UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

JOANEMILE PACHECO DE FIGUEIREDO

TESE DE DOUTORADO

IgE e IgG4 na Susceptibilidade e Resistência à Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e no Desenvolvimento da Asma

Salvador - Bahia
2012

JOANEMILE PACHECO DE FIGUEIREDO

IgE e IgG4 na Susceptibilidade e Resistência à Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e no Desenvolvimento da Asma

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araujo

Salvador - Bahia
2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI - UFBA.

F475 Figueiredo, Joanemile Pacheco

IgE e IgG4 na susceptibilidade e resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni* e no desenvolvimento da asma/ Joanemile Pacheco de Figueiredo. – Salvador, 2012.

137 f.

Orientadora: Profª. Drª Maria Ilma Andrade Santos Araujo

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Esquistossomose. 3. Asma. 4. Resistência. I. Araujo, Maria Ilma Andrade Santos. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU: 616.995.122

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE DA DOUTORANDA **Joanemile Pacheco de Figueiredo**

Aos vinte e três dias do mês de março do ano de 2012 às 14 horas no auditório III, segundo andar no Instituto de Ciências da Saúde, se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra **Maria Ilma Andrade Santos Araujo** orientadora, Dr. **Mario Adriano dos Santos**, Dra. **Maria Luiza Brito de Sousa Atta**, Dra. **Neuza Maria Alcântara Neves**, Dr. **Sérgio Costa Oliveira**, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado: "**IgE e IgG4 na Susceptibilidade e Resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni* e no desenvolvimento da Asma**" da doutoranda, **Joanemile Pacheco de Figueiredo**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a Doutoranda teve a sua defesa de Tese APROVADA emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, e lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela Doutoranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, vinte e três de março do ano de dois mil e doze.

Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araujo
Orientadora

Dr. Mario Adriano dos Santos
Banca Examinadora

Dra. Maria Luiza Brito de Sousa Atta
Banca Examinadora

Dra. Neuza Maria Alcântara Neves
Banca Examinadora

Dr. Sérgio Costa Oliveira
Banca Examinadora

Joanemile Pacheco de Figueiredo
Doutoranda

Profa. Dra. Silvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm
Em exercício

Avenida Reitor Miguel Calmon, S/N – Vale do Canela, CEP: 40.110-100, Salvador – Bahia – Brasil
Tel: (71) 3247-6269 /32838921 e-mail: ppgimics@ufba.br / Site: www.ppgim.ufba.br

Dedico este trabalho à tia e madrinha Marlene que me faz sonhar, desde minha infância, com suas "experiências" de vida.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Maria Ilma Araujo, orientadora e amiga, pelo incentivo e pela confiança em meu trabalho. Exemplo de pesquisadora, a sua competência e generosidade em compartilhar seus conhecimentos me despertam profunda admiração.

A Dr. Edgar Carvalho, pelos ensinamentos e por ter me dado a oportunidade de participar do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos.

A Ricardo Riccio Oliveira pelo carinho, cumplicidade, apoio inestimável e colaboração em todas as etapas deste trabalho, especialmente pelo auxílio nas análises estatísticas dos resultados.

Aos amigos e colegas de profissão Cecília Almeida e Regis Campos, pelas palavras de incentivo e pelo carinho sempre demonstrado.

A todos os colegas do Serviço de Imunologia do HUPES, em especial Luciana Cardoso, Milena Latrilha, Rafael Jabar, Luciane Mota, Robson Paixão, Andreia Barreto e Aline Bafica.

Aos funcionários do Serviço de Imunologia do HUPES, pelo entusiasmo em colaborar, tornando o ambiente de trabalho sempre muito agradável.

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

A Secretaria de Saúde do município do Conde, e às agentes de saúde Adaliundes Conceição, Luciana Quintela e Ivanice Santos, que sempre colaboraram de forma prestativa e foram fundamentais para a realização deste estudo e aos pacientes envolvidos neste trabalho.

Aos amigos, de modo geral, por influenciarem minha vida e por se alegrarem comigo nesta conquista.

A minha família, em especial minha mãe Marly Pacheco por sempre acreditar em minha capacidade e pelo incentivo na realização dos meus objetivos e minha filha Julia, pela recompensa que é o seu sorriso quando chego em casa.

A Deus, minha rocha firme.

"...De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre recomeçando;
a certeza de que precisamos continuar;
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar.
Portanto, devemos fazer:
da interrupção, um caminho novo;
da queda, um passo de dança;
do medo, uma escada;
do sonho, uma ponte;
da procura, um encontro..."

Fernando Sabino

RESUMO

A esquistossomose é uma doença de grande impacto na saúde pública dos países em desenvolvimento. As principais ações de controle da transmissão da doença são através da educação, melhorias no saneamento e campanhas de tratamento em massa. O desenvolvimento de vacina representa uma importante estratégia para o controle da mesma, entretanto, ainda não foi desenvolvida vacina que confira proteção adequada contra a infecção humana. Por outro lado, há evidências que infecções crônicas parasitárias, especialmente pelo *S. mansoni*, protegem contra as alergias. Com o objetivo de esclarecer o papel da IgE e IgG4 na indução de resistência/susceptibilidade à infecção pelo *Schistosoma mansoni* e no risco de desenvolvimento de asma foi avaliado, em uma grande casuística, indivíduos de área endêmica em esquistossomose do interior da Bahia. Foi observado que a razão entre IgE/IgG4 para antígeno solúvel de verme adulto do *S. mansoni* (SWAP) foi maior nos indivíduos não infectados ou com baixas cargas, quando comparado aos indivíduos altamente infectados. A carga parasitária de *S. mansoni* foi positivamente correlacionada com os níveis de IgE total, de IgG4 específico para SWAP e para o antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (SEA). Os valores dos anticorpos e a razão entre eles, não interferiram, entretanto, no risco de reinfecção seis meses após o tratamento da parasitose. Adicionalmente, os indivíduos não infectados pelo *S. mansoni*, apresentaram níveis mais elevados de IgE específico e da razão IgE/IgG4 para antígeno 1 do *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1), quando comparado aos infectados, enquanto que não foi observado diferença significativa nos níveis de IgG4 específico entre os dois grupos. Essas diferenças, no entanto, não foram observadas quando as análises foram ajustados para idade, gênero e grau de exposição à água contaminada. Estes resultados ressaltam o papel fundamental da IgG4 específica para antígenos do *S. mansoni* e da relação IgE/IgG4 na resistência/susceptibilidade à infecção por este helminto. Por outro lado, é possível que a infecção pelo *S. mansoni* proteja contra o desenvolvimento da asma, modulando negativamente a produção de anticorpos que participam da resposta inflamatória alérgica. O melhor entendimento do papel da resposta imune humoral na resistência à infecção pelo *S. mansoni* e no controle da asma pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias de controle destas doenças.

Palavras-chave: *S. mansoni;* IgE, IgG4, resistência, susceptibilidade, asma

ABSTRACT

Schistosomiasis is a disease of high impact in the public health in developing countries. The main measures for transmission control are education, sanitation improvement, or through mass treatment programs. The development of a vaccine is an important alternative strategy for the schistosomiasis control; however no suitable vaccine that confers protection against human infection has yet been developed. On the other hand, there are evidences that chronic parasite infections, especially by *Schistosoma mansoni*, protect against allergy. In order to elucidate the role of IgE and IgG4 in inducing resistance/susceptibility to infection by *S. mansoni* and the risk of developing asthma, individuals from a schistosomiasis endemic area in Bahia were evaluated in a large casuistic. It was observed that the soluble adult worm of *S. mansoni* (SWAP)-specific IgE/IgG4 ratio was higher in uninfected or lightly infected subjects than heavily infected ones. Moreover, *S. mansoni* parasite load was positively correlated with the levels of total IgE and with the levels of SWAP and of *S. mansoni* soluble egg antigen (SEA) specific-IgG4. Nevertheless, the levels of antibodies and the ratio IgE/IgG4 six months after anthelminthic treatment did not affect the risk of *S. mansoni* reinfection. Additionally, *Dermatophagoides pteronyssinus antigen* 1 (Der p1)-specific IgE and IgE/IgG4 ratio were higher in uninfected than in infected individuals, whereas no significant difference was observed in the levels of parasite-specific IgG4 between the two groups. These differences, however, were not observed when the analyses were adjusted for age, gender and for the level of exposure to the contaminated water. These results highlight the important role that IgG4 and IgE/IgG4 ratio specific for *S. mansoni* antigens play in the resistance/susceptibility for *S. mansoni* infection. Furthermore, it is possible that infection with *S. mansoni* protects against the development of asthma, by modulating the production of antibodies which participate in the allergic inflammatory response. The better understanding of the role of the humoral immune response in the resistance to *S. mansoni* infection and in asthma control could be useful for the development of news strategies for controlling these diseases.

Key words: *S. mansoni;* IgE, IgG4, resistance, susceptibility, asthma

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma do Estudo 37

Figura 2. Prevalência e carga parasitária da infecção pelo *S. mansoni* distribuído por faixa etária na população estudada do município do Conde-Bahia. 44

Figura 3. Níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP (A) e carga parasitária de *S. mansoni* em indivíduos altos e baixos produtores de IgG4 específico para SWAP (B), residentes do município do Conde-Bahia 47

Figura 4. Níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP de acordo com o gênero (A e B), faixa etária (C e D) e exposição referida à água do rio (E e F) em residentes do município do Conde-Bahia. 49

Figura 5. Distribuição dos níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA em residentes do município do Conde-Bahia. 50

Figura 6. Níveis de IgE e IgG4 específicos para SEA de acordo com o gênero (A e B), faixa etária (C e D) e exposição referida à água do rio (E e F) em residentes do município do Conde-Bahia. 52

Figura 7. Correlação entre carga parasitária e níveis de IgE total (A), IgE (B) e IgG4 (C) específicos para SWAP e IgE (D) e IgG4 (E) específicos para SEA em residentes do município do Conde-Bahia. 53

Figura 8. Razão de IgE/IgG4 específicos para SWAP (A) e SEA (B) de acordo com categoria de carga parasitária em residentes do município do Conde-Bahia 54

Figura 9. Frequência de reinfecção pelo *S. mansoni* (A) e carga parasitária (B) antes e seis meses após tratamento com Praziquantel em residentes do município do Conde-Bahia. 57

Figura 10. Níveis de IgE (A) e IgG4 (B) específicos para SWAP antes e seis meses após tratamento com Praziquantel em residentes do município do Conde-Bahia 58

Figura 11. Níveis de IgE (A) e IgG4 (B) específicos para SWAP entre os indivíduos que se reinfectaram e não se reinfectaram após tratamento com Praziquantel 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas, exposição referida à água do rio e infecções por helmintos em residentes do município do Conde-Bahia 43

Tabela 2. Análises univariada e multivariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e idade, gênero e coinfecção com outros helmintos em residentes do município do Conde-BA 45

Tabela 3. Análise univariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e níveis de exposição à água do rio em residentes do município do Conde-Bahia 46

Tabela 4. Análise univariada e multivariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e níveis de IgE total e IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA antes do tratamento com Praziquantel em residentes do município do Conde-Bahia 56

Tabela 5. Análise univariada e multivariada da associação entre reinfecção pelo *S. mansoni* seis meses após o tratamento com Praziquantel e idade, gênero e carga parasitária para *S. mansoni* em residentes do município do Conde-Bahia 59

Tabela 6. Análise univariada e multivariada da associação entre reinfecção pelo *S. mansoni* e níveis de IgE total, IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA antes e após o tratamento com Praziquantel, em residentes do município do Conde-Bahia 60

Tabela 7. Análises univariada e multivariada da associação entre asma e idade, gênero e infecção por helmintos em residentes do município do Conde-Bahia 63

Tabela 8. Análise univariadas e multivariada da associação entre asma e níveis de IgE total, IgE e IgG4 específicos para Der p1 em residentes do município do Conde-Bahia..... 64

Tabela 9. Análise univariada e multivariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e frequência de asma, níveis de IgE e IgG4 específicos para Der p1 em residentes do município do Conde-Bahia 66

Tabela 10. Análise univariadas e multivariada da associação entre asma e níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA em residentes do município do Conde-Bahia..... 67

Tabela 11. Análises univariadas e multivariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e níveis dos anticorpos em asmáticos residentes do município do Conde-Bahia..... 68

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAC	Antígenos anódicos circulantes
BSA	Fração V de albumina bovina
CD	Molécula de superfície celular (C*lusters of Diferenciation*)
Der p1	Alérgeno 1 de *Dermatophagoides pteronyssinus*
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
FcεRI	Receptor de alta afinidade para porção Fc da Imunoglobulina E
FcεRII	Receptor de baixa afinidade para porção Fc da Imunoglobulina E
HLA	Antígeno de histocompatibilidade leucocitária
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ISAAC	Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância (*International Study of asthma and allergy in childhood*)
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
OPG	Ovos por grama de fezes
OR	Razão de Chances (*Odds Ratio*)
PBS	Tampão salina fosfato
RF	Fator reumatóide
SEA	Antígeno solúvel do ovo de *Schistosoma mansoni*
STEG	Antígeno solúvel do tegumento do esquistossômulo de *Schistosoma sp*
SWAP	Antígeno solúvel do verme adulto de *Schistosoma mansoni*
$TCD4^+$	Células T auxiliares

Th1	Linfócito T auxiliador (*Helper*) 1
Th2	Linfócito T auxiliador (*Helper*) 2
Th17	Linfócito T auxiliador (*Helper*) 17
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
α	Símbolo Grego - Alfa
β	Símbolo Grego - Beta
γ	Símbolo Grego - Gama

SUMÁRIO

1. Revisão de literatura 15
1.1. Epidemiologia e imunopatogênese na Esquistossomose 15
1.2. Epidemiologia e imunopatogênese da Asma 21
1.3. Associação entre alergia e helmintíases 24
1.4. Resposta imune humoral envolvida na infecção pelo *S. mansoni* e na atopia 26
2. Justificativa 32
3. Hipótese 33
4. Objetivos 34
4.1. Objetivo geral 34
4.2. Objetivos específicos 34
5. Material e métodos 35
5.1. Seleção de indivíduos de áreas endêmicas em *S. mansoni* 35
5.1.1. Critérios de inclusão 36
5.1.2. Critérios de exclusão 36
5.2. Avaliação laboratorial e clínica 38
5.2.1. Exame parasitológico de fezes 38
5.2.2. Dosagem de IgE total e IgE e IgG4 específicas para SWAP, SEA e Der p1 38
5.2.3. Avaliação do grau de exposição à água contaminada do rio 39
5.3. Análise estatística 40
5.4. Considerações éticas 41
6. Resultados 42
6.1. Resultados referentes aos objetivos específicos 1 e 2 42
6.1.1. Características da população 42
6.1.2. Produção de IgE total e IgE e IgG4 específicas para o antígeno solúvel do verme adulto (SWAP) e do ovo (SEA) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* 46
6.1.3. Produção de IgE e IgG4 específica para antígeno de verme adulto (SWAP) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* após tratamento com Praziquantel 56
6.2. Resultados referentes ao objetivo específico 3 62
6.2.1. Características demográficas e infecções helmínticas nos indivíduos asmáticos e não asmáticos da área endêmica em infecção pelo *S. mansoni* 62
6.2.2. Níveis de anticorpos em asmáticos de área endêmica em infecção pelo *S. mansoni* 64

7. Discussão 69
8. Sumário dos Resultados 81
9. Conclusão 84
10. Referências Bibliográficas 85
11. Anexos 94
Anexo I – Questionário ISAAC 94
Anexo II – Questionário de exposição à água do rio 97
Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 98
Anexo IV – Manuscrito submetido 100
Anexo V – Outras publicações 128

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. EPIDEMIOLOGIA E IMUNOPATOGÊNESE NA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença parasitária tropical causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. As principais espécies que infectam o homem são: *S. mansoni*, causando esquistossomose intestinal e hepática na África, península Arábica e América do Sul; *S. haematobium*, causando esquistossomose urinária na África e península Arábica; e *S. japonicum*, responsável pela esquistossomose intestinal e hepatoesplênica na China, Filipinas e Indonésia. O *S. intercalatum* e *S. mekongi* são outras espécies que têm apenas importância local na África ocidental e sudeste asiático, respectivamente (Hotez et al. 2004).

Diferente de outros trematódeos, os vermes adultos do *Schistosoma* apresentam dimorfismo sexual. O corpo do macho forma um canal ginecóforo onde mantém a fêmea, maior e menos espessa. O *Schistosoma* vive entre o plexo venoso perivesical (*S. haematobium*) ou mesentérico (demais espécies). Eles se alimentam de sangue e globulinas através de glicólise anaeróbica, regurgitando seus resíduos no sangue do hospedeiro. Cada fêmea é capaz de produzir centenas a milhares de ovos por dia, cada um dos quais possui um miracídio ciliado no seu interior. Estes ovos, secretados pela urina (*S. haematobium*) ou fezes (demais espécies) podem permanecer viáveis por até sete dias. Em contato com água, os miracídios são liberados dos ovos e, guiados pela luz e por estímulos químicos, procuram pelo seu hospedeiro intermediário, o caramujo aquático do gênero *Biomphalaria* (*S. mansoni*), *Bulinus* (*S. haematobium*) ou *Oncomelania* (*S. japonicum*). Quatro a seis semanas após a infecção do caramujo inicia-se a liberação de cercárias, as quais podem permanecer livres na água, com longevidade por até 48 horas. Um caramujo infectado por um único miracídio pode liberar milhares de cercárias diariamente. Ao encontrar o hospedeiro definitivo, a cercária penetra na pele, transformando-se em esquistossômulo, ganha a circulação, realizando o ciclo

pulmonar e migra para o fígado. Os vermes amadurecem de 4 a 6 semanas na região portal e migram para o plexo perivesical ou mesentérico, iniciando novamente o ciclo (McManus & Loukas 2008). A média de vida do verme adulto no hospedeiro definitivo é de 3 a 5 anos, podendo sobreviver por até 30 anos após a infecção. O potencial reprodutivo teórico de um verme adulto chega a 600 bilhões de ovos.

Alguns autores têm avaliado diferentes formas de aferir o nível de exposição à água do rio contaminada, uma vez que a transmissão da esquistossomose depende exclusivamente do contato com água onde existam caramujos infectados (Dessein et al. 1988, Friedman et al. 2001, Gazzinelli et al. 2001, Lima e Costa et al. 1987). Existem dois métodos principais utilizados para tal fim: a observação direta e o uso de questionários que captam informações quanto ao motivo e frequência de cada contato. Entretanto, ambos apresentam vantagens e desvantagens. A observação direta costuma alterar o comportamento natural das pessoas quanto ao contato com a água devido à presença de um observador, além de subnotificar contatos que se dão fora do campo de visão ou do período de trabalho do observador (Fulford et al. 1996, Kloos et al. 1998). Por outro lado, a utilização de questionários pode estar sujeita a viés de informação, principalmente quando se deseja colher dados sobre a frequência e duração de cada contato (Sama & Ratard 1994). Aparentemente, a melhor forma de se fazer a medida do contato com a água contaminada é através de uma observação prévia, para se conhecer os tipos e motivos de contatos na região, associado à elaboração posterior de um questionário aplicado aos hábitos e costumes da população alvo (Friedman et al. 2001, Gazzinelli et al. 2001). O nível de exposição à água do rio contaminada tem sido expresso tanto em categorias de nível de exposição baixo, moderado e alto (Dessein et al. 1988), quanto numericamente através de índices que são calculados a partir da informação sobre o tipo de contato como lavar roupas, banho, pescar, etc. e a frequência em número de vezes ao dia, semana ou mês (Lima e Costa et al. 1987).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a esquistossomose é classificada como uma das 15 Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN). As DTN são assim chamadas por terem sido amplamente eliminadas das áreas mais desenvolvidas, persistindo nas comunidades mais pobres e marginalizadas sendo, na maioria das vezes, negligenciadas pela saúde pública. A esquistossomose é um problema de saúde relacionado à pobreza, altamente prevalente em países tropicais em desenvolvimento. Entre as doenças parasitárias, a esquistossomose assume o segundo lugar em termos de importância socioeconômica e de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais. Estimativas mais recentes indicam que 200 milhões de indivíduos estão afetados, com mais de 700 milhões de pessoas em risco de infecção, vivendo em áreas com deficiência na distribuição de água encanada e com precárias condições sanitárias (Steinmann et al. 2006).

A infecção pelo *S. mansoni* é endêmica em 52 países e territórios da América do Sul, Caribe, África e Mediterrâneo Oriental, além de estar presente também em mais 41 países da África e Mediterrâneo Oriental juntamente com o *S. haematobium* (WHO 2006). Atualmente, a esquistossomose no Brasil se distribui em uma ampla área endêmica que vai do Maranhão ao Espírito Santo, incluindo Minas Gerais. Focos isolados da transmissão ocorrem também no Distrito Federal e nos estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Adicionalmente, existem casos importados de áreas endêmicas que são registrados em quase todo território nacional, especialmente em estados considerados como pontos de migração, como é o caso de Rondônia (Coura & Amaral 2004).

O Ministério da Saúde criou em oito estados do Nordeste brasileiro, o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) em 1976, com a finalidade principal de reduzir a prevalência da esquistossomose no Brasil. As ações do programa incluíam tratamento em massa com Oxamniquine, aplicação regular de moluscicida em focos de transmissão importantes, educação sanitária, bem como melhora das condições sanitárias e de

abastecimento de água. O acompanhamento da eficácia deste programa não foi realizado utilizando a metodologia mais adequada, visto que a prevalência de esquistossomose foi avaliada de forma pontual em determinadas localidades, através da consulta ao Banco de Dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS), a qual representa apenas uma pequena parcela da população de uma quantidade reduzida de municípios. Apesar disto, os dados obtidos entre os anos de 1977 e 1979 demonstraram uma redução dramática de 23,3% a 9,0% na prevalência de esquistossomose, a qual continuou a reduzir de forma menos gradativa e irregular até atingir níveis de 5,4% em 2002. Um dos principais resultados obtidos com este programa, entretanto, foi a redução significativa e contínua na mortalidade e no número de hospitalizações por esquistossomose, provavelmente em função dos repetidos tratamentos em massa e individuais realizados durante o período (Coura & Amaral 2004). Mesmo assim, ainda existem áreas isoladas, mas de grande endemicidade até os dias atuais, com prevalência acima de 50% de indivíduos infectados (Araujo et al. 2004, Gazzinelli et al. 2006).

O principal impacto da infecção crônica pelo *S. mansoni* na saúde pública está relacionado ao envolvimento intestinal e hepatoesplênico. Cerca de 5 a 10% dos indivíduos infectados por este helminto evoluem para a forma grave da doença, caracterizada pela fibrose hepática, hipertensão periportal e consequente ascite e formação de varizes esofágicas e gástricas, que podem complicar com hemorragia digestiva e morte (Bina 1997). Este quadro está associado à impactação de ovos nos espaços porta do fígado, levando à formação de granulomas, que são caracterizados pela reação inflamatória aos antígenos do ovo, seguida da produção de colágeno, evoluindo com fibrose local (Pearce 2005). Apesar do baixo custo e eficácia do tratamento, a transmissão da infecção continua elevada, em parte devido aos índices de reinfecção precoces após quimioterapia curativa.

Três a sete semanas após a primeira exposição à água do rio contaminada inicia-se a fase aguda da doença, conhecida como síndrome toxêmica (de Jesus et al. 2002, Lambertucci

2010, Rabello et al. 1997). Esta fase é caracterizada principalmente por febre, astenia e acentuada perda de peso, associadas à elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina (IL) 1 e IL-6. Dispneia e dor torácica também têm sido descritas em decorrência da pneumonite e pericardite, relacionadas com níveis elevados de complexos imunes circulantes e reação de hipersensibilidade tipo III (de Jesus et al. 2002, Galvao-Castro et al. 1981). Adicionalmente, dor abdominal e diarreia são frequentes nesta fase e coincidem com o início da postura dos ovos, causando destruições focais na mucosa e submucosa intestinal. A despeito da elevação dos níveis de IgE nesta fase, não há evidência de broncoespasmo e não há associação dos níveis de IgE com manifestações respiratórias. Esta fase aguda é raramente encontrada em pessoas residentes em áreas endêmicas, sendo mais comum em indivíduos expostos pela primeira vez à infecção, sugerindo que a modulação da resposta imune que ocorre após a fase aguda previne o aparecimento destas manifestações nos indivíduos previamente infectados (Lambertucci 1993, Rabello 1995, Wynn et al. 1998).

A resposta imune na fase inicial da infecção pelo *S. mansoni* é do tipo T auxiliar (Th) 1, com produção de interferon gama (IFN-γ) e também de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do TNF-α, IL-6 e IL-1 (de Jesus et al. 2002, Montenegro et al. 1999, Wynn et al. 1998). Esta resposta é então modulada de forma que na fase crônica a resposta é do tipo Th2 regulatória, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10, com baixos níveis de IFN-γ (Araujo et al. 1996, Finkelman et al. 1997, Mwatha et al. 1998). Esta mudança no padrão de resposta tem sido relacionada à produção de IL-4 e IL-10 induzida por antígenos do ovo, desde que coincide com o início da oviposição (Montenegro et al. 1999, Silveira et al. 2004).

A patologia observada na infecção pelo *S. mansoni* está intimamente relacionada à resposta imune aos antígenos parasitários (Wilson et al. 2007). Do ponto de vista clínico e imunopatológico, as fases aguda e crônica da doença são bastante distintas (de Jesus et al.

2002, Lambertucci 1993). Na fase crônica são descritas três formas clínicas bem caracterizadas: as formas mais brandas da doença, chamadas intestinal e hepato-intestinal, e a forma mais grave ou hepato-esplênica (Bina & Prata 2003). Vários fatores parecem estar envolvidos na patogênese da esquistossomose e evolução para as formas graves da doença, a exemplo do tipo de HLA (Secor et al. 1996), pertencer à raça branca (Prata 1988, Tavares-Neto & Prata 1990), a alta carga parasitária (Sleigh et al. 1985) e a resposta imune do hospedeiro (Wynn & Cheever 1995).

A resposta inflamatória ao redor dos ovos constitui o fator mais importante na patogênese da esquistossomose mansoni crônica (Abath et al. 2006). Os antígenos liberados pelos ovos estimulam as células $TCD4^+$ a produzirem citocinas que promovem o recrutamento celular (Finkelman et al. 1997, Grzych et al. 1991). Estas reações induzem a formação de granuloma ao redor dos ovos, o qual possui importância na proteção do hospedeiro aos produtos difusíveis dos mesmos, capazes de lesar os hepatócitos. Os granulomas servem, então, como uma barreira de contensão para os antígenos dos ovos do *S. mansoni*. Porém, quando ocorre deposição de numerosos ovos, o processo inflamatório pode evoluir para fibrose grave, o que leva à interrupção do fluxo sanguíneo normal do sistema venoso para os sinusóides resultando em hipertensão portal e suas complicações, a exemplo de formação de varizes gástricas e esofágicas que podem levar a sangramentos (Cheever et al. 2000). As lesões mais antigas transformam-se em cicatrizes periportais denominadas fibrose em “cachimbo de barro” de Symmers, que é particularmente bem demarcada na infecção causada pelo parasito (Cheever & Andrade 1967). Existem alguns trabalhos na literatura que sugerem ser a infecção crônica por helmintos, particularmente pelo *S. mansoni*, protetora contra o desenvolvimento de alergias, com a produção elevada de células e citocinas do tipo regulatória, que preveniria o processo inflamatório nestas doenças (Cardoso et al. 2011, Mpairwe et al. 2011).

1.2. EPIDEMIOLOGIA E IMUNOPATOGÊNESE DA ASMA

A asma é uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiper-reatividade (HR) das vias aéreas inferiores e por limitação variável ao fluxo aéreo, reversível, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispneia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar. A inflamação brônquica constitui o mais importante fator fisiopatogênico da asma. O diagnóstico da doença é baseado na história clínica do paciente e exame físico. Alguns exames complementares, a exemplo da prova de função pulmonar, podem auxiliar no diagnóstico e definir a gravidade da doença (ASBAI/SBPT/SBP 2006).

Apesar de existir muitos estudos determinando a prevalência de asma em determinadas regiões ou países, a grande maioria dos mesmos não pode ser utilizado para fornecer uma noção da real prevalência de asma no mundo, em virtude principalmente da falta de padronização na metodologia e nas definições de caso. O primeiro estudo a apresentar uma metodologia mais adequada para este fim foi o “Estudo da Saúde Respiratória na Comunidade Européia” (ECRHS), o qual avaliou a prevalência de asma e rinite alérgica em adultos de 20 a 44 anos de idade de 48 centros localizados em 22 países, dos quais apenas seis não pertenciam à Europa Ocidental (Burney et al. 1997, Burney et al. 1994, ECRHS 1996). A despeito da metodologia adequada, os resultados deste estudo ainda não foram capazes de gerar informações quanto à prevalência mundial de asma, visto que os dados se referem quase que exclusivamente à Europa. Desta forma, o “Estudo Internacional de Asma e Alergias na Infância” (ISAAC) elaborou questionários padronizados com o objetivo de permitir comparações da prevalência de asma, rinoconjuntivite alérgica e eczema atópico em populações de diferentes países, além de avaliar a variação da prevalência com o passar do tempo (Asher et al. 1995, Ellwood et al. 2005).

De forma geral, considerando-se importantes exceções, pode-se afirmar que os maiores índices de prevalência de asma são encontrados em países desenvolvidos, como Austrália, Estados Unidos e Canadá, enquanto as menores taxas são encontradas em países ainda em desenvolvimento, como a Índia e Indonésia (ISAAC 1998). De acordo ainda com o estudo ISAAC a prevalência média de sintomas de asma entre crianças de 6-7 e 13-14 anos de idade no Brasil foi 24,3 e 19,0%, respectivamente (Sole et al. 2006).

O termo alergia refere-se a certas doenças nas quais ocorrem respostas imunológicas a antígenos ambientais, causando inflamação tecidual através da disfunção orgânica. Além disso, as doenças alérgicas resultam da interação de fatores genéticos, ambientais e culturais que levam a exposição aos alérgenos e ao desenvolvimento e manutenção dos sintomas (Flohr et al. 2008). Os indivíduos susceptíveis a reações de hipersensibilidade imediata são chamados de atópicos (Johansson et al. 2004). Os níveis séricos de IgE total e específicos para aeroalérgenos nestes indivíduos são, em média, mais elevados do que naqueles não atópicos (Busse & Lemanske 2001).

No processo de hipersensibilidade imediata, a sequência típica de eventos consiste na exposição do indivíduo a alérgenos do ambiente, interação com o sistema inato por meio das células apresentadoras de antígenos, seguido da ativação de células Th2 específicas para esse antígeno, com a consequente produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (Blackburn et al. 2003). A IL-4 estimula a produção de IgE, que liga-se à receptores de IgE de alta afinidade presentes nos mastócitos e basófilos, que em contato subsequente com o alérgeno, promovem a liberação de mediadores da inflamação (Haile et al. 1999). As citocinas IL-4 e IL-13 estão associadas à estimulação da produção de IgE, expressão do FcεRII, receptor de IgE de baixa afinidade, e moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II, regulação de moléculas de adesão vascular nos eosinófilos, mastócitos e basófilos, além da estimulação da produção de quimiocinas. A ação dos mediadores inflamatórios liberados ou ativados pelos

mastócitos e basófilos, a exemplo da histamina, prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária são importantes na fisiopatologia das fases imediata e tardia das doenças atópicas (Holgate et al. 1985, Platts-Mills & Wheatley 1996).

Após a indução da resposta imunológica, muitas células presentes na mucosa brônquica, como macrófagos, células epiteliais, fibroblastos, células do músculo liso, células T, mastócitos e eosinófilos, são ativadas e envolvidas no processo inflamatório da asma. Porém, são os basófilos, mastócitos e eosinófilos ativados, as células de maior importância na inflamação alérgica devido à liberação de proteínas catiônicas granulares de alta carga, como a proteína básica principal eosinofílica, proteína catiônica eosinofílica e mediadores pró-inflamatórios que, juntamente com radicais livres de oxigênio e citocinas, resultam em aumento da permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, contração da musculatura lisa, dano epitelial e hiper-reatividade brônquica (Gleich et al. 1993).

Embora o principal fator de patogenia das doenças alérgicas esteja ligado a uma exacerbação da resposta do tipo Th2, com produção de IL-4, IL-5 e IL-13, observa-se também, em indivíduos asmáticos, a produção de IL-17, citocina pró-inflamatória (Iwakura & Ishigame 2006, Rutitzky et al. 2005) e INF-γ, citocina do tipo Th1, associadas ao agravamento do quadro clínico (Cho et al. 2005, Smart & Kemp 2002). Isso sugere que na asma brônquica tanto a resposta Th2 quanto a resposta Th1 e Th17 podem coexistir (Araujo & de Carvalho 2006), o que deve resultar de uma falta de regulação do sistema imunológico.

Dessa forma, a infecção por helmintos, particularmente o *S. mansoni*, ao tempo em que induz mecanismos regulatórios da resposta imune pode conter ou minimizar a patogenia associada às doenças alérgicas (van den Biggelaar et al. 2004).

1.3. ASSOCIAÇÃO ENTRE ALERGIA E HELMINTÍASES

As infecções por helmintos, altamente prevalentes em vários países do mundo, vêm tornando-se objeto de interesse entre os imunologistas, especialmente *Schistosoma*, por apresentarem duas características dominantes: primeiro, elas são indutoras eficientes de resposta imune do tipo Th2 (Araujo et al. 1996, Correa-Oliveira et al. 1998, Williams et al. 1994), representando um modelo de resposta imunológica polarizada deste tipo e segundo, sendo parasitas bem adaptados ao homem, as infecções são crônicas, de longa duração, causando modulação da resposta imune. Ocorre produção elevada de IL-4, IL-5 e IL-13, citocinas do tipo Th2 e, consequentemente, produção de altos níveis de IgE, eosinófilos e mastócitos, além de IL-10, uma citocina regulatória da resposta imune. De um modo geral, apenas um pequeno percentual de indivíduos infectados por helmintos desenvolve doença. Os sintomas geralmente são leves e, no caso particular da infecção por *Schistosoma mansoni*, 5 a 10% dos infectados evoluem para a forma hepatoesplênica (Bina 1997). Com o tratamento em massa da população disponível atualmente, as formas graves da esquistossomose vêm se tornando mais raras, enquanto a prevalência tem se mantido elevada em países em desenvolvimento (Bina 1997, Butterworth et al. 1994). Recentemente, vem crescendo o interesse pelo estudo da associação entre helmintíases e outras doenças, pois a resposta inflamatória ou do tipo Th1, responsável por lesão tecidual em muitos casos de doenças infecciosas e autoimunes, pode ser regulada pela resposta do tipo Th2 induzida por helmintos (Alcantara-Neves et al. 2012, Yazdanbakhsh et al. 2002). Em estudos experimentais, a infecção pelo *S. mansoni* previne o desenvolvimento de diabetes tipo I em camundongos geneticamente susceptíveis (Dunne et al. 1992a), de encefalomielite experimental autoimune (La Flamme et al. 2003) e de asma (Kitagaki et al. 2006).

Considerando a elevada frequência de infecção por helmintos, é provável que muitos dos indivíduos infectados certamente também sejam expostos a outras infecções ou doenças.

O questionamento que se faz, atualmente, é como a infecção crônica pelo *S. mansoni*, cursando com uma resposta imune altamente polarizada para o tipo Th2, poderia interferir na resposta imune e no curso clínico de outra doença concomitante que também induz uma resposta do tipo Th2. Estudos realizados por Lynch e colaboradores na Venezuela demonstraram que, em área endêmica para *Ascaris lumbricoides*, existe diminuição da reatividade aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos, e que o tratamento com anti-helmíntico resulta em aumento da positividade ao teste de alergia e da produção de IgE específica para aeroalérgenos (Lynch et al. 1993, Lynch et al. 1998, van den Biggelaar et al. 2004). Observações do grupo do Serviço de Imunologia (SIM) do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)-UFBA, estudando populações residentes em áreas endêmicas para esquistossomose, demonstraram que indivíduos infectados pelo *S. mansoni* respondem pobremente aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos (Araujo et al. 2000) e não desenvolvem asma grave (Medeiros et al. 2003). O mecanismo de inibição da resposta inflamatória alérgica nesses indivíduos vem sendo estudado pelo grupo de pesquisadores do SIM/HUPES, e a IL-10 parece participar do processo. A IL-10 é uma citocina produzida na fase crônica da esquistossomose (Araujo et al. 1996, Correa-Oliveira et al. 1998) capaz de inibir, *in vitro*, a produção de citocinas do tipo Th2 envolvidas na patogênese da asma (Araujo et al. 2004). Adicionalmente, foi demonstrado por Royer e colaboradores que a IL-10 inibe a liberação *in vitro* de histamina pelo mastócitos (Royer et al. 2001). Além da produção de IL-10, outros mecanismos devem estar envolvidos na modulação da resposta em indivíduos infectados por helmintos como, por exemplo, a expressão de CTLA-4, HLA-DR e receptor para IL-10 (Oliveira et al. 2009).

