasitol* 2014; 202:145-55.
- [14] Dreesen L, De Bosscher K, Grit G, Staels B, Lubberts E, Bauge E, et al. *Giardia muris* infection in mice is associated with a protective IL-17A response and induction of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. *Infect Immun* 2014; 82:3333-40.
- [15] Boef AG, May L, van Bodegom D, van Lieshout L, Verweij JJ, Maier AB, et al. Parasitic infections and immune function: effect of helminth infections in a malaria endemic area. *Immunobiology* 2013; 218:706-11.

LEGENDS

Figure 1. IFN- γ + /CD4+(A), IL-17+ /CD4+(B) and IL-4+ /CD4+(C) cells frequency in the peripheral blood of *G. lamblia*-infected children (G); *G. lamblia*-infected children with asthma and/or rhinitis (GA); children with asthma and/or rhinitis (A); and the control group of non-infected and non-allergic children (NG+NA). Cells were stained with anti-CD4 PerCPCy5.5 plus anti-IFN- γ FITC, anti-IL-17 PE or anti-IL-4 APC monoclonal antibodies and analyzed by flow cytometry. The results correspond to the percentage of double-positive cells. *p < 0.05 compared to the NG+NA group

Figure 1

[Click here to download high resolution image](#)

Figure 2. Intensity of fluorescence for IFN- γ (A), IL-17(B) and IL-4(C) in CD4+ lymphocytes from of peripheral blood of *G. lamblia*-infected children (G); *G. lamblia*-infected children with asthma and/or rhinitis (GA); children with asthma and/or rhinitis (A); and the control group of non-infected and non-allergic children (NG+NA). Cells were stained with anti-CD4 PerCP-Cy5.5 plus anti-IFN- γ FITC, anti-IL-17 PE or anti-IL-4 APC monoclonal antibodies and analyzed by flow cytometry. The results correspond to median with interquartile interval. *p < 0.05 compared to the NG+NA group.

[Click here to download high resolution image](#)

Cytokine Submission Confirmation

Cytokine <cytokine@elsevier.com> 19 de julho de 2015 22:26

Para: valdenia.souza@gmail.com

Title: **IL-4, IFN- γ e IL-17 production, *G. lamblia* infection and respiratory allergies in children from urban areas of the Brazilian Northeast**

Corresponding Author: Dr. Valdenia Souza

Authors: Ana Lucia Fontenele; Cassia Nobrega; Wheverton Nascimento; Virginia Lorena; Decio Medeiros; Dirceu Solé; Emanuel Sarinho; Constança Barbosa.

Short communication.

Dear Dr. Souza,

This is to confirm that the abovementioned manuscript has been received for consideration in Cytokine. You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Cytokine as an author:

<http://ees.elsevier.com/ycyto/>

Your username is: valdenia.souza@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/ycyto/automail_query.asp.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an email with this number for your reference. Thank you for submitting your manuscript to Cytokine. Should you have any questions, please feel free to contact our office. Kind regards, Cytokine

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Projeto: Estudo da associação entre infecção por *Giardia lamblia* e as alergias das vias respiratórias: avaliação da resposta imune celular e humoral em crianças de área urbana, Recife, Pernambuco no período de 2012-2014.

Durante a leitura do documento abaixo fui informado que posso interromper para fazer quaisquer perguntas.

O estudo acima citado tem por objetivo estudar os anticorpos de alergia no sangue de crianças de 2 a 10 anos de idade com alergia das vias aéreas respiratórias. Em outros estudos parece que estes anticorpos são diferentes em crianças alérgicas com e sem parasitos intestinais (vermes) e parece que isto é capaz de interferir nas manifestações das doenças alérgicas das crianças parasitadas. Também será avaliado como se comportam estes anticorpos no sangue de crianças não alérgicas, com e sem vermes, para comparar com as crianças alérgicas.

Foi solicitada a minha permissão para que o menor sob minha guarda _____ participe desta pesquisa. Serão selecionadas crianças que frequentadoras de creches públicas da Grande Recife e será solicitada a participação de irmãos destas crianças.

A participação consta de uma consulta inicial, três coletas de fezes para exame parasitológico, a retirada de 1 ml (1 colher de chá) de sangue de veia do braço com agulha e seringa descartáveis para as dosagens de anticorpos, um teste alérgico na pele com 7 picadinhas para verificar as alergias da criança.