1.4. RESPOSTA IMUNE HUMORAL ENVOLVIDA NA INFECÇÃO PELO *S. MANSONI* E NA ATOPIA

É conhecida a hipótese de que a IgE policlonal produzida na infecção crônica pelo *S. mansoni* poderia inibir a produção de IgE específica para aeroalérgenos ou competir com a mesma pela ligação nos receptores de basófilos e mastócitos (Lynch et al. 1993). Infecção por helmintos está geralmente associada com altos níveis de IgE policlonal que não são específicas para os antígenos parasitários. Se a IgE que não é direcionada a nenhum antígeno específico, saturar receptores de alta afinidade para IgE da superfície de mastócitos, pode ocorrer o bloqueio da ligação de IgE específica direcionada para antígenos parasitários ou alérgenos ambientais. Em um editorial na Lancet de 1976, foi proposto uma nova abordagem teórica para prevenção e tratamento de doenças alérgicas na qual poderia ser, deliberadamente, induzido intensa resposta por IgE, através da infecção artificial com parasitas (Lancet 1976). Em recente ensaio clínico, duplo cego controlado com placebo, Feary e colaboradores estudaram o efeito da infecção experimental de ancilostomídeos em humanos asmáticos. Apesar de a infecção ter sido bem tolerada e não ter ocorrido aumento da hiper-responsividade brônquica, não houve melhora no controle da asma nos indivíduos avaliados (Feary et al. 2010). Outro ensaio clínico semelhante foi realizado para avaliar a eficácia da terapia com helmintos na rinite alérgica em humanos, por meio da ingestão de ovos de *Trichuris suis* e, da mesma forma, não houve alterações significativas nos critérios de melhora da rinite alérgica no grupo de indivíduos analisados (Bager et al. 2010).

A molécula de IgE é um elemento-chave tanto para a imunidade anti-helmíntica quanto para a reação de hipersensibilidade imediata. Embora células que apresentam moléculas de IgE específica para alérgenos em sua superfície estejam envolvidas em muitos dos sintomas de alergia, níveis altos de IgE circulantes, bem como células que apresentam o receptor de alta afinidade FcεRI, encontrados em infecções helmínticas crônicas, não causam

efeitos clínicos sistêmicos, mesmo quando os indivíduos infectados são expostos a alérgenos, como acontece quando o *S. mansoni* é destruído, *in situ*, por tratamento com drogas anti-helmínticas (Fallon et al. 1996, Kabatereine et al. 2003).

Um dos modelos mais diretos para explicar a modulação da resposta alérgica por helmintos é que a infecção resulta tanto em produção de IgE específica para o parasita, quanto em níveis altos de IgE policlonal. A elevação dos níveis de IgE sérica total poderia diluir a IgE específica para alérgenos e saturar os receptores FcεRI em mastócitos e basófilos (Lynch et al. 1999). Em pacientes infectados com *Loa loa*, a degranulação de basófilos foi bloqueada quando estas células foram sensibilizados com razão elevada (>500) entre IgE total e IgE específica (Mitre et al. 2005), o que é possível ser encontrado durante infecção pelo *S. mansoni*, na qual ocorre a produção de altos níveis de IgE policlonal.

Outra possível explicação para a inibição da atopia seria de que a IgG4, também produzida na resposta imune do tipo Th2, pudesse competir com a IgE pela ligação com o antígeno, prevenindo a reação de hipersensibilidade imediata (Mitre & Nutman 2006). Na esquistossomose, as infecções assintomáticas são correlacionadas com altos níveis de IgG4 específico para o parasita, o que pode inibir a degranulação mediada por IgE em células efetoras (Hussain et al. 1992). Em revisão realizada por Platts-Mills foi mostrado que alta exposição a alérgenos de gato resulta em títulos elevados de IgG4 e redução da atopia, reforçando o papel do IgG4 na modulação da resposta alérgica (Platts-Mills et al. 2004). É possível considerar que a perda de reatividade cutânea em indivíduos parasitados pode ser devido à presença de IgG4 bloqueador. Embora isso não tenha sido muito estudado, um trabalho realizado em área endêmica de *S. mansoni*, relatou evidências de correlação inversa entre IgG4 e reatividade cutânea (Rihet et al. 1992).

Os poucos estudos publicados sobre o assunto ainda são inconclusivos. Araújo e colaboradores em 2000, demonstraram níveis elevados de IgE total e tendência para níveis

mais baixos de IgE específica para aeroalérgenos em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* quando comparado com indivíduos não infectados, apesar do tamanho amostral do estudo ter sido pequeno (Araujo et al. 2000). Diante desses dados, fica clara a necessidade de avaliação do papel da IgE e da IgG4 na modulação da resposta alérgica e na infecção pelo *S. mansoni.*

Dessein e colaboradores, avaliando a associação entre resistência humana à reinfecção pelo *S. mansoni* e isotipos de imunoglobulinas específicas para o parasita, observou correlação positiva para IgE e negativa para IgG4 e IgG2 (Demeure et al. 1993). Além disso, seus resultados reforçaram a ideia de que IgG4 sérica pode estar envolvida no controle do reconhecimento antigênico pelo anticorpo IgE e, consequentemente, na regulação de reações anafiláticas e da imunidade mediada por IgE (Rihet et al. 1992).

Os resultados sobre estudos de campo sugerem que a resistência à reinfecção pelo *S. mansoni* pode ser desenvolvida naturalmente (Silveira et al. 1998), mas apenas após vários ciclos de exposição, tratamento e reinfecção (Black et al. 2010). Estas observações levaram a um modelo de resistência dependente da idade que têm dominado os estudos sobre a esquistossomose por várias décadas (Etard et al. 1995, Gryseels 1994). Neste modelo, crianças abaixo de 15 anos de idade são altamente susceptíveis à reinfecção após o tratamento com aumento gradual da resistência ao longo do tempo (Butterworth et al. 1985, Etard et al. 1995). Entretanto, este modelo foi questionado, sendo sugerido que, indivíduos expostos à agua contaminada durante a atividade ocupacional podem ser classificados em três grupos distintos em relação à reinfecção: resistentes ou susceptíveis imunologicamente, independentes da idade, e resistentes após tratamentos (Karanja et al. 2002). Este estudo sugere que a resistência à reinfeção pode ser desenvolvida em resposta ao tratamento e, portanto, não pode ser estritamente dependente da idade, mas sim da exposição. Vale ressaltar que a idade e a exposição em indivíduos residentes em áreas endêmicas, são proporcionais e intimamente relacionados.

O princípio geral das estratégias para desenvolver vacinas para *Schistosoma* é a indução de imunidade à infecção e reinfecção após tratamento. Apesar de trabalhos interessantes na área ao longo dos últimos 50 anos, o exato mecanismo envolvido na resistência à reinfecção continua sendo debatido. Em estudo realizado com jovens residentes de uma área endêmica em esquistossomose, observou-se que a resistência à infecção pelo *S. mansoni* estava associada à reatividade do anticorpo IgG4 à uma proteína de 37 kDa constituinte da superfície antigênica do verme adulto, revelando um possível antígeno candidato à vacina (Dessein et al. 1988). Outras proteínas a exemplo da Sm22.6, estão associadas à indução de elevados níveis de IgE e proteção à reinfecção (Fitzsimmons et al. 2007). Entretanto, em modelo experimental, a imunização com Sm22.6, associado ou não com adjuvante hidróxido de alumínio, apesar de resultar em produção de altos níveis de IgG1 e IgG2a, não apresentou nenhuma proteção contra a infecção (Pacifico et al. 2006).

Avaliando 250 moradores de uma pequena vila rural endêmica em *S. mansoni* no Brasil foram observados níveis elevados de IgE e reduzidos de IgG4 em resposta a antígenos do tegumento do esquistossômulo (STEG) e antígeno solúvel do verme adulto (SWAP), associados à resistência a reinfecção após tratamento (Caldas et al. 2000). Em outro trabalho, Gomes e colaboradores, estudando a resposta de anticorpos específicos para antígeno solúvel do ovo (SEA) antes e após tratamento, não observaram interferência do tratamento neste tipo de resposta imune (Gomes et al. 2002).

Em uma comunidade de 380 pescadores com idade entre 5 e 59 anos, em Uganda, região endêmica em esquistossomose mansoni, com alto índice de exposição e intensidade de infecção, foi observado que a resposta de anticorpos contra antígenos do *S. mansoni* varia de acordo com a idade, gênero e a intensidade da infecção do hospedeiro, estando associada com susceptibilidade ou resistência à infecção (Naus et al. 2003). Além da ocorrência de maior grau de infecção entre indivíduos do gênero masculino, a resposta humoral específica, em

relação à idade, aumentou para SWAP e reduziu para SEA, especialmente após a puberdade. Neste mesmo estudo, foi observado que quanto maior a intensidade de infecção, maior são os níveis de IgG1 e IgG4 específicos para SWAP e SEA. O padrão de resposta específica para SWAP foi qualitativamente diferente entre IgE e IgG4, sugerindo mecanismos de regulação independentes.

Na Etiópia, foi realizado um estudo sobre a resposta humoral contra SEA, levando em consideração a idade e gênero antes e após cinco semanas e um ano de tratamento para esquistossomose. O índice de infecção foi significantemente mais alto em adolescentes do gênero masculino menor que 12 anos de idade do que em meninas do mesmo grupo. Após 5 semanas do tratamento, os níveis de IgE e IgG1 mostraram tendência a aumento, embora os níveis de IgM e IgG3 tendessem a reduzir. Um ano após tratamento, significante queda foi observada nos níveis de IgG1 e IgG4 e aumento dos níveis de IgG2 (Abebe et al. 2001).

Outro estudo avaliou o papel dos anticorpos na resistência à infecção pelo *S. haematobium* em 148 crianças em idade escolar, residentes em Camarões. A intensidade de infecção foi determinada por meio de dosagem da concentração sérica de antígenos anódicos circulantes (AAC). Um mês após tratamento, os níveis dos anticorpos específicos para SWAP aumentaram, mas um ano após o tratamento esse níveis retornaram aos encontrados no pré-tratamento. As concentrações de AAC foram associadas positivamente com níveis de IgG4 específico para SEA e SWAP mas não com níveis de IgE. A idade correlacionou-se negativamente com concentrações de AAC e positivamente com níveis de IgE específicos para SWAP. O balanço de IgG4 e IgE específico para SWAP foram correlacionados com concentração de AAC, em particular na faixa etária de 11 a 13 anos, sugerindo que os mecanismos de proteção imunológica durante a infecção *S. haematobium* de forma efetiva ocorre em torno de 12 anos de idade (Naus et al. 1998).

Investigando a dinâmica da resposta humoral contra SWAP e SEA entre comunidades distintas, foram comparados dados de duas áreas endêmicas de *S. japonicum*. Os níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP foram significantemente maiores na área que recebeu repetidos tratamentos em relação a uma nova área em uma outra parte da mesma província, sem tratamento (Jiz et al. 2009). Portanto, há indícios de que múltiplos episódios de infecção pelo *Schistosoma sp* pode levar à secreção de determinados níveis de isotipos de anticorpos que vem sendo associados com resistência à reinfecção.

2. JUSTIFICATIVA

Em áreas endêmicas em esquistossomose, muitos indivíduos não apresentam sinais de infecção ativa, apesar do contato diário com água do rio contaminada por cercárias, ou apresentam diferentes intensidades de infecção pelo *S. mansoni*, indicando presença de resposta imunológica protetora contra este helminto. Além disso, apesar de pesquisas sobre esquistossomose e programas de controle colaborarem para maior disponibilidade e variabilidade de drogas anti-schistosoma (particularmente depois do surgimento de parasitas resistentes ao Praziquantel), o desenvolvimento de novas vacinas, são abordagens adicionais necessárias para complementação da quimioterapia clássica. Adicionalmente, dados publicados pelos pesquisadores do Serviço de Imunologia do HUPES, em concordância com a literatura, mostram, sistematicamente, que em indivíduos residentes em áreas endêmicas em esquistossomose apresentam diminuição da resposta ao teste cutâneo de hipersensibilidade imediata com ácaros da poeira domiciliar e menor gravidade de asma (Araujo et al. 2000, Lynch et al. 1993, Lynch et al. 1998, Medeiros et al. 2003, van den Biggelaar et al. 2004).

Diante do importante papel da IgE na reação alérgica faz-se necessário avaliar os padrões de resposta imune humoral em asmáticos infectados pelo *S. mansoni*. A identificação de possíveis mecanismos indutores da modulação da resposta a aeroalérgenos abre perspectivas para a prevenção e novas terapêuticas das doenças alérgicas. Portanto, com o propósito de esclarecer o papel da IgE e IgG4 na indução de resistência/susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni* e no risco de desenvolvimento de asma foi avaliado, em uma grande casuística, moradores de área endêmica em infecção pelo *S. mansoni* do interior da Bahia. Compreender os mecanismos imunológicos de resistência/susceptibilidade à reinfecção na esquistossomose pode ajudar no desenvolvimento de vacinas e de estratégias de tratamento mais eficazes para asma.

3. HIPÓTESE

A elevada produção de IgE na infecção crônica pelo *S. mansoni* protege contra a reinfecção e previne o desenvolvimento de alergia por competir com a IgE específica para alérgenos pela ligação em mastócitos. A IgG4, por outro lado, protege contra alergias e aumenta a susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni.*

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da IgE e IgG4 na proteção e susceptibilidade para infecção pelo *S. mansoni* e desenvolvimento da asma em indivíduos residentes em uma área endêmica em esquistossomose.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em indivíduos de área endêmica em esquistossomose:

1. Avaliar os níveis séricos de IgE total e IgE e IgG4 específicos para antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) e antígeno solúvel de ovo (SEA) antes e 6 meses após o tratamento com anti-helmínticos;
2. Correlacionar os níveis desses anticorpos com carga parasitária, grau de exposição à água contaminada e reinfecção pelo *S. mansoni* após o tratamento;
3. Comparar os níveis séricos de IgE total, IgE e IgG4 específicos para o antígeno 1 do *D. pteronyssinus* (Der p1) entre asmáticos e não asmáticos e entre infectados e não infectados pelo *S. mansoni*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. SELEÇÃO DE INDIVÍDUOS DE ÁREAS ENDÊMICAS EM *S. MANSONI*

O presente estudo é parte de um projeto maior que vem sendo desenvolvido no Serviço de Imunologia do HUPES, que avalia a resistência e susceptibilidade genética para asma e infecção pelo *S. mansoni* com a colaboração e financiamento da Universidade Johns Hopkins – Estados Unidos.

O estudo sobre resistência à infecção pelo *S. mansoni* foi realizado avaliando em indivíduos residentes em área endêmica em esquistossomose, distribuídos em quatro vilas (Sempre Viva, Jenipapo, Camarões e Buri) pertencentes ao município do Conde, localizado a cerca de 150 km ao norte de Salvador, capital da Bahia. Esta população vem sendo acompanhada pelo Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) desde o ano 2001, devido à elevada frequência de esquistossomose observada (Araujo et al. 2004). Os indivíduos destas comunidades possuem em comum a necessidade do uso dos rios para seus afazeres domésticos, lazer e como fonte de renda, já que a economia da região baseia-se principalmente na pesca. Por ser um local de difícil acesso, no ano de 2001 os moradores ainda não dispunham de cuidados médicos como consultas, exames ou medicamentos, além de as residências não possuírem energia elétrica, esgotamento sanitário ou água encanada. Para este estudo foi realizado inquérito copro-parasitológico que atingiu 1215 indivíduos. A partir de então, ressalvados os critérios de exclusão referidos adiante, todos que concordaram em participar do estudo, inicialmente, foram incluídos, perfazendo um total de 707 indivíduos (Figura 1, coluna 1).

Os indivíduos asmáticos foram identificados utilizando-se o questionário "International study of asthma and allergy in childhood" (ISAAC; ANEXO I) (Ellwood et al. 2005, Sole et al. 2006), aceito internacionalmente para o diagnóstico epidemiológico de asma brônquica. Foram selecionados os indivíduos que responderam positivamente a questão de

presença de sibilos nos últimos 12 meses. O questionário foi adaptado para, além de informações sobre rinite alérgica, alergia a drogas e alimentos, história familiar de atopia e patologias concomitantes, incluir também questões básicas abrangendo nível socioeconômico e condições de habitação. No total, 741 indivíduos aceitaram participar do estudo, respondendo o questionário ISAAC. Durante a seleção, os indivíduos asmáticos foram submetidos a exame parasitológico de fezes, dosagem de IgE total e IgE e IgG4 séricas específicas para SWAP, SEA e Der p1 (Figura 1, coluna 2).

Após esta avaliação, os indivíduos da área endêmica foram tratados com Albendazol (400 mg, dose única) e Praziquantel (50 mg/Kg, dose única). Aqueles que participaram do estudo de resistência e susceptibilidade à esquistossomose foram reavaliados através de exame parasitológico de fezes e dosagem de IgE e IgG4 específicas para SWAP seis meses após o tratamento.

5.1.1. Critérios de inclusão

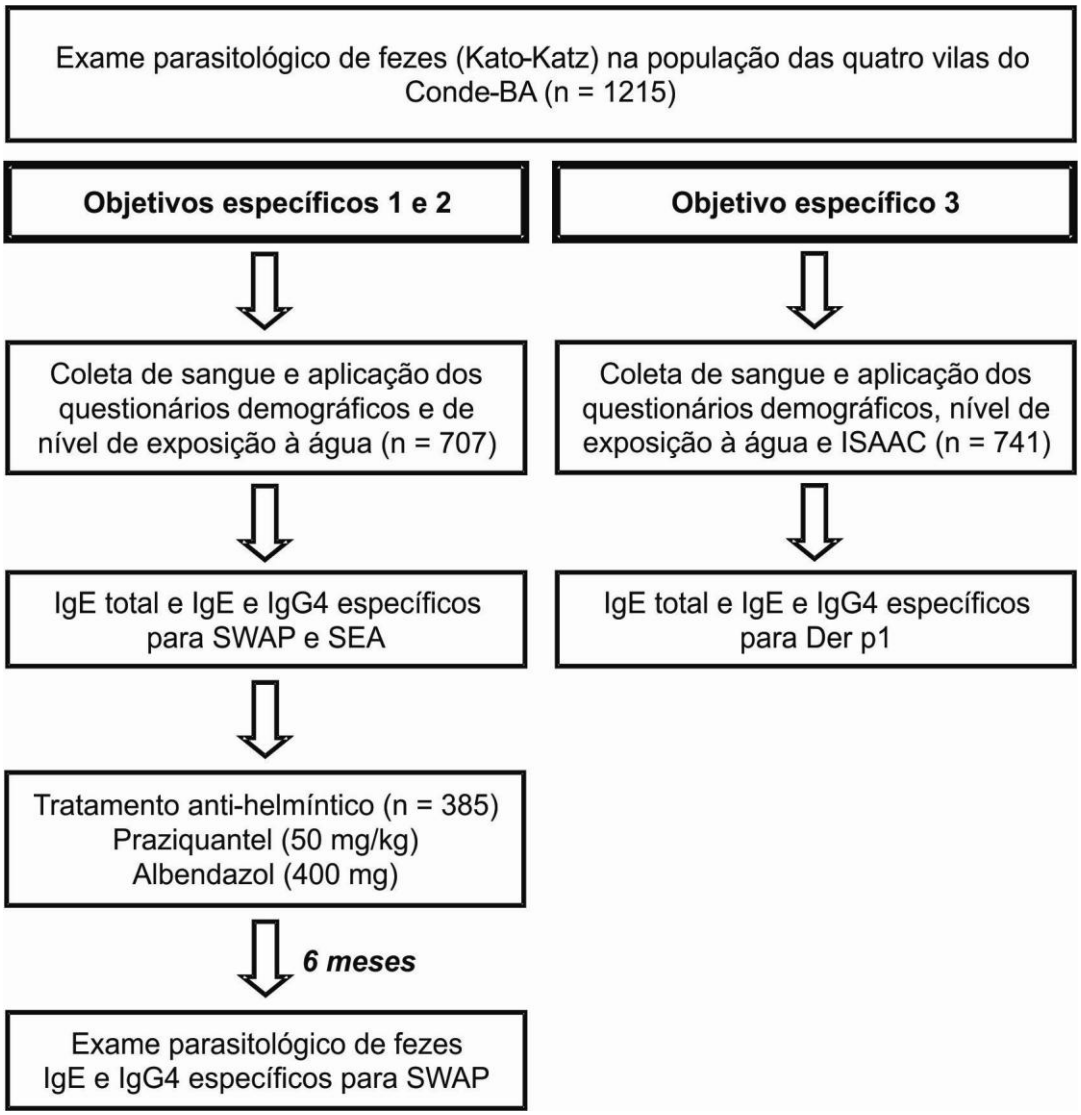
- Residentes na área endêmica do Conde que aceitaram participar do estudo

5.1.2. Critérios de exclusão

Não foram admitidos no estudo:

- Indivíduos com asma grave;
- Indivíduos com forma hepatoesplênica da esquistossomose;
- Indivíduos em uso de drogas imunossupressoras;
- Mulheres gestantes e aqueles que apresentaram alguma condição que não permitisse estrita colaboração, por ocasião da inclusão do estudo.

Figura 1. Fluxograma do Estudo



5.2. AVALIAÇÃO LABORATORIAL E CLÍNICA

5.2.1. Exame parasitológico de fezes

Os indivíduos selecionados para inclusão no estudo foram submetidos a exames parasitológicos de fezes (três amostras), pela técnica da sedimentação espontânea de Hoffmann-Pons-Janer para a determinação de infecção parasitária por helmintos (Hoffman et al. 1934). A quantificação da carga parasitária de helmintos foi realizado pela técnica de Kato-Katz sendo os resultados expressos em ovos por grama de fezes (opg) (Katz et al. 1970).

5.2.2. Dosagem de IgE total e IgE e IgG4 específicas para SWAP, SEA e Der p1

Os níveis séricos de IgE total foram medidos por meio da técnica de quimioluminescência (ADVIA Centaur Bayer Corporation, Salvador, Bahia, Brasil), realizada pelo laboratório de análises clínicas da rede privada LEME. As dosagens de IgE e IgG4 específicas foram realizadas por meio da técnica de ELISA indireto. As placas foram sensibilizadas com concentração de 10µg/ml para Der p1 e SWAP e 5µg/ml para SEA e deixadas a 4ºC por uma noite. Para determinação de IgE específico, anticorpos da classe IgG foram removidos por fator reumatoide absorvente (RF absorvent, Behring Diagnostics Inc., Westwood, Mass) (Souza-Atta et al. 1999). Os soros foram diluídos 1:2 em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e incubados com RF à temperatura ambiente por uma noite, seguido de centrifugação a 2000 RPM por 10 minutos. As amostras de soro com absorção prévia de IgG foram utilizadas na diluição de 1:4. As placas sensibilizadas com os antígenos foram bloqueadas com PBS contendo 5% de albumina bovina e 100µL das amostras dos soros foram adicionados. As placas então foram incubadas a 4ºC por uma noite. Anticorpos de camundongo anti-IgE e anti-IgG4 humanos (1:500) foram adicionados às placas. Após incubação por 2 horas a 37° C e seis lavagens com PBST, anti-Imunoglobulina de

camundongo marcada com peroxidase (1:1000) foi adicionada às placas, sendo as mesmas incubadas por 1 hora a 37°C (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Em seguida foram feitas seis lavagens com PBST e a reação foi revelada pela adição do substrato TMB (Tetrametilbenzidina, ICN Biomedicals Inc.) e interrompida com o uso de H_2SO_4. As placas foram lidas em espectrofotômetro a 450nm e os resultados expressos em densidade óptica (DO). O ponto de corte (cut-off) das dosagens de IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA foi determinado utilizando a média mais dois desvios padrões da absorbância obtida com o soro de 10 indivíduos saudáveis, dentre eles, alguns infectados com outros helmintos, mas negativos para *S. mansoni*, e outros indivíduos negativos para qualquer helminto, inclusive o *S. mansoni* e não residentes em áreas endêmicas em helmintíases. O cut-off das dosagens de IgE e IgG4 para Der p1 foi calculado utilizando 10 indivíduos saudáveis, sem história de doença alérgica e com teste cutâneo de alergia negativo para ácaros.

5.2.3. Avaliação do grau de exposição à água contaminada do rio

Durante entrevista, foi aplicado aos participantes do estudo um questionário que leva em consideração os hábitos da população em relação ao contato com o rio. Para cada uma das sete atividades observadas (banho, agricultura, lavar roupa, lavar o cabelo, lavar prato, pescar e lazer), foi solicitado o nome do rio e local, a frequência e duração de cada atividade (ANEXO II). Com base nos questionários preenchidos, os nomes das fontes de água foram copiados e resumidos em uma lista, sendo coletadas amostras de caramujos destes locais para pesquisa de cercárias. Naqueles indivíduos expostos às fontes positivas para cercárias, as atividades foram classificadas em quatro categorias para refletir o nível de exposição: nenhuma exposição, baixa exposição (menos que 1 hora por semana), exposição moderada (1 a 3 horas por semana) ou alta exposição (1 a 3 horas por dia) (Araujo et al. 2004, Grant et al. 2008).

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados e analisados estatisticamente pelos programas "Statistical Package for Social Science" (SPSS®) versão 9 ou STATA® versão 11.0 (Stata Corporation College Station, TX, EUA), sendo os gráficos construídos utilizando GraphPad® versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As variáveis contínuas como idade, carga parasitária e as variáveis imunológicas foram expressas como média e desvio padrão (DP). Para as análises estatísticas, o número de ovos por grama de fezes (opg) foram transformados em log (log10[opg + 1]) para aproximação da distribuição normal. A carga parasitária de *S. mansoni* foi classificada em leve (1-99 opg), moderada (100-399 opg) ou intensa (≥400 opg), de acordo com os critérios adotados pela Organização Mundial da Saúde (WHO 2006).

O teste de normalidade D´Agostino-Pearson foi usado para designar testes estatísticos mais adequados para cada avaliação. Dependendo do resultado do teste de normalidade, o teste de Mann-Whitney ou teste t de Student foi utilizado para comparar variáveis contínuas entre dois grupos, enquanto que o teste não paramétrico ANOVA (Kruskal-Wallis) foi utilizado para comparar variáveis contínuas entre três ou mais grupos. O teste do qui-quadrado foi usado para comparar proporções de indivíduos infectados e não infectados, asmáticos e não asmáticos entre os diferentes grupos de idade, gêneros e nível de exposição a água do rio. As análises univariadas e multivariadas foram realizadas através do modelo de regressão logística, sendo obtida a razão de chances (*Odds Ratio* – OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% para cada variável analisada. A diferença na carga parasitária entre baixo e alto produtores de IgG4 foi avaliada por regressão logística ajustada por idade, gênero e nível de exposição à água do rio. As correlações entre os níveis de anticorpos e carga parasitária foram realizadas pelo teste de correlação de Spearman, considerando que para

obter valor de *p*, foi utilizada regressão linear ajustada por idade, gênero e nível de exposição. O nível de significância estatística foi estabelecido como 0,05 para todas as análises.

5.4. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo da Imunogenética da Asma e Esquistossomose tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira Hospital Universitário Professor Edgard Santos (Parecer/Resolução nº 50/2003, ANEXO III). Todos os seus participantes foram voluntários que, após esclarecimentos sobre o objetivo desta pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). No caso de menores, este foi assinado por um dos responsáveis. Todos os indivíduos portadores de parasitoses intestinais ou que apresentaram queixas de alergia foram devidamente orientados e tratados gratuitamente.

6. RESULTADOS

6.1. RESULTADOS REFERENTES AOS OBJETIVOS ESPECÍFICOS 1 E 2

6.1.1. Características da população

Os dados demográficos sobre a população estudada estão resumidos na Tabela 1. Participaram do estudo sobre resistência e susceptibilidade à infecção por *S. mansoni* 707 indivíduos, sendo pouco mais da metade do gênero feminino (57%), com faixa etária de 6 a 85 anos, média de idade de 28 ± 19 anos.

História de contato com a água contaminada do rio foi relatada por 359 (55%) indivíduos dos quais, 32% apresentavam baixo nível de exposição (< 1 h por semana), 27% nível moderado (1-3 h por semana) e 41% se expunham a água do rio diariamente, em alto nível de exposição (1-3 h por dia). O grupo com alto nível de exposição à água do rio foi composto principalmente por homens (57%), na sua maioria para lidar com a pesca ou tomar banho. Além da influência do gênero na exposição à água do rio, a idade é um fator que interferiu no nível de exposição dos indivíduos avaliados. O grupo classificado como altamente exposto apresentou média de idade de 29 ± 16 anos, enquanto que os grupos de médio e baixo nível de exposição apresentaram a mesma média de idade (23 ± 17 anos; $p < 0,001$), respectivamente. Como esperado, o grupo que relatou maior nível de exposição à água do rio apresentou também maior intensidade de infecção pelo *S. mansoni* (103 ± 174 opg), quando comparado com o grupo que relatou não ser exposto (17 ± 92 opg; $p < 0,001$).

Tabela 1. Características demográficas, exposição referida à água do rio e infecções por helmintos em residentes do município do Conde-Bahia (n = 707).

Características	População (n = 707)
Idade (média ± DP)[a]	28 ± 19
Gênero [n (%)]	
Masculino	307 (43,4)
Feminino	400 (56,6)
Exposição referida à água do rio [n (%)]	
Ausência de exposição	296 (45,2)
Presença de exposição	359 (54,8)
Nível de exposição à água do rio	
Baixo (1 h/semana)	115 (32,0)
Moderado (1-3 h/semana)	96 (26,8)
Alto (1-3 h/dia)	148 (41,2)
Infecção por helmintos	
S. mansoni [n (%)]	197 (37,7)
Carga parasitária (média ± DP)[b]	46,7 ± 148,4
T. trichiura [n (%)]	347 (66,3)
A. lumbricoides [n (%)]	280 (53,5)
Ancilostomídeos [n (%)]	150 (28,7)
Nível de Infecção pelo *S. mansoni* [n(%)]	
Infecção leve (1-99 opg)	142 (72,1)
Infecção moderada (100-399 opg)	42 (21,3)
Infecção intensa (≥ 400 opg)	13 (6,6)
Coinfecção[c]	172 (87,3)

[a]Idade expressa em anos.
[b]Carga parasitária de *Schistosoma mansoni* expressa em ovos por grama de fezes (opg).
[c]Coinfecção definido como infecção pelo *S. mansoni* associada a um ou mais helmintos.

A prevalência de infecção pelo *S. mansoni* foi de 38%, com carga parasitária média de 47 ± 148, variando de 0 a 2100 opg. Entre os indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, 72% apresentavam carga parasitária até 99 ovos por grama de fezes, 21% apresentava intensidade de infecção moderada (100 – 399 opg) e apenas 7% estavam altamente infectados, com carga acima de 400 opg (Tabela 1). Além disso, a intensidade de infecção pelo *S. mansoni* foi mais elevada nos indivíduos do gênero masculino (85 ± 216 opg) que no feminino (38 ± 92 opg; $p < 0,05$). Aproximadamente 87% dos indivíduos infectados com *S. mansoni* estavam coinfectados com um ou mais helmintos. O helminto mais encontrado na região foi *Trichuris trichiura* (66%), seguido por *Ascaris lumbricoides* (54%) e Ancilostomídeos (29%, Tabela 1).

A idade dos indivíduos foi um importante determinante na carga parasitária por *S. mansoni*, sendo a prevalência de infecção maior entre os mais jovens ($p < 0,01$; Figura 2). Adicionalmente, níveis de infecção mais elevados foram observados nas primeiras três décadas de vida (0,71 ± 0,91, 0,82 ± 0,96, 0,85 ± 1,03 $\log_{10}$opg) quando comparados com as três décadas de vida subsequentes (0,56 ± 0,85, 0,66 ± 0,89, 0,37 ± 0,72 $\log_{10}$opg,) e com os indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos (0,13 ± 0,40 $\log_{10}$opg; $p < 0,001$; Figura 2).

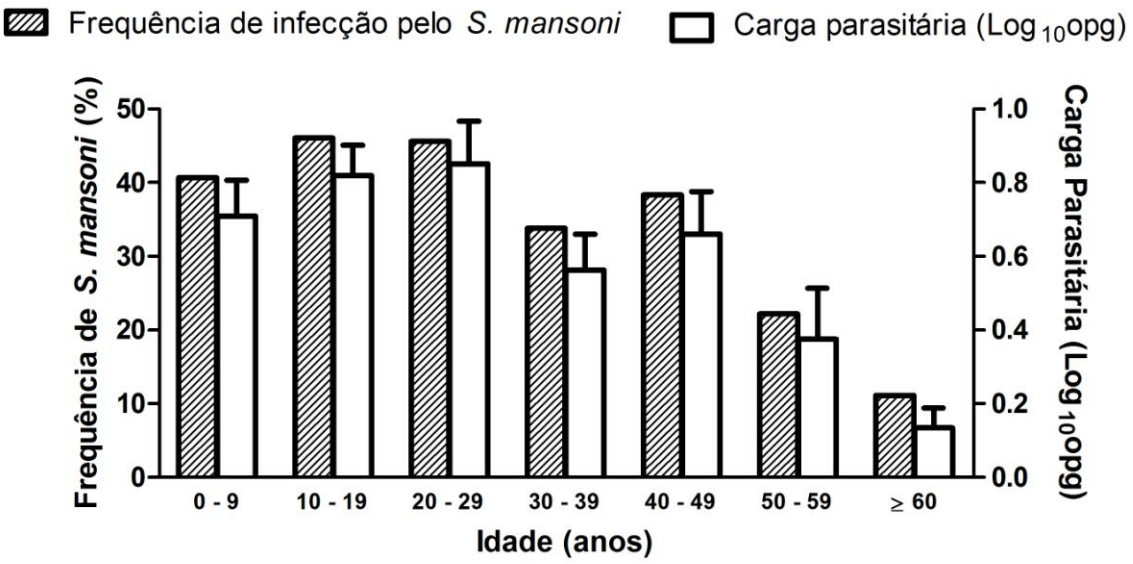


Figura 2. Prevalência e carga parasitária da infecção pelo *S. mansoni* distribuído por faixa etária na população estudada do município do Conde-Bahia.

Apesar dos indivíduos residirem em área endêmica em esquistossomose, houve características que diferiram entre os infectados ou não pelo *S. mansoni*. A Tabela 2 mostra os resultados de análises univariada e multivariada da associação entre presença ou não de infecção pelo *S. mansoni* e diferentes variáveis como idade, gênero, presença de infecção pelo *T. trichiura*, *A. lumbricoides* e Ancilostomídeos em 523 indivíduos, representando todos os que realizaram exame parasitológico de fezes. Ajustando as análises pelo nível de exposição à água do rio, os mais jovens eram mais susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni* (OR ajustado =

0,98; IC = 0,97-0,99; p < 0,001). Apesar dos homens apresentarem maior carga parasitária, as mulheres apresentaram maior frequência de infecção pelo *S. mansoni* (OR ajustado = 1,54; IC = 1,01-2,34; p < 0,05). Os indivíduos infectados pelo *S. mansoni* apresentaram maior prevalência de infecção pelo *T. trichiura* (OR ajustado = 2,43; IC 1,44-4,10; p < 0,01) e pelo *A. lumbricoides* (OR ajustado = 1,92; IC = 1,23-3,00; p < 0,01), o que não ocorreu em relação à coinfecção pelo Ancilostomídeos (OR ajustado = 1,16; IC 0,73-1,86; p > 0,05).

Tabela 2. Análises univariada e multivariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e idade, gênero e coinfecção com outros helmintos em residentes do município do Conde-BA (n = 523).

	Sm Negativo	**Sm Positivo**	**Análise não ajustada**		**Análise ajustada***	
	(n = 326)	**(n = 197)**	**OR (95% IC)**	**P**	**OR (95% IC)**	**P**
Idade (média ± DP)	31,9 ± 21,1	24,3 ± 16,0	0,98 (0,97-0,99)	< 0,001	0,98 (0,97-0,99)	< 0,001
Faixa etária [n (%)]						
0 – 9 anos	51 (15,7)	35 (18,0)	1,00		1,00	
10 – 19 anos	74 (22,8)	63 (32,3)	1,24 (0,72-2,14)		1,54 (0,82-2,90)	
20 – 29 anos	43 (13,2)	36 (18,5)	1,22 (0,66-2,26)		0,96 (0,46-2,01)	
30 – 39 anos	51 (15,7)	26 (13,3)	0,74 (0,39-1,41)		0,75 (0,36-1,60)	
40 – 49 anos	37 (11,4)	23 (11,8)	0,91 (0,46-1,78)		1,06 (0,48-2,34)	
50 – 59 anos	21 (6,5)	6 (3,1)	0,42 (0,15-1,14)		0,26 (0,08-0,86)	
≥ 60 anos	48 (14,8)	6 (3,1)	0,18 (0,07-0,47)	< 0,001	0,22 (0,07-0,68)	< 0,001
Gênero [n (%)]						
Masculino	201 (61,7)	93 (47,2)	1,00		1,00	
Feminino	125 (38,3)	104 (52,8)	1,79 (1,26-2,57)	< 0,01	1,54 (1,01-2,34)	< 0,05
Infecção por helmintos [n (%)]						
Trichuris trichiura						
Negativo	139 (42,6)	37 (18,8)	1,00		1,00	
Positivo	187 (57,4)	160 (81,2)	3,21 (2,11-4,89)	< 0,01	2,43 (1,44-4,10)	< 0,01
Ascaris lumbricoides						
Negativo	175 (53,7)	68 (34,5)	1,00		1,00	
Positivo	151 (46,3)	129 (65,5)	2,20 (1,52-3,17)	< 0,01	1,92 (1,23-3,00)	< 0,01
Ancilostomídeos						
Negativo	241 (73,9)	132 (67,0)	1,00		1,00	
Positivo	85 (26,1)	65 (33,0)	1,40 (0,95-2,06)	0,091	1,16 (0,73-1,86)	0,528

*Análises ajustadas para nível de exposição à água do rio, Regressão logística.
Sm = *Schistosoma mansoni*

Como observado na Tabela 3, os indivíduos mais expostos à água do rio apresentaram maior frequência de infecção pelo *S. mansoni*. Aqueles que afirmavam ter baixa exposição apresentaram 1,18 vezes mais chance de se infectarem do que os não expostos. Os indivíduos

que apresentavam exposição intermediária tiveram 5,34 mais chances e os altamente expostos 13,96 mais chances de serem infectados pelo *S. mansoni* do que os não expostos (p < 0,0001). Embora a intensidade de infecção esteja de acordo com o grau de exposição à água contaminada, foi detectado 24% de infecção pelo *S. mansoni* entre os indivíduos que negaram exposição à água do rio. É uma região peculiar já que em períodos de chuvas o contato com a água contaminada não se restringe apenas ao rio, mas também em alagamentos que se formam próximo às casas.

Tabela 3. Análise univariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e níveis de exposição à água do rio em residentes do município do Conde-Bahia (n = 492).

	Sm Negativo n (%)	**Sm Positivo n (%)**	**Análise não ajustada***	
			OR (95% IC)	**P**
Não expostos	182 (59,3)	44 (23,8)	1,00	
Baixa exposição	70 (22,8)	20 (10,8)	1,18 (0,65-2,14)	
Moderada exposição	31 (10,1)	40 (21,6)	5,34 (3,01-9,47)	
Alta exposição	24 (7,8)	81 (43,8)	13,96 (7,96-24,49)	0,0001

* Regressão logística. Sm = *Schistosoma mansoni*.

6.1.2. Produção de IgE total e IgE e IgG4 específicas para o antígeno solúvel do verme adulto (SWAP) e do ovo (SEA) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*

Nos indivíduos avaliados, o nível de IgE total foi de 1600 ± 1330 U/L (n = 690), variando de 1 a 9673 U/L. Como esperado, os níveis de IgE total foram mais elevados nos indivíduos infectados (1850 ± 1274 U/L) pelo *S. mansoni* quando comparado aos indivíduos não infectados (1362 ± 1251 U/L; p < 0,001). Resultado semelhante foi obtido quando comparado níveis de IgE total dos indivíduos infectados (1684 ± 1283 U/L) e não infectados por qualquer helminto (1033 ± 1134 U/L; p < 0,001). Entretanto, não foi observado diferença significativa nos níveis de IgE total entre os indivíduos infectados pelo *S. mansoni*

coinfectados ou não com outros helmintos (1925 ± 1242 e 1333 ± 1394 U/L respectivamente; $p > 0,05$).

Independente dos indivíduos estarem infectados ou não, os anticorpos específicos para SWAP foram detectados em uma elevada porcentagem, com 91% dos indivíduos (625/687) respondendo com a produção de anticorpo da subclasse IgG4 e 98% (507/517) com a produção da classe IgE. Os níveis médios de IgE e Ig4 específicos para SWAP foram de 0,80 ± 0,44 e 1,48 ± 1,49 DO, respectivamente (Figura 3A). Enquanto os níveis de IgE específico foram distribuídos de forma homogênea em torno da média, os níveis de IgG4 específico tiveram distribuição bimodal, o que permitiu separar os indivíduos em fenótipos de baixo (abaixo de 0,6 DO, n = 241) e alto (acima de 3,0 DO, n = 120) produtor de IgG4. Quando a análise foi ajustada por idade, gênero e nível de exposição à água contaminada, os indivíduos com níveis mais elevados de IgG4 eram aqueles que apresentavam maior carga parasitária (1,01 ± 0,98 $\log_{10}$ opg), quando comparados ao grupo de baixos produtores de IgG4 (0,27 ± 0,62 $\log_{10}$opg; $p < 0,001$, Figura 3B).

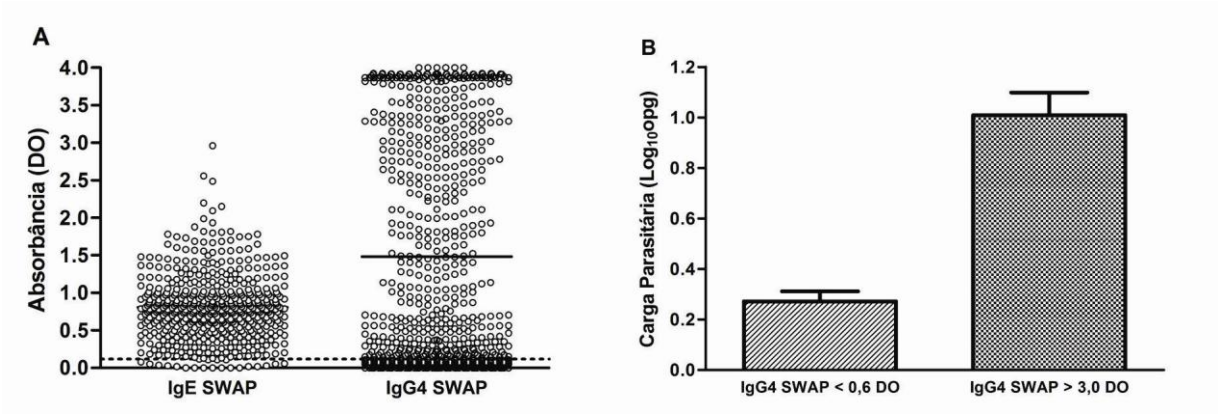


Figura 3. Níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP (A) e carga parasitária de *S. mansoni* em indivíduos altos e baixos produtores de IgG4 específico para SWAP (B), residentes do município do Conde-Bahia ($p < 0,001$; Teste t não pareado).

A figura 4 representa os níveis de anticorpos IgE e IgG4 específicos para SWAP distribuídos de acordo com gênero, faixa etária e grau de exposição referida à água do rio. Os indivíduos do gênero masculino apresentaram níveis mais elevados de IgE específico que o feminino (0,86 ± 0,45 e 0,77 ± 0,42 DO, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 4A). Da mesma forma, os níveis de IgG4 foram mais elevados no gênero masculino (1,84 ± 1,56 DO) quando comparado ao feminino (1,20 ± 1,37 DO, $p < 0,001$; Figura 4B). Não houve diferença significativa entre os níveis de IgE específico para SWAP nas diversas faixas etárias da população estudada (Figura 4C), porém os níveis de IgG4 foram menores na faixa etária de 0 a 9 anos de idade, quando comparado às outras faixas etárias ($p < 0,001$, Figura 4D). Os níveis de IgG4 também foram reduzidos na faixa etária de 10 a 19 anos quando comparado à faixa de 30 a 39 anos ($p < 0,05$; Figura 4D). Não foram observados diferenças nos valores de IgE específico para SWAP em relação aos diferentes graus de exposição à água do rio (Figura 4E). Porém, em relação às dosagens de IgG4, foi observado que quanto maior o grau de exposição à água do rio relatado pelos indivíduos, maiores foram os níveis de IgG4, com média de 1,10 ± 1,37 DO entre os que negaram exposição à água do rio, 0,92 ± 1,27 DO no grupo que afirmava ter baixa exposição, 1,71 ± 1,44 DO média exposição e 2,48 ± 1,41 DO entre os que responderam estarem altamente expostos ($p < 0,001$; Figura 4F).

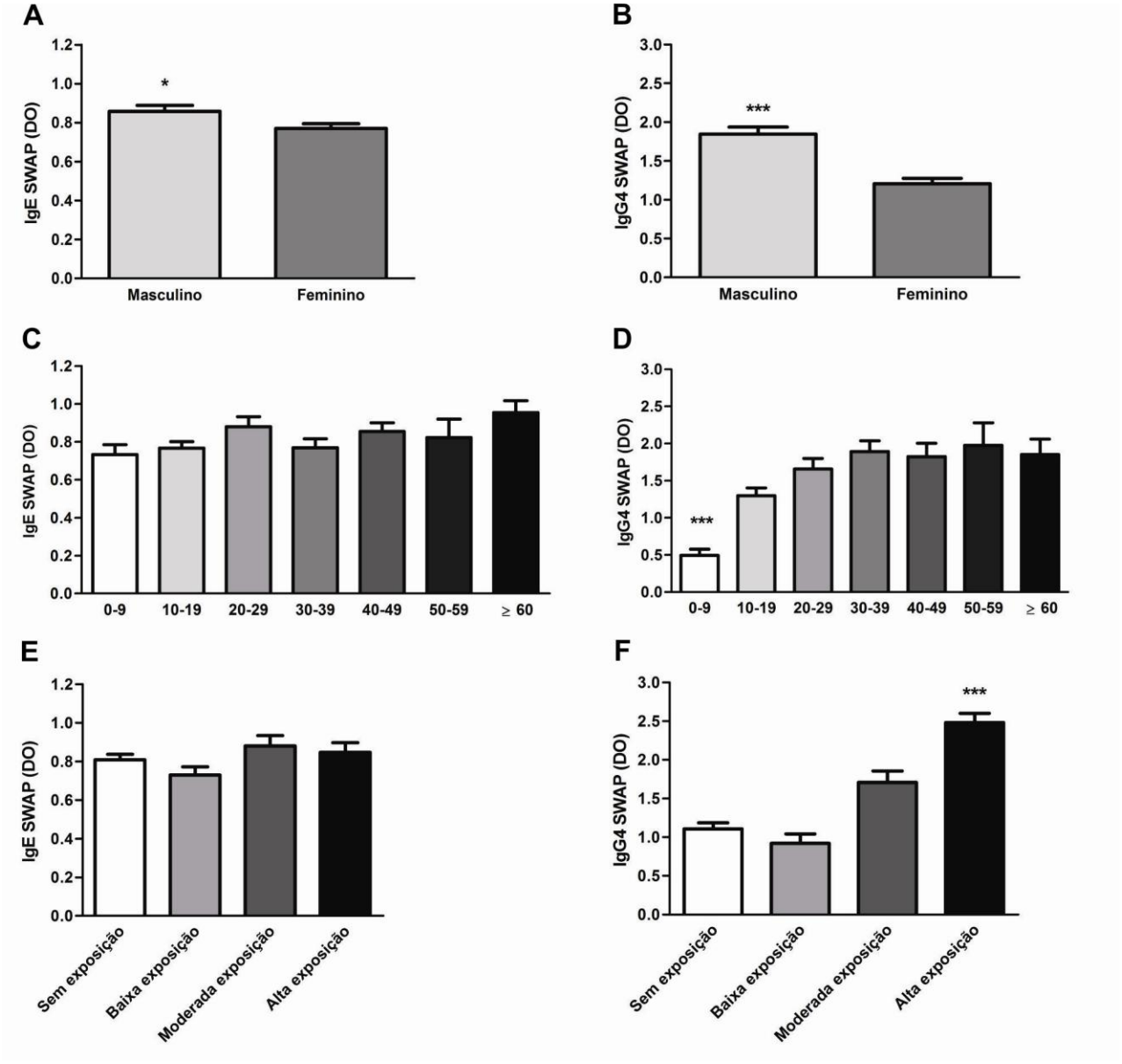


Figura 4. Níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP de acordo com o gênero (A e B), faixa etária (C e D) e exposição referida à água do rio (E e F) em residentes do município do Conde-Bahia. Análise estatística utilizando o *Teste t não pareado* para comparação de dois grupos e *ANOVA* para comparar três grupos ou mais. As diferenças estatísticas nos níveis de anticorpos são indicados por asteriscos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A produção de IgE (n = 701) e IgG4 (n = 690) para SEA também foi avaliada na população analisada, sendo detectada em todos os indivíduos a presença destes anticorpos. Os níveis de IgE específico para SEA apresentaram média de 1,02 ± 0,46 DO, enquanto que a média dos níveis de IgG4 foi 2,44 ± 1,07 DO (Figura 5).

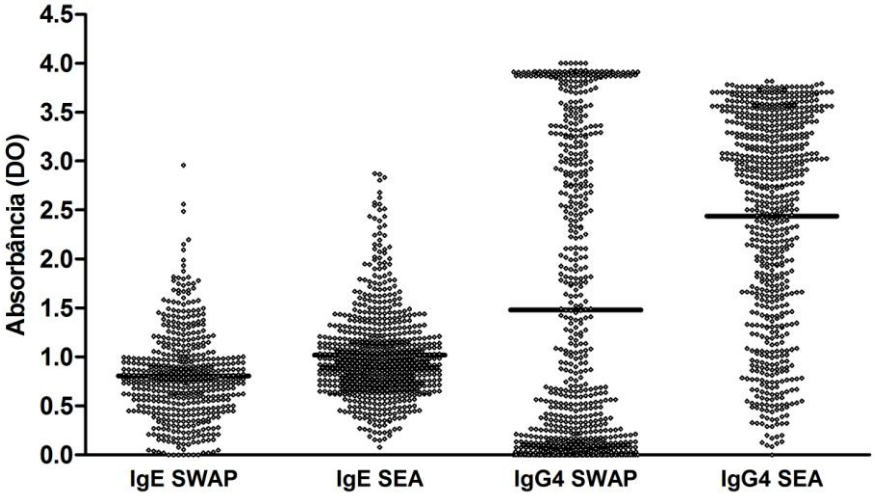


Figura 5. Distribuição dos níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA em residentes do município do Conde-Bahia.

As dosagens de IgE e IgG4 específicos mostraram-se mais elevados para SEA quando comparados com as dosagens para SWAP (Figura 5). Semelhante às dosagens de IgE para SWAP, foi observado tendência de concentração em torno da média dos níveis de IgE específico para SEA. No entanto, a distribuição dos níveis de IgG4 específicos para SEA diferiu da distribuição bimodal observada nos níveis de IgG4 para SWAP (Figura 5).

As dosagens de IgE e IgG4 direcionados para SEA foram analisadas em relação ao gênero, idade e exposição à água do rio (Figura 6). Os níveis de IgE foram mais elevados no gênero masculino (1,07 ± 0,46 DO) do que no feminino (0,98 ± 0,45 DO, $p < 0,01$, Figura 6A). Da mesma forma, foram encontrados níveis mais elevados de IgG4 no gênero masculino quando comparado ao feminino (2,70 ± 0,93 DO e 2,23 ± 1,11 DO; respectivamente, $p < 0,001$, Figura 6B).

Quanto à distribuição por faixas etárias das dosagens de anticorpos específicos para SEA, os níveis de IgE foram mais elevados nas primeiras duas décadas de vida com redução gradual em relação às outras faixa etárias ($p < 0,001$), sendo que os indivíduos com idade entre 10 e 19 anos (1,27 ± 0,46 DO) apresentaram níveis mais elevados quando comparados

aos indivíduos com faixa etária de 30 a 39 anos (0,96 ± 0,35 DO; $p < 0,05$) e aos indivíduos com idade igual ou maior que 60 anos (0,79 ± 0,45 DO; $p < 0,001$; Figura 6C). Os níveis de IgG4 específico, foram encontrados mais baixos nas faixas etárias extremas, de 0 a 9 anos (1,89 ± 1,15 DO) e acima de 60 anos (2,13 ± 1,05 DO), quando comparados às outras faixas etárias ($p < 0,0001$; Figura 6D).

Em relação ao grau de exposição à água do rio referido pelos indivíduos da área endêmica, não foi observado diferença significativa em relação às dosagens de IgE específica para SEA nos diferentes grupos de exposição (Figura 6E). Entretanto, os níveis de IgG4 específico foram maiores de acordo com o aumento da exposição à água do rio referida, sendo os valores de 2,20 ± 1,09 DO no grupo que negou exposição, 2,19 ± 1,12 DO entre os que responderam ter baixa exposição, 2,72 ± 0,90 DO exposição intermediária e 2,95 ± 0,86 DO entre os altamente expostos à água do rio ($p < 0,001$; Figura 6F).

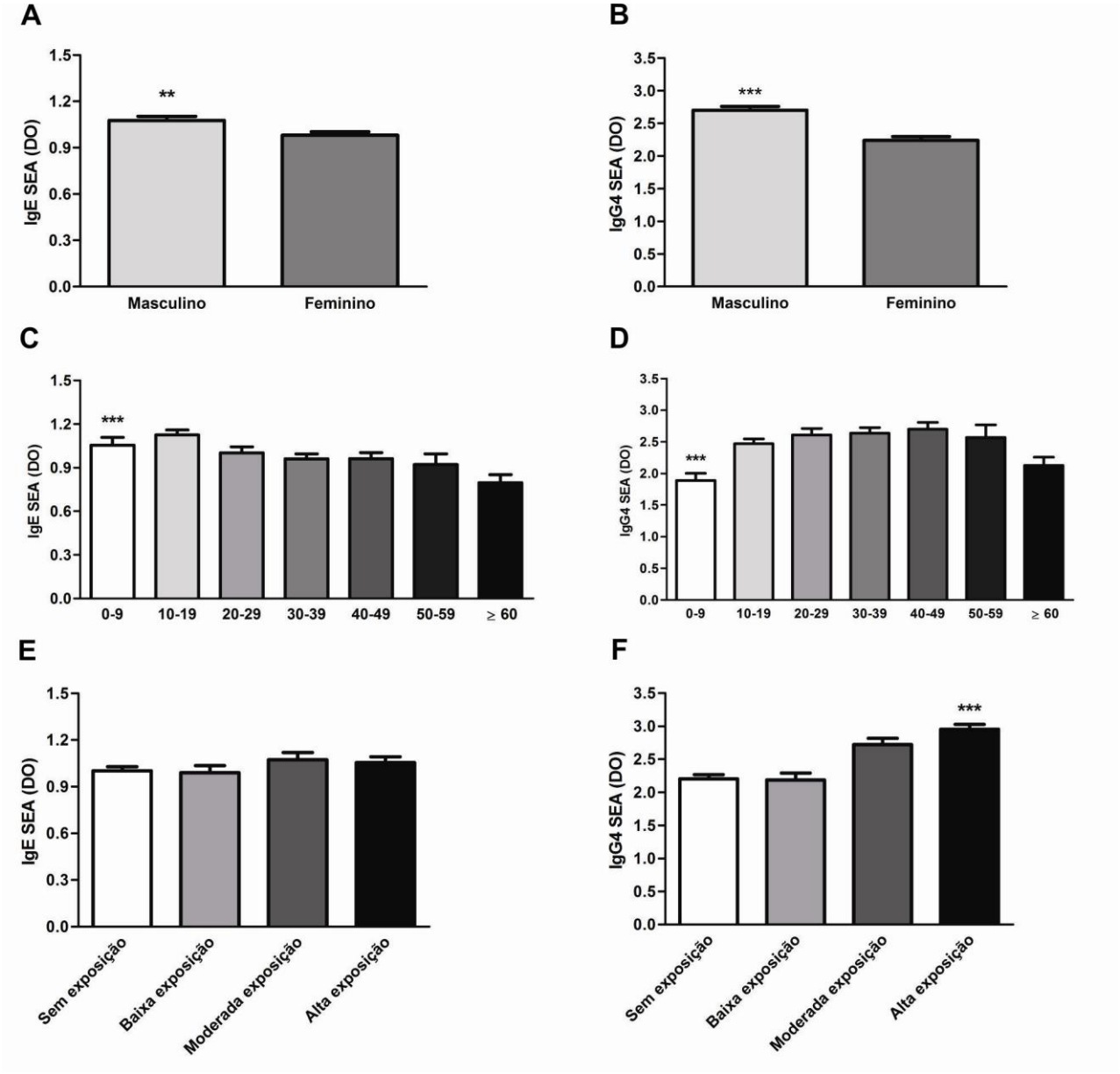


Figura 6. Níveis de IgE e IgG4 específicos para SEA de acordo com o gênero (A e B), faixa etária (C e D) e exposição referida à água do rio (E e F) em residentes do município do Conde-Bahia. Análise estatística utilizando o *Teste t não pareado* para comparação de dois grupos e *ANOVA* para comparar três grupos ou mais. As diferenças estatísticas nos níveis de anticorpos são indicados por asteriscos: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Quando avaliado a relação entre intensidade de infecção pelo *S. mansoni* e níveis de anticorpos específicos observou-se correlação positiva com os níveis de IgE total ($r = 0,24$; $p < 0,05$, Figura 7A), mas não houve correlação com os níveis de IgE específico para SWAP ($r = 0,04$; $p > 0,05$; Figura 7B), quando ajustado para idade, gênero e nível de exposição.

Analisando da mesma forma, foi observado correlação positiva entre os níveis de IgG4 específico para SWAP com a carga parasitária (r = 0,38; p < 0,001; Figura 7C). Quanto aos anticorpos dirigidos para SEA, houve correlação positiva fraca de IgE (r = 0,19; p < 0,001; Figura 7D) e de IgG4 específicos (r = 0,42; p < 0,001; Figura 7E) com carga parasitária.

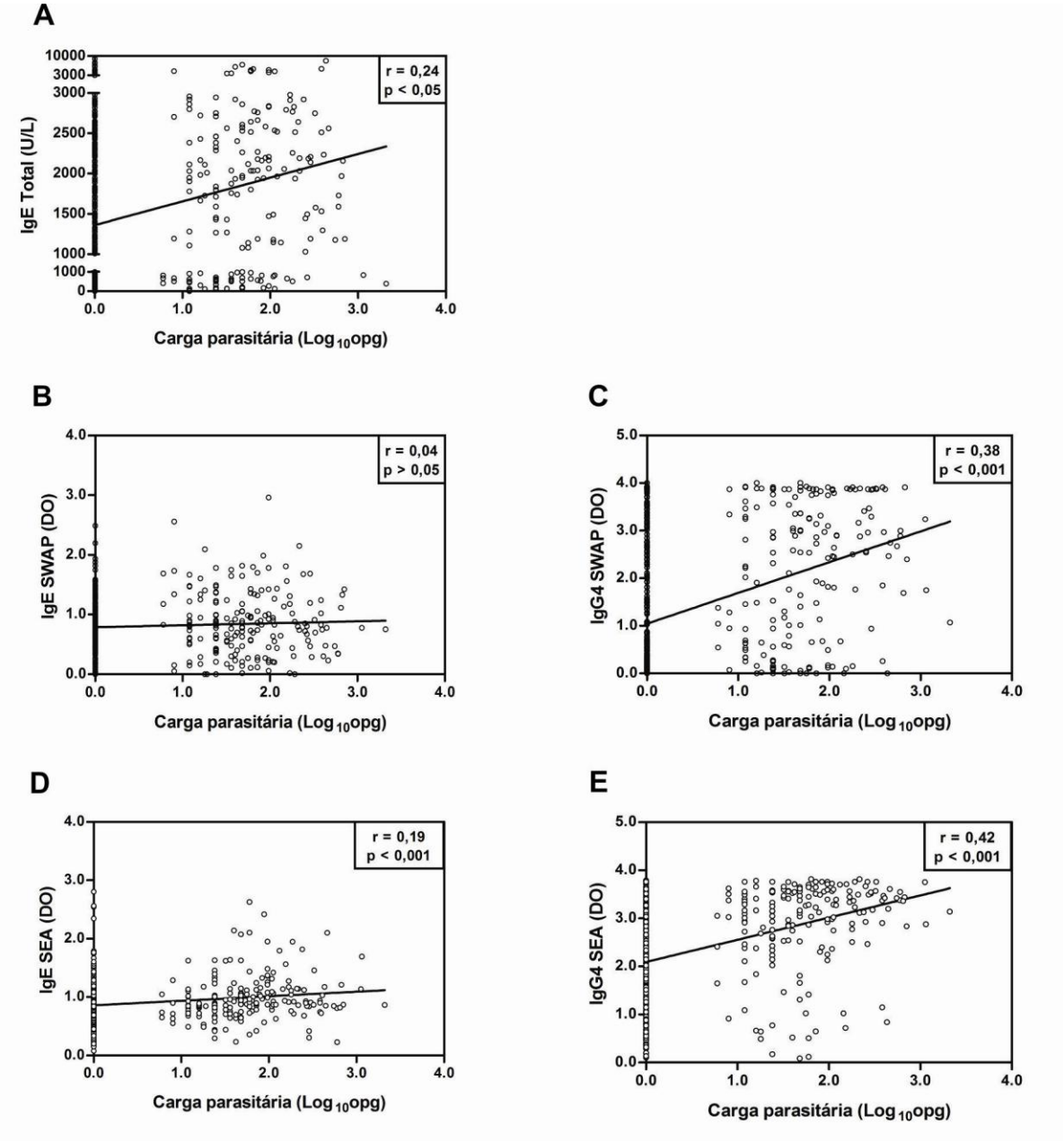


Figura 7. Correlação entre carga parasitária e níveis de IgE total (A), IgE (B) e IgG4 (C) específicos para SWAP e IgE (D) e IgG4 (E) específicos para SEA em residentes do município do Conde-Bahia. Análise ajustada para idade, gênero e nível de exposição (*r = Coeficiente de correlação de Spearman*)

A razão entre IgE e IgG4 específicos para SWAP foi mais elevada em indivíduos não infectados comparando com indivíduos com intensidade de infecção leve (1-99 opg), moderada (100-399 opg) e intensamente infectados pelo *S. mansoni* (≥ 400 opg; p < 0,001; Figura 8A). Entretanto, não houve diferença significativa entre a razão de IgE/IgG4 específicos para SEA em relação às categorias de carga parasitária (p > 0,05; Figura 8B).

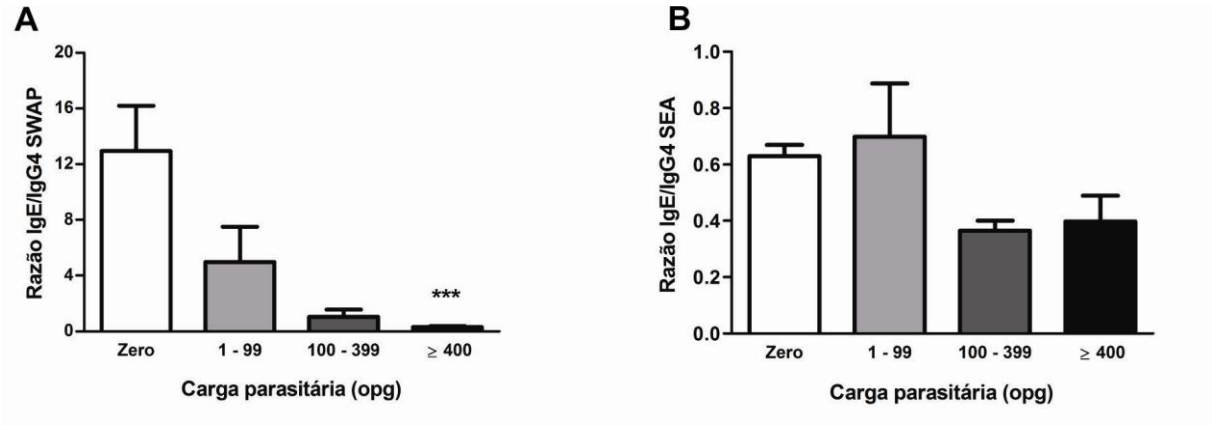


Figura 8. Razão de IgE/IgG4 específicos para SWAP (A) e SEA (B) de acordo com categoria de carga parasitária em residentes do município do Conde-Bahia (***p < 0,001; *ANOVA*).

A Tabela 4 mostra os níveis de IgE total e IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA nos grupos de indivíduos infectados ou não pelo *S. mansoni*. Os níveis de IgE total foram mais elevados nos indivíduos infectados (1850,0 ± 1273,6 U/L) que no grupo dos não infectados (1362,3 ± 1250,6 U/L, p < 0,001), assim como os níveis de IgE para SWAP foram mais elevados nos indivíduos infectados quando comparado aos não infectados (0,860 ± 0,531 DO e 0,780 ± 0,375 DO; respectivamente; p < 0,05) e de IgE para SEA (0,990 ± 0,381 DO e 0,862 ± 0,368 DO; respectivamente; p < 0,001). Da mesma forma, os indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, comparando com os não infectados, apresentaram níveis mais elevados de IgG4 para SWAP (2,178 ± 1,430 DO e 1,044 ± 1,351 DO; respectivamente; p < 0,001) e de IgG4 para SEA (2,928 ± 0,894 DO e 2,072 ± 1,071 DO; respectivamente; p < 0,001).

Adicionalmente, ao analisar a razão de IgE/IgG4 para SWAP não ajustada nos grupos de indivíduos infectados ou não pelo *S. mansoni* foram observados valores mais baixos no grupo dos infectados (3,78 ± 2,30) quando comparado ao grupo dos não infectados (12,94 ± 54,09, $p < 0,01$), não sendo observado diferença significativa da razão IgE/IgG4 para SEA entre os grupos analisados.

Os indivíduos de área endêmica infectados pelo *S. mansoni*, independentemente da idade, gênero e nível de exposição à água do rio, apresentam níveis mais elevados de IgE total e de anticorpos específicos para os antígenos do *S. mansoni* quando comparados a indivíduos não infectados ou com carga parasitária não detectada (Tabela 4). Portanto, a infecção pelo *S. mansoni* foi associada positivamente aos níveis de IgE total (OR ajustado = 1,00; IC = 1,00-1,01; $p < 0,05$), assim como de IgE específico para SWAP (OR ajustado = 1,65; IC = 1,01-2,69; $p < 0,05$) , IgE específico para SEA (OR ajustado = 2,18; IC = 1,21-3,95; $p < 0,05$), IgG4 específico para SWAP (OR ajustado = 1,71; IC = 1,43-2,04; $p < 0,001$), e IgG4 específico para SEA (OR ajustado = 2,12; IC = 1,65-2,72; $p < 0,001$). Adicionalmente, a razão IgE/IgG4 para SWAP foi associada negativamente à infecção pelo *S. mansoni*, apresentando valores mais elevados os indivíduos não infectados ou com carga parasitária não detectada (OR não ajustado = 0,98; IC 0,97-1,00; $p < 0,01$), não sendo observado, entretanto, o envolvimento da razão IgE/IgG4 para SEA na presença de infecção ou não pelo *S. mansoni* (Tabela 4).

Tabela 4. Análise univariada e multivariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e níveis de IgE total e IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA antes do tratamento com Praziquantel em residentes do município do Conde-Bahia (n = 523).

Anticorpos	Sm Negativo (n = 326)	Sm Positivo (n = 197)	Análise não ajustada		Análise ajustada*	
			OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
IgE Total (U/L)	1362,3 ± 1250,6	1850,0 ± 1273,6	1,50 (1,00-2.26)	< 0,001	1,00 (1,00-1,01)	< 0,05
IgE anti-SWAP (DO)	0,780 ± 0,375	0,860 ± 0,531	1,50 (1,00-2,26)	0,051	1,65 (1,01-2,69)	< 0,05
IgE anti-SEA (DO)	0,862 ± 0,368	0,990 ± 0,381	2,48 (1,52-4,05)	< 0,001	2,18 (1,21-3,95)	< 0,05
IgG4 anti-SWAP (DO)	1,044 ± 1,351	2,178 ± 1,430	1,70 (1,49-1,94)	< 0,001	1,71 (1,43-2,04)	< 0,001
IgG4 anti-SEA (DO)	2,072 ± 1,071	2,928 ± 0,894	2,40 (1,94-2,98)	< 0,001	2,12 (1,65-2,72)	< 0,001
IgE/IgG4 anti-SWAP	12,94 ± 54,09	3,78 ± 2,30	0,98 (0,97-1,00)	< 0,01	0,99 (0,98-1,00)	0,249
IgE/IgG4 anti-SEA	0,630 ± 0,720	0,603 ± 1,825	0,98 (0,84-1,14)	0,809	0,80 (0,60-1,06)	0,124

*Análises ajustadas para idade, gênero e nível de exposição à água do rio, Regressão logística.
Valores apresentados em Média ± DP. Sm = *Schistosoma mansoni*.

6.1.3. Produção de IgE e IgG4 específica para antígeno de verme adulto (SWAP) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* após tratamento com Praziquantel

O tratamento geral da população das vilas do município do Conde, Bahia atingiu 60,3%, sendo que, dos 707 indivíduos que aceitaram participar do estudo, 61,7% (n=385) usaram Praziquantel. Analisando as características dos indivíduos que receberam ou não o tratamento, foi observado que a carga parasitária foi mais elevada nos indivíduos tratados (67,0 ± 178,8 opg) quando comparado à carga dos indivíduos que não receberam medicação (13,0 ± 65,3 opg; p < 0,001). Os indivíduos tratados eram mais expostos à água contaminada, sendo que 28,4% deles estavam altamente expostos, enquanto que dentre os indivíduos não tratados, 7,7% apenas apresentavam alto nível de exposição (p < 0,001). O grupo que recebeu medicação era composto por mais jovens (24,4 ± 16,2 anos) comparando aos que não foram tratados (35,0 ± 21,4 anos; p < 0,001) e moravam em vilas mais próximas ao local onde foi oferecido o tratamento.

Após seis meses, 101 indivíduos dos 385 que receberam tratamento com Praziquantel e eram positivos para *S. mansoni* antes do tratamento, aceitaram que fosse examinada pelo menos uma amostra de fezes. Estes indivíduos estavam infectados antes do tratamento com

Praziquantel com carga de 118,2 ± 236,6 opg, variando de 6 a 2100 opg. Seis meses após o tratamento, cerca de 24% (24/101) foram reinfectados (Figura 9A). Embora a frequência de reinfecção pelo *S. mansoni* tenha sido elevada, a carga parasitária foi baixa, com média de 3,15 ± 6,9 opg, variando de 0 a 42 opg (Figura 9B). Interessante notar que entre os avaliados, destacou-se um indivíduo pela elevada carga parasitária de 2100 opg antes do tratamento, do gênero masculino, 10 anos de idade, com exposição moderada à água do rio e que, após o uso do Praziquantel, apresentou as duas amostras de fezes examinadas negativas para ovos de *S. mansoni*. Além dos indivíduos serem moradores de área endêmica, é provável que no período de tempo avaliado não tenha ocorrido modificações em relação à exposição à infecção por helmintos.

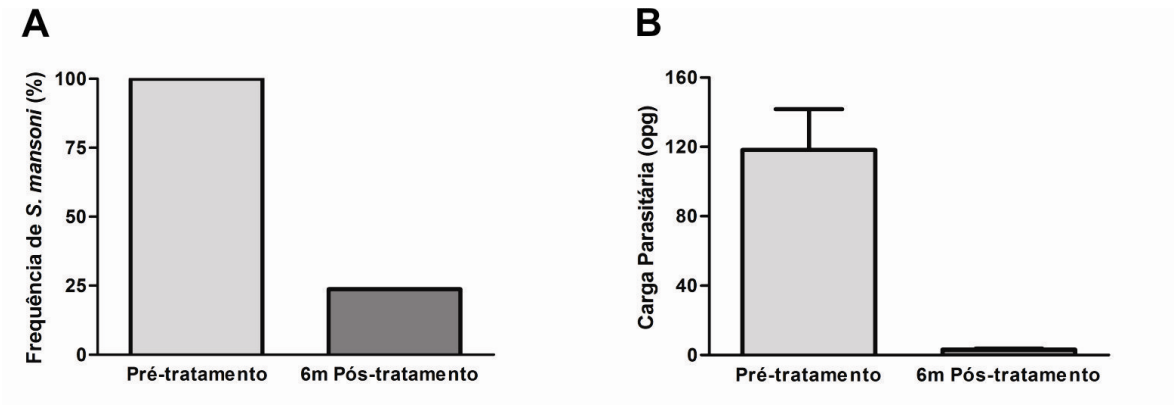


Figura 9. Frequência de reinfecção pelo *S. mansoni* (A) e carga parasitária (B) antes e seis meses após tratamento com Praziquantel em residentes do município do Conde-Bahia.

Dos 101 indivíduos que foram avaliados com exame parasitológico de fezes após seis meses, 86 aceitaram coletar sangue para a análise dos níveis de IgE e IgG4 específicos. Com relação aos níveis de IgE específicos, houve redução dos níveis seis meses após o tratamento, passando de 0,78 ± 0,55 para 0,27 ± 0,28 DO ($p < 0,001$; Figura 10A). Antes do tratamento, os indivíduos investigados apresentaram médias elevadas de IgG4 específico para SWAP

(1,99 ± 1,47 DO). Seis meses após tratamento, os níveis destes anticorpos aumentaram significativamente (2,38 ± 1,52 DO, p < 0,001, Figura 10B).

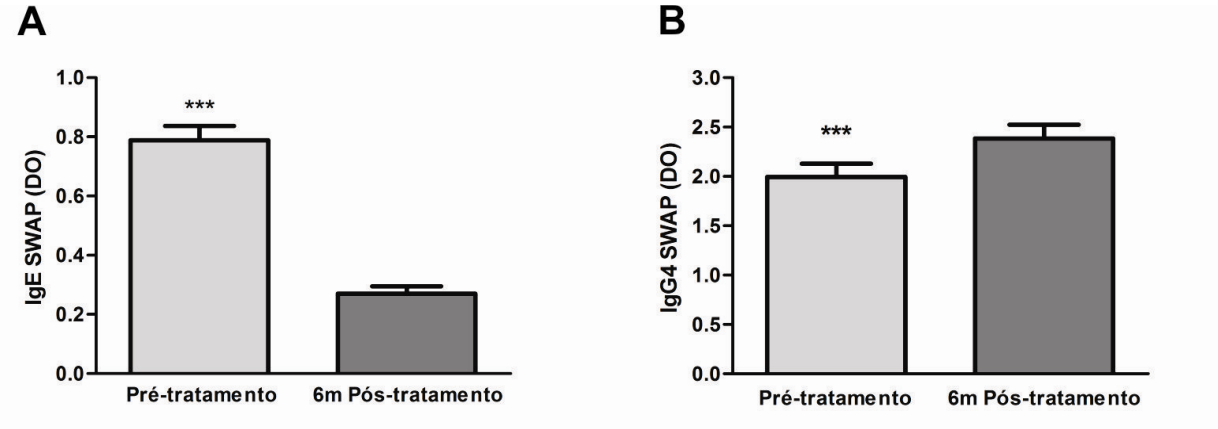


Figura 10. Níveis de IgE (A) e IgG4 (B) específicos para SWAP antes e seis meses após tratamento com Praziquantel em residentes do município do Conde-Bahia (***p < 0,001; *Teste t pareado*).

Os indivíduos então foram divididos em grupos que se reinfectaram e que não se reinfectaram seis meses após o tratamento (Tabela 5). Independente do nível de exposição, a reinfecção após o tratamento não se mostrou associada à idade (OR ajustado = 0,93; IC = 0,92-1,01; p > 0,05), gênero (OR ajustado = 1,69; IC = 0,59-4,80; p > 0,05) e carga parasitária antes do tratamento (OR ajustado = 1,00; IC = 1,00 – 1,01; p > 0,05; Tabela 5). Além disso, não houve diferença significativa entre os que reinfectaram ou não de acordo com o nível de exposição à água do rio e região do domicílio (dados não mostrados).