As crianças que possuírem alergias das vias aéreas respiratórias serão tratadas de suas alergias conforme o atendimento normal padrão no Ambulatório de Alergia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFPE. As crianças que tiverem parasitoses serão tratadas da verminose – a escolha do remédio vai depender do verme encontrado. Nas crianças que tiverem alergia e vermes, será realizada nova coleta de sangue, exame de fezes e teste alérgico 3 meses depois do tratamento da verminose.

Os riscos que as crianças podem ter ao participar desta pesquisa são o de acontecer hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue e de ter algum efeito colateral da medicação

(náusea, vômitos, diarreia) para vermes, que são raros e, de qualquer forma deverá ser tomada, pois os vermes fazem mal à saúde e devem ser eliminados.

De benefício pessoal, a criança terá o tratamento da verminose e será verificado se a parasitose foi eliminada 3 meses depois e receberei orientações de higiene. O tratamento das alergias seguirá normalmente dentro do atendimento do Ambulatório.

A contribuição para o conhecimento das doenças e sua relação (alergias e parasitoses) poderá levar a um melhor tratamento das alergias e das verminoses, mas isto pode não ocorrer diretamente para o menor sob minha guarda.

Caso ocorra algum efeito colateral imprevisto, o paciente será tratado no próprio Ambulatório ou, se necessário, poderá ser internado na enfermaria de Pediatria do Hospital das Clínicas. Para tanto, os Drs. Décio Medeiros e Deborah Schorr estarão disponíveis no Ambulatório ou pelo telefone 2126.3918.

Uma vez que todo o atendimento será feito durante as visitas regulares dos pacientes para seu tratamento ao Ambulatório de Alergia Pediátrica, não está previsto pagamento de despesas de locomoção, exceto para os voluntários sem alergias.

Foi explicado que tenho o direito de recusar a participação do menor sob minha guarda, ou, se já a tiver dado, retirá-la, sem necessidade de explicação e sem perda de qualquer direito e de atendimento digno no referido Ambulatório. As informações desta pesquisa são confidenciais e a identidade do menor será preservada, sem que apareça o nome do menor em nenhum documento de divulgação dos resultados ou qualquer dado que possa identificá-lo.

Nome do responsável _____

Assinatura _____

Data

____/____/____

Di

ANEXO B - Questionário padronizado (ISAAC)

Formulário Nº _____ Data _____

Nome _____

Filiação _____

Endereço _____ Tel _____

Data do Nascimento: ____/____/____

Responsável pela entrevista _____

Variáveis socioeconômicas

Escolaridade materna: não estudou () EF incompleto () Ensino fundamental (EF) ()

Ens. Médio incompleto () Ens. Medio () Ensino Superior ()

Renda familiar: meio salário mínimo () 1 salário mínimo () 1-2 Salários mínimos ()

3-4 salários mínimos () 5 salários mínimos ou mais ()

História Familiar de Alergia: Mãe: Sim () Não () Pai: Sim () Não () Irmão: Sim () Não ()

Tabagismo passivo: alguém fuma dentro de casa Sim () Não ()

Sexo: masculino () Feminino () Peso ____ Estatura ____ IMC ____ (Kg / m²)**Questionário 1 (asma)**

1. Alguma vez na vida seu (sua) filho (a) teve sibilos (cansaço, chiado no peito)?

Sim () Não () se você respondeu Não, passe para a questão número 6.

2. Nos últimos 12 meses, seu (sua) filho (a) teve sibilos (cansaço, chiado no peito)?

Sim () Não ()

3. Nos últimos 12 meses, quantas crises de sibilos (cansaço, chiado no peito) seu (sua) filho (a) teve?

4. Nos últimos 12 meses, com que frequência, seu (sua) filho (a) teve sono perturbado por chiado no peito?

() nunca acordou com chiado ; Menos de 1 noite por semana () ; 1 ou mais noites por semana ()

5. Nos últimos 12 meses, seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que seu (sua) filho (a) conseguisse dizer mais de 2 palavras entre cada respiração?

Sim () Não ()

6 Alguma vez seu (sua) filho (a) teve asma? Sim () Não ()

7. Nos últimos 12 meses teve chiado no peito após exercícios físico? Sim () Não ()

8. Nos últimos 12 meses teve seu (sua) filho (a) teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou infecção respiratória? Sim () Não ()

Questionário 2 (rinite alérgica)

Todas as perguntas são problemas que ocorrem quando você não estava gripado ou resfriado.