Tabela 5. Análise univariada e multivariada da associação entre reinfecção pelo *S. mansoni* seis meses após o tratamento com Praziquantel e idade, gênero e carga parasitária para *S. mansoni* em residentes do município do Conde-Bahia (n = 86).

.	**Não reinfectado pelo Sm (n = 66)**	**Reinfectado pelo Sm (n = 20)**	**Análise não ajustada**		**Análise ajustada**	
			OR (95% IC)	**P**	**OR (95% IC)**	**P**
Idade*	23,0 ± 15,1	21,4 ± 10,7	0,96 (0,92-1,00)	< 0,05	0,93 (0,92-1,01)	0,129[a]
Faixa etária [n (%)]						
0 – 9 anos	12 (18,2)	6 (30,0)	1,00		1,00	
10 – 19 anos	22 (33,3)	9 (45,0)	0,82 (0,23-2,86)		0,93 (0,25-3,43)	
20 – 29 anos	13 (19,7)	2 (10,0)	0,31 (0,05-1,83)		0,35 (0,06-2,17)	
30 – 39 anos	9 (13,6)	2 (10,0)	0,44 (0,07-2,74)		0,49 (0,07-3,17)	
40 – 49 anos	7 (10,6)	1 (5,0)	0,29 (0,03-2,89)		0,36 (0,03-3,91)	
50 – 59 anos	1 (1,5)	0	-		-	
≥ 60 anos	2 (3,0)	0	-	0,532	-	0,505[a]
Gênero [n (%)]						
Masculino	35 (53,0)	8 (40,0)	1,00		1,00	
Feminino	31 (47,0)	12 (60,0)	1,69 (0,61-4,68)	0,306	1,69 (0,59-4,80)	0,267[a]
Carga Sm pré-tratamento (opg)*	136,1 ± 278,8	119,8 ± 146,1	1,00 (1,00-1,01)	0,793	1,00 (1,00-1,01)	0,321[b]
Nível de infecção pelo Sm [n (%)]						
1 a 99 opg	46 (69,7)	12 (60,0)	1,00		1,00	
100 a 399 opg	15 (22,7)	7 (35,0)	1,79 (0,60-5,37)		1,51 (0,44-5,22)	
≥ 400 opg	5 (7,6)	1 (5,0)	0,77 (0,08-7,20)	0,544	0,26 (0,02-2,95)	0,138[b]

[a]Análises ajustadas para nível de exposição à água do rio, Regressão logística.
[b]Análises ajustadas para idade, gênero e nível de exposição à água do rio.
*Valores apresentados em média ± DP. Sm = *Schistosoma mansoni*.

Analisando os níveis de anticorpos antes e seis meses após o tratamento, não foi observado associação da presença de reinfecção com os níveis de IgE total e IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA, independente da idade, gênero e nível de exposição à água do rio (Tabela 6). A reinfecção pelo *S. mansoni*, portanto, não se mostrou associada a níveis de IgE total antes do tratamento (OR ajustado = 1,00; IC = 0,99-1,00; p > 0,05) ou após o tratamento (OR ajustado = 1,00; IC = 0,99-1,00; p > 0,05), assim como de IgE específico para SWAP antes e após tratamento (OR ajustado = 1,65; IC = 0,53-5,11; p > 0,05 e OR ajustado = 2,37; IC = 0,31-17,98; p > 0,05, respectivamente) e IgG4 específico para SWAP antes e após tratamento (OR ajustado = 1,12; IC = 0,68-1,85; p > 0,05 e OR ajustado = 1,17; IC = 0,76-1,81; p > 0,05, respectivamente). Da mesma forma a reinfecção pelo *S. mansoni* não esteve associada a níveis de IgE e IgG4 para SEA antes do tratamento (OR ajustado = 4,46; IC =

0,99-20,13; p > 0,05 e OR ajustado = 1,18; IC = 0,59-2,37; p > 0,05, respectivamente). Adicionalmente, a razão entre IgE/IgG4 para SWAP não interferiu no risco destes indivíduos de se reinfectarem, tanto no que diz respeito à razão antes do tratamento (OR ajustado = 1,06; IC = 0,96-1,16; p > 0,05) quanto em relação à razão após o tratamento com Praziquantel (OR ajustado 0,99 IC = 0,95-1,04; p > 0,05; Tabela 6). Os valores da razão IgE/IgG4 específico para SEA antes do tratamento também não interferiram na presença ou não de reinfecção pelo *S. mansoni* seis meses após o tratamento (OD ajustado = 1,24; IC 0,47-3,27; p > 0,05, Tabela 6).

Tabela 6. Análise univariada e multivariada da associação entre reinfecção pelo *S. mansoni* e níveis de IgE total, IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA antes e após o tratamento com Praziquantel, em residentes do município do Conde-Bahia (n = 86).

Anticorpos[a]	**Não reinfectado pelo Sm (n = 66)**	**Reinfectado pelo Sm (n = 20)**	**Análise não ajustada**		**Análise ajustada**[b]	
			OR (95% IC)	**P**	**OR (95% IC)**	**P**
IgE Total (U/L)						
Pré-tratamento	1843,3 ± 1437,7	1976,9 ± 856,8	1,00 (0,99-1,00)	0,708	1,00 (0,99-1,00)	0,973
Pós-tratamento	2859,0 ± 2998,4	3015,1 ± 2014,8	1,00 (0,99-1,00)	0,826	1,00 (0,99-1,00)	0,896
IgE anti-SWAP (DO)						
Pré-tratamento	0,847 ± 0,588	0,846 ± 0,644	1,00 (0,41-2,41)	0,993	1,65 (0,53-5,11)	0,386
Pós-tratamento	0,262 ± 0,248	0,301 ± 0,315	1,74 (0,27-11,31)	0,567	2,37 (0,31-17,98)	0,403
IgE anti-SEA (DO)						
Pré-tratamento	1,011 ± 0,345	1,215 ± 0,392	4,16 (1,11-15,61)	< 0,05	4,46 (0,99-20,13)	0,052
IgG4 anti-SWAP (DO)						
Pré-tratamento	1,866 ± 1,469	1,761 ± 1,601	0,95 (0,65-1,40)	0,804	1,12 (0,68-1,85)	0,666
Pós-tratamento	2,184 ± 1,641	2,050 ± 1.549	0,95 (0,67-1,34)	0,767	1,17 (0,76-1,81)	0,485
IgG4 anti-SEA (DO)						
Pré-tratamento	2,906 ± 0,878	3,029 ± 0,980	1,18 (0,64-2,18)	0,593	1,18 (0,59-2,37)	0,390
IgE/IgG4 anti-SWAP						
Pré-tratamento	1,480 ± 2,927	11,057 ± 31,175	1,05 (0,95-1,17)	0,058	1,06 (0,96-1,16)	0,259
Pós-tratamento	4,852 ± 30,980	1,895 ± 4,630	0,99 (0,96-1,03)	0,683	0,99 (0,95-1,04)	0,767
IgE/IgG4 anti-SEA						
Pré-tratamento	0,478 ± 0,581	0,532 ± 0,503	1,17 (0,50-2,74)	0,720	1,24 (0,47-3,27)	0,663

[a]Valores apresentados em média ± DP.
[b]Análises ajustadas para idade, gênero e nível de exposição à água do rio, Regressão logística.
Sm = *Schistosoma mansoni*

A figura 11 apresenta os níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP nos indivíduos que se reinfectaram ou não seis meses após o tratamento com Praziquantel. Os níveis de IgE específico não apresentaram mudanças significativas entre os indivíduos que se reinfectaram e os que não se reinfectaram (0,301 ± 0,315 DO e 0,262 ± 0,248 DO; respectivamente; $p > 0,05$). Da mesma forma, não houve variação significativa dos níveis de IgG4 específico entre os indivíduos que se reinfectaram (2,050 ± 1,549 DO) e aqueles que não se reinfectaram após o tratamento (2,184 ± 1,641 DO, $p > 0,05$).

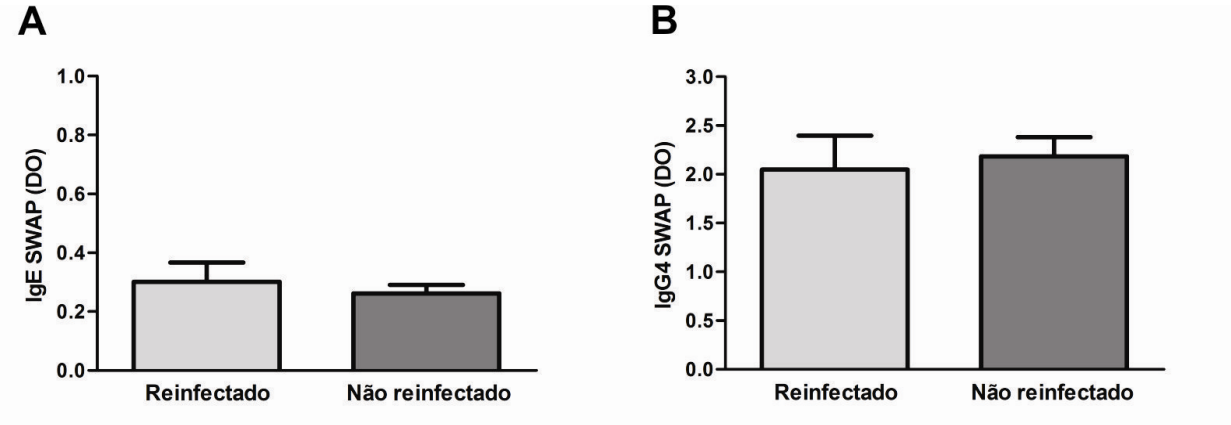


Figura 11. Níveis de IgE (A) e IgG4 (B) específicos para SWAP entre os indivíduos que se reinfectaram e não se reinfectaram após tratamento com Praziquantel (Teste t pareado).

6.2. RESULTADOS REFERENTES AO OBJETIVO ESPECÍFICO 3

6.2.1. Características demográficas e infecções helmínticas nos indivíduos asmáticos e não asmáticos da área endêmica em infecção pelo *S. mansoni*

Com o objetivo de avaliar o papel da IgE e IgG4 na susceptibilidade e proteção para o desenvolvimento da asma, 741 indivíduos que aceitaram participar do estudo, responderam o questionário ISAAC. A prevalência de asma nesta população foi de 11,7%, quando adotado como parâmetro para definir casos de asma a questão número 2 da primeira parte do questionário ISAAC (asma auto referida nos últimos 12 meses). As características dos indivíduos da área endêmica avaliada, asmáticos e não asmáticos, estão detalhados na Tabela 7. Não houve diferença significativa na frequência dos gêneros masculino e feminino entre os grupos de indivíduos asmáticos e nãos asmáticos. A média de idade no grupo de asmáticos foi de 26,1 ± 19,7 anos e no grupo de não asmáticos foi de 26,9 ± 18,6 anos ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa também em relação à frequência de indivíduos nas diferentes faixas etárias entre os dois grupos. Comparando indivíduos asmáticos com os indivíduos não asmáticos, não houve diferença estatística na prevalência e intensidade de infecção pelo *S. mansoni*. Da mesma forma, não foi observada diferença estatística em relação ao grau de exposição à água do rio entre os grupos analisados (dados não mostrados).

As frequências de infecção pelo *T. trichiura*, *A. lumbricoides* e Ancilostomídeos foram semelhantes nos dois grupos. Ajustando as análises para idade e gênero, a presença ou não de infecção por qualquer helminto não esteve associado ao desenvolvimento de asma (OR ajustado = 0,99; IC 0,52-1,88; $p > 0,05$). De todas as infecções testadas neste modelo, apesar de não atingir significância estatística, a ascaridíase foi a que apresentou maior nível de associação positiva com a presença de asma (OR ajustado = 1,54; IC 0,92-2,59; $p = 0,099$), após realização de análise multivariada.

Dos 87 asmáticos incluídos no estudo, 74 (85,1%) realizaram exame parasitológico de fezes e não houve diferença na distribuição entre os gêneros e faixa etária ao comparar o grupo de asmáticos infectados ou não pelo *S. mansoni*, independente da idade, gênero e nível de exposição à água do rio.

Tabela 7. Análises univariada e multivariada da associação entre asma e idade, gênero e infecção por helmintos em residentes do município do Conde-Bahia (n = 741).

.	**Não Asmático (n = 654)**	**Asmático (n = 87)**	**Análise não ajustada**		**Análise ajustada[a]**	
			OR (95% IC)	**P**	**OR (95% IC)**	**P**
Idade*	26,9 ± 18,6	26,1 ± 19,7	1,00 (0,98-1,01)	0,688		
Faixa etária [n (%)]						
0 – 9 anos	110 (16,8)	19 (21,8)	1,00			
10 – 19 anos	200 (30,6)	25 (28,7)	0,72 (0,38-1,37)			
20 – 29 anos	99 (15,1)	11 (12,6)	0,64 (0,29-1,42)			
30 – 39 anos	99 (15,1)	11 (12,6)	0,64 (0,29-1,42)			
40 – 49 anos	65 (9,9)	9 (10,3)	0,80 (0,34-1,88)			
50 – 59 anos	27 (4,1)	3 (3,4)	0,64 (0,18-2,33)			
≥ 60 anos	54 (8,3)	9 (10,3)	0,96 (0,41-2,27)	0,893		
Gênero [n (%)]						
Masculino	275 (42,0)	35 (40,2)	1,00			
Feminino	379 (58,0)	52 (59,8)	0,93 (0,59-1,46)	0,104		
S. mansoni [n (%)]						
Negativo	228 (56,4)	42 (57,5)	1,00		1,00	
Positivo	223 (43,6)	31 (42,5)	0,95 (0,58-1,56)	0,850	0,95 (0,57-1,59)	0,856
Carga Sm (opg)*	51,2 ± 156,5	44,6 ± 96	1,00 (0,99-1,00)	0,726	0,99 (0,99-1,00)	0,749
Nível de infecção pelo Sm [n (%)]						
Negativo	288 (56,4)	43 (58,1)	1,00		1,00	
1 a 99 opg	154 (30,1)	21 (28,4)	0,91 (0,52-1,60)		0,92 (0,52-1,62)	
100 a 399 opg	58 (11,4)	8 (10,8)	0,92 (0,41-2,07)		0,92 (0,41-2,08)	
≥ 400 opg	11 (2,2)	2 (2,7)	1,22 (0,26-5,68)	0,977	1,26 (0,26-5,98)	0,953
Infecção por helmintos [n (%)]						
Trichuris trichiura						
Negativo	156 (30,5)	24 (32,9)	1,00		1,00	
Positivo	335 (69,5)	49 (67,1)	0,90 (0,53-1,51)	0,685	0,86 (0,50-1,48)	0,587
Ascaris lumbricoides						
Negativo	236 (46,2)	26 (35,6)	1,00		1,00	
Positivo	275 (53,8)	47 (64,4)	1,55 (0,93-2,58)	0,091	1,54 (0,92-2,59)	0,099
Ancilostomídeos						
Negativo	356 (69,7)	49 (67,1)	1,00		1,00	
Positivo	155 (30,3)	24 (32,9)	1,12 (0,67-1,90)	0,659	1,12 (0,66-1,90)	0,587
Qualquer helminto						
Negativo	97 (19,0)	14 (18,9)	1,00		1,00	
Positivo	414 (81,0)	60 (81,1)	1,00 (0,54-1,87)	0,990	0,99 (0,52-1,88)	0,969

[a]Análises ajustadas para idade e gênero, Regressão logística.
*Valores apresentados em média ± DP. Sm = *Schistosoma mansoni*.

6.2.2. Níveis de anticorpos em asmáticos de área endêmica em infecção pelo *S. mansoni*

A Tabela 8 mostra os níveis de IgE total, IgE e IgG4 específicos para Der p1 em indivíduos asmáticos e não asmáticos de área endêmica em esquistossomose. Os níveis de IgE total foram mais elevados nos asmáticos em relação aos não asmáticos (1903 ± 1500 U/L e 1579 ± 1316 U/L, respectivamente, $p < 0,05$). Da mesma forma, os níveis de IgE específico para Der p1 foram mais elevados no grupo de asmáticos (0,683 ± 0,420 DO) comparando aos não asmáticos (0,570 ± 0,390 DO; $p < 0,05$). Já em relação às dosagens de IgG4 específico para Der p1 não houve diferença significativa entre os asmáticos (1,380 ± 0,957 DO) e não asmáticos (1,289 ± 0,818 DO; $p > 0,05$). Ao analisar a razão entre IgE e IgG4 específico para Der p1, não foi observada diferença significativa entre os níveis dos indivíduos asmáticos e não asmáticos (0,746 ± 0,687 DO e 0,708 ± 0,853 DO, respectivamente; $p > 0,05$). Independente da idade e do gênero, foram associados positivamente à presença de asma, os níveis elevados de IgE total (OR ajustado = 1,00; IC 1,00-1,001; $p < 0,05$) e específico para Der p1 (OR ajustado = 2,00; IC 1,14-3,53; $p < 0,05$), o que não ocorreu com os níveis de IgG4 para Der p1.

Tabela 8. Análise univariadas e multivariada da associação entre asma e níveis de IgE total, IgE e IgG4 específicos para Der p1 em residentes do município do Conde-Bahia (n = 741).

Anticorpos[a]	Não Asmático (n = 654)	Asmático (n = 87)	Análise não ajustada		Análise ajustada[b]	
			OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
IgE Total (U/L)	1578,7 ± 1316,1	1902,9 ± 1500,3	1,00 (1,00-1,01)	< 0,05	1,00 (1,00-1,01)	< 0,05
IgE anti-Der p1 (DO)	0,570 ± 0,390	0,683 ± 0,420	1,93 (1,10-3,37)	< 0,05	2,00 (1,14-3,53)	< 0,05
IgG4 anti-Der p1 (DO)	1,289 ± 0,818	1,380 ± 0,957	1,13 (0,86-1,50)	0,378	1,12 (0,84-1,50)	0,452
IgE/IgG4 anti-Der p1	0,708 ± 0,853	0,746 ± 0,687	1,05 (0,80-1,39)	0,715	1,07 (0,81-1,41)	0,646

[a]Valores apresentados em média ± DP.
[b]Análises ajustadas para idade e gênero, Regressão logística.

Foram também avaliados a frequência de asma e os níveis de anticorpos específicos para o alérgeno Der p1 nos grupos de indivíduos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* (Tabela 9). De forma semelhante, a frequência de asma entre os indivíduos infectados pelo *S. mansoni* foi de 12,6% e no grupo de indivíduos sem a infecção, 12,7%. Os níveis de IgE para Der p1 foram mais baixos no grupo de indivíduos infectados que nos indivíduos não infectados (0,600 ± 0,353 DO e 0,698 ± 0,371 DO, respectivamente; $p < 0,01$), enquanto que não houve diferença significativa nos níveis de IgG4 específico entre os dois grupos. Foi também observado que a razão IgE/IgG4 para Der p1 foi mais baixa no grupo de indivíduos infectados, comparando com os não infectados pelo *S. mansoni* (0,762 ± 0,913 e 0,941 ± 1,003, respectivamente; $p < 0,05$).

Ao analisar a influência dos anticorpos específico para alérgeno de ácaro (Der p1), na presença de infecção ou não pelo *S. mansoni* em indivíduos de área endêmica em esquistossomose, foi observado que tanto os níveis de IgE (OR não ajustado = 0,48; IC = 0,29-0,79; $p < 0,01$) quanto a razão IgE/IgG4 para Der p1 (OR não ajustado = 0,81; IC = 0,65-0,99; $p < 0,05$) foram associados negativamente à presença de infecção pelo *S. mansoni* na população estudada, embora essa associação não tenha sido observada quando as análises foram ajustadas pela idade e gênero (Tabela 9). Não foi observado associação entre os níveis de IgG4 para Der p1 e presença ou não de infecção pelo *S. mansoni* (Tabela 9).

Tabela 9. Análise univariada e multivariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e frequência de asma, níveis de IgE e IgG4 específicos para Der p1 em residentes do município do Conde-Bahia (n = 523).

	Sm Negativo (n = 326)	**Sm Positivo (n = 197)**	**Análise não ajustada**		**Análise ajustada***	
			OR (95% IC)	**P**	**OR (95% IC)**	**P**
Frequência de Asma [n/total (%)]	42/330 (12,7)	32/255 (12,6)	0,98 (0,60-1,61)	0,949	1,29 (0,73-2,27)	0,381
IgE anti-Der p1 (DO)**	0,698 ± 0,371	0,600 ± 0,353	0,48 (0,29-0,79)	< 0,01	0,82 (0,44-1,52)	0,523
IgG4 anti-Der p1 (DO)**	2,243 ± 0,893	1,258 ± 0,768	1,02 (0,83-1,26)	0,839	0,91 (0,70-1,19)	0,492
IgE/IgG4 anti-Der p1**	0,941 ± 1,003	0,762 ± 0,913	0,81 (0,65-0,99)	< 0,05	0,97 (0,76-1,23)	0,775

*Análises ajustadas para idade, gênero e nível de exposição à água do rio, Regressão logística.
**Valores apresentados em Média ± DP. Sm = *Schistosoma mansoni*.

A comparação dos níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA dos indivíduos asmáticos e não asmáticos de área endêmica em *S. mansoni* são mostrados na Tabela 10. Não foi observada diferença significativa nos níveis de IgE para SWAP entre asmáticos (0,747 ± 0,480 DO) e não asmáticos (0,651 ± 0,450 DO; p > 0,05) de área endêmica em esquistossomose. Não houve diferença significativa também nos níveis de IgG4 para SWAP, entre os asmáticos e não asmáticos (1,465 ± 1,486 DO e 1,377 ± 1,466 DO, respectivamente; p > 0,05). Da mesma forma, os níveis de anticorpos específicos para SEA não diferiram de forma significativa, entre os grupos de asmáticos e de indivíduos sem asma. As médias das concentrações de IgE para SEA no grupo dos asmáticos foi de 1,000 ± 0,412 DO e no grupo dos indivíduos sem asma 1,017 ± 0,463 DO, (p > 0,05) e de IgG4 para SEA nos grupos de asmáticos e não asmáticos foram 2,488 ± 1,093 DO e 2,435 ± 1,083 DO, respectivamente (p > 0,05; Tabela 10). A presença de asma nos indivíduos de área endêmica não se mostrou associada aos níveis de anticorpos específicos para *S. mansoni*, mesmo quando ajustando as análises para idade e gênero, embora tenha ocorrido uma tendência à associação positiva dos níveis de IgE para SWAP com a presença de asma (OR ajustado = 1,64; IC 0,98-2,74; p = 0,061).

Tabela 10. Análise univariadas e multivariada da associação entre asma e níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA em residentes do município do Conde-Bahia (n = 741).

Anticorpos[a] (DO)	Não Asmático (n = 654)	Asmático (n = 87)	Análise não ajustada		Análise ajustada[b]	
			OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
IgE anti-SWAP	0,651 ± 0,450	0,747 ± 0,480	1,55 (0,94-2,58)	0,093	1,64 (0,98- 2,74)	0,061
IgG4 anti-SWAP	1,377 ± 1,466	1,465 ± 1,486	1,04 (0,89-1,22)	0,626	1,07 (0,90-1,27)	0,464
IgE anti-SEA	1,017 ± 0,463	1,000 ± 0,412	0,92 (0,54-1,57)	0,765	0,88 (0,51-1,52)	0,641
IgG4 anti-SEA	2,435 ± 1,083	2,488 ± 1,093	1,05 (0,84-1,31)	0,693	1,06 (0,84-1,33)	0,632

[a]Valores apresentados em média ± DP.
[b]Análises ajustadas para idade e gênero, Regressão logística.

Analisando os níveis de anticorpos entre asmáticos de área endêmica, infectados e não infectados pelo *S. mansoni*, não foi observado diferença significativa em relação às concentrações de IgE total (1959 ± 942 U/L e 1859 ± 1876 U/L, respectivamente; $p > 0,05$, Tabela 11). Em relação aos anticorpos específicos para o alérgeno, os níveis de IgE para Der p1 dos asmáticos infectados foram mais baixos comparando com asmáticos não infectados (0,553 ± 0,400 DO e 0,820 ± 0,393 DO, respectivamente; $p < 0,01$) e não houve diferença significativa nos níveis de IgG4 para Der p1 entre os dois grupos analisados (1,155 ± 0,797 DO e 1,372 ± 0,978 DO, respectivamente; $p > 0,05$). A razão entre IgE/IgG4 para Der p1 nos asmáticos infectados foi de 0,724 ± 0,773 e 0,891 ± 0,670 nos asmáticos não infectados ($p > 0,05$). Analisando as concentrações séricas dos anticorpos específicos para SWAP, não foi observada diferença significativa entre os valores encontrados de IgE nos asmáticos infectados (0,754 ± 0,567 DO) e não infectados (0,860 ± 0,400 DO, $p > 0,05$; Tabela 11) e também em relação aos níveis de IgG4 nos asmáticos infectados (1,798 ± 1,375 DO) e no grupo dos não infectados pelo *S. mansoni* (1,295 ± 1,523 DO). Entretanto, os níveis de IgE específicos para SEA foram mais elevados no grupo de asmáticos infectados (1,142 ± 0,516 DO) do que no grupo dos asmáticos não infectados pelo *S. mansoni* (0,843 ± 0,278 DO, $p < 0,001$), o que não ocorreu quando comparado os níveis de IgE para SEA entre os dois grupos analisados (2,730 ± 1,073 DO e 2,244 ± 1,106 DO, respectivamente; $p > 0,05$, Tabela 11).

Ao analisar a influência dos níveis de anticorpos na presença ou não de infecção pelo *S. mansoni* em asmáticos residentes em área endêmica em esquistossomose, foi observado que indivíduos asmáticos infectados apresentam níveis de IgE específico para alérgeno de ácaro (Der p1) mais baixos quando comparado ao grupo dos asmáticos não infectados (OR não ajustado = 0,18; IC 0,04-0,72; p < 0,01), embora quando as análises são ajustadas para idade e gênero, foi observada apenas uma tendência à associação negativa (OD ajustado = 0,26; IC 0,06-1,23; p = 0,09, Tabela 11). Por outro lado, a infecção pelo *S. mansoni* nos asmáticos está associada positivamente aos níveis de IgE para SEA com OR (não ajustado) 10,94 (IC 1,56-76,80; p < 0,001). Além disso, há tendência a associação positiva entre níveis de IgG4 para SWAP e presença de infecção pelo *S. mansoni* em asmáticos, ajustando as análises para idade e gênero (OR ajustado = 1,55; IC 0,99-2,43; p = 0,056; Tabela 11). Os demais anticorpos, como IgE total, IgE para SWAP, IgG4 para Der p1 e SEA, assim como a razão IgE/IgG4 para Der p1 não mostraram envolvimento na presença ou não de infecção pelo *S. mansoni* entre os asmáticos analisados (Tabela 11).

Tabela 11. Análises univariadas e multivariada da associação entre infecção pelo *S. mansoni* e níveis dos anticorpos em asmáticos residentes do município do Conde-Bahia (n = 73).

Anticorpos[a]	**Asmáticos não infectados pelo Sm (n = 42)**	**Asmáticos infectados pelo Sm (n = 31)**	**Análise não ajustada**		**Análise ajustada**[b]	
			OR (95% IC)	**P**	**OR (95% IC)**	**P**
IgE Total (U/L)	1859,1 ± 1876,6	1959,5 ± 942,9	1,00 (0,99-1,00)	0,792	1,00 (0,99-1,00)	0,766
IgE anti-Der p1 (DO)	0,820 ± 0,393	0,553 ± 0,400	0,18 (0,04-0,72)	< 0,01	0,26 (0,06-1,23)	0,090
IgG4 anti-Der p1 (DO)	1,372 ± 0,978	1,155 ± 0,797	0,76 (0,41-1,38)	0,349	0,66 (0,33-1,33)	0,248
IgE/IgG4 anti-Der p1	0,891 ± 0,670	0,724 ± 0,773	0,70 (0,32-1,51)	0,355	1,15 (0,47-2,82)	0,757
IgE anti-SWAP (DO)	0,860 ± 0,400	0,754 ± 0,567	0,60 (0,19-1,90)	0,379	0,52 (0,15-1,78)	0,298
IgG4 anti-SWAP (DO)	1,295 ± 1,523	1,798 ± 1,375	1,26 (0,89-1,79)	0,192	1,55 (0,99-2,43)	0,056
IgE anti-SEA (DO)	0,843 ± 0,278	1,142 ± 0,516	10,94 (1,56-76,80)	< 0,001	4,36 (0,63-29,99)	0,135
IgG4 anti-SEA (DO)	2,244 ± 1,106	2,730 ± 1,073	1,54 (0,93-2,54)	0,081	1,75 (0,99-3,08)	0,054

[a]Valores apresentados em média ± DP.
[b]Análises ajustadas para idade e gênero, Regressão logística. Sm = *Schistosoma mansoni*.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados o papel da IgE e IgG4 e fatores de risco na proteção e susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni* e ocorrência de asma em uma grande coorte de indivíduos que vivem em área endêmica em esquistossomose, no município do Conde-BA. Os resultados demonstraram que a resposta imune associada com resistência à infecção pelo *S. mansoni* foi associada ao balanço positivo na produção de IgE/IgG4 específicos para SWAP. Altos níveis de IgG4 específico foram também associados com elevada carga parasitária. Estes achados, ressaltam o papel fundamental da IgG4 e da relação IgE/IgG4 específicos para o antígeno parasitário na resistência à infecção pelo *S. mansoni*. Por outro lado, a associação negativa entre a presença de infecção pelo *S. mansoni* e a razão IgE/IgG4 e níveis de IgE específico para alérgeno de ácaro, Der p1, sugere que a infecção pelo *S. mansoni* protege contra o desenvolvimento da asma, modulando a resposta inflamatória alérgica.

A prevalência de infecção pelo *S. mansoni*, bem como a carga parasitária são influenciados por vários fatores nas comunidades endêmicas, como exposição aos antígenos do ambiente, características comportamentais e aspectos associados à susceptibilidade ou resistência do hospedeiro à infecção; neste caso, relacionados à resposta imunológica intrínseca e predisposição genética. Embora estudos em modelos experimentais possam ser rigidamente controlados, os estudos em populações humanas são mais complexos por se tratarem de indivíduos altamente heterogêneos, variando de acordo com características demográficas, antecedentes genéticos e grau de exposição a infecções (Pinot de Moira et al. 2010).

Neste trabalho, as cargas parasitárias mais elevadas de *S. mansoni* foram observadas entre os indivíduos do gênero masculino e entre crianças e adultos jovens. Outros autores já haviam documentado diferenças na prevalência de infecção pelo *Schistosoma sp* ou na intensidade de infecção, relacionadas à idade e gênero em comunidades rurais endêmicas,

mostrando grau de infecção mais elevado entre os indivíduos jovens do gênero masculino (de Lima e Costa et al. 1993, Kabatereine et al. 2004, Kahama et al. 1999, Klumpp & Webbe 1987, Matthys et al. 2007, Wu et al. 1993). As diferenças de prevalência ou intensidade de infecção relacionada ao gênero são frequentemente atribuídas a fatores socioculturais ou comportamentais (Kabatereine et al. 2004, Matthys et al. 2007, Wu et al. 1993). No entanto, evidências em modelos experimentais indicam possível relação destas diferenças com fatores imunológicos envolvidos na susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni* (Eloi-Santos et al. 1992). Apesar dos homens apresentarem maior carga parasitária neste estudo, foi observado que as mulheres foram mais frequentemente infectadas pelo *S. mansoni*. Aparentemente, a melhor forma de se fazer a medida de contato com a água é através de uma observação prévia para se conhecer os tipos e motivos de contato na região, com a elaboração posterior de um questionário que possa ser aplicado aos hábitos e costumes da população alvo (Gazzinelli et al. 2001). Neste estudo, não foi possível realizar a avaliação da exposição à água do rio através da observação direta, tendo sido utilizado questionário contendo perguntas sobre o local, tempo de exposição à água do rio e o tipo de atividade realizada. Apesar disso, neste estudo, o risco de infecção pelo *S. mansoni* aumentou de acordo com a frequência de exposição à água contaminada. Estes dados comprovam a eficácia do questionário aplicado para análise de exposição à agua do rio, sem tanta interferência de viés de informação. Mesmo assim, a fim de neutralizar a influência do nível de exposição à água dos indivíduos avaliados, as análises foram ajustadas também para os níveis de contato com a água do rio.

A intensidade de infecção pelo *S. mansoni* foi mais elevada nas três primeiras décadas de vida e, independente do nível de exposição à água do rio, os mais jovens foram mais susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni*. De acordo com outros estudos, o pico de infecção pelo parasito ocorre geralmente na puberdade, seguido de redução nos anos seguintes, sugerindo resistência à infecção relacionada à idade em áreas endêmicas de esquistossomose

(Grant et al. 2008, Kabatereine et al. 1999). A observação de que anticorpos, principalmente da classe IgE dirigidos para SWAP, podem desempenhar papel importante na proteção contra infecção pelo *S. mansoni*, e que tende a aumentar com a idade, levou à hipótese de que a resistência à infecção relacionada à faixa etária pode ser mediada por IgE específica aos antígenos parasitários (Webster et al. 1997). Neste estudo, não houve diferença nos níveis de IgE específica para SWAP associada à idade, mas os níveis de IgE específica para SEA foram mais elevados nas primeiras duas décadas de vida, com redução gradual em relação às outras faixa etárias.

Foi observada correlação positiva entre carga parasitária de *S. mansoni* e níveis de IgE total. Isso também foi encontrado por outros autores (Dunne et al. 1992a, Hagan et al. 1991) e poderia resultar da ativação policlonal presente em algumas infecções parasitárias crônicas (Souza-Atta et al. 1999). O papel que a IgE exerce na resposta imune *in vitro* contra *Schistosoma spp.* tem sido demonstrado (Hagan et al. 1991, Viana et al. 1995, Zhang et al. 1997), sugerindo que o aumento dos níveis de IgE pode representar uma tentativa de controlar a infecção. Cabe salientar que os níveis de IgE total foram mais elevados nos indivíduos infectados por qualquer helminto, quando comparando com indivíduos não infectados na referida população. Embora os indivíduos infectados pelo *Schistosoma* apresentem uma frequência maior de infecção pelo *T. trichiura* e pelo *A. lumbricoides*, não foi observado diferença significante nos níveis de IgE total entre os indivíduos infectados pelo *S. mansoni* coinfectados ou não com outros helmintos.

Apesar da evidente associação entre IgE total e intensidade de infecção, não foi encontrada correlação entre IgE especifica para SWAP e carga parasitária, contrariando o que já foi descrito na literatura (Dunne et al. 1992b). Quanto à IgE dirigida para SEA, houve correlação positiva, mesmo que fraca, com a carga parasitária, após ter sido controlado alguns fatores confundidores como idade, gênero e nível de exposição à água do rio. Trabalhos do

grupo de pesquisa do Serviço de Imunologia do HUPES também já havia demonstrado alta hereditariedade para os níveis de IgE total, sugerindo que há genes que controlam a produção de IgE total, independente da relativa proporção de IgE específico para antígeno do *S. mansoni* (Grant et al. 2008). Adicionalmente, nesta mesma população do estudo, foi demonstrado anteriormente que polimorfismos no promotor da citocina regulatória IL-10 estão associados com níveis elevados de IgE total (Grant et al. 2011).

Embora a IgE total possa não estar associada com resistência contra infecções por helmintos, altos níveis de IgE total em detrimento de IgE específico para *Schistosoma sp*, pode resultar em resposta imune com menor capacidade protetora. De fato, foi observada supressão *in vitro* da liberação de histamina por basófilos em infecção por helmintos quando a razão IgE policlonal e específica foi maior que 500:1 (Mitre et al. 2005).

Neste estudo, em concordância com outros trabalhos, foi encontrado associação positiva entre nível de IgG4 específicos para SWAP e SEA e carga parasitária para *S. mansoni* (Hagan et al. 1991, Jiz et al. 2009, Li et al. 2001, Satti et al. 1996). Especula-se que a IgG4 possa competir com a IgE específico pela ligação com o antígeno, interferindo na degranulação dos mastócitos mediada por IgE. Assim, a produção de IgG4, prejudicaria o provável papel protetor de IgE específico na resistência à infecção pelo *S. mansoni* (Jiz et al. 2009).

Apesar da falta de correlação entre IgE específico para SWAP e carga parasitária observada neste estudo, a razão IgE/IgG4 foi menor em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* quando comparado com os indivíduos não infectados, apesar de não ter sido encontrado diferença significativa entre a razão de IgE/IgG4 para SEA em relação às categorias de carga parasitária. Altos níveis de IgE específico para antígenos parasitários tem sido associados com resistência à infecção (Demeure et al. 1993, Dunne et al. 1992a, Hagan et al. 1991, Satti et al. 1996). Entretanto, parece que a expressão da imunidade protetora não depende exclusivamente dos níveis de IgE ou IgG4 específicos mas também do balanço favorável para

produção de IgE (Demeure et al. 1993, Hagan et al. 1991). A razão elevada de IgE/IgG4 específicos para SWAP foi associada com redução da taxa de reinfecção dois anos após tratamento anti-helmíntico (Li et al. 2001). Além disso, tem sido demonstrado também a influência da elevada relação IgE/IgG4 específicos para antígenos *S. mansoni* (Demeure et al. 1993) e *S. haematobium* (Mutapi et al. 2011) na proteção contra infecção. No presente estudo, a resistência à infecção pelo *S. mansoni* esteve associada ao balanço positivo na produção de IgE/IgG4 específicos para SWAP, enquanto que os níveis elevados de IgG4 específico foram associados com elevada carga parasitária. Estes achados ressaltam o papel fundamental da relação IgE/IgG4 específicos na resistência à infecção pelo *S. mansoni*. Essa informação pode ser útil em futuros estudos sobre os antígenos candidatos à vacina na esquistossomose.

No intuito de investigar a resistência/susceptibilidade à reinfecção pelo *S. mansoni*, foram analisados aspectos demográficos e níveis de anticorpos na população estudada, seis meses após o tratamento com Praziquantel. Os pesquisadores do Serviço de Imunologia do HUPES vêm acompanhando a redução da prevalência e intensidade de infecção pelo *S. mansoni* desde o início dos estudos no município do Conde, Bahia. Em 2001, avaliando 216 indivíduos desta região, foi observada prevalência de infecção pelo *S. mansoni* de 90,2% sendo que 40% dos indivíduos estavam altamente infectados, com carga parasitária acima de 400 ovos por grama de fezes (Araujo et al. 2004). Após dez anos, a prevalência desta infecção reduziu para 37,7%, sendo que apenas 6,6% dos moradores avaliados da região apresentavam carga parasitária acima de 400 ovos por grama de fezes. É provável que as melhorias nas condições sanitárias e de habitação, acesso facilitado aos serviços de saúde e tratamentos repetidos com anti-helmínticos, estejam envolvidos na redução da frequência das helmintíases em geral.

Embora a carga parasitária tenha sido baixa após seis meses do tratamento neste estudo, a frequência de reinfecção pelo *S. mansoni* nas comunidades avaliadas foi elevada já

que, nos primeiros doze meses, pouca ou nenhuma reinfecção costuma ser encontrada (Dunne et al. 1992b). Não foi possível avaliar se a resistência à reinfeção pode ser desenvolvida em resposta ao tratamento, como anteriormente foi demonstrado (Karanja et al. 2002). Após seis meses do tratamento, de modo geral, houve redução dos níveis de IgE e aumento de IgG4 para SWAP, comparando com os níveis destes anticorpos antes do tratamento. Além dos indivíduos serem moradores de área endêmica, é provável que no curto período de tempo avaliado não tenha ocorrido modificações imunológicas suficientes para interferir na produção ou não dos anticorpos.

Entre aqueles indivíduos que se reinfectaram e que não se reinfectaram após o tratamento, não houve diferença significativa em relação à região de localização do domicílio e nível de exposição à água do rio. Além disso, a reinfecção após o tratamento não se mostrou associada à idade, gênero e carga parasitária antes ou após o tratamento, independente do nível de exposição. Adicionalmente, não foi observado associação com os níveis de IgE total e IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA, independente da idade, gênero e nível de exposição à água do rio, entre os que se reinfectaram e os que não se reinfectaram, indicando que os níveis destes anticorpos não interferiram no risco de reinfecção a curto prazo. Dunne e colaboradores, encontraram correlação negativa entre os níveis de IgE para SWAP e taxa de reinfecção pelo *S. mansoni*, seis meses após o tratamento, embora não tenha sido encontrado correlação entre IgE para SWAP e carga parasitária antes do tratamento e entre IgE para SWAP antes do tratamento e reinfecção após o tratamento (Dunne et al. 1992b). Em coorte de indivíduos infectados pelo *S. haematobium*, Hagan e colaboradores também demonstraram associação positiva entre IgE para SWAP e SEA e resistência à reinfecção (Hagan et al. 1991).

Por fim, na avaliação realizada após seis meses de tratamento, não foi encontrado maior frequência de reinfecção nos indivíduos com a razão IgE/IgG4 para antígenos

parasitários mais baixa, o que seriam considerados mais susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni*. Provavelmente, sejam necessários estudos prospectivos de maior tempo de seguimento, para melhor avaliação da influência da resposta humoral na resistência/susceptibilidade à reinfecção pelo *S. mansoni*, após o tratamento com Praziquantel.

A supressão da resposta imediata a aeroalérgenos que ocorre em indivíduos infectados por helmintos tem sido bem demonstrada na literatura. Entretanto, os mecanismos desta supressão não estão ainda totalmente esclarecidos. De acordo com observações de pesquisadores do Serviço de Imunologia do HUPES, a gravidade da asma tende a ser menor nos indivíduos residentes em áreas endêmicas em *S. mansoni* (Medeiros et al. 2003). Um levantamento realizado por este mesmo grupo, em uma pequena amostra de indivíduos residentes no Conde mostrou inibição da resposta cutânea aos testes de leitura imediata com alérgenos intradomiciliares (Araujo et al. 2004). Estes dados estão de acordo com trabalho publicado pelo mesmo grupo em outra área endêmica em esquistossomose na Bahia (Araujo et al. 2000, Medeiros et al. 2004). No presente estudo, foi observado que os níveis de IgE e a razão IgE/IgG4 específicos para alérgeno de ácaro (Der p1) estão associados negativamente à presença de infecção pelo *S. mansoni* em indivíduos residentes em área endêmica em esquistossomose, embora essa associação não tenha sido observada quando as análises foram ajustadas pela idade e gênero. Adicionalmente não foi observado envolvimento dos níveis de IgG4 para Der p1 na presença ou não de infecção pelo *S. mansoni*. Portanto, o encontro dos níveis reduzidos de IgE para Der p1 em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* apoia a hipótese de que esta infecção crônica protege do desenvolvimento de asma, e é possível que esta modulação da resposta inflamatória alérgica seja devida, dentre outros mecanismos, à competição entre IgE específica para antígenos parasitários e para alérgenos do ambiente pela ligação aos receptores em superfície de células efetoras como mastócitos.

Ainda na segunda parte deste estudo, com o objetivo de estudar o papel da IgE e IgG4 na proteção e susceptibilidade para ocorrência de asma, foi observada a prevalência de asma local de apenas 11,7 %, muito abaixo da frequência observada nas zonas urbanas da Bahia, nos municípios de Salvador (24,6%), Feira de Santana (21,5%) ou Vitória da Conquista (30,5%), quando utilizado o mesmo critério para definição de casos de asma (Sole et al. 2006), apesar de as características geográficas, climáticas e até mesmo a base genética dessas populações poderem diferir entre si. Desta forma, é clara a existência de algum fator protetor para o desenvolvimento da asma em comunidade endêmica em esquistossomose. Comparando indivíduos asmáticos com os indivíduos não asmáticos da região endêmica, não houve diferença estatística no que diz respeito ao gênero, faixa etária, prevalência e intensidade de infecção pelo *S. mansoni* e nível de exposição à água do rio. Ao comparar asmáticos infectados ou não pelo *S. mansoni*, também não houve diferença na distribuição entre os gêneros e faixa etária.

A hipótese que infecções por helmintos podem proteger contra doenças alérgicas levanta a possibilidade de que a erradicação das helmintíases possa aumentar as manifestações de asma e de outras doenças alérgicas. No presente estudo, observou-se que a presença ou não de infecção por qualquer helminto não está associado diretamente ao desenvolvimento de asma, independente da idade e gênero, sendo que, dentre todas as infecções avaliadas, a ascaridíase foi a que apresentou maior nível de associação positiva com a presença de asma. Em concordância com este dado, uma recente de revisão sistemática concluiu que infecção por qualquer helminto, incluindo *S. mansoni*, não está associada ao risco de asma e que, especificamente, infecção pelo *A. lumbricoides* está associada com aumento da ocorrência de asma, enquanto infecção pelo ancilostomídeos está associado a certa proteção ao desenvolvimento de asma, estando diretamente relacionado com a intensidade da infecção (Leonardi-Bee et al. 2006). Outro estudo mostrou que níveis elevados

de IgE e eosinofilia resultam na redução da fecundidade de vermes adultos de *Necator americanus* e nas taxas de reinfecção após quimioterapia, sugerindo que o estado atópico pode conferir resistência à infecção por helmintos (Quinnell et al. 2004). No presente estudo, a presença ou não de asma, não interferiu na prevalência e na intensidade de infecção pelo *S. mansoni*. Considerando que a região é endêmica em esquistossomose e que um estudo recente mostrou que em apenas em 5% dos indivíduos desta região não foram detectados ovos de *S. mansoni* nas fezes durante um período de avaliação de 10 anos (Oliveira et al. 2012), é de se esperar ausência de diferença na frequência de asma entre infectados e não infectados pelo *S. mansoni*, observada no presente estudo.

Entre os indivíduos de área endêmica em esquistossomose com ou sem asma, não foi observado diferença nos níveis de IgE total. É provável que por serem moradores de área endêmica em esquistossomose, mesmo apresentando carga parasitária baixa ou não detectável, os asmáticos não infectados produzam níveis elevados de IgE policlonal ou inespecífica (Lynch et al. 1993). De acordo com estes dados, em estudo publicado anteriormente por pesquisadores do Serviço de Imunologia do HUPES, foram avaliados indivíduos de outra região da Bahia, endêmica em esquistossomose, com história de sibilância nos últimos 12 meses, comparando com indivíduos de área rural, endêmica em outras helmintíases exceto *S. mansoni* e de área urbana, não sendo observado diferenças significativas em relação aos níveis de IgE total e específica para Der p1 entre os três grupos (Medeiros et al. 2004). Um dos modelos mais aceitos para explicar a modulação da resposta alérgica por helmintos é que a infecção resulta tanto em produção de IgE específica para o parasita, quanto em níveis altos de IgE policlonal. A elevação dos níveis de IgE sérica total poderia diluir a IgE específica para alérgenos e saturar os receptores FcεRI em mastócitos e basófilos (Lynch et al. 1999). Em pacientes infectados com *Loa loa*, por exemplo, a degranulação de basófilos foi bloqueada quando estas células são sensibilizadas com razão

entre IgE total e IgE específica elevada (Mitre et al. 2005), o que é possível ser encontrado durante infecção pelo *S. mansoni*, onde ocorre a produção de altos níveis de IgE policlonal.

Como esperado, a presença de níveis elevados de IgE total e específica para Der p1 foi associada ao desenvolvimento de asma, o que não ocorreu com os níveis de IgG4 para Der p1, independente da idade e do gênero. Portanto, diante desses dados, não foi possível confirmar a hipótese de que a perda de reatividade cutânea e redução das manifestações clínicas da asma em indivíduos parasitados, pode ser devido à presença de IgG4 bloqueador. Embora este tema ainda não tenha sido amplamente explorado, trabalho realizado em área endêmica de *S. mansoni*, relatou evidências de associação negativa entre IgG4 e reatividade cutânea (Rihet et al. 1992). Adicionalmente, não houve associação dos níveis de anticorpos específicos para *S. mansoni* com a presença de asma, embora tenha ocorrido uma tendência à associação positiva dos níveis de IgE para SWAP com a ocorrência de asma.

Em estudo realizado também por pesquisadores do Serviço de Imunologia do HUPES, não foram encontradas diferenças significativas, apesar de ter sido observado uma tendência de níveis mais elevados de IgE total e IgE para SWAP em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* com alta carga parasitária e de níveis mais elevados de IgE para Der p1 entre indivíduos não infectados pelo *S. mansoni* ou com baixa carga parasitária (Araujo et al. 2000). Neste trabalho, realizado em outra região endêmica, utilizando uma casuística maior, não foi observado diferença significativa em relação às dosagens de IgE total entre asmáticos infectados ou não pelo *S. mansoni*. A infecção pelo *S. mansoni* nos asmáticos foi, entretanto, associada positivamente aos níveis de IgE para SEA e houve uma tendência de níveis mais elevados de IgG4 para SWAP nos asmáticos infectados pelo *S. mansoni*.

Adicionalmente, neste estudo, os indivíduos asmáticos infectados apresentaram níveis de IgE para alérgeno de ácaro (Der p1) mais baixos quando comparado ao grupo dos asmáticos não infectados, embora quando as análises foram ajustadas para idade e gênero,

observou-se apenas uma tendência de associação. Portanto, a presença de infecção pelo *S. mansoni* pode interferir nos níveis de IgE específico para Der p1 em asmáticos de área endêmica em esquistossomose. Níveis reduzidos de IgE para o alérgeno Der p1 nos asmáticos infectados está de acordo com a hipótese de que a infecção pelo *S. mansoni* pode prevenir o desenvolvimento de alergia, uma vez que a reação de hipersensibilidade imediata envolvida nesta patologia está associada aos níveis de IgE para alérgenos (Lynch et al. 1993). Em concordância com estes dados, em uma recente revisão sistemática e metanálise, foi demonstrado que infecção por geohelmintos reduzem o risco de sensibilização cutânea a aeroalérgenos, sendo encontrado um consistente efeito protetor nas infecções pelo *S. mansoni* e também pelo *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e ancilostomídeos (Feary et al. 2011).

As principais limitações deste trabalho foi o desenho de estudo ser, de forma preponderante, do tipo corte transversal, com exceção dos dados relacionados à reinfecção após seis meses do tratamento, e o uso de questionário para obter informações sobre presença de asma. Apesar de em estudos transversais a razão de prevalência (RP) ser a principal medida de associação entre duas variáveis, foi demonstrado que as estimativas de OR obtidas através de regressão logística se aproximam muito da RP quando a prevalência do desfecho é baixa (Coutinho et al. 2008), como no caso da frequência de asma na população de 11,7%. Entretanto, a interpretação dos resultados de OR nestes estudos continua fornecendo apenas razão de prevalência de determinado desfecho entre os diferentes grupos avaliados, não fornecendo informações sobre causalidade ou sequência de fluxo entre fatores de risco e condição estudada. Além disso, o uso de questionários para o diagnóstico de asma deixa o estudo sujeito a viés de informação, uma vez que dependem da resposta do entrevistado, por não serem medidas objetivas como, por exemplo, infecção por helmintos e carga parasitária. Uma vez que este estudo é de base populacional, seus resultados se aplicam e podem ser

generalizados apenas para populações tropicais de zonas rurais endêmicas em helmintíases, incluindo o *S. mansoni*, do Brasil ou áreas similares da América latina.

Portanto, diante das observações prévias do grupo do Serviço de Imunologia do HUPES, que vem estudando populações residentes em áreas endêmicas para esquistossomose, de que indivíduos infectados pelo *S. mansoni* respondem pobremente aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos (Araujo et al. 2000) e não desenvolvem asma grave (Medeiros et al. 2003), uma das possíveis hipóteses, testadas neste estudo, sugere que a infecção pelo *S. mansoni* resulta tanto em produção de IgE específica para o parasita, quanto em níveis altos de IgE policlonal, e isto poderia diluir a IgE específica para o alérgeno e saturar os receptores em células efetoras envolvidas na resposta inflamatória alérgica. Além desta hipótese, outros mecanismos de inibição da resposta alérgica nesses indivíduos vêm sendo estudado pelo grupo de pesquisa do Serviço de Imunologia do HUPES. Dentre eles, destaca-se a participação da citocina regulatória IL-10 (Araujo et al. 2004) e de outras moléculas regulatórias, à exemplo de CTLA-4 e CD40L, possam participar do processo (Oliveira et al. 2009).

8. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- A frequência de infecção pelo *S. mansoni* na área endêmica estudada foi de 38%, com carga média de 47 ± 148, variando de 0 a 2100 opg.
- A intensidade de infecção pelo *S. mansoni* foi mais elevada nas três primeiras décadas de vida e, independente do nível de exposição à água do rio, os mais jovens são mais susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni*.
- Apesar dos homens apresentarem maior carga parasitária, as mulheres são mais susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni*.
- O helminto mais encontrado na região foi *T. trichiura*, seguido por *A. lumbricoides* e ancilostomídeos e 87% dos indivíduos infectados com *S. mansoni* estavam coinfectados com um ou mais helmintos. Os indivíduos infectados pelo *Schistosoma* apresentam uma frequência maior de infecção pelo *T. trichiura* e pelo *A. lumbricoides*.
- Os níveis de IgE total foram mais elevados nos indivíduos infectados por qualquer helminto quando comparando com indivíduos não infectados. Entretanto, não foi observado diferença significativa nos níveis de IgE total entre os indivíduos infectados pelo *S. mansoni* coinfectados ou não com outros helmintos.
- Houve correlação positiva da carga parasitária com os níveis de IgE total e também com IgG4 específico para SWAP, não havendo correlação com os níveis de IgE específico para SWAP, quando as análises foram ajustadas para idade, gênero e nível de exposição. Apesar disso, a razão entre IgE e IgG4 específicos para SWAP foi mais elevada em indivíduos não infectados ou com intensidade de infecção leve comparando com indivíduos intensamente infectados pelo *S. mansoni*.
- Quanto aos anticorpos dirigidos para SEA, houve correlação positiva de carga parasitária com IgE e com IgG4, porém não houve diferença significativa entre a razão de IgE/IgG4 para SEA em relação às categorias de carga parasitária.

- A infecção pelo *S. mansoni* foi associada positivamente aos níveis de IgE total e níveis de IgE e IgG4 para SWAP e SEA, ajustando as análises para idade, gênero e nível de exposição à água do rio.
- A razão IgE/IgG4 para SWAP foi associada negativamente à infecção pelo *S. mansoni*, apresentando valores mais elevados os indivíduos não infectados (OD não ajustado), não sendo observado, entretanto, o envolvimento da razão IgE/IgG4 para SEA na presença de infecção ou não pelo *S. mansoni*.
- Embora a frequência de reinfecção pelo *S. mansoni* após seis meses do tratamento com Praziquantel tenha sido elevada, a carga parasitária manteve-se baixa.
- Após o tratamento, houve redução dos níveis de IgE para SWAP e aumento de IgG4 para SWAP.
- Os níveis de IgE e IgG4 específicos para SWAP e SEA antes e após o tratamento não interferiram no risco de reinfecção.
- A razão entre IgE/IgG4 para SWAP ou para SEA não interferiu no risco destes indivíduos de se reinfectarem seis meses após tratamento, tanto no que diz respeito aos níveis antes do tratamento quanto em relação aos níveis após o tratamento com Praziquantel.
- Comparando os grupos de indivíduos asmáticos com os indivíduos não asmáticos, residentes em área endêmica estudada, não houve diferença estatística no que diz respeito ao gênero, faixa etária, prevalência, intensidade de infecção pelo *S. mansoni* e nível de exposição à água do rio. Ao comparar asmáticos infectados ou não pelo *S. mansoni*, também não houve diferença na distribuição entre os gêneros e faixa etária.
- A presença ou não de infecção por qualquer helminto não foi associado ao desenvolvimento de asma, independentemente da idade e gênero. De todas as

infecções testadas neste modelo, a ascaridíase foi a que apresentou maior nível de associação positiva com a presença de asma.

- Os níveis de IgE e a razão IgE/IgG4 para Der p1 foram associados negativamente à presença de infecção pelo *S. mansoni* na população estudada, embora essa associação não tenha sido observada quando as análises foram ajustadas pela idade e gênero. Adicionalmente não foi observado envolvimento dos níveis de IgG4 para Der p1 na presença de infecção ou não pelo *S. mansoni*.
- A presença de níveis elevados de IgE total e específica para Der p1 foi associado ao desenvolvimento de asma o que não ocorre com os níveis de IgG4 para Der p1, independente da idade e do gênero.
- A presença de asma nos indivíduos de área endêmica não se mostrou associada aos níveis de anticorpos específicos para *S. mansoni*, mesmo quando ajustando as análises para idade e gênero, embora tenha ocorrido uma tendência à associação positiva dos níveis de IgE para SWAP com a presença de asma.

- Ao analisar a influência dos níveis de anticorpos na presença ou não de infecção pelo *S. mansoni* em asmáticos residentes em área endêmica em esquistossomose, foi observado que indivíduos asmáticos infectados apresentam níveis de IgE específico para alérgeno de ácaro (Der p1) mais baixos quando comparado ao grupo dos asmáticos não infectados, embora quando as análises são ajustadas para idade e gênero, foi observada apenas uma tendência de associação.

9. CONCLUSÃO

A resposta imune associada com resistência à infecção pelo *S. mansoni*, neste estudo, foi o balanço positivo da relação IgE/IgG4 específicos para SWAP. Adicionalmente, altos níveis de IgG4 específico foram associados com elevada carga parasitária. Estes achados, utilizando uma coorte com grande número de indivíduos que vivem em uma área endêmica de esquistossomose no Brasil, ressaltam o papel fundamental da IgG4 e da relação IgE/IgG4 específicos na susceptibilidade e resistência à infecção pelo *S. mansoni*.

Por outro lado, a associação negativa dos níveis de IgE específico e da razão IgE/IgG4 para alérgeno de ácaro, Der p1, com a presença de infecção pelo *S. mansoni* na população estudada, sugere que a infecção pelo *S. mansoni* protege contra o desenvolvimento da asma, modulando a resposta inflamatória alérgica.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abath FG, Morais CN, Montenegro CE, Wynn TA, Montenegro SM 2006. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol 22*: 85-91.

Abebe F, Gaarder PI, Petros B, Gundersen SG 2001. Age- and sex-related differences in antibody responses against *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen in a cohort of school children in Ethiopia. *Apmis 109*: 816-824.

Alcantara-Neves NM, Veiga RV, Dattoli VC, Fiaccone RL, Esquivel R, Cruz AA, Cooper PJ, Rodrigues LC, Barreto ML 2012. The effect of single and multiple infections on atopy and wheezing in children. *J Allergy Clin Immunol 129*: 359-367, 367 e351-353.

Araujo MI, de Carvalho EM 2006. Human schistosomiasis decreases immune responses to allergens and clinical manifestations of asthma. *Chem Immunol Allergy 90*: 29-44.

Araujo MI, de Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM 1996. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol 26*: 1399-1403.

Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M, Jr., Alcantara L, Almeida MC, Schriefer A, Oliveira RR, Kruschewsky R, Figueiredo JP, Cruz AA, Carvalho EM 2004. Impaired T Helper 2 Response to Aeroallergen in Helminth-Infected Patients with Asthma. *J Infect Dis 190*: 1797-1803.

Araujo MI, Lopes AA, Medeiros M, Cruz AA, Sousa-Atta L, Sole D, Carvalho EM 2000. Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection. *Int Arch Allergy Immunol 123*: 145-148.

ASBAI/SBPT/SBP 2006. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *Jornal Brasileiro de Pneumologia 32*: 447-474.

Asher MI, Keil U, Anderson HR, Beasley R, Crane J, Martinez F, Mitchell EA, Pearce N, Sibbald B, Stewart AW, et al. 1995. International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *Eur Respir J 8*: 483-491.

Bager P, Arnved J, Ronborg S, Wohlfahrt J, Poulsen LK, Westergaard T, Petersen HW, Kristensen B, Thamsborg S, Roepstorff A, Kapel C, Melbye M 2010. *Trichuris suis* ova therapy for allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Allergy Clin Immunol 125*: 123-130 e121-123.

Bina JC 1997. Estudo de variáveis que podem influenciar na evolução da esquistossomose mansônica: efeito da terapêutica específica e da interrupção da transmissào. *Rev. Patol. Trop. 26*: 69-128.

Bina JC, Prata A 2003. [Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I- *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms]. *Rev Soc Bras Med Trop 36*: 211-216.

Black CL, Mwinzi PN, Muok EM, Abudho B, Fitzsimmons CM, Dunne DW, Karanja DM, Secor WE, Colley DG 2010. Influence of exposure history on the immunology and development of resistance to human Schistosomiasis mansoni. *PLoS Negl Trop Dis 4*: e637.

Blackburn MR, Lee CG, Young HW, Zhu Z, Chunn JL, Kang MJ, Banerjee SK, Elias JA 2003. Adenosine mediates IL-13-induced inflammation and remodeling in the lung and interacts in an IL-13-adenosine amplification pathway. *J Clin Invest 112*: 332-344.

Burney P, Malmberg E, Chinn S, Jarvis D, Luczynska C, Lai E 1997. The distribution of total and specific serum IgE in the European Community Respiratory Health Survey. *J Allergy Clin Immunol 99*: 314-322.

Burney PG, Luczynska C, Chinn S, Jarvis D 1994. The European Community Respiratory Health Survey. *Eur Respir J 7*: 954-960.

Busse WW, Lemanske RF, Jr. 2001. Asthma. *N Engl J Med 344*: 350-362.

Butterworth AE, Capron M, Cordingley JS, Dalton PR, Dunne DW, Kariuki HC, Kimani G, Koech D, Mugambi M, Ouma JH, et al. 1985. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Trans R Soc Trop Med Hyg 79*: 393-408.

Butterworth AE, Curry AJ, Dunne DW, Fulford AJ, Kimani G, Kariuki HC, Klumpp R, Koech D, Mbugua G, Ouma JH, et al. 1994. Immunity and morbidity in human schistosomiasis mansoni. *Trop Geogr Med 46*: 197-208.

Caldas IR, Correa-Oliveira R, Colosimo E, Carvalho OS, Massara CL, Colley DG, Gazzinelli G 2000. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *Am J Trop Med Hyg 62*: 57-64.

Cardoso LS, Oliveira SC, Araujo MI 2011. *Schistosoma mansoni* antigens as modulators of the allergic inflammatory response in asthma. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*.

Cheever AW, Andrade ZA 1967. Pathological lesions associated with *Schistosoma mansoni* infection in man. *Trans R Soc Trop Med Hyg 61*: 626-639.

Cheever AW, Hoffmann KF, Wynn TA 2000. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol Today 21*: 465-466.

Cho SH, Stanciu LA, Holgate ST, Johnston SL 2005. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med 171*: 224-230.

Correa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcao PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, Fraga LA, Prata A, Coffman RL, Lambertucci JR, Cunha-Melo JR, Martins-Filho OA, Wilson RA, Gazzinelli G 1998. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. *Braz J Med Biol Res 31*: 171-177.

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

Coutinho LM, Scazufca M, Menezes PR 2008. Methods for estimating prevalence ratios in cross-sectional studies. *Rev Saude Publica 42*: 992-998.

de Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhaes A, de Jesus AA, de Almeida RP, Rego MA, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM 2002. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *J Infect Dis 185*: 98-105.

de Lima e Costa MF, Rocha RS, Coura Filho P, Katz N 1993. A 13-year follow-up of treatment and snail control in an area endemic for *Schistosoma mansoni* in Brazil: incidence of infection and reinfection. *Bull World Health Organ 71*: 197-205.

Demeure CE, Rihet P, Abel L, Ouattara M, Bourgois A, Dessein AJ 1993. Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J Infect Dis 168*: 1000-1008.

Dessein AJ, Begley M, Demeure C, Caillol D, Fueri J, dos Reis MG, Andrade ZA, Prata A, Bina JC 1988. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. *J Immunol 140*: 2727-2736.

Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJ, Kariuki HC, Langley JG, Ouma JH, Capron A, Pierce RJ, Sturrock RF 1992a. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol 22*: 1483-1494.

Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJ, Ouma JH, Sturrock RF 1992b. Human IgE responses to *Schistosoma mansoni* and resistance to reinfection. *Mem Inst Oswaldo Cruz 87 Suppl 4*: 99-103.

ECRHS 1996. Variations in the prevalence of respiratory symptoms, self-reported asthma attacks, and use of asthma medication in the European Community Respiratory Health Survey (ECRHS). *Eur Respir J 9*: 687-695.

Ellwood P, Asher MI, Beasley R, Clayton TO, Stewart AW 2005. The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC): phase three rationale and methods. *Int J Tuberc Lung Dis 9*: 10-16.

Eloi-Santos S, Olsen NJ, Correa-Oliveira R, Colley DG 1992. *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. *Exp Parasitol 75*: 168-175.

Etard JF, Audibert M, Dabo A 1995. Age-acquired resistance and predisposition to reinfection with *Schistosoma haematobium* after treatment with praziquantel in Mali. *Am J Trop Med Hyg 52*: 549-558.

Fallon PG, Fookes RE, Wharton GA 1996. Temporal differences in praziquantel- and oxamniquine-induced tegumental damage to adult *Schistosoma mansoni*: implications for drug-antibody synergy. *Parasitology 112 (Pt 1)*: 47-58.

Feary J, Britton J, Leonardi-Bee J 2011. Atopy and current intestinal parasite infection: a systematic review and meta-analysis. *Allergy 66*: 569-578.

Feary JR, Venn AJ, Mortimer K, Brown AP, Hooi D, Falcone FH, Pritchard DI, Britton JR 2010. Experimental hookworm infection: a randomized placebo-controlled trial in asthma. *Clin Exp Allergy 40*: 299-306.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF, Jr. 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol 15*: 505-533.

Fitzsimmons CM, McBeath R, Joseph S, Jones FM, Walter K, Hoffmann KF, Kariuki HC, Mwatha JK, Kimani G, Kabatereine NB, Vennervald BJ, Ouma JH, Dunne DW 2007. Factors affecting human IgE and IgG responses to allergen-like *Schistosoma mansoni* antigens: Molecular structure and patterns of in vivo exposure. *Int Arch Allergy Immunol 142*: 40-50.

Flohr C, Weiland SK, Weinmayr G, Bjorksten B, Braback L, Brunekreef B, Buchele G, Clausen M, Cookson WO, von Mutius E, Strachan DP, Williams HC 2008. The role of atopic sensitization in flexural eczema: findings from the International Study of Asthma and Allergies in Childhood Phase Two. *J Allergy Clin Immunol 121*: 141-147 e144.

Friedman JF, Kurtis JD, McGarvey ST, Fraga AL, Silveira A, Pizziolo V, Gazzinelli G, LoVerde P, Correa-Oliveira R 2001. Comparison of self-reported and observed water contact in an *S. mansoni* endemic village in Brazil. *Acta Trop 78*: 251-259.

Fulford AJ, Ouma JH, Kariuki HC, Thiongo FW, Klumpp R, Kloos H, Sturrock RF, Butterworth AE 1996. Water contact observations in Kenyan communities endemic for schistosomiasis: methodology and patterns of behaviour. *Parasitology 113 (Pt 3)*: 223-241.

Galvao-Castro B, Bina JC, Prata A, Lambert PH 1981. Correlation of circulating immune complexes and complement breakdown products with the severity of the disease in human schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg 30*: 1238-1246.

Gazzinelli A, Bethony J, Fraga LA, LoVerde PT, Correa-Oliveira R, Kloos H 2001. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil. I: water contact. *Trop Med Int Health 6*: 126-135.

Gazzinelli A, Hightower A, LoVerde PT, Haddad JP, Pereira WR, Bethony J, Correa-Oliveira R, Kloos H 2006. The spatial distribution of *Schistosoma mansoni* infection before and after chemotherapy in the Jequitinhonha Valley in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz 101 Suppl 1*: 63-71.

Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM 1993. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med 44*: 85-101.

Gomes YM, Pereira VR, Nakazawa M, Montarroyos U, Souza WV, Abath FG 2002. Antibody isotype responses to egg antigens in human chronic Schistosomiasis mansoni before and after treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz 97 Suppl 1*: 111-112.

Grant AV, Araujo MI, Ponte EV, Oliveira RR, Cruz AA, Barnes KC, Beaty TH 2008. High heritability but uncertain mode of inheritance for total serum IgE level and *Schistosoma mansoni* infection intensity in a schistosomiasis-endemic Brazilian population. *J Infect Dis 198*: 1227-1236.

—— 2011. Polymorphisms in IL10 are associated with total Immunoglobulin E levels and *Schistosoma mansoni* infection intensity in a Brazilian population. *Genes Immun 12*: 46-50.

Gryseels B 1994. Human resistance to Schistosoma infections: age or experience? *Parasitol Today 10*: 380-384.

Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J Immunol 146*: 1322-1327.

Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJ, Wilkins HA 1991. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature 349*: 243-245.

Haile S, Lefort J, Joseph D, Gounon P, Huerre M, Vargaftig BB 1999. Mucous-cell metaplasia and inflammatory-cell recruitment are dissociated in allergic mice after antibody- and drug-dependent cell depletion in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol 20*: 891-902.

Hoffman WA, Pons JA, Janer JL 1934. Sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. *Puerto Rico Journal of Public Health 9*: 283-298.

Holgate ST, Benyon RC, Howarth PH, Agius R, Hardy C, Robinson C, Durham SR, Kay AB, Church MK 1985. Relationship between mediator release from human lung mast cells in vitro and in vivo. *Int Arch Allergy Appl Immunol 77*: 47-56.

Hotez PJ, Remme JH, Buss P, Alleyne G, Morel C, Breman JG 2004. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis 38*: 871-878.

Hussain R, Poindexter RW, Ottesen EA 1992. Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass. *J Immunol 148*: 2731-2737.

ISAAC 1998. 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 351*: 1225-1232.

Iwakura Y, Ishigame H 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest 116*: 1218-1222.

Jiz M, Friedman JF, Leenstra T, Jarilla B, Pablo A, Langdon G, Pond-Tor S, Wu HW, Manalo D, Olveda R, Acosta L, Kurtis JD 2009. Immunoglobulin E (IgE) responses to paramyosin predict resistance to reinfection with Schistosoma japonicum and are attenuated by IgG4. *Infect Immun 77*: 2051-2058.

Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol 113*: 832-836.

Kabatereine NB, Kemijumbi J, Ouma JH, Kariuki HC, Richter J, Kadzo H, Madsen H, Butterworth AE, Ornbjerg N, Vennervald BJ 2004. Epidemiology and morbidity of *Schistosoma mansoni* infection in a fishing community along Lake Albert in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg 98*: 711-718.

Kabatereine NB, Kemijumbi J, Ouma JH, Sturrock RF, Butterworth AE, Madsen H, Ornbjerg N, Dunne DW, Vennnervald BJ 2003. Efficacy and side effects of praziquantel treatment in a highly endemic *Schistosoma mansoni* focus at Lake Albert, Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg 97*: 599-603.

Kabatereine NB, Vennervald BJ, Ouma JH, Kemijumbi J, Butterworth AE, Dunne DW, Fulford AJ 1999. Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. *Parasitology 118 (Pt 1)*: 101-105.

Kahama AI, Vennervald BJ, Kombe Y, Kihara RW, Ndzovu M, Mungai P, Ouma JH 1999. Parameters associated with *Schistosoma haematobium* infection before and after chemotherapy in school children from two villages in the coast province of Kenya. *Trop Med Int Health 4*: 335-340.

Karanja DM, Hightower AW, Colley DG, Mwinzi PN, Galil K, Andove J, Secor WE 2002. Resistance to reinfection with *Schistosoma mansoni* in occupationally exposed adults and effect of HIV-1 co-infection on susceptibility to schistosomiasis: a longitudinal study. *Lancet 360*: 592-596.

Katz N, Coelho PM, Pellegrino J 1970. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. *J Parasitol 56*: 1032-1033.

Kitagaki K, Businga TR, Racila D, Elliott DE, Weinstock JV, Kline JN 2006. Intestinal helminths protect in a murine model of asthma. *J Immunol 177*: 1628-1635.

Kloos H, Gazzinelli A, Van Zuyle P 1998. Microgeographical patterns of schistosomiasis and water contact behavior; examples from Africa and Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz 93 Suppl 1*: 37-50.

Klumpp RK, Webbe G 1987. Focal, seasonal and behavioural patterns of infection and transmission of *Schistosoma haematobium* in a farming village at the Volta Lake, Ghana. *J Trop Med Hyg 90*: 265-281.

La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT 2003. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect Immun 71*: 4996-5004.

Lambertucci JR 1993. Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo 35*: 399-404.

—— 2010. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz 105*: 422-435.

Lancet 1976. Clinical immunology. *Lancet 1*: 450-451.

Leonardi-Bee J, Pritchard D, Britton J 2006. Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med 174*: 514-523.

Li Y, Sleigh AC, Ross AG, Zhang X, Williams GM, Yu X, Tanner M, McManus DP 2001. Human susceptibility to Schistosoma japonicum in China correlates with antibody isotypes to native antigens. *Trans R Soc Trop Med Hyg 95*: 441-448.

Lima e Costa MF, Magalhaes MH, Rocha RS, Antunes CM, Katz N 1987. Water-contact patterns and socioeconomic variables in the epidemiology of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *Bull World Health Organ 65*: 57-66.

Lynch NR, Goldblatt J, Le Souef PN 1999. Parasite infections and the risk of asthma and atopy. *Thorax 54*: 659-660.

Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvarez N 1993. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol 92*: 404-411.

Lynch NR, Hagel IA, Palenque ME, Di Prisco MC, Escudero JE, Corao LA, Sandia JA, Ferreira LJ, Botto C, Perez M, Le Souef PN 1998. Relationship between helminthic

infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment. *J Allergy Clin Immunol 101*: 217-221.

Matthys B, Tschannen AB, Tian-Bi NT, Comoe H, Diabate S, Traore M, Vounatsou P, Raso G, Gosoniu L, Tanner M, Cisse G, N'Goran EK, Utzinger J 2007. Risk factors for *Schistosoma mansoni* and hookworm in urban farming communities in western Cote d'Ivoire. *Trop Med Int Health 12*: 709-723.

McManus DP, Loukas A 2008. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev 21*: 225-242.

Medeiros M, Jr., Almeida MC, Figueiredo JP, Atta AM, Mendes CM, Araujo MI, Taketomi EA, Terra SA, Silva DA, Carvalho EM 2004. Low frequency of positive skin tests in asthmatic patients infected with *Schistosoma mansoni* exposed to high levels of mite allergens. *Pediatr Allergy Immunol 15*: 142-147.

Medeiros M, Jr., Figueiredo JP, Almeida MC, Matos MA, Araujo MI, Cruz AA, Atta AM, Rego MA, de Jesus AR, Taketomi EA, Carvalho EM 2003. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. *J Allergy Clin Immunol 111*: 947-951.

Mitre E, Norwood S, Nutman TB 2005. Saturation of immunoglobulin E (IgE) binding sites by polyclonal IgE does not explain the protective effect of helminth infections against atopy. *Infect Immun 73*: 4106-4111.

Mitre E, Nutman TB 2006. Basophils, basophilia and helminth infections. *Chem Immunol Allergy 90*: 141-156.

Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Teixeira KM, Coutinho EM, Brinkman J, Goncalves I, Domingues LA, Domingues AL, Sher A, Wynn TA 1999. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis 179*: 1502-1514.

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

Mutapi F, Bourke C, Harcus Y, Midzi N, Mduluza T, Turner CM, Burchmore R, Maizels RM 2011. Differential recognition patterns of *Schistosoma haematobium* adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG1 and IgG4. *Parasite Immunol 33*: 181-192.

Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, Mbugua GG, Ouma JH, Mumo J, Fulford AJ, Jones FM, Butterworth AE, Roberts MB, Dunne DW 1998. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol 160*: 1992-1999.

Naus CW, Booth M, Jones FM, Kemijumbi J, Vennervald BJ, Kariuki CH, Ouma JH, Kabatereine NB, Dunne DW 2003. The relationship between age, sex, egg-count and specific antibody responses against *Schistosoma mansoni* antigens in a Ugandan fishing community. *Trop Med Int Health 8*: 561-568.

Naus CW, van Dam GJ, Kremsner PG, Krijger FW, Deelder AM 1998. Human IgE, IgG subclass, and IgM responses to worm and egg antigens in schistosomiasis haematobium: a 12-month study of reinfection in Cameroonian children. *Clin Infect Dis 26*: 1142-1147.

Oliveira RR, Figueiredo JP, Cardoso LS, Jabar RL, Souza RP, Wells MT, Carvalho EM, Fitzgerald DW, Barnes KC, Araujo MI, Glesby MJ 2012. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg 2*: 296-305.

Oliveira RR, Gollob KJ, Figueiredo JP, Alcantara LM, Cardoso LS, Aquino CS, Campos RA, Almeida MC, Carvalho EM, Araujo MI 2009. *Schistosoma mansoni* infection alters co-stimulatory molecule expression and cell activation in asthma. *Microbes Infect 11*: 223-229.

Pacifico LG, Fonseca CT, Barsante MM, Cardoso LS, Araujo MI, Oliveira SC 2006. Aluminum hydroxide associated to *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa protein abrogates partial protection against experimental infection but not alter interleukin-10 production. *Mem Inst Oswaldo Cruz 101 Suppl 1*: 365-368.

Pearce EJ 2005. Priming of the immune response by schistosome eggs. *Parasite Immunol 27*: 265-270.

Pinot de Moira A, Fulford AJ, Kabatereine NB, Ouma JH, Booth M, Dunne DW 2010. Analysis of complex patterns of human exposure and immunity to Schistosomiasis mansoni: the influence of age, sex, ethnicity and IgE. *PLoS Negl Trop Dis 4*.

Platts-Mills TA, Wheatley LM 1996. The role of allergy and atopy in asthma. *Curr Opin Pulm Med 2*: 29-34.

Platts-Mills TA, Woodfolk JA, Erwin EA, Aalberse R 2004. Mechanisms of tolerance to inhalant allergens: the relevance of a modified Th2 response to allergens from domestic animals. *Springer Semin Immunopathol 25*: 271-279.

Prata A 1988. The importance of consanguinity in hepatosplenic schistosomiasis in some endemic areas. *Rev Soc Bras Med Trop 21*: 45-46.

Quinnell RJ, Pritchard DI, Raiko A, Brown AP, Shaw MA 2004. Immune responses in human necatoriasis: association between interleukin-5 responses and resistance to reinfection. *J Infect Dis 190*: 430-438.

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

Rabello AL, Garcia MM, Pinto da Silva RA, Rocha RS, Katz N 1997. Humoral immune responses in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed up for two years after treatment. *Clin Infect Dis 24*: 304-308.

Rihet P, Demeure CE, Dessein AJ, Bourgois A 1992. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. *Eur J Immunol 22*: 2063-2070.

Royer B, Varadaradjalou S, Saas P, Guillosson JJ, Kantelip JP, Arock M 2001. Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10. *Clin Exp Allergy 31*: 694-704.

Rutitzky LI, Lopes da Rosa JR, Stadecker MJ 2005. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *J Immunol 175*: 3920-3926.

Sama MT, Ratard RC 1994. Water contact and schistosomiasis infection in Kumba, south-western Cameroon. *Ann Trop Med Parasitol 88*: 629-634.

Satti MZ, Lind P, Vennervald BJ, Sulaiman SM, Daffalla AA, Ghalib HW 1996. Specific immunoglobulin measurements related to exposure and resistance to *Schistosoma mansoni* infection in Sudanese canal cleaners. *Clin Exp Immunol 106*: 45-54.

Secor WE, del Corral H, dos Reis MG, Ramos EA, Zimon AE, Matos EP, Reis EA, do Carmo TM, Hirayama K, David RA, David JR, Harn DA, Jr. 1996. Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1*0201. *J Infect Dis 174*: 1131-1135.

Silveira AM, Fraga LA, Prata A, Correa-Oliveira R, Addiss DA, Viana IR, Colley DG, Gazzinelli G 1998. Resistance to infection/reinfection by *Schistosoma mansoni* is not

augmented by three treatments with 45 days intervals. *Mem Inst Oswaldo Cruz 93*: 113-114.

Silveira AM, Gazzinelli G, Alves-Oliveira LF, Bethony J, Gazzinelli A, Carvalho-Queiroz C, Alvarez MC, Lima-Silva FC, Prata A, LoVerde PT, Correa-Oliveira R 2004. Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. *Trans R Soc Trop Med Hyg 98*: 514-519.

Sleigh AC, Mott KE, Hoff R, Barreto ML, Mota EA, Maguire JH, Sherlock I, Weller TH 1985. Three-year prospective study of the evolution of Manson's schistosomiasis in north-east Brazil. *Lancet 2*: 63-66.

Smart JM, Kemp AS 2002. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease. *Clin Exp Allergy 32*: 796-802.

Sole D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK 2006. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - Phase 3. *J Pediatr (Rio J) 82*: 341-346.

Souza-Atta ML, Araujo MI, D'Oliveira Junior A, Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Atta AM, Carvalho EM 1999. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. *Braz J Med Biol Res 32*: 1101-1105.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis 6*: 411-425.

Tavares-Neto J, Prata A 1990. [Hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni, in relation to race and socioeconomic level, in Catolandia-Bahia]. *Rev Soc Bras Med Trop 23*: 37-42.

van den Biggelaar AH, Rodrigues LC, van Ree R, van der Zee JS, Hoeksma-Kruize YC, Souverijn JH, Missinou MA, Borrmann S, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M 2004. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis 189*: 892-900.

Viana IR, Correa-Oliveira R, Carvalho Odos S, Massara CL, Colosimo E, Colley DG, Gazzinelli G 1995. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. *Parasite Immunol 17*: 297-304.

Webster M, Libranda-Ramirez BD, Aligui GD, Olveda RM, Ouma JH, Kariuki HC, Kimani G, Olds GR, Fulford AJ, Butterworth AE, Dunne DW 1997. The influence of sex and age on antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* and Schistosoma japonicum in human populations in Kenya and the Philippines. *Parasitology 114 (Pt 4)*: 383-393.

WHO WHO 2006. Report of the Scientific Working Group meeting on schistosomiasis. *on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Available at: http://www.who.int/tdr/publications/publications/pdf/swg_schisto.pdf*.

Williams ME, Montenegro S, Domingues AL, Wynn TA, Teixeira K, Mahanty S, Coutinho A, Sher A 1994. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. *J Infect Dis 170*: 946-954.

Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA 2007. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol 85*: 148-154.

Wu Z, Bu K, Yuan L, Yang G, Zhu J, Liu Q 1993. Factors contributing to reinfection with schistosomiasis japonica after treatment in the lake region of China. *Acta Trop 54*: 83-88.

Wynn TA, Cheever AW 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr Opin Immunol 7*: 505-511.

Wynn TA, Cheever AW, Williams ME, Hieny S, Caspar P, Kuhn R, Muller W, Sher A 1998. IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *J Immunol 160*: 4473-4480.

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R 2002. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science 296*: 490-494.

Zhang Z, Wu H, Chen S, Hu L, Xie Z, Qiu Y, Su C, Cao JP, Wu Y, Zhang S, Wu G 1997. Association between IgE antibody against soluble egg antigen and resistance to reinfection with Schistosoma japonicum. *Trans R Soc Trop Med Hyg 91*: 606-608.

11. ANEXOS

ANEXO I – QUESTIONÁRIO ISAAC

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

ISAAC

Família *Indivíduo*

1. Nome: _____ Identificação: ☐☐☐ ☐☐
2. Comunidade: _____
3. Data de Nascimento: _____/_____/_____ 4. Idade: _____
5. Gênero: ( ) Masculino ( ) Feminino

QUESTIONÁRIO I

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

   ( ) Sim ( ) Não

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

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

   ( ) Sim ( ) Não

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

   ( ) nenhuma crise ( ) 4 a 12 crises

   ( ) mais de 12 crises ( ) 1 a 3 crises

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

   ( ) nenhuma

   ( ) menos de uma noite por semana

   ( ) uma ou mais noites por semana

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

   ( ) Sim ( ) Não

6. Alguma vez na vida você já teve asma?

   ( ) Sim ( ) Não

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

   ( ) Sim ( ) Não

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

   ( ) Sim ( ) Não

Família			*Indivíduo*	

QUESTIONÁRIO II

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

Família			Indivíduo	

QUESTIONÁRIO III

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

   ( ) Sim ( ) Não

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

   ( ) Sim ( ) Não

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

   ( ) Sim (....) Não

QUESTIONÁRIO IV

1. Alergia a medicamentos, bebidas ou alimentos ?

   ( ) Sim ( ) Não Qual: _____

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

   ( ) Sim ( ) Não Qual: _____

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

   ( ) Sim ( ) Não Qual: _____

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

   ( ) Sim ( ) Não Qual: _____

OBSERVAÇÕES: _____

_____

_____

Responsável pela entrevista: _____ Data: _____/_____/_____

ANEXO II – QUESTIONÁRIO DE EXPOSIÇÃO À ÁGUA DO RIO

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

CONTATO COM A ÁGUA

Família *Indivíduo*

1. Nome: _____ Identificação: ☐☐☐ ☐☐
2. Comunidade: _____
3. Data da avaliação: _____/_____/_____

Atividade	Rio	Tempo
Lavoura		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia
Pesca		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia
Lavar pratos		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia
Lavar roupas		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia
Banho		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia
Lazer		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia
Outros: _____		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia
Outros: _____		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia

Total de contato – RIO1		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia
Total de contato – RIO2		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia
Total de contato – RIO3		(a) Esporadicamente (b) 01 h/semana (c) 01-03 h/semana, 01-02 vezes/semana (d) 01-03 h/dia (e) > 03h/dia

HISTÓRIA DE TRATAMENTO CONTRA HELMINTOS

(a) Sim (b) Não

Caso Sim, mês e ano dos últimos tratamentos: 1) ___/___; 2) ___/___; 3) ___/___.

ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1/2

Serviço Público Federal
Comitê de Ética em Pesquisa
Maternidade Climério de Oliveira -UFBA

PARECER/ RESOLUÇÃO N.º 50/2003

Registro CEP: 50/03.

Projeto de Pesquisa: "Imunogenética da Asma e Esquistossomose".
Pesquisadora Responsável Local: Doutora Maria Ilma Andrade Santos Araújo, Bioquímica, Médica do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos. "Currículum Vitae" anexo.
Pesquisadora Principal, Coordenadora: Doutora Katlhen Carole Barnes, Professora Associada de Medicina, Divisão de Imunologia Clínica, Escola de Medicina da Universidade Johns Hopkins.
Instituições: Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos e Universidade Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, Estados Unidos.
Área do Conhecimento: 2.11, Nível E, Grupo I.8
Data de entrada: 23.09.2003

Objetivos: principal – testar a hipótese de que existe base genética para a relação inversa entre resistência a infecção por helmintos e gravidade da asma atópica; **secundários** - identificar genes candidatos comuns que controlem resistência à infecção pelo S. mansoni e a gravidade da asma, (**hipótese A**, testar genes associados com resistência à infecção pelo S.m., e **hipótese B**, verificar se os genes associados com a gravidade da asma são os mesmos associados com a resistência a infecção pelo S.m.) e determinar o efeito interativo da exposição parasitária, tratamento da parasitose e gravidade de doença, asma e esquistossomose.

Estudo acadêmico, observacional, bi-nacional (**em verdadeira colaboração estrangeira**), "baseado em outro anterior desenvolvido pela mesma Pesquisadora local e que objetiva estudar 60 **famílias-nuclear** residentes em área de polihelmintiases endêmicas, mediante: **1** – um levantamento populacional transversal para determinar a prevalência da asma e a captação **de "sujeitos de pesquisa"** pós **"Consentimento Livre e Pré-Esclarecido", 2 –** um estudo de caso-controle entre asmáticos selecionados e outro grupo-controle selecionados randomizadamente com características previamente estabelecidas e testes realizados e **3** – um estudo longitudinal para avaliar mensalmente a exposição a aeroalérgenos por um ano". Está proposto um **"Desenho Experimental"** que objetiva sintetizar a pesquisa e sua execução. Exame de fezes, testes cutâneos com 13 aeroalérgenos e de função pulmonar, exame físico e questionário para avaliação da asma compõe as **"ferramentas"'** investigatoriais. Haverá obtenção de sangue para o devido processamento laboratorial-genético, extenso, intrinsecamente externo, complexo e bem exposto. Está firmado o **compromisso de ambas as Pesquisadoras** para destinação exclusiva de material genético.

Rua Padre Feijó 240, Canela – Ambulatório Magalhães Neto 3.º andar, Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
Cep.: 40.160-170 - Salvador, BA. Telefax.: (71) 203-2740 E-mail.: cep.mco@zipmail.com.br

Serviço Público Federal
Comitê de Ética em Pesquisa
Maternidade Climério de Oliveira -UFBA

Não existe orçamento posto que a pesquisa será suportada por verbas remanescentes do estudo anteriormente referido. **O "Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido"** está correto. Extensos, múltiplos e valiosos **"Curricula Vitae"** estão anexados, certamente de **"colaboradores outros"** relacionados no fim deste Parecer./Resolução. **Inexiste maleficência**. É de se esperar benefícios pessoais e populacionais, face aos novos conhecimentos certamente trazidos sobre ambas patologias. Pesquisa com colaboração estrangeira, devendo subir a **CONEP**. Projeto aprovável.

Salvador, 29 de outubro de 2003

Relator: Adnólia Souza

Projeto aprovado.

Coordenador: Dr. Dr. Antonio dos Santos Barral
Coordenador do Comité de Ética
em Pesquisas Humana
CMO - Universidade Federal da Bahia

Observação importante: toda a documentação anexa ao protocolo proposto e rubricada pelo Pesquisador, arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da secretária deste ao Pesquisador, faz parte intrínseca deste **Parecer/Resolução**.

Relação dos Colaboradores: Terri Hagan Beaty, Ph.D, Professora de Epidemiologia na Escola de Higiene e Saúde Pública do Johns Hpkins Bloomberg e geneticista estatísitco e epidemiologista com especial interesse na análise de complexos genéticos que influenciam na susceptibilidade a doença humana; **Alkis Togias, M.D.**,Professor associado e investigador clínico no campo de rinosinusite e asma focalizando modelos humanos da doença; **Kathryn Barnard Held, Ph.D.,** Investigadora associada da Divisão de Alergia e Imunologia Clínica, antropóloga, médica, com experiência em antropometria a avaliação de crescimento e epidemiologia, estilo de vida e interação materno-fetal em assuntos relacionados a asma e doenças alérgicas; **Daniela N. Baltadzhieva, Ph.D.,** Cientista visitante no Centro de Asma e Alergia do Johns Hopkins no laboratório da Doutora Barnes. Experiente imunologista que tem atuado em diferentes aspectos de mecanismos imunes envolvendo a patogênese da atopia a asma.

Rua Padre Feijó 240, Canela – Ambulatório Magalhães Neto 3.º andar, Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
Cep.: 40.160-170 - Salvador, BA. Telefax.: (71) 203-2740 E-mail.: cep.mco@zipmail.com.br

ANEXO IV – MANUSCRITO SUBMETIDO

Parasite Immunology

Adult worm-specific IgE/IgG4 balance is associated with low infection levels of *Schistosoma mansoni* in an endemic area

Journal:	*Parasite Immunology*
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Figueiredo, Joanemile; Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia - SIM Oliveira, Ricardo; Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia - SIM; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais, INCT-DT; Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia, Análises Clínicas e Toxicológicas Cardoso, Luciana; Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia - SIM; Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Ciências da Vida; Instituto Nacional de Cienência e Tecnologia de Doenças Tropicais, INCT-DT Barnes, Kathleen; Johns Hopkins University, Division of Allergy and Clinical Immunology Grant, Audrey; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases; University Paris Descartes, Necker Medical School Carvalho, Edgar; Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia - SIM; Instituto Nacional de Cienência e Tecnologia de Doenças Tropicais, INCT-DT; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Araujo, Maria Ilma; Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Imunologia - SIM; Instituto Nacional de Cienência e Tecnologia de Doenças Tropicais, INCT-DT; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Faculdade de Medicina
Key Words:	Schistosomiasis < Disease, Humoral immunity < Immunological terms

SCHOLARONE™
Manuscripts

TITLE: Adult worm-specific IgE/IgG4 balance is associated with low infection levels of *Schistosoma mansoni* in an endemic area

RUNNING TITLE: IgE/IgG4 balance in *Schistosoma mansoni* infection

AUTHORS

JOANEMILE P. FIGUEIREDO[1]*, RICARDO R. OLIVEIRA[1,2,3], LUCIANA S. CARDOSO[1,2,4], KATHLEEN C. BARNES[5], AUDREY V. GRANT[6,7] EDGAR M. CARVALHO[1,2,8], MARIA ILMA ARAUJO[1,2,8]

INSTITUTIONS

[1]Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, [2]Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais INCT-DT (CNPq/MCT), [3]Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, [4]Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, [5]Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, USA, [6]Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, U980, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France, [7]Necker Medical School, University Paris Descartes, Paris, France, [8]Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil.

Correspondence: Joanemile P. Figueiredo, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Universidade Federal da Bahia, Rua João das Botas s/n, Canela, Salvador, BA 40110-160, Brazil. (e-mail: joanemile@hotmail.com).

Keywords: *Schistosoma mansoni*; IgG4; IgE; helminth

For Peer Review

SUMMARY

Strategies to control schistosomiasis focusing on mass chemotherapy with praziquantel have significantly reduced severe pathology; however, reinfections with consequent morbidities persist despite repeated treatments. Field studies have suggested an immune-mediated mechanism associated with resistance to *S. mansoni* infection. The aim of this study was to evaluate serum levels of anti-SWAP specific IgE and IgG4 in relation to resistance to infection in individuals living in an endemic area of schistosomiasis in Bahia. The overall prevalence of *S. mansoni* infection was 37.7% and the mean parasite burden was 46.7 ± 148.3 epg/feces. There was no significant difference in levels of specific IgE in individuals with different parasite burden, whereas high producers of specific IgG4 (>3.0 OD) presented higher parasite burden when compared to low IgG4 producers (<0.6 OD). Additionally, *S. mansoni* parasite load was positively correlated with levels of specific IgG4 or total IgE. No significant correlation was observed between parasite burden and specific IgE. Nevertheless, the SWAP-specific IgE/IgG4 ratio was higher in heavily infected individuals (≥400 epg/feces) than in uninfected or lightly infected ones (1-99 epg/feces). These findings highlight the important role of IgE/IgG4 ratio in the resistance to infection, which could be useful for further studies in schistosomiasis vaccine candidates.

For Peer Review

INTRODUCTION

Schistosomiasis remains a major public health concern and according to recent estimates, approximately 200 million individuals are infected, with a further 700 million people living at risk of infection (1). Control strategies focusing on mass chemotherapy with praziquantel (PZQ) have significantly reduced severe pathology. However, post-treatment reinfection and accompanying morbidities such as anemia, malnutrition, and cognitive impairment persist despite subsequent rounds of treatment (2). Although repeated drug administration is necessary, chemotherapy alone does not seem to be sufficient for long-term control (3). Several other factors have been related to susceptibility or resistance to infection, such as genetic predisposition, host immune response, and environmental or behavioral factors (4-7).

Although human immune responses to *Schistosoma mansoni* have been extensively studied, mechanisms by which human hosts resist to schistosome infection are still unclear. Results from longitudinal field study suggests that resistance to reinfection can be naturally developed (8), or induced after multiple rounds of exposure, treatment and reinfection (9, 10). These observations have led to the conception of an age-dependent model of resistance, which has been the main accepted model over the last several decades (9, 11). This theory states that children under 15 years of age are highly susceptible to post-treatment reinfection, with a gradual increase in resistance over time (11, 12). Nevertheless, an important study suggested that resistance to reinfection could be developed in response to curative chemotherapy and thus may not be strictly age-dependent, but rather exposure-

For Peer Review

dependent (13). It is worth noting, however, that age and exposure are inversely proportional and closely related.

Resistance to reinfection has been associated with a Th2 immunity and consequent high level of IgE, as well as recruitment and activation of eosinophils and mast cells (14-20). Many authors have reported correlations between levels of anti-schistosome IgE and IgG4 and protection against reinfection. High levels of IgE against soluble adult worm antigen preparation (SWAP) have been associated with resistance to reinfection (16, 17, 21-23), whereas high levels of IgG4 against adult worm and egg antigens have been associated with susceptibility to reinfection (16, 21, 24, 25). The balance between levels of IgE and IgG4 tends towards the production of IgE in a Th2 milieu with low levels of IFN-γ and IL-10 (26). On the other hand, an environment rich in IL-10, as seen in *S. mansoni* infection, is associated with high levels of IgG4 (27). A recent study demonstrated that the blockage of IL-10 signaling during PZQ treatment enabled the development of protective immunity in the experimental mouse model of *S. mansoni* infection (28).

Considerable evidence suggests that the balance between IgE and IgG4 might determine resistance or susceptibility to *S. mansoni* infection (16, 25, 29) and that IgG4 might attenuate the protective effect of IgE (24). However, most of the previous studies evaluating resistance to *S. mansoni* infection have been developed in small cohorts. Therefore, we wondered whether anti-SWAP IgE and IgG4 production would be associated with parasite burden in an endemic area of Bahia, Brazil. To address this question, we conducted a large casuistic study, measuring levels of total IgE and SWAP-specific IgE and IgG4, and correlated levels of these isotypes with parasite burden and degree of exposure to

For Peer Review

contaminated water. Moreover, we were able to assess the effect of age and gender on infection status and antibody production.

MATERIALS AND METHODS

Study population

This study was conducted in Conde, a city located 200 km north of Salvador, the capital of Bahia, Brazil. It includes four small villages (Sempre Viva, Jenipapo, Camarões and Buri), with approximately 800 inhabitants. They live in poor sanitary conditions and fishing is the predominant occupation.

Pregnant women and individuals using immunosuppressive drugs or with evidence of hepatomegaly were not included in this study. All adults provided written informed consent. Children gave written assent, and written consent for children's participation was obtained from a parent or guardian. The research protocol was approved by the Ethical Committee of Maternidade Climério de Oliveira at the Federal University of Bahia. All study participants were treated with PZQ in a split dose of 50 mg/kg of body weight.

Water contact surveys

An interview-administered questionnaire, which was previously developed, was administered to each participant (4). This environmental questionnaire was modified based on previous studies conducted in the same area, taking local water usage habits into consideration. For each of the 7 activities observed (farming, bathing, washing clothes, washing hair, washing dishes, fishing, and playing), each subject was asked to provide a local name for the water source along with the frequency and duration of each activity.

For Peer Review

Water source names were compiled from all questionnaires and reduced to a nonredundant list, and snails sampled at these sites were tested for cercariae. For water sources positive for cercariae, subjects were classified across all activities into 4 categories to reflect the level of exposure: no exposure, low exposure (1 h/week), medium exposure (1–3 h/week), or high exposure (1–3 h/day) (4, 30).

Parasite exams

Stool samples from a total of 707 subjects were tested by using the Kato-Katz method (31) to estimate the number of *S. mansoni* eggs per gram of fecal matter from 3 subsamples taken from 2 independent samples per individual, and the arithmetic mean was calculated for each subject. Parasite burden was expressed as average eggs per gram (epg) of feces. The presence of *Ascaris lumbricoides, Trichuris trichiura,* and hookworm eggs was also determined.

Antibody determination

Blood was collected through venipuncture using Vacutainer serum separation tubes (Becton Dickinson, Franklin Lanes, NJ). Serum was obtained by centrifugation and stored at -20°C in single-use aliquots. Total serum IgE level was measured using Chemiluminescence (ADVIA Centaur; Bayer) in Salvador, Brazil. Specific IgE antibodies against *S. mansoni* were investigated by indirect ELISA performed on wells of polystyrene microtiter plates coated with 10 µg/ml of SWAP, obtained as previously described (32). Plates were blocked by 5% bovine serum albumin (BSA) solution followed by 1 hour incubation at room temperature. Given that IgE specific response is not always detected in *S. mansoni* infected patients, IgG was removed by using RF absorbent (Behring Diagnostics, Marburg,

For Peer Review

Germany) (33). Immunoprecipitates were removed by a 10 minutes centrifugation at 4ºC. Reactions were developed with 100 µl of supernatants incubated overnight at 4°C, followed by addition of peroxidase-conjugated mouse monoclonal anti-human IgE (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) for 1 hour at 37ºC. Immunoassay was revealed with 100 µl of sodium acetate buffer containing TMB (3,3`,5,5` tetramethylbenzidine) and H_2O_2 for 15 minutes at room temperature. The reaction was stopped with 50 µl of 2M sulphuric acid and the absorbance immediately measured at 450 nm.

Immunoglobulin G4 against SWAP was measured in serum of recruited subjects using a previously described ELISA method (17, 34). Briefly, microtiter plates were coated 100 µl per well with 10 µg/ml of SWAP and incubated overnight at 4ºC. A monoclonal biotinylated mouse anti-human IgG4 was used as detection antibody (Sigma-Aldrich St. Louis, USA). Finally, streptavidin horse-radish peroxidase (BD Biosciences Pharmigen) was used to amplify the signal. The revelation and stop phases of the reaction were identical to those described for specific IgE.

Specific antibody response was expressed as optical density (OD), which was recorded into a data file in DeltaSOFT II (BioMetalics, Inc USA) microplate analysis software.

Statistical analysis

Data was entered into STATA statistical package version 11.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA) for statistical analysis and GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to build graphs.

For Peer Review

Continuous variables, such as age, parasite load and immunological variables were expressed as the mean and standard deviation (SD) of observed values. *S. mansoni* parasite load was classified into light (1 - 99 epg/feces), moderate (100 - 399 epg/feces) or heavy-intensity of infection (≥400 epg/feces) (35). For statistical analysis egg counts per gram of feces were log-transformed ($\log_{10}$[epg+1]) to approach the Normal distribution. Cutoff points for specific IgE and IgG4 were obtained by adding two SDs to the mean absorbance of results from 10 healthy individuals (IgG4 cutoff = 0.11 OD; IgE cutoff = 0.14 OD).

The d'Agostino-Pearson omnibus normality test was used to designate the most appropriate statistical test for each evaluation. Depending on the result of the normality test, the Mann-Whitney or Student's t test was used to compare continuous variables between two groups, whereas a nonparametric ANOVA (Kruskal-Wallis test) was used to compare continuous variables between three or more groups. The chi-square test was used to compare counts of infected and uninfected subjects among gender or groups of age. The difference in parasite load between low and high IgG4 producers was assessed by logistic regression adjusted for age, gender and level of exposure to contaminated water. Correlations between antibody levels and parasite load were performed using the Spearman's rank test. Linear regression models adjusted for age, gender and level of exposure were fitted and the Wald test for the parasite load variable was used to obtain the *P* value. The alpha level for statistical significance was established as 0.05 for all analyses.

For Peer Review

RESULTS

Baseline characteristics

A total of 707 individuals were included in the study. The mean age of the population was 28 ± 19 years, ranging from 6 to 85 years of age, and slightly more than half of studied individuals were female (56.6%). A high proportion of subjects had no exposure to fresh water in the region (45.2%). Among those who reported water contact, 32.0% were exposed up to 1 hour per week (low exposure), 26.8% were exposed to 1-3 hours/week (medium exposure) and 41.2% were exposed to infested water daily (high exposure; Table 1).

The overall prevalence of *S. mansoni* infection was 37.7%, and the parasite load was 46.7 ± 148.3 epg/feces, ranging from 0 to 2100 epg/feces. Among those who were infected, 72.1% had a parasite burden up to 99 epg/feces, 21.3% had moderate intensity of infection (100 - 399 epg/feces), and only 6.6% were heavily infected, with a parasite load equal to or greater than 400 epg/feces (Table 1). The prevalence and intensity of *S. mansoni* infection was significantly higher in males (45.4% and 70.0 ± 203.4 epg/feces, respectively) than females (31.6% and 28.0 ± 79.6 epg/feces, respectively; $P < 0.001$). Additionally, patients' age was important in determining *S. mansoni* parasite load, since higher levels of infection were observed for the first three decades of life ($P < 0.01$; Figure 1). Parasite burden was also higher among those individuals with 0 to 9, 10 to 19 and 20 to 29 years old (52.6 ± 116.7, 76.1 ± 205.5 and 93.6 ± 195.1 epg/feces, respectively), when compared to the following three decades of life (47.0 ± 130.5, 43.1 ± 105.1 and 15.1 ± 28.1 epg/feces), as wells as to subjects over 60 years old (12.0 ± 53.4 epg/feces; $P < 0.001$; Figure 1). In

For Peer Review

addition to increased prevalence of infection and parasite load, younger individuals were also more exposed to infested water than older individuals (data not shown). Approximately 87% of *S. mansoni* infected patients were coinfected with one or more helminths. The most common helminth found in the region was *Trichuris trichiura* (66.3%), followed by *Ascaris lumbricoides* (53.5%) and hookworm infection (28.7%; Table 1).

Total IgE and SWAP-specific IgE and IgG4 in infected subjects

The mean level of total IgE in the whole population was 1600.9 ± 1335.5 U/L, ranging from 1 to 9673 U/L. As expected, total IgE level was higher among those currently infected with *S. mansoni* (1850.0 ± 1273.6 U/L) as compared to *S. mansoni* uninfected subjects (1362.2 ± 1250.6 U/L; $P < 0.001$). Higher IgE levels were also observed in subjects infected with any helminths (1684.1 ± 1283.3 U/L) compared to non-infected individuals (1032.9 ± 1134.0 U/L; $P < 0.001$). However, we observed no significant difference in total IgE levels among *S. mansoni* infected subjects whether or not they were coinfected with other helminths (1925.2 ± 1241.7 and 1332.8 ± 1394.4 U/L respectively; $P > 0.05$).

Independent of current *S. mansoni* infection status, SWAP-specific antibody isotypes were detected in a large proportion of individuals. Anti-SWAP IgG4 was positive in 91% of the tested samples, while 98% of the samples were positive for anti-SWAP IgE. The mean levels of SWAP-specific IgE and IgG4 in the overall population were 0.81 ± 0.44 and 1.48 ± 1.49 OD, respectively (Figure 2a). Regarding *S. mansoni* infection status, similar levels of SWAP specific IgE were observed among infected (0.86 ± 0.53 OD) and uninfected individuals (0.78 ± 0.38 OD; $P > 0.05$), whereas higher levels of SWAP IgG4 was found in

For Peer Review

those infected (2.18 ± 1.43 OD) when compared to uninfected ones (1.04 ± 1.35 OD; $P < 0.001$). Moreover, while levels of specific IgE were uniformly distributed around the mean, levels of IgG4 had a bimodal distribution, allocating subjects into phenotype of low (below 0.6 OD, n = 241) or high (above 3.0 OD, n = 120) IgG4 producer. When adjusted by age, gender and level of exposure to contaminated water, those subjects considered as high IgG4 producers presented a higher parasite burden (1.01 ± 0.98 $\log_{10}$epg) as compared to low IgG4 producers (0.27 ± 0.62 $\log_{10}$epg; $P < 0.001$, Figure 2b).

Additionally, *S. mansoni* parasite load was positively correlated with levels of SWAP specific IgG4 ($P < 0.001$; Figure 3a) or total IgE ($P < 0.05$; Figure 3b), whereas no significant correlation was observed between parasite burden and SWAP specific IgE ($P > 0.05$; Figure 3c) when adjusted by age, gender and level of exposure. Despite this lack of association between specific IgE and intensity of infection, the SWAP specific IgE/IgG4 ratio was higher in uninfected and light-intensity infected individuals (1-99 epg/feces) compared to heavily infected ones (≥400 epg/feces; $P < 0.0001$; Figure 4).

For Peer Review

DISCUSSION

Prevalence of *S. mansoni* infection as well as parasite load is influenced by several factors within endemic communities, which includes exposure-related factors such as local environment and behavior, and aspects associated with host susceptibility or resistance to infection, specifically intrinsic immune response and genetic predisposition. While animal studies can be tightly controlled, human populations are highly heterogeneous, varying according to demographic characteristics, genetic background and exposure to infection (36). In the current study, we examined whether anti-adult worm IgE and IgG4 production is associated with *S. mansoni* parasite burden in four villages situated in the northeast of Bahia, Brazil.

Higher intensity of infection was observed in males compared to females and among children and young adults compared to older adults. Other authors have also documented differences in *Schistosoma* prevalence or intensity of infection according to gender and age in rural endemic communities, similarly showing heavier infection among males and younger individuals (37-42). Gender-related differences in infection prevalence or intensity of infection are frequently attributed to sociocultural or behavioral factors (39, 41, 42), however experimental evidence shows that they may also be related to differences in susceptibility to infection (43). The higher prevalence and intensity of infection observed in males in our study could not be attributed to differences in levels of exposure, since we did not observe differences in water exposure by sex despite differing activities linked to water exposure. The main reason for men in these communities have contact with the contaminated water is fishing, for females is to perform household activities such as

For Peer Review

washing clothes and dishes. It has been discussed the possible bias in water exposure determination methods, however, in order to remove variability caused by differences in exposure to water, the analyses were adjusted for levels of water contact.

Consistent with other studies, the prevalence and parasite load was higher in the first three decades of life, demonstrating that the peak of infection burden usually occurs in puberty and decreases thereafter, suggesting an age-related resistance to infection in schistosomiasis endemic areas (4, 44). The observation that antibodies, particularly IgE may play a role in protection against schistosomiasis and tends to increase with age in endemic areas led to the hypothesis that age-related resistance to infection may be mediated by parasite-specific IgE (34). In the present study we did not observe differences in SWAP-specific IgE levels in different age groups; however levels of this antibody did differ among individuals with different parasite burden.

A positive correlation between *S. mansoni* parasite load and total IgE levels was found in this study. This has also been found by other researchers (16, 17) and could result from the polyclonal activation seen in some parasite infections (33). An *in vitro* role for IgE in the immune response to *Schistosoma spp.* has been demonstrated (16, 45, 46), suggesting that increased levels of this isotype may represent an attempt to control the infection. Our research group also demonstrated, in the same population enrolled in this study, that polymorphisms in the IL-10 promoter were associated with high total IgE levels (47).

Despite the notable association between total IgE and intensity of infection, no correlation between SWAP specific-IgE and parasite load was found. We showed previously a high

For Peer Review

heritability to total IgE levels implying that there are genes controlling total IgE production regardless of the relative proportion of schistosome antigen-specific IgE (4). While total IgE seems not to be associated with resistance against helminth infections, high levels of total IgE production in detriment of schistosome-specific IgE, may result in a less protective immune response. Indeed, in helminth infection suppression of basophil histamine release *in vitro* was observed when polyclonal to antigen-specific IgE ratios were greater than 500:1 (48).

Levels of SWAP specific IgG4, however, were positively associated with *S. mansoni* parasite load in this study and this is in agreement with other studies (16, 21, 24, 25). It is speculated that parasite-specific IgG4 can compete with specific IgE for the antigen binding, interfering in the IgE-mediated mast cell degranulation. Thus, IgG4 production would impair the protective role of specific IgE in the resistance to *S. mansoni* infection (24).

Despite the lack of correlation between SWAP-specific IgE and parasite load, specific IgE/IgG4 ratio was lower in infected individuals when compared to non-infected ones. High levels of specific IgE has been associated with resistance to infection (16, 17, 21, 29), however it seems that the expression of protective immunity does not depend exclusively on the levels of specific-IgE or -IgG4, but rather on the favorable balance toward IgE production (16, 29). Elevated SWAP-specific IgG4/IgE balance was associated with increased rate of reinfection in a two-year post-treatment follow-up study (25). Moreover, the influence of high specific-IgE/IgG4 ratio in the resistance to *S. mansoni* (29) and *S. haematobium* infection (49) has been demonstrated by other authors.

For Peer Review

Consistent with previous studies, we showed, in a large casuistic study, that reduction in schistosome intensity of infection observed amongst adults in endemic community may be mediated by acquired immunity. Specifically, the immune response associated with resistance to *S. mansoni* infection in this study was a positive balance of SWAP-specific IgE/IgG4 production. On the other hand, high levels of parasite-specific IgG4 were associated with high parasite burden. These findings, using a large cohort of individuals living in an endemic area of schistosomiasis in Brazil, highlight the key role of parasite-specific IgE/IgG4 ratio in resistance to *S. mansoni* infection. This information could be useful for further studies of schistosomiasis vaccine candidates. Ongoing prospective studies are being conducted to determine whether the level of reinfection after treatment will be greater in those subjects with a lower IgE/IgG4 ratio, considered to be more susceptible to infection.

For Peer Review

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank people of the endemic areas Buri, Camarão, Genipapo and Sempre Viva in Conde for their participation in our study, the health liaisons, Adaliudes Conceição, Luciana Quintela, Ivanice Santos and the public health officers of the main Conde office, Analú Lima, Benivaldo Valber Oliveira Silva and Iraci Santos Araujo. KCB was supported in part by the Mary Beryl Patch Turnbull Scholar Program. MIA and EMC are investigators supported by CNPq.

For Peer Review

REFERENCES

1. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect Dis. 2006 Jul;6(7):411-25.
2. King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helmintic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. Lancet. 2005 Apr 30-May 6;365(9470):1561-9.
3. Liese BS, Govaker DA. The five-session quit-smoking clinic. Kans Med. 1987 Oct;88(10):291-3.
4. Grant AV, Araujo MI, Ponte EV, Oliveira RR, Cruz AA, Barnes KC, et al. High heritability but uncertain mode of inheritance for total serum IgE level and Schistosoma mansoni infection intensity in a schistosomiasis-endemic Brazilian population. J Infect Dis. 2008 Oct 15;198(8):1227-36.
5. Correa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcao PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, et al. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human Schistosoma mansoni infection. Braz J Med Biol Res. 1998 Jan;31(1):171-7.
6. Gazzinelli A, Velasquez-Melendez G, Crawford SB, LoVerde PT, Correa-Oliveira R, Kloos H. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in a poor rural area in Brazil. Acta Trop. 2006 Oct;99(2-3):260-71.
7. Oliveira RR, Figueiredo JP, Cardoso LS, Jabar RL, Souza RP, Wells MT, et al. Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. Am J Trop Med Hyg. In press.
8. Silveira AM, Fraga LA, Prata A, Correa-Oliveira R, Addiss DA, Viana IR, et al. Resistance to infection/reinfection by Schistosoma mansoni is not augmented by three treatments with 45 days intervals. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998 Jan-Feb;93(1):113-4.
9. Gryseels B. Human resistance to Schistosoma infections: age or experience? Parasitol Today. 1994 Oct;10(10):380-4.
10. Mutapi F, Ndhlovu PD, Hagan P, Spicer JT, Mduluza T, Turner CM, et al. Chemotherapy accelerates the development of acquired immune responses to Schistosoma haematobium infection. J Infect Dis. 1998 Jul;178(1):289-93.
11. Etard JF, Audibert M, Dabo A. Age-acquired resistance and predisposition to reinfection with Schistosoma haematobium after treatment with praziquantel in Mali. Am J Trop Med Hyg. 1995 Jun;52(6):549-58.
12. Butterworth AE, Capron M, Cordingley JS, Dalton PR, Dunne DW, Kariuki HC, et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79(3):393-408.
13. Karanja DM, Hightower AW, Colley DG, Mwinzi PN, Galil K, Andove J, et al. Resistance to reinfection with Schistosoma mansoni in occupationally exposed adults and effect of HIV-1 co-infection on susceptibility to schistosomiasis: a longitudinal study. Lancet. 2002 Aug 24;360(9333):592-6.
14. Roberts M, Butterworth AE, Kimani G, Kamau T, Fulford AJ, Dunne DW, et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. Infect Immun. 1993 Dec;61(12):4984-93.

For Peer Review

15. Medhat A, Shehata M, Bucci K, Mohamed S, Dief AD, Badary S, et al. Increased interleukin-4 and interleukin-5 production in response to Schistosoma haematobium adult worm antigens correlates with lack of reinfection after treatment. J Infect Dis. 1998 Aug;178(2):512-9.
16. Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJ, Wilkins HA. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with Schistosoma haematobium. Nature. 1991 Jan 17;349(6306):243-5.
17. Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJ, Kariuki HC, Langley JG, Ouma JH, et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. Eur J Immunol. 1992 Jun;22(6):1483-94.
18. Rihet P, Demeure CE, Bourgois A, Prata A, Dessein AJ. Evidence for an association between human resistance to Schistosoma mansoni and high anti-larval IgE levels. Eur J Immunol. 1991 Nov;21(11):2679-86.
19. Hagan P, Wilkins HA, Blumenthal UJ, Hayes RJ, Greenwood BM. Eosinophilia and resistance to Schistosoma haematobium in man. Parasite Immunol. 1985 Nov;7(6):625-32.
20. MacDonald AS, Araujo MI, Pearce EJ. Immunology of parasitic helminth infections. Infect Immun. 2002 Feb;70(2):427-33.
21. Satti MZ, Lind P, Vennervald BJ, Sulaiman SM, Daffalla AA, Ghalib HW. Specific immunoglobulin measurements related to exposure and resistance to Schistosoma mansoni infection in Sudanese canal cleaners. Clin Exp Immunol. 1996 Oct;106(1):45-54.
22. Naus CW, van Dam GJ, Kremsner PG, Krijger FW, Deelder AM. Human IgE, IgG subclass, and IgM responses to worm and egg antigens in schistosomiasis haematobium: a 12-month study of reinfection in Cameroonian children. Clin Infect Dis. 1998 May;26(5):1142-7.
23. Grogan JL, Kremsner PG, van Dam GJ, Metzger W, Mordmuller B, Deelder AM, et al. Antischistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults. J Infect Dis. 1996 May;173(5):1242-7.
24. Jiz M, Friedman JF, Leenstra T, Jarilla B, Pablo A, Langdon G, et al. Immunoglobulin E (IgE) responses to paramyosin predict resistance to reinfection with Schistosoma japonicum and are attenuated by IgG4. Infect Immun. 2009 May;77(5):2051-8.
25. Li Y, Sleigh AC, Ross AG, Zhang X, Williams GM, Yu X, et al. Human susceptibility to Schistosoma japonicum in China correlates with antibody isotypes to native antigens. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2001 Jul-Aug;95(4):441-8.
26. Capron A, Dombrowicz D, Capron M. Regulation of the immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. Microbes Infect. 1999 Jun;1(7):485-90.
27. Ribeiro de Jesus A, Araujo I, Bacellar O, Magalhaes A, Pearce E, Harn D, et al. Human immune responses to Schistosoma mansoni vaccine candidate antigens. Infect Immun. 2000 May;68(5):2797-803.
28. Wilson MS, Cheever AW, White SD, Thompson RW, Wynn TA. IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with Schistosoma mansoni. PLoS Pathog. Aug;7(8):e1002171.
29. Demeure CE, Rihet P, Abel L, Ouattara M, Bourgois A, Dessein AJ. Resistance to Schistosoma mansoni in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. J Infect Dis. 1993 Oct;168(4):1000-8.

30. Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M, Jr., Alcantara L, Almeida MC, Schriefer A, et al. Impaired T Helper 2 Response to Aeroallergen in Helminth-Infected Patients with Asthma. J Infect Dis. 2004 Nov 15;190(10):1797-803.
31. Katz N, Coelho PM, Pellegrino J. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of Schistosoma mansoni eggs added to human feces. J Parasitol. 1970 Oct;56(5):1032-3.
32. Pearce EJ, James SL, Dalton J, Barrall A, Ramos C, Strand M, et al. Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a Schistosoma mansoni antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a nonliving vaccine. J Immunol. 1986 Dec 1;137(11):3593-600.
33. Souza-Atta ML, Araujo MI, D'Oliveira Junior A, Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Atta AM, et al. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. Braz J Med Biol Res. 1999 Sep;32(9):1101-5.
34. Webster M, Libranda-Ramirez BD, Aligui GD, Olveda RM, Ouma JH, Kariuki HC, et al. The influence of sex and age on antibody isotype responses to Schistosoma mansoni and Schistosoma japonicum in human populations in Kenya and the Philippines. Parasitology. 1997 Apr;114 (Pt 4):383-93.
35. WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. World Health Organ Tech Rep Ser. 2002;912:i-vi, 1-57, back cover.
36. Pinot de Moira A, Fulford AJ, Kabatereine NB, Ouma JH, Booth M, Dunne DW. Analysis of complex patterns of human exposure and immunity to Schistosomiasis mansoni: the influence of age, sex, ethnicity and IgE. PLoS Negl Trop Dis.4(9).
37. de Lima e Costa MF, Rocha RS, Coura Filho P, Katz N. A 13-year follow-up of treatment and snail control in an area endemic for Schistosoma mansoni in Brazil: incidence of infection and reinfection. Bull World Health Organ. 1993;71(2):197-205.
38. Kahama AI, Vennervald BJ, Kombe Y, Kihara RW, Ndzovu M, Mungai P, et al. Parameters associated with Schistosoma haematobium infection before and after chemotherapy in school children from two villages in the coast province of Kenya. Trop Med Int Health. 1999 May;4(5):335-40.
39. Kabatereine NB, Kemijumbi J, Ouma JH, Kariuki HC, Richter J, Kadzo H, et al. Epidemiology and morbidity of Schistosoma mansoni infection in a fishing community along Lake Albert in Uganda. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004 Dec;98(12):711-8.
40. Klumpp RK, Webbe G. Focal, seasonal and behavioural patterns of infection and transmission of Schistosoma haematobium in a farming village at the Volta Lake, Ghana. J Trop Med Hyg. 1987 Oct;90(5):265-81.
41. Matthys B, Tschannen AB, Tian-Bi NT, Comoe H, Diabate S, Traore M, et al. Risk factors for Schistosoma mansoni and hookworm in urban farming communities in western Cote d'Ivoire. Trop Med Int Health. 2007 Jun;12(6):709-23.
42. Wu Z, Bu K, Yuan L, Yang G, Zhu J, Liu Q. Factors contributing to reinfection with schistosomiasis japonica after treatment in the lake region of China. Acta Trop. 1993 Aug;54(2):83-8.
43. Eloi-Santos S, Olsen NJ, Correa-Oliveira R, Colley DG. Schistosoma mansoni: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. Exp Parasitol. 1992 Sep;75(2):168-75.
44. Kabatereine NB, Vennervald BJ, Ouma JH, Kemijumbi J, Butterworth AE, Dunne DW, et al. Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection

remains constant in communities with diverse exposure patterns. Parasitology. 1999 Jan;118 (Pt 1):101-5.

45. Viana IR, Correa-Oliveira R, Carvalho Odos S, Massara CL, Colosimo E, Colley DG, et al. Comparison of antibody isotype responses to Schistosoma mansoni antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. Parasite Immunol. 1995 Jun;17(6):297-304.

46. Zhang Z, Wu H, Chen S, Hu L, Xie Z, Qiu Y, et al. Association between IgE antibody against soluble egg antigen and resistance to reinfection with Schistosoma japonicum. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1997 Sep-Oct;91(5):606-8.

47. Grant AV, Araujo MI, Ponte EV, Oliveira RR, Cruz AA, Barnes KC, et al. Polymorphisms in IL10 are associated with total Immunoglobulin E levels and Schistosoma mansoni infection intensity in a Brazilian population. Genes Immun. Jan;12(1):46-50.

48. Mitre E, Norwood S, Nutman TB. Saturation of immunoglobulin E (IgE) binding sites by polyclonal IgE does not explain the protective effect of helminth infections against atopy. Infect Immun. 2005 Jul;73(7):4106-11.

49. Mutapi F, Bourke C, Harcus Y, Midzi N, Mduluza T, Turner CM, et al. Differential recognition patterns of Schistosoma haematobium adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE, IgG1 and IgG4. Parasite Immunol. Mar;33(3):181-92.

For Peer Review

1

2 FIGURE LEGENDS

3

4 **Figure 1.** Prevalence of *S. mansoni* infection and parasite load according to categories of
5 age in subjects from an endemic area for schistosomiasis. Horizontal black lines above each
6 bar represent the standard error of the mean (SEM). Difference in parasite load and
7 frequency of infection between clusters of age was statistically significant ($P < 0.0001$ and
8 $P < 0.01$, respectively).

9

10 **Figure 2.** SWAP-specific IgE and IgG4 (a) and parasite load according to categories of
11 IgG4 production (b) in subjects from an endemic area for schistosomiasis. Figure a – Each
12 point represents one individual. Horizontal black lines indicate the mean, whereas
13 discontinuous horizontal black line represent the Cutoff level for anti-SWAP IgE (0.14 OD)
14 and IgG4 (0.11 OD). Figure b – First bar shows *S. mansoni* parasite load of low anti-SWAP
15 IgG4 producers; the second bar represent parasite load of high IgG4 producers. Horizontal
16 black lines above each bar represent the standard error of the mean (SEM). Difference in
17 parasite load between low and high IgG4-producers was statistically significant ($P < 0.001$).

18

19 **Figure 3.** Correlation between parasite load and SWAP-specific IgG4 (a), total IgE (b) and
20 SWAP-specific IgE (c) in subjects from an endemic area for schistosomiasis. Each point
21 represents one individual. Positive correlation, assessed by Spearman's rank test and linear
22 regression adjusted by age, gender and level of exposure to contaminated water, was found

For Peer Review

between parasite load and specific IgG4 (a; $P < 0.001$) and total IgE (b; $P < 0.05$), whereas no correlation was observed between parasite load and specific IgE (c; $P > 0.05$).

Figure 4. SWAP-specific IgE/IgG4 ratio according to intensity of infection in subjects from and endemic area for schistosomiasis. Horizontal black lines above each bar represent the standard error of the mean (SEM). Difference between specific IgE/IgG4 ratio and intensity of infection was statistically significant ($P < 0.0001$).

For Peer Review

TABLE

Table 1. Baseline characteristics of the population (n= 707)

Variables	Values
Age in years	
Mean (SD)	28 ± 19
Median (min-max)	23 (6-85)
Gender [n (%)]	
Male	307 (43.4)
Female	400 (56.6)
Water contact [n (%)]	
No reported exposure	296 (45.2)
Reported exposure	359 (54.8)
Low exposure (1 h/week)	115 (32.0)
Medium exposure (1-3 h/week)	96 (26.8)
High exposure (1-3 h/day)	148 (41.2)
Helminth infections [n (%)]	
Schistosoma mansoni	197 (37.7)
Epg/feces (mean ± SD)	46.7 ± 48.4
Trichuris trichiura	347 (66.3)
Ascaris lumbricoides	280 (53.5)
Hookworm	150 (28.7)
***S. mansoni* parasite load categories** [n (%)]	
Light-intensity infection (1- 99 epg/feces)	142 (72.1)
Moderate-intensity infection (100 - 399 epg/feces)	42 (21.3)
Heavy-intensity infection (≥ 400 epg/feces)	13 (6.6)
Coinfection[a] [n (%)]	172 (87.3)

[a]Coinfection defined as infection with *S. mansoni* plus one or more helminths

For Peer Review

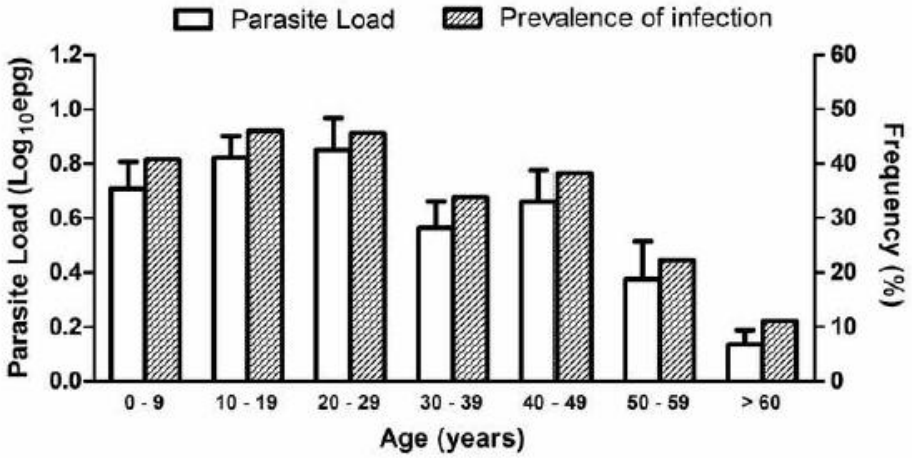


Figure 1 - Prevalence of *S. mansoni* infection and parasite load according to categories of age in subjects from an endemic area for schistosomiasis. Horizontal black lines above each bar represent the standard error of the mean (SEM). Difference in parasite load and frequency of infection between clusters of age was statistically significant ($P < 0.0001$ and $P < 0.01$, respectively).
61x31mm (300 x 300 DPI)

er Review

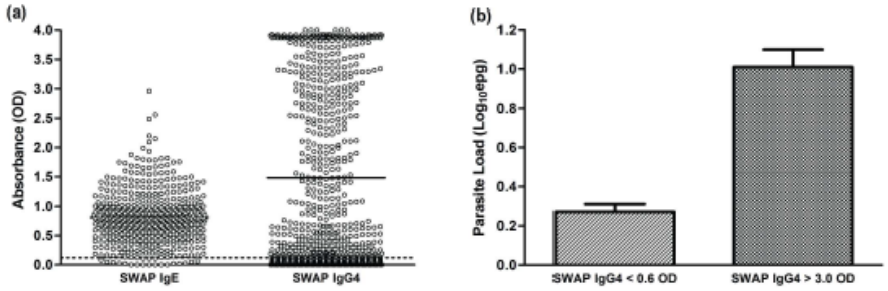


Figure 2 - SWAP-specific IgE and IgG4 (a) and parasite load according to categories of IgG4 production (b) in subjects from an endemic area for schistosomiasis. Figure a – Each point represents one individual. Horizontal black lines indicate the mean, whereas discontinuous horizontal black line represent the Cutoff level for anti-SWAP IgE (0.14 OD) and IgG4 (0.11 OD). Figure b – First bar shows *S. mansoni* parasite load of low anti-SWAP IgG4 producers; the second bar represent parasite load of high IgG4 producers. Horizontal black lines above each bar represent the standard error of the mean (SEM). Difference in parasite load between low and high IgG4-producers was statistically significant ($P < 0.001$).
192x63mm (300 x 300 DPI)

eer Review

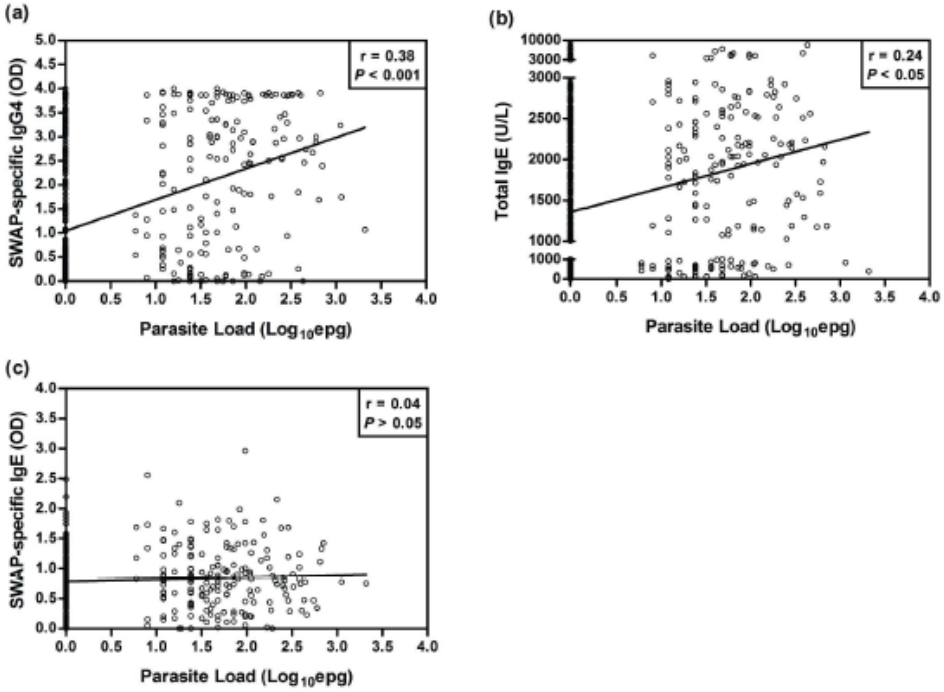


Figure 3 - Correlation between parasite load and SWAP-specific IgG4 (a), total IgE (b) and SWAP-specific IgE (c) in subjects from an endemic area for schistosomiasis. Each point represents one individual. Positive correlation, assessed by Spearman's rank test and linear regression adjusted by age, gender and level of exposure to contaminated water, was found between parasite load and specific IgG4 (a; $P < 0.001$) and total IgE (b; $P < 0.05$), whereas no correlation was observed between parasite load and specific IgE (c; $P > 0.05$).
182x133mm (300 x 300 DPI)

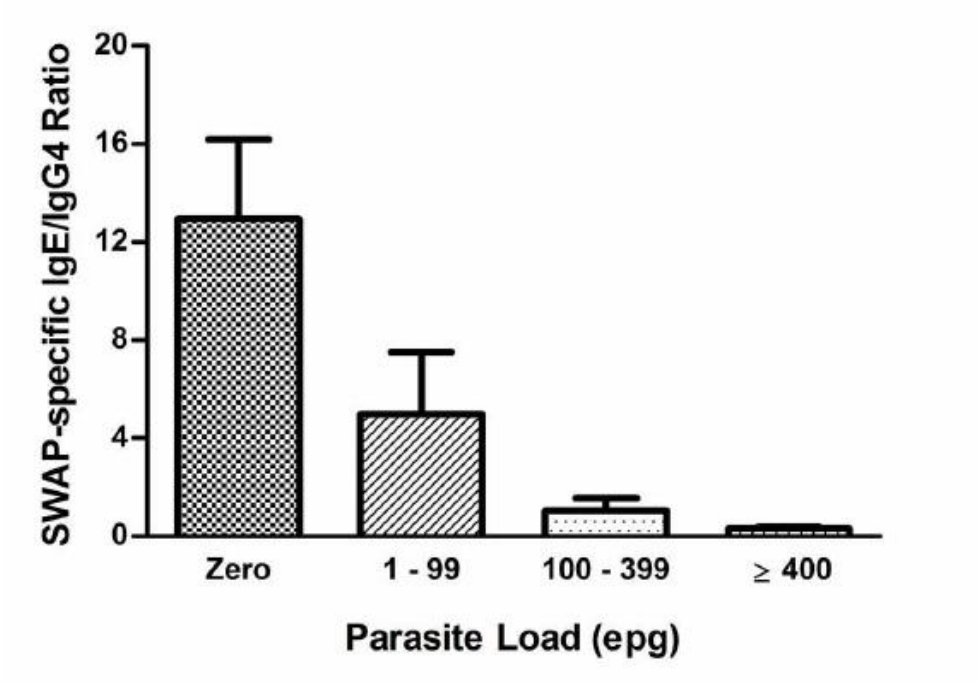


Figure 4 - SWAP-specific IgE/IgG4 ratio according to intensity of infection in subjects from and endemic area for schistosomiasis. Horizontal black lines above each bar represent the standard error of the mean (SEM). Difference between specific IgE/IgG4 ratio and intensity of infection was statistically significant ($P < 0.0001$).
85x61mm (300 x 300 DPI)

Review

ANEXO V – OUTRAS PUBLICAÇÕES

Am. J. Trop. Med. Hyg., 86(2), 2012, pp. 296–305
doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0204
Copyright © 2012 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Factors Associated with Resistance to *Schistosoma mansoni* Infection in an Endemic Area of Bahia, Brazil

Ricardo R. Oliveira,* Joanemile P. Figueiredo, Luciana S. Cardoso, Rafael L. Jabar, Robson P. Souza, Martin T. Wells, Edgar M. Carvalho, Daniel W. Fitzgerald, Kathleen C. Barnes, Maria Ilma Araújo, and Marshall J. Glesby

Serviço de Imunologia, Hospital Universitrio Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; Department of Biological Statistics and Computational Biology, Cornell University, Ithaca, New York; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais, Salvador, Bahia, Brazil; Center for Global Health, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, New York; Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland

Abstract. Detailed knowledge of factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in endemic areas might facilitate more effective schistosomiasis control. We conducted a cross-sectional study of persons resistant to schistosomiasis and found no association between socioeconomic status and resistance to infection. Mononuclear cells of resistant subjects produced higher levels of interleukin-5 (IL-5), IL-13 and interferon-γ upon stimulation with soluble egg antigen (SEA) compared with infected persons. When stimulated with Sm21.6 or Sm22.6, levels of IL-10 were higher in cell culture of resistant persons. Levels of IgE against soluble adult worm antigen (SWAP) and against interleukin-4–inducing principle from *S. mansoni* eggs (IPSE) and levels of IgG4 against SWAP, SEA, and Sm22.6 were lower in the resistant group compared with the susceptible group. Our data suggest that socioeconomic status could not fully explain resistance to *S. mansoni* infection observed in the studied area. However, a mixture of Th1 and Th2 immune responses and low levels of specific IgG4 against parasite antigens could be mediating resistance to infection.

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a tropical disease caused mainly by the blood flukes *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*. It is estimated that the disease affects 200 million persons worldwide, and is endemic to 74 countries in tropical regions of Africa, Asia, and South America.[1] The species that causes most infections in Brazil is *S. mansoni*. Soon after infection and before the egg-laying phase, the immune response is predominantly the T helper 1 (Th1) inflammatory immune response, with high levels of tumor necrosis factor-α, interleukin-1 (IL-1), IL-6 and interferon-γ (IFN-γ) characterizing the acute phase of schistosomiasis.[2] The natural progress of the disease leads to liver and intestinal injury caused mainly by the immune response against *S. mansoni* eggs deposited in these sites. In the chronic phase of the disease, there is a predominance of the Th2 immune response to egg antigens, with low production of IFN-γ, and high levels of IL-4, IL-5, IL-13, and IL-10.[3–5]

Current strategies of schistosomiasis control programs include use of molluscicides to eliminate the intermediate host, education of the population with respect to improvement in sanitation, and mass treatment programs.[6] The development of a vaccine is an important alternative strategy for the control of schistosomiasis. However, no suitable vaccine has yet been developed that confers more than partial protection against infection.[7] Membrane proteins including receptors, ion-binding proteins, immunomodulatory molecules, and enzymes accessible to the human immune system likely represent suitable vaccine targets.[8] Recently investigators have demonstrated that some recombinant *Schistosoma* spp. antigens, such as Sm22.6, Sm29, Sm21.6, and Sm14, are associated with resistance to infection and/or reduction of morbidity.[9–12] These particular proteins are found mainly in the tegument of *S. mansoni*, and induce high levels of IL-4, IL-10, and IFN-γ production that exert partial protection against experimental *S. mansoni* infection.[13] Additionally, a fraction of *S. mansoni* soluble adult worm antigen (SWAP) known as PIII is able to induce protection against a challenge infection after immunization in a murine model of schistosomiasis.[14] Egg antigens are also able to induce a Th1 or Th2 immune response in murine models.[15] The most abundant proteins in the egg, the interleukin-4–inducing principle from *S. mansoni* eggs (IPSE), by inducing IL-4 production is associated with a shift to a Th2 immune response.[16,17]

In schistosomiasis-endemic areas, resistance to reinfection after specific chemotherapy has been correlated with a Th2 immune response, with the presence of specific IgE[18–20] and production of IL-4 and IL-5.[21] Conversely, susceptibility to infection has been correlated with high levels of specific IgG4.[22,23] An appropriate high IgE:IgG4 ratio against egg or adult worm antigens is associated with development of resistance to reinfection.[18,24] This type of resistance to reinfection has been strongly correlated with the immune response as opposed to physiologic or behavioral alterations observed at different ages or with the level of exposure to infested water.[25,26]

Correa-Oliveira and others reported a group of persons living in schistosomiasis-endemic areas who had multiple egg-negative stools despite exposure to infested water; this group was called endemic normal (EN).[27,28] The immune response of these persons differs from that of infected persons and those resistant to reinfection after specific chemotherapy. They produce higher levels of IgE against schistosomula tegument and IgG against paramyosin than infected persons.[29] Moreover, when stimulated with *Schistosoma* antigens, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of EN persons proliferate vigorously and produce higher levels of IFN-γ than those of persons currently infected and those resistant to reinfection.[28,30,31] On the basis of this evidence, it appears that Th1 and Th2 immune response are involved in protection against the infection in this naturally resistant group of persons.

*Address correspondence to Ricardo R. Oliveira, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Rua João das Botas s/n, Canela, Salvador, BA 40110-160, Brazil. E-mail: ricardoriccio@gmail.com

In this cross-sectional study, we used previously collected data from persons residing in the schistosomiasis-endemic area of Conde-BA to identify schistosomiasis-resistant persons. These persons had multiple egg-negative stools in all parasitologic surveys performed, despite exposure to infested water. We assessed epidemiologic data and collected blood samples for identifying possible risk factors for infection, and to evaluate the immune response of schistosomiasis-resistant persons living in an endemic area in Bahia, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Schistosomiasis-endemic area and selection of resistant and susceptible persons. This study was carried out in Conde, a city 200 km north of Salvador, the capital of Bahia, Brazil. It includes four small villages named Sempre Viva, Jenipapo, Camarões, and Buri, which have approximately 800 inhabitants. These inhabitants live in poor sanitary conditions, and fishing is the predominant occupation.

Cross-sectional parasitologic surveys were conducted in 2001 and 2004, and stool specimens were examined for *S. mansoni*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, and hookworm eggs. Also, the intensity of exposure to *S. mansoni* infection was assessed by a previously developed questionnaire, which provides four categories of level of exposure to infested water: no exposure, low exposure (< 1 hour/week), medium exposure (1–3 hours/week), or high exposure (1–3 hours/day).[32,33]

The Immunology Service of the Federal University of Bahia has been studying these villages irrespective of the prevalence of schistosomiasis since 2001. At that time, the prevalence of *S. mansoni* infection was approximately 90%.[33] A schistosomiasis mass treatment program was implemented and the population was followed-up until 2004, when another parasitologic survey was conducted. This second survey showed an overall schistosomiasis prevalence of 44%, which preceded the second treatment of this population,[32] following the World Health Organization recommendations for areas with high or moderate schistosomiasis prevalence.[34]

The subject selection strategy was performed in two steps (Figure 1). First, 2001 and 2004 databases were checked to select exposed persons from those 10–60 years of age whose previous parasitologic results were all negative for *Schistosoma*. In the second part of the selection procedure, which was conducted in 2009, pre-selected persons were asked to provide two stool samples and answer a questionnaire, which included information about exposure to fresh water. Each person who was still negative for schistosomiasis in 2009 and who had a history of exposure to the infection was invited to be included

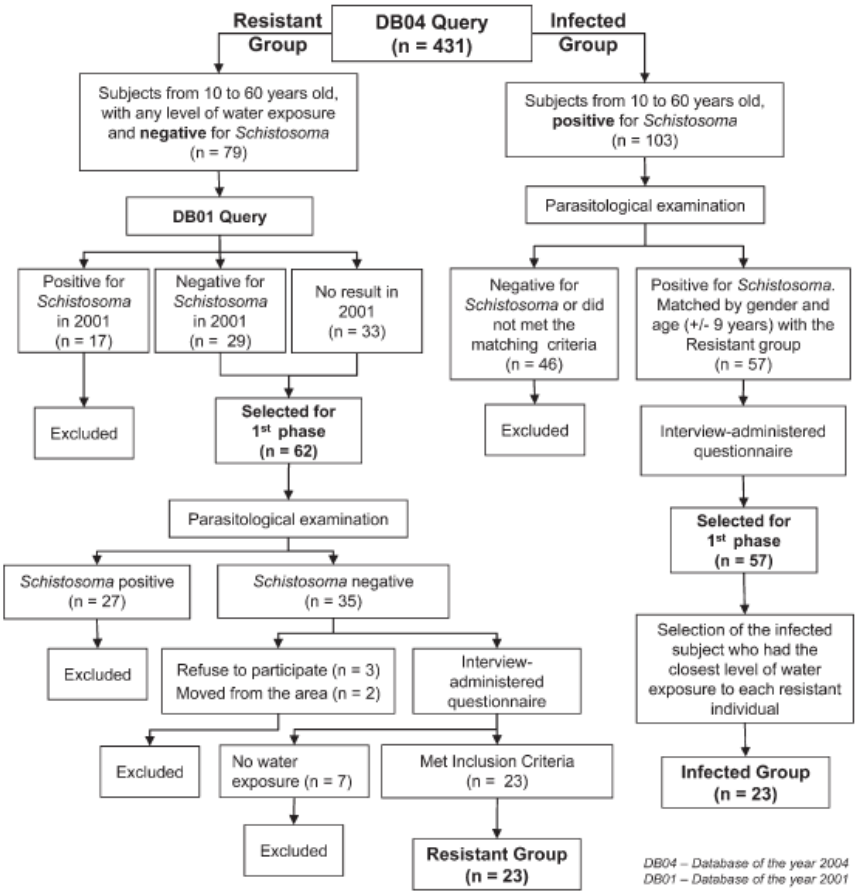


FIGURE 1. Flowchart of study participant selection strategy, Bahia, Brazil.

in a group of putative resistant persons. The infected group was composed of persons matched to the resistant persons by age (±9 years), sex, and level of exposure to infested water. To compose the infected group, the 2004 database was queried for persons from those 10–60 years of age who were positive for *S. mansoni*. These participants were asked to provide one stool sample. Four infected persons who met the matching criteria were then selected per resistant subject. All four potential controls per persons were asked to answer the same exposure questionnaire. Afterward, the infected person who had the closest level of water exposure to each resistant person was invited to participate in this study. An additional group of 10 persons with no helminth infections and who were living outside the schistosomiasis-endemic area was invited to be included in a healthy group to provide baseline information on cytokine and antibody levels.

Ethics. All adults provided written informed consent. Children gave written assent, and written consent for children's participation was obtained from a parent or guardian. The research protocol was approved by Institutional Review Boards at Weill Cornell Medical College and at the Federal University of Bahia.

Socioeconomic and water contact surveys. An interview-administered questionnaire was developed for the purpose of this study and administered to each participant. This questionnaire was divided into 3 sections: A) schistosomiasis-related questions, which included the water contact information and questions regarding the last schistosomiasis treatment; B) demographic and socioeconomic information, which included age, sex, housing conditions, sanitation, occupation, and income; and C) health-related questions, which included information about other related diseases, the CAGE questionnaire, and questions 1 and 7–9 of the Household Food Insecurity Access Scale. This scale is used to assess food insecurity information and was developed by the Food and Nutrition Technical Assistance project on the basis of validation studies.[35] The CAGE questionnaire is a four-item alcohol-screening instrument, an acronym indicating cut down on drinking; annoyed by complaints about drinking; guilty about drinking; had an eye-opener first thing in the morning.[36]

The water contact questionnaire obtained information about the reasons for and frequency of each contact. This questionnaire was modified on the basis of previous studies conducted in the same area and took into consideration the population habits. The reasons (R) and frequency (F) of contact were scored on the basis of previous work to obtain the Water Contact Index (WCI), a numeric coefficient that reflects the level of water exposure.[37] The reason for contact was scored from 2 to 5 as follows: 2 = crossing the streams; 3 = collecting water for the household and dish-washing; 4 = laundering and watering agricultural fields; and 5 = bathing, swimming, and playing in the streams and fishing. The frequency of contact was scored as follows: 1 = < 2 contacts/month; 2 = ≥ 2 contacts/month; 4 = ≥ 1 contact/week; and 28 = ≥ 1 contact/day. The WCI was obtained by the sum of each reason score multiplied by the respective frequency score according to the equation $WCI = \Sigma (R \times F)$.

Fecal examinations for parasites. To evaluate the intensity of *S. mansoni* infection and the presence or absence of *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, and hookworm eggs, each person received one plastic container for fecal samples at two time points 2–30 days apart. Participants were instructed to deposit the stool sample and return the container immediately to the collection point, where the samples were stored at 4°C. Each stool sample had two slides prepared and tested by using the Kato-Katz method to estimate the number of *S. mansoni* eggs per gram of feces.[38]

Cell culture and laboratory investigations. Blood was collected by venipuncture. Serum was separated and stored at –20°C for evaluation of specific IgE and IgG4. The PBMCs were obtained for cell cultures and cytokine measurements.

The PBMCs were isolated from venous blood collected into heparin-treated tubes by Ficoll-Hypaque gradient sedimentation and adjusted to a concentration of 3×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium containing 10% normal human serum (AB positive and heat-inactivated), 100 U/mL of penicillin, 100 mg/mL of streptomycin, 2 mmol/L of L-glutamine, and 30 mmol/L of HEPES (all from Life Technologies GIBCO BRL, Gaithersburg, MS). We added 10 μg/mL of SWAP, SEA, Sm21.6, Sm22.6, PIII, IPSE, or phytohemagglutinin (PHA) to each well and incubated the plates at 37°C in an atmosphere containing 5% CO_2. Supernatants were removed after 72 hours of incubation and maintained at –20°C for measurement of cytokines by enzyme-linked immunosorbent assay. Levels of IFN-γ, IL-5, IL-13, IL-10, and IL-21 were determined by using Duoset (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), and results were expressed as picograms per milliliter on the basis of a standard curve.

Recombinant proteins Sm21.6, Sm22.6, and IPSE were produced in *Escherichia coli* and tested for lipopolysaccharide (LPS) by using a commercially available chromogenic LAL end-point assay kit (Cambrex, Charles City, IA). Levels of LPS in Sm21.6, Sm22.6, and IPSE were less than 1.2 endotoxin units/mg of protein. To neutralize potential effects of the LPS present in low levels on the *S. mansoni* recombinant antigens, polymyxin B was added to cell cultures every 12 hours according to an established protocol.[39]

IgG4 specific for SWAP, SEA, IPSE, and Sm22.6 was measured by using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay as described.[40,41] Briefly, microtiter plates (Immulon 2; Dynatech, Geneva, Switzerland) were coated overnight with the antigens at a concentration of 5 μg/mL for SEA, IPSE, and Sm22.6 and 10 μg/mL for SWAP in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. Plates were washed with phosphate-buffered-saline, 0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO) and non-specific attachment sites were blocked with phosphate-buffered saline, 0.1% Tween 20 and incubated at 37°C for 2 hours. Samples were diluted 1:4 and distributed into the wells of the plates. Biotin-conjugated anti-human IgG4 and streptavidin horseradish peroxidase (BD Bioscience, San Jose, CA) were used to amplify the signal. Specific antibody responses were expressed as the mean optical density (OD). Conditions for the specific IgE measurement were the same as those described for IgG4 except for the plates used (Maxisorb; Nunc, Roskilde, Denmark), the specific antibodies, and the sample dilution (1:32). Given that the IgE-specific response is not always detected in *S. mansoni*-infected patients, total IgG was removed by using rheumatoid factor absorbent (Behring Diagnostics Inc., Westwood, MA).[41,42]

Data analysis. Statistical analysis was performed by using the STATA statistical package version 10.0 (Stata Corp., College Station, TX). GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used to construct graphs. Continuous variables, such as WCI, age, and immunologic

variables, were expressed as median and interquartile range (IQR) of observed values. A random effects logistic regression model was used to test for association between *S. mansoni* infection and covariates. Linear regression was used to compare cytokine and antibody levels between groups. All analyses took into account the matched design. Given that the water exposure was not well-matched within groups, statistical analyses were adjusted for WCI. The alpha level for statistical significance was established as 0.05 for all analyses.

For the random effects model, the villages of Sempre Viva and Jenipapo were analyzed as only one region (region A), and Buri and Camarões were analyzed as Region B. This procedure was conducted because the grouped villages share geographic proximity and similar population habits.

The CAGE questionnaire was composed of four questions, each of which yielded an answer in the form of binary responses as yes or no. Each yes answer accounted for one point and each no answer accounted for no points. The CAGE score was the resulting total point and varied from 0 to 4. For this study, the CAGE score was grouped in two categories: 1) score 0 or 1, which has no clinical significance; and 2) score ≥ 2, which indicates alcoholism or problem drinking.[43,44]

RESULTS

Study compliance and baseline characteristics. A total of 431 persons were evaluated for resistance to *Schistosoma* infection. The strategy to identify possible resistant persons living in Conde-BA was used initially with 62 persons who were exposed to but negative for *Schistosoma* in 2004, of whom 29 (46.8%) were also *Schistosoma* negative in 2001; 33 (53.2%) had no parasitologic results in 2001. In the parasitologic survey that was performed for this specific study, we found that 27 (43.5%) of 62 persons were currently *Schistosoma* positive, and 35 (56.5%) were still negative for *S. mansoni* infection. The questionnaire was then administered to 30 of these putative resistant persons; 2 of them had moved from the area and 3 did not consent to participate. Of these 30 persons, 7 were no longer exposed to the infection and were not included in the study. Therefore, the estimated prevalence of putative resistant persons living in the area was 5.3% (23 of 431 screened persons; 95% confidence interval = 3.4–7.9%). Age and sex did not differ between included and excluded persons.

Approximately 50% of the resistant persons had at least one stool sample analyzed in 2001 or 2004. They had ≥ 6 stool samples analyzed since the first survey and most (65%) provided 5 or 6 stool samples in all parasitologic surveys. In 2004, 57% of resistant persons had an intermediate (1–3 hours/week) or high (1–3 hours/day) level of exposure to infested water. Only 2 (9%) of the resistant persons were not treated in 2004 during the schistosomiasis mass treatment.

TABLE 1
Baseline characteristics of study participants, Bahia, Brazil

Characteristics	Resistant (n = 23)	Infected (n = 23)
Age, median (IQR)	24 (26)	24 (24)
Male sex (%)	26.1	26.1
Water Contact Index, median (IQR)*	48 (61)	86 (188)
No. stool samples provided, median (IQR)*	5 (2)	3 (1)
Schistosoma mansoni parasite load (EGF), median (IQR)	0	48 (96)

*$P < 0.05$, by linear regression.
IQR = interquartile range; EGF = eggs per gram of feces.

The infected group was composed of 23 persons of similar ages and sex (Table 1). However, exposure to infection estimated by the WCI was slightly higher in the infected group than in the resistant group ($P = 0.025$). Despite this significant difference in the WCI, 12 of 23 pairs were well matched regarding the WCI, with a difference in WCI between matched pairs $\leq 15\%$. We also included a group of healthy persons who lived outside the schistosomiasis-endemic area. The median age of these persons (26.5 years) was similar to what was observed in the resistant and infected groups. The healthy control group had a higher proportion of men (60%).

Factors associated with *S. mansoni* infection. As shown in Table 2, none of the demographic or other covariates assessed by the questionnaire were statistically associated with infection status in this population. Although persons from region B (75%) appeared more likely to be infected than persons living in region A (41.2%), this association was not statistically significant by matched analysis. Moreover, all participants reported an average income $\leq$ \$250.00 per month, which could be explained by the fact that most of them were students or unemployed. Nine persons were fisherman, mostly (88.9%) from the infected group. However when we adjusted for WCI in the random effects model, we found that there was no statistically significant association between this occupation and infection status.

The prevalence of other helminth infections among persons in the resistant and infected groups is summarized in Table 3. The frequency of *A. lumbricoides* and/or *T. trichiura* infection was significantly lower in resistant persons (47.6% and 52.4%, respectively) than in infected persons (73.9%; $P = 0.047$ and 95.6%; $P = 0.008$, respectively). This trend was not observed for hookworm infection, which was slightly less frequent in the resistant group than in the infected group (28.6% and 43.5%, respectively). However, this small difference was not statistically significant. When the presence of any helminth infection (*A. lumbricoides*, *T. trichiura*, or hookworm) was tested for an association with *S. mansoni* infection, we found that the *Schistosoma*-resistant persons were less likely to have any other helminth infection than persons from the *Schistosoma*-infected group (66.7% and 95.6%, respectively; $P = 0.046$).

Cytokine profile and humoral immune response. Levels of IL-5, IL-13, IL-10, IL-21, and IFN-γ measured in supernatant of PBMCs cultures unstimulated or stimulated with SWAP, SEA, Sm21.6, Sm22.6, PIII, IPSE, or PHA are shown in Figure 2. Levels of IL-5 and IL-13 were similar in both resistant and infected groups when cells were stimulated with all tested antigens, except for SEA. After stimulation with SEA, cells of resistant subjects produced significantly higher levels of IL-5 and IL-13 (median = 1,342 [IQR = 1,832] and median = 94 [IQR = 132] pg/mL) than cells of infected persons (median = 266 [IQR = 556], $P = 0.007$; and median = 94 [IQR = 0] pg/mL, $P = 0.022$). We also demonstrated that the recombinant antigens Sm21.6, Sm22.6, and IPSE were unable to stimulate the production of IL-5 or IL-13 because their levels were similar to those found in unstimulated cultures in both groups tested.

After antigen stimulation, levels of IL-10 increased in cultures of cells of all tested persons independent of the specific antigen or infection status. However, when compared with

TABLE 2

Random-effects model adjusted by Water Contact Index for the association between *Schistosoma mansoni* infection and covariates, Bahia, Brazil

Characteristic	Resistant, no. (%) (n = 23)	Infected, no. (%) (n = 23)	OR (95% CI)	*P*
Place of residence				
Region A	20 (87.0)	14 (60.9)	1.00	
Region B	3 (13.0)	9 (39.1)	4.45 (0.42–47.53)	0.217
Sanitation at home				
None	5 (21.7)	10 (43.5)	1.00	
Outhouse	18 (78.3)	13 (56.5)	0.40 (0.11–1.50)	0.175
Frequency of piped water				
Not daily	2 (8.7)	7 (30.4)	1.00	
Daily	21 (91.3)	16 (69.6)	0.30 (0.05–2.00)	0.214
Water intake treatment				
None	9 (39.1)	10 (43.5)	1.00	
Any	14 (60.9)	13 (56.5)	0.96 (0.28–3.24)	0.946
Education				
None	2 (8.7)	4 (17.4)	1.00	
Some	21 (91.3)	19 (82.6)	0.63 (0.09–4.26)	0.635
No. of persons per room				
1	5 (21.7)	2 (8.7)	1.00	
2	13 (56.5)	13 (56.5)	2.45 (0.37–16.20)	0.354
3	3 (13.1)	5 (21.7)	4.30 (0.45–41.00)	0.205
≥ 4	2 (8.7)	3 (13.1)	4.06 (0.34–49.20)	0.271
Occupation				
Student/none	17 (73.9)	15 (65.2)	1.00	
Fisherman	1 (4.4)	8 (34.8)	6.91 (0.73–65.65)	0.092
Agriculture	3 (13.0)	0	–	0.998
All others	2 (8.7)	0	–	0.999
Drinks alcoholic beverages				
No	19 (86.4)	16 (69.6)	1.00	
Yes	3 (13.6)	7 (30.4)	2.86 (0.62–13.20)	0.178
CAGE score				
0 or 1	21 (95.4)	20 (87.0)	1.00	
≥ 2	1 (4.6)	3 (13.0)	3.28 (0.31–34.71)	0.323
Past smoker				
No	18 (81.8)	18 (78.3)	1.00	
Yes	4 (18.2)	5 (21.7)	0.98 (0.21–4.64)	0.982
Food insecurity*				
No	20 (90.9)	22 (95.6)	1.00	
Yes	2 (9.1)	1 (4.4)	0.55 (0.05–6.65)	0.638

*Question no. 9 of the Household Food Insecurity Access Scale (Did you or any household member go a whole day and night without eating anything because there was not enough food?).
OR = odds ratio; CI = confidence interval; CAGE = Cut down, annoyed, guilty, eye opener.

levels of IL-10 produced by cells of infected or resistant persons, we found that IL-10 was significantly higher in Sm21.6- or Sm22.6-stimulated culture of cells from resistant persons (median = 2,126 [IQR = 405] and median = 2,103 [IQR = 412] pg/mL) than in cells from infected persons (median = 1,514 [IQR = 875] pg/mL, $P = 0.002$, and median = 1,490 [IQR = 940] pg/mL, $P = 0.001$). Conversely, levels of IL-10 after stimulation with PIII were lower in the resistant group than in the infected group (median = 593 [IQR = 476] versus median = 886 [IQR = 488] pg/mL, $P = 0.017$). Another cytokine with regulatory properties that was tested (IL-21) was produced in low levels by cells of persons from the schistosomiasis-endemic area.

Levels of IFN-γ were similar in both resistant and infected groups when cells were stimulated with the different antigens, except for SEA. After stimulation with SEA, the concentration of IFN-γ was higher in cultures of cells from resistant

TABLE 3

Random-effects model adjusted by Water Contact Index for the association between *Schistosoma mansoni* infection and other helminth infections, Bahia, Brazil

Organism	Resistant,* no. (%) (n = 21)	Infected, no. (%) (n = 23)	OR (95% CI)	*P*
Ascaris lumbricoides				
Negative	11 (52.4)	6 (26.1)	1.00	
Positive	10 (47.6)	17 (73.9)	4.03 (1.02–15.99)	0.047
Trichuris trichiura				
Negative	10 (47.6)	1 (4.4)	1.00	
Positive	11 (52.4)	22 (95.6)	19.95 (2.16–184.46)	0.008
Hookworm				
Negative	15 (71.4)	13 (56.5)	1.00	
Positive	6 (28.6)	10 (43.5)	1.96 (0.55–7.08)	0.302
Any helminth				
Negative	7 (33.3)	1 (4.4)	1.00	
Positive	14 (66.7)	22 (95.6)	9.57 (1.04–87.85)	0.046

*Data were not available for two resistant persons.
OR = odds ratio; CI = confidence interval.

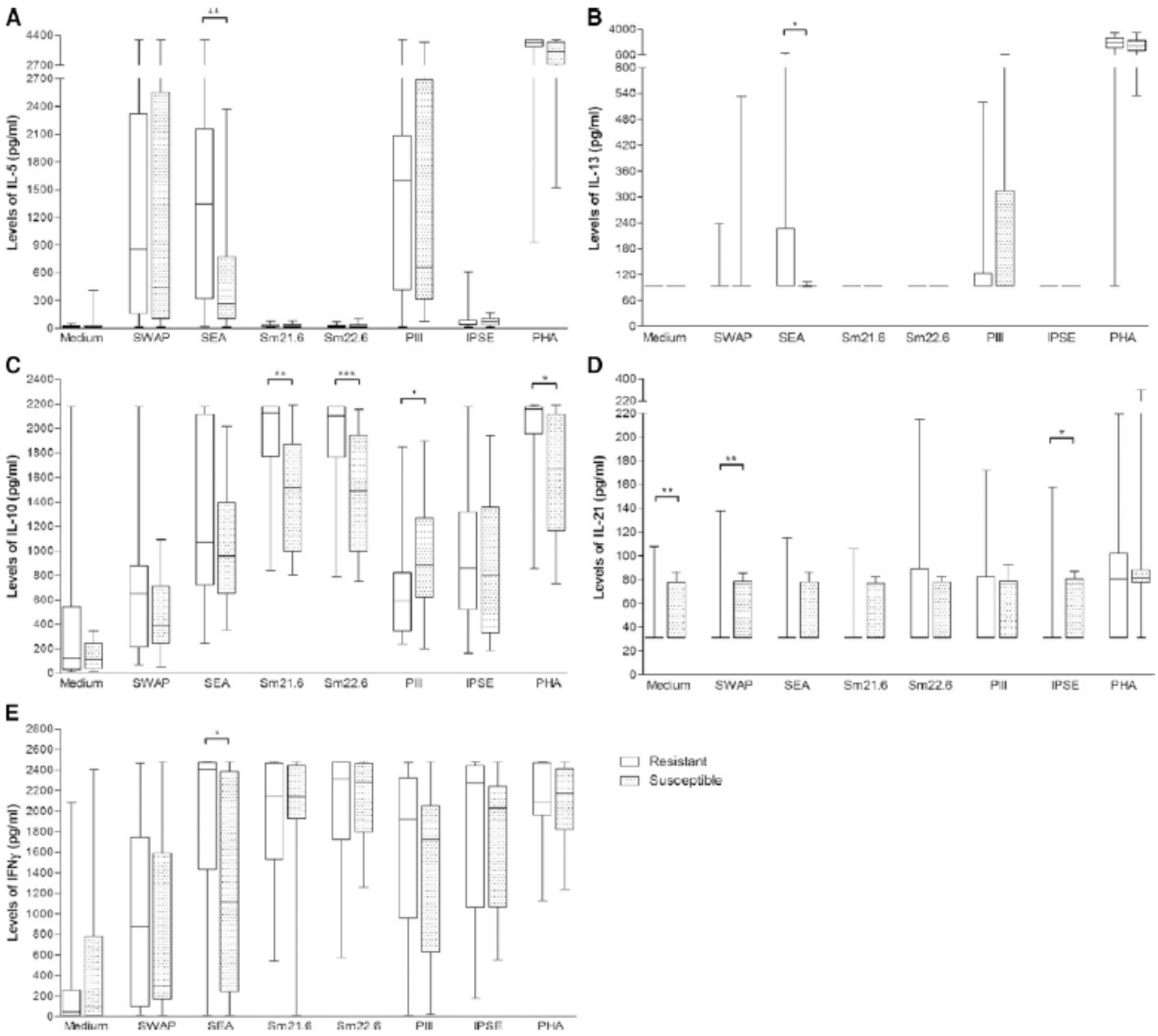


FIGURE 2. Levels of **A**, interleukin-5 (IL-5); **B**, IL-13; **C**, IL-10; **D**, IL-21; and **E**, interferon-γ (IFN-γ) produced by peripheral blood mononuclear cells of schisosomiasis-resistant and -infected persons, Bahia, Brazil. Minimum and maximum values, and 25th, 50th, and 75th percentiles are indicated by horizontal lines. Statistical difference in levels of cytokines between infected and resistant persons are indicated by asterisks (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, and ***$P < 0.001$).

persons (median = 2,407 [IQR = 715] pg/mL) than in cells from infected persons (median = 1,117 [IQR = 2,128] pg/mL, $P = 0.034$).

Regarding the cytokine response in the health control group, we found that levels of IFN-γ, IL-5, IL-13, and IL-21 were below the detection limits and were detected in response to PHA (median = 1,461 [IQR = 1,135], 3,274 [814], 978 [1,749], and 31 [50] pg/mL, respectively). However, IL-10 was produced in response to *S. mansoni* antigens Sm21.6, Sm22.6, IPSE and to PHA (median = 1,140 [IQR = 485], 1,481 [849], 1,193 [835], and 1,792 [455] pg/mL, respectively).

Levels of specific IgE and IgG4 against SWAP, Sm22.6, SEA and IPSE are shown in Figure 3. IgE against SWAP and IPSE were lower in the resistant group (median OD units = 0.64 [IQR = 0.25] and median OD units = 1.33 [IQR = 1.36]) than in the infected group (median OD units = 0.99 [IQR = 0.50], $P = 0.013$; and median OD units = 1.82 [IQR = 0.66], $P = 0.048$). Conversely, there was no significant difference in the levels of IgE against Sm22.6 and SEA between groups. As expected, levels of specific IgE in both groups were higher than the median levels of healthy persons, except for IgE against Sm22.6, in which approximately half of the persons from the schistosomiasis-endemic area had lower or similar levels compared with healthy persons.

Regarding specific IgG4 levels, we demonstrated that infected persons had higher levels of IgG4 against SWAP (median 3.17 OD units [IQR = 2.11]), Sm22.6 (median = 0.06 OD units [IQR = 0.13]), and SEA (median = 3.09 OD units [IQR = 0.53]) than resistant persons (median = 0.89 OD units [IQR = 2.10], $P = 0.013$; median = 0.04 OD units [IQR = 0.11],

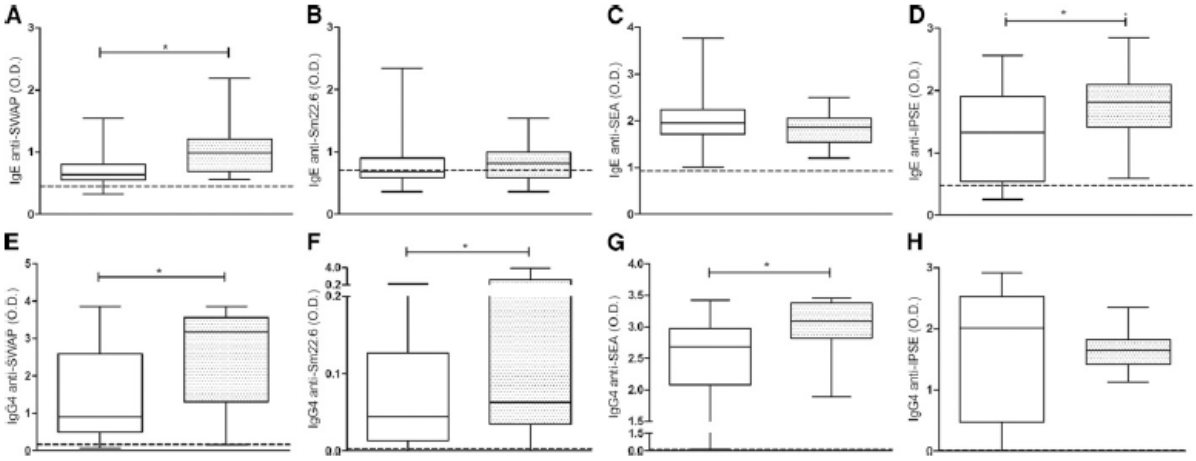


FIGURE 3. Levels of specific IgE (**A–D**) and IgG4 (**E–H**) in the study groups, Bahia, Brazil. Minimum and maximum values, and 25th, 50th, and 75th percentiles are indicated by horizontal lines. Discontinuous horizontal lines indicate median antibody levels of healthy persons. O.D. = optical density. Statistical differences between resistant (□) and infected (■) persons are highlighted by asterisks (*$P < 0.05$).

$P = 0.047$; and median = 2.68 OD units [IQR = 0.90], $P = 0.044$), and levels of IgG4 against IPSE were similar in both groups.

DISCUSSION

The present study describes factors associated with resistance to *S. mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. None of the environmental aspects evaluated, such as place of residence, sanitation at home, occupation, income, and education, was associated with resistance to infection. However, we observed a significantly higher Th1 and Th2 immune response when PBMCs of resistant persons were stimulated with *S. mansoni* antigens such as SEA. Unexpectedly, we found that IgE against SWAP and IPSE was lower in the resistant group than in the infected group. Conversely, levels of IgG4 against SWAP, Sm22.6, and SEA were higher in susceptible persons.

The risk of acquiring schistosomiasis has been directly associated with exposure to infested water, and direct observation and survey administration are the most efficient methods for estimating the level of exposure.[45] The WCI was obtained for all participants in this study by an interviewer-administered questionnaire, which was modified on the basis of observation of the main activities of the population in previous studies.[32,33] Although in the study design resistant persons were matched to infected persons by age, sex, and WCI, it was not always possible to match closely by WCI. However, ≥ 12 pairs of persons were well matched and showed a WCI difference ≤ 15%, which was reflected in similar WCI ranges observed in both groups. Furthermore, to reduce the potential effect of confounding by differences in exposure to water, all analyses performed were adjusted for WCI.

Our results showed no association between infection and housing parameters, such as number of persons per room or sanitation, in contrast to what has been reported by other authors.[46–49] Differences in study design may explain these discrepant findings because in this study we selected persons who were persistently negative for schistosomiasis over time and compared them with matched infected controls. Most other studies have considered resistant persons to be those who had negative parasite examination results in a small number of surveys over a short period of follow-up.

We found no association between resistance to infection and education status or income. This finding is consistent with other studies that have demonstrated that income was not an independent factor associated with infection, which suggests that improving income alone may not reduce the rate of infection.[50,51] Other studies have shown an inverse correlation between education or income with presence of infection,[46,47,49,52] but our ability to detect such an association was limited because levels of education and income were relatively homogeneous in our overall population.

Consistent with our data, studies of host genetics have demonstrated a low contribution from environmental factors to the variance of parasite burden.[53] Moreover, ≤ 66% of the variation in *S. mansoni* worm burden is caused by a few host genes.[54] Therefore, our findings of stronger associations between resistance to infection and the immune response against *Schistosoma* antigens rather than environmental factors are not unexpected.

Interestingly, the *S. mansoni*-infected group had a higher prevalence of other helminth infections, which could not be explained by their behavior or socioeconomic status. These results are consistent with what was found in another study,[51] which suggested that resistance to *Schistosoma* infection could be conferring cross-resistance against other helminth infections, or that there is a genetic factor associated with resistance to helminth infections in general. However, we cannot rule out that the lack of association between epidemiologic data and resistance to *Schistosoma* infection could be caused by the small number of resistant persons found in the schistosomiasis-endemic area or by geographic factors.

Others factors related to resistance to reinfection in schistosomiasis-endemic areas are age and prior treatment for schistosomiasis. It is hypothesized that drug-dependent killing of worms *in situ* might induce protective immunity against reinfection by immunizing with newly exposed tegument antigens released from dying worms.[55,56] The mean life span of

S. mansoni worms is estimated to be 6–10 years.[57] Thus, exposure to antigens from naturally dying worms in untreated populations could explain the age-dependent resistance to reinfection. Age was unlikely to be a confounder in this study because the age of the resistant persons ranged from 10 to 60 years, and infected persons were matched by age. Some of the tegument antigens that are released during parasite death, such as Sm21.6 and Sm22.6, were tested in this study for a correlation with resistance to infection. Additionally, SEA and IPSE that are obtained from the *Schistosoma* eggs were also tested.

The PBMCs of resistant persons produced higher levels of IL-5, IL-13, and IFN-γ after stimulation with SEA than those of infected persons, as has been found in naturally resistant persons.[27,28] Although the resistant persons studied had no prior history of schistosomiasis and were negative by multiple screenings, 21 of 23 persons previously received schistosomiasis treatment. This treatment was given in a mass schistosomiasis treatment program conducted because of the high prevalence of infection detected in our previous surveys. Thus, it is plausible that some of these *Schistosoma*-negative persons had a low intensity infection by the time they were treated with praziquantel. Another possible explanation of this intense immune response detected in the resistant persons compared with infected persons would be the absence of immune suppression that is commonly observed in patients chronically infected with helminths.[33,58] However, it seems not to be the case in this study because cells from resistant persons were able to produce similar or higher levels of the regulatory cytokine IL-10 than cells from infected individuals.

A positive correlation has been described between resistance to reinfection and a high IgE:IgG4 ratio, suggesting that resistant persons have higher levels of IgE and lower levels of IgG4 than infected persons.[18–20,41,59] Although levels of specific IgE have been correlated with resistance to infection in putatively resistant persons,[29] in the present study, levels of IgG4 were more likely to be correlated with susceptibility to infection than IgE with resistance to infection, given that levels of specific IgG4 were higher in the infected group and levels of specific IgE were similar or lower in the resistant group. Because this was not a prospective study, we cannot rule out the possibility of IgG4 levels were higher in infected persons exclusively because of their infection status, as suggested in epidemiologic studies.[20,23] However, it is reasonable to believe that the presence of specific IgG4 might block a protective role of IgE in infected persons, which causes them to be more susceptible to infection than persons with lower levels of IgG4.

Overall, our data suggest that resistance to *Schistosoma* infection in the studied area is associated with a mixture of Th1 and Th2 cytokine responses and low levels of IgG4 against *S. mansoni* tegument and egg antigens. This finding is consistent with available data, which gives support to the idea that the antigens tested for a schistosomiasis vaccine should be able to induce Th1 and Th2 responses and some level of regulatory molecules to reduce morbidity.

Received April 6, 2011. Accepted for publication November 1, 2011.

Acknowledgments: We thank the persons from schistosomiasis-endemic areas in Conde (Buri, Camarao, Jenipapo and Sempre Viva) for participating in the study; the health agents (Adaliudes Conceição, Luciana Quintela, Ivanice Santos, and Analú Lima) for collaborating in the field work; and Dr. Audrey V. Grant, Dr. Mary E. Charlson, and Dr. Carol A. Mancuso for support.

Financial support: This study was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) Universal (482064/2010-2). Ricardo R. Oliveira and Marshall J. Glesby were supported in part by the Fogarty/Ellison International Clinical Research Scholars Program and National Institutes of Health/National Institutes of Allergy and Infectious Diseases grant K24AI078884, respectively. Kathleen C. Barnes was supported in part by the Mary Beryl Patch Turnbull Scholar Program. Maria Ilma Araújo and Edgar M. Carvalho are investigators supported by CNPq.

Disclaimer: The contents of this publication are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

Authors' addresses: Ricardo R. Oliveira, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT/CNPq), Salvador, Bahia, Brazil, E-mail: ricardoriccio@gmail.com. Joanemile P. Figueiredo, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, E-mail: milepf@yahoo.com.br. Luciana S. Cardoso, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT/CNPq), Salvador, Bahia, Brazil, E-mail: luciana.imuno@gmail.com. Rafael L. Jabar and Robson P. Souza, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, E-mails: rafajabar@hotmail.com and robson.imuno@gmail.com. Martin T. Wells, Department of Biological Statistics and Computational Biology, Cornell University, Ithaca, NY, E-mail: martin.t.wells@gmail.com. Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT/CNPq), Salvador, Bahia, Brazil, E-mail: edgar@ufba.br. Daniel W. Fitzgerald, Center for Global Health, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY, E-mail: dfitzgerald@gheskio.org. Kathleen C. Barnes, Division of Allergy and Clinical Immunology, Department of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, E-mail: kbarnes5@jhmi.edu. Maria Ilma Araújo, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT/CNPq), Salvador, Bahia, Brazil, E-mail: mia@ufba.br. Marshall J. Glesby, Center for Global Health, Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY, E-mail: mag2005@med.cornell.ed.

REFERENCES

1. WHO/TDR, 2002. *Strategic Direction for Research: Schistosomiasis.* Geneva: World Health Organization.
2. de Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhaes A, de Jesus AA, de Almeida RP, Rego MA, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM, 2002. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis *mansoni. J Infect Dis 185:* 98–105.
3. Gazzinelli G, Colley DG, 1992. Human immune responses during schistosomiasis *mansoni. Rev Soc Bras Med Trop 25:* 125–134.
4. Williams ME, Montenegro S, Domingues AL, Wynn TA, Teixeira K, Mahanty S, Coutinho A, Sher A, 1994. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. *J Infect Dis 170:* 946–954.
5. Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF Jr, 1997. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol 15:* 505–533.
6. Sturrock RF, 2001. Schistosomiasis epidemiology and control: how did we get here and where should we go? *Mem Inst Oswaldo Cruz 96 (Suppl):* 17–27.

7. Bergquist R, Utzinger J, McManus DP, 2008. Trick or treat: the role of vaccines in integrated schistosomiasis control. *PLoS Negl Trop Dis 2:* e244.
8. McManus DP, Loukas A, 2008. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev 21:* 225–242.
9. Cardoso FC, Macedo GC, Gava E, Kitten GT, Mati VL, de Melo AL, Caliari MV, Almeida GT, Venancio TM, Verjovski-Almeida S, Oliveira SC, 2008. *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. *PLoS Negl Trop Dis 2:* e308.
10. Lopes DO, Paiva LF, Martins MA, Cardoso FC, Rajao MA, Pinho JM, Caliari MV, Correa-Oliveira R, Mello SM, Leite LC, Oliveira SC, 2009. Sm21.6 a novel EF-hand family protein member located on the surface of *Schistosoma mansoni* adult worm that failed to induce protection against challenge infection but reduced liver pathology. *Vaccine 27:* 4127–4135.
11. Tendler M, Brito CA, Vilar MM, Serra-Freire N, Diogo CM, Almeida MS, Delbem AC, Da Silva JF, Savino W, Garratt RC, Katz N, Simpson AS, 1996. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA 93:* 269–273.
12. Pacheco LG, Zucconi E, Mati VL, Garcia RM, Miyoshi A, Oliveira SC, de Melo AL, Azevedo V, 2005. Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. *Acta Trop 95:* 132–142.
13. Pacifico LG, Fonseca CT, Chiari L, Oliveira SC, 2006. Immunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 kDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine. *Immunobiology 211:* 97–104.
14. Hirsch C, Zouain CS, Alves JB, Goes AM, 1997. Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm. *Parasitology 115:* 21–28.
15. Fahel JS, Macedo GC, Pinheiro CS, Caliari MV, Oliveira SC, 2010. IPSE/alpha-1 of *Schistosoma mansoni* egg induces enlargement of granuloma but does not alter Th2 balance after infection. *Parasite Immunol 32:* 345–353.
16. Schramm G, Mohrs K, Wodrich M, Doenhoff MJ, Pearce EJ, Haas H, Mohrs M, 2007. Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils *in vivo*. *J Immunol 178:* 6023–6027.
17. Schramm G, Falcone FH, Gronow A, Haisch K, Mamat U, Doenhoff MJ, Oliveira G, Galle J, Dahinden CA, Haas H, 2003. Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *J Biol Chem 278:* 18384–18392.
18. Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJ, Kariuki HC, Langley JG, Ouma JH, Capron A, Pierce RJ, Sturrock RF, 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol 22:* 1483–1494.
19. Rihet P, Demeure CE, Bourgois A, Prata A, Dessein AJ, 1991. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur J Immunol 21:* 2679–2686.
20. Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJ, Wilkins HA, 1991. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature 349:* 243–245.
21. Roberts M, Butterworth AE, Kimani G, Kamau T, Fulford AJ, Dunne DW, Ouma JH, Sturrock RF, 1993. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infect Immun 61:* 4984–4993.
22. Iskander R, Das PK, Aalberse RC, 1981. IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. *Int Arch Allergy Appl Immunol 66:* 200–207.
23. Grogan JL, Kremsner PG, van Dam GJ, Metzger W, Mordmuller B, Deelder AM, Yazdanbakhsh M, 1996. Antischistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults. *J Infect Dis 173:* 1242–1247.
24. Caldas IR, Correa-Oliveira R, Colosimo E, Carvalho OS, Massara CL, Colley DG, Gazzinelli G, 2000. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *Am J Trop Med Hyg 62:* 57–64.
25. Wilkins HA, Blumenthal UJ, Hagan P, Hayes RJ, Tulloch S, 1987. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg 81:* 29–35.
26. Barbour AD, 1985. The importance of age and water contact patterns in relation to *Schistosoma haematobium* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg 79:* 151–153.
27. Correa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC, Golgher DB, Katz N, Bahia LG, Carvalho OS, Gazzinelli G, Sher A, 1989. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg 83:* 798–804.
28. Viana IR, Sher A, Carvalho OS, Massara CL, Eloi-Santos SM, Pearce EJ, Colley DG, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R, 1994. Interferon-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg 88:* 466–470.
29. Viana IR, Correa-Oliveira R, Carvalho Odos S, Massara CL, Colosimo E, Colley DG, Gazzinelli G, 1995. Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. *Parasite Immunol 17:* 297–304.
30. Bahia-Oliveira LM, Gazzinelli G, Eloi-Santos SM, Cunha-Melo JR, Alves-Oliveira LF, Silveira AM, Viana IR, Carmo J, Souza A, Correa-Oliveira R, 1992. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of *Schistosoma mansoni*. *Trans R Soc Trop Med Hyg 86:* 57–61.
31. Brito CF, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R, Oliveira SC, 2000. CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. *Scand J Immunol 51:* 595–601.
32. Grant AV, Araujo MI, Ponte EV, Oliveira RR, Cruz AA, Barnes KC, Beaty TH, 2008. High heritability but uncertain mode of inheritance for total serum IgE level and *Schistosoma mansoni* infection intensity in a schistosomiasis-endemic Brazilian population. *J Infect Dis 198:* 1227–1236.
33. Araujo MI, Hoppe B, Medeiros M Jr, Alcantara L, Almeida MC, Schriefer A, Oliveira RR, Kruschewsky R, Figueiredo JP, Cruz AA, Carvalho EM, 2004. Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. *J Infect Dis 190:* 1797–1803.
34. World Health Organization, 2002. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *World Health Organ Tech Rep Ser 912:* 1–57.
35. Swindale A, Bilinsky P, 2006. Development of a universally applicable household food insecurity measurement tool: process, current status, and outstanding issues. *J Nutr 136:* 1449S–1452S.
36. Ewing JA, 1984. Detecting alcoholism. The CAGE questionnaire. *JAMA 252:* 1905–1907.
37. Lima e Costa MF, Magalhaes MH, Rocha RS, Antunes CM, Katz N, 1987. Water-contact patterns and socioeconomic variables in the epidemiology of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *Bull World Health Organ 65:* 57–66.
38. Katz N, Coelho PM, Pellegrino J, 1970. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. *J Parasitol 56:* 1032–1033.
39. Cardoso LS, Araujo MI, Goes AM, Pacifico LG, Oliveira RR, Oliveira SC, 2007. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. *Microb Cell Fact 6:* 1.
40. Naus CW, Kimani G, Ouma JH, Fulford AJ, Webster M, van Dam GJ, Deelder AM, Butterworth AE, Dunne DW, 1999. Development of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* in an immunologically naive immigrant population: influence of infection duration, infection intensity, and host age. *Infect Immun 67:* 3444–3451.
41. Ribeiro de Jesus A, Araujo I, Bacellar O, Magalhaes A, Pearce E, Harn D, Strand M, Carvalho EM, 2000. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Infect Immun 68:* 2797–2803.

42. Souza-Atta ML, Araujo MI, D'Oliveira Junior A, Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Atta AM, Carvalho EM, 1999. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. *Braz J Med Biol Res 32:* 1101–1105.
43. Mayfield D, McLeod G, Hall P, 1974. The CAGE questionnaire: validation of a new alcoholism screening instrument. *Am J Psychiatry 131:* 1121–1123.
44. King M, 1986. At risk drinking among general practice attenders: validation of the CAGE questionnaire. *Psychol Med 16:* 213–217.
45. Gazzinelli A, Bethony J, Fraga LA, LoVerde PT, Correa-Oliveira R, Kloos H, 2001. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil. I: water contact. *Trop Med Int Health 6:* 126–135.
46. Pereira WR, Kloos H, Crawford SB, Velasquez-Melendez JG, Matoso LF, Fujiwara RT, Cancado GG, Loverde PT, Correa-Oliveira R, Gazzinelli A, 2010. *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil: analysis of exposure risk. *Acta Trop 113:* 34–41.
47. Gazzinelli A, Velasquez-Melendez G, Crawford SB, LoVerde PT, Correa-Oliveira R, Kloos H, 2006. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in a poor rural area in Brazil. *Acta Trop 99:* 260–271.
48. Lima e Costa MF, Rocha RS, Leite ML, Carneiro RG, Colley D, Gazzinelli G, Katz N, 1991. A multivariate analysis of sociodemographic factors, water contact patterns and *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo 33:* 58–63.
49. Ximenes R, Southgate B, Smith PG, Guimaraes Neto L, 2003. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in an urban area in the northeast of Brazil. *Rev Panam Salud Publica 14:* 409–421.
50. Kapito-Tembo AP, Mwapasa V, Meshnick SR, Samanyika Y, Banda D, Bowie C, Radke S, 2009. Prevalence distribution and risk factors for *Schistosoma hematobium* infection among school children in Blantyre, Malawi. *P LoS Negl Trop Dis 3:* e361.
51. de Cassia Ribeiro Silva R, Barreto ML, Assis AM, de Santana ML, Parraga IM, Reis MG, Blanton RE, 2007. The relative influence of polyparasitism, environment, and host factors on schistosome infection. *Am J Trop Med Hyg 77:* 672–675.
52. Matthys B, Tschannen AB, Tian-Bi NT, Comoe H, Diabate S, Traore M, Vounatsou P, Raso G, Gosoniu L, Tanner M, Cisse G, N'Goran EK, Utzinger J, 2007. Risk factors for *Schistosoma mansoni* and hookworm in urban farming communities in western Côte d'Ivoire. *Trop Med Int Health 12:* 709–723.
53. Quinnell RJ, 2003. Genetics of susceptibility to human helminth infection. *Int J Parasitol 33:* 1219–1231.
54. Abel L, Demenais F, Prata A, Souza AE, Dessein A, 1991. Evidence for the segregation of a major gene in human susceptibility/resistance to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am J Hum Genet 48:* 959–970.
55. Woolhouse ME, Hagan P, 1999. Seeking the ghost of worms past. *Nat Med 5:* 1225–1227.
56. Karanja DM, Hightower AW, Colley DG, Mwinzi PN, Galil K, Andove J, Secor WE, 2002. Resistance to reinfection with *Schistosoma mansoni* in occupationally exposed adults and effect of HIV-1 co-infection on susceptibility to schistosomiasis: a longitudinal study. *Lancet 360:* 592–596.
57. Fulford AJ, Butterworth AE, Ouma JH, Sturrock RF, 1995. A statistical approach to schistosome population dynamics and estimation of the life-span of *Schistosoma mansoni* in man. *Parasitology 110:* 307–316.
58. Doetze A, Satoguina J, Burchard G, Rau T, Loliger C, Fleischer B, Hoerauf A, 2000. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int Immunol 12:* 623–630.
59. Demeure CE, Rihet P, Abel L, Ouattara M, Bourgois A, Dessein AJ, 1993. Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. *J Infect Dis 168:* 1000–1008.