1. Alguma vez na vida seu (sua) filho (a) teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?

Sim () Não () Se a resposta foi Não, passe para a questão 6

2. Nos últimos 12 meses seu (sua) filho (a) teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?

Sim () Não () Se a resposta foi Não, passe para a questão 6

3. Nos últimos 12 meses, esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?

Sim () Não ()

4. Em qual dos últimos 12 meses esse problema nasal ocorreu? (Por favor marque em qual ou quais meses isto ocorreu)

() Janeiro () fevereiro () Março () Abril () Maio () Junho () Julho () Agosto ()

Setembro () Outubro () Novembro () Dezembro ()

5. Nos últimos 12 meses, quantas vezes as atividades diárias do seu (sua) filho (a) atrapalhadas por esse problema nasal?

() Nada () Um pouco () Moderado () Muito

6 Alguma vez na vida seu (sua) filho (a) teve Rinite?

Sim () Não ()

ANEXO C - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estudo da associação entre infecção por enteroparasitas e a gravidade das alergias de vias respiratórias: avaliação da resposta imune celular e humoral em crianças de área urbana, Recife, Pernambuco no período de 2012-2014

Área Temática:

Pesquisador: Valdênia Maria Oliveira de Souza

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

CAAE: 01486912.5.0000.5208

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 31639

Data da Relatoria: 28/05/2012

Apresentação do Projeto:

Existem evidências que a infecção parasitária pode alterar a reatividade alérgica, especialmente em infecção por helmintos. Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem o desenvolvimento de imunidade adquirida em indivíduos previamente infectados com *Giardia lamblia*. Contudo, a interrelação entre a imunidade celular e as doenças alérgicas de vias respiratórias em indivíduos com esta protozoose é pouco conhecida. Com relação aos geohelmintos, observou-se que a infecção com *Ascaris lumbricoides*, diminuiu a intensidade dos testes cutâneos e do quadro alérgico de asma. Este trabalho tem como objetivo: Verificar se existe associação entre infecção por *Giardia lamblia* ou *A. lumbricoides* e a gravidade da asma em crianças. Para isto, crianças de 2-10 anos de idade, moradoras do grande Recife, serão selecionadas a partir de história clínica (sintomatologia de doenças alérgicas e questionário) e teste cutâneo de puntura no ambulatório de alergia e pediatria do Hospital das Clínicas-UFPE. As crianças alérgicas selecionadas serão submetidas a uma análise da gravidade da doença, coleta de sangue e fezes. Será realizada a dosagem de IgE no soro e cultivo de células par dosagem de citocinas. É esperado que presença de IL-17 durante a infecção pela *G. lamblia* e associação com o agravamento da asma, com a geração de um perfil de Th17 em pacientes alérgicos. Por outro lado, associar o perfil Th2 (elevação da IgE e IL-4) devido a infecção com geohelmintos, no quadro de asma grave.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral Verificar se existe associação entre infecção por *Giardia lamblia*, *A. lumbricoides* a gravidade da asma em crianças. Comparar os valores de eosinófilos e neutrófilos, o perfil de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17) e os níveis séricos de IgE (Total e Específica) nos pacientes com asma (grave e leve) e sem asma com e sem *G. lamblia* ou *A. lumbricoides*.

1.5.2 Objetivos Específicos

1. Comparar os pacientes com asma grave, leve e sem asma quanto à frequência de infecção por *G. lamblia*
2. Comparar os pacientes com asma

Trata-se de projeto de pesquisa com interesse clínico em problema de saúde bastante frequente em regiões mais pobres de países em desenvolvimento, como o Brasil. A equipe de pesquisadores é formada por pessoas de qualidade técnica e científica qualificada para o trabalho proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE é apresentado em formato de convite, contendo todas as informações necessárias ao bom entendimento do que será realizado no projeto. Orçamento bem dimensionado. Cartas de anuência do HC-UFPE e LIKA-UFPE. Nota-se a ausência de cronograma de atividades, bem como o não comprometimento com o custeio do projeto. Além do mais é informado que o projeto poderá ser adiado ou suspenso devido a intercorrências externas.

Recomendações:

Apresentar um cronograma de atividades para melhor acompanhamento do projeto; retirar do projeto a parte que diz não garantir seu término; justificar a fonte de custeio do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendidas as pendências relatadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado considera aprovado o parecer do presente protocolo para início da coleta de dados. Projeto foi avaliado e a APROVAÇÃO definitiva do projeto será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE

RECIFE, 04 de Junho de 2012

Assinado por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO