

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

**Associação negativa entre atopia e toxoplasmose em seres
humanos**

Jorge Fernando Carísio Fernandes

Uberlândia

Fevereiro - 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e

Parasitologia Aplicadas

**Associação negativa entre atopia e toxoplasmose em seres
humanos**

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre

Jorge Fernando Carísio Fernandes

Orientador: Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi

Co-orientadora: Profa. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva

Uberlândia

Fevereiro - 2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F363a Fernandes, Jorge Fernando Carísio, 1985-
Associação negativa entre atopia e toxoplasmose em seres humanos

/ Jorge Fernando Carísio Fernandes. - 2009.

61 f. : il.

Orientador: Ernesto Akio Taketomi.

Co-orientador: Deise Aparecida de Oliveira Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Toxoplasmose - Teses. 2. Alergia - Teses. I. Taketomi, Ernesto Akio. II. Silva, Deise Aparecida de Oliveira. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 616.993.1

*Aos meus pais e irmãos que dividem comigo essa aventura
fantástica que é a vida.*

“It’s a magical world, Hobbes, ol’ buddy... Let’s go exploring!”

Calvin, em *“Calvin and Hoobes’ Magical World”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais essa vida.

Aos meus pais, Jorge e Maysa, e irmãos, Leandro e Murilo, por todo amor, compreensão, respeito e incentivo.

Aos meus avós, Esoly e Suelly, João e Beth, pelo carinho.

À Renata, pelo amor a mim dedicado e compreensão nos momentos de ausência.

Ao Professor Dr. Ernesto Akio Taketomi pelos ensinamentos e confiança em mim depositada.

À Professora Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, pela dedicação e carinho que tem demonstrado durante a minha formação acadêmica, tornando-se para todos nós uma verdadeira “mãe científica”.

Aos Professores Dr. Nelson Figueiredo Mendes e Dra. Maria Aparecida de Souza por abdicarem de seu tempo para auxiliarem na concretização desse trabalho.

Ao grande amigo Diego Miranda, pela solicitude e pela enorme ajuda concedida durante todas as etapas deste estudo.

Aos demais amigos da alergia, Leandro, Rafael, Ronaldo, Priscila, Karine, Cristiane, Renato, Juliana, Lucas, Ana Carolina, Isabella, Laura, Julliane, Carolina, Bôscollí, Carlos, Daniela, Danielle, e aos amigos do laboratório de Imunoparasitologia,

Dâmaso, Hércílio, Ana Cláudia, Gabriele, Cristina, Celene, Pablo, Mariana, Marina, Julliane,..., pelos momentos de alegria e aprendizado.

Aos funcionários do laboratório de Imunologia, Marley, Max e Zilda pelo auxílio nos momentos necessários.

Às secretárias do Programa de Pós-graduação: Lucileide Freitas Queiroz e Lucélia dos Santos Assis pela presteza e atenção.

A todos os pacientes que colaboraram para a execução deste trabalho.

E a todos aqueles que porventura não mencionei e contribuíram direta ou indiretamente para a execução ou elaboração deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ABTS	<i>2,2'-azinobis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid</i> (Ácido 2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico])
BSA	Soroalbumina bovina
CD	Marcador do tipo <i>Cluster of Differentiation</i> (Diferenciação de grupo)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
D.O.	Densidade óptica
Dp	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DP	Desvio Padrão
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
et al.	E colaboradores
FcεRI	Receptor 1 de IgE de alta afinidade
g	Grama
G	Força relativa da gravidade
HC-UFU	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
Hz	Hertz
IE	Índice ELISA
IFN-γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IL	Interleucina
M	Molar
mg	Miligrama
MG	Estado de Minas Gerais
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo Principal de Histocompatibilidade)
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
n	Número de indivíduos
n°	Número
N	Normal
NK	Células Natural Killer
nm	Nanômetro
OPD	Ortofenilenodiamina
PBS	Solução salina tamponada com fosfatos
PBS-T	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20
PBS-T-BSA	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e BSA
PBS-T-M	Solução salina tamponada com fosfatos adicionada de Tween 20 e 5% de leite em pó

	desnatado
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl</i> (Fenilmetilsulfonil)
SP	Estado de São Paulo
TCP	Teste cutâneo de puntura
TGF	Fator transformante de crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
Tg	<i>Toxoplasma gondii</i>
TG+	Grupo soropositivo a <i>Toxoplasma gondii</i>
TG+AT	Grupo soropositivo a <i>Toxoplasma gondii</i> e atópico
TG+NA	Grupo soropositivo a <i>Toxoplasma gondii</i> e não-atópico
TG-AT	Grupo soronegativo a <i>Toxoplasma gondii</i> e atópico
TG-NA	Grupo soronegativo a <i>Toxoplasma gondii</i> e não-atópico
TG-	Grupo soronegativo a <i>Toxoplasma gondii</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UI	Unidades Internacionais

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Atopia e alergia	12
1.2 Fisiopatologia da resposta imune alérgica	12
1.3 Ácaros e alérgenos da poeira domiciliar	14
1.4 Toxoplasmose e <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.5 Associação entre atopia e marcadores de infecção	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Geral	21
2.2 Específicos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Aspectos éticos	22
3.2 Pacientes	22
3.3 Teste cutâneo de puntura (TCP)	23
3.4 Amostras de sangue	23
3.5 Extratos alergênicos de ácaros	23
3.6 Manutenção e obtenção de <i>T. gondii</i>	24
3.7 Obtenção do antígeno solúvel de <i>T. gondii</i>	24
3.8 Testes sorológicos	25
3.8.1 ELISA para detecção de anticorpos IgE específicos a alérgenos de ácaros	25
3.8.2 ELISA para detecção de IgE sérica total	26
3.8.3 ELISA para detecção de anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i>	26
3.9 Avaliação da resposta imune celular	27
3.9.1 Resposta proliferativa	27
3.9.2 Análise de citocinas	28
3.10 Análise estatística	29
3.11 Normas de biossegurança	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Características dos pacientes	30
4.2 IgE contra alérgenos de ácaros em pacientes soropositivos e soronegativos a <i>T. gondii</i>	30
4.3 IgG anti- <i>T. gondii</i> em pacientes atópicos e não-atópicos	33
4.4 IgE sérica total em pacientes soropositivos e soronegativos a <i>T. gondii</i>	33
4.5 Associação entre atopia e infecção por <i>T. gondii</i>	34
4.6 Resposta proliferativa	35
4.7 Perfil de citocinas	36

5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO 1	57
ANEXO 2	58
ANEXO 3	59
ANEXO 4	61

RESUMO

Segundo a hipótese da higiene, a menor exposição a infecções está associada com o aumento na prevalência de doenças alérgicas. O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre atopia e infecção por *Toxoplasma gondii* (Tg) em seres humanos pela análise da resposta imune humoral e celular em pacientes atópicos e não-atópicos, soropositivos e soronegativos a *T. gondii*. Um total de 275 indivíduos foram avaliados e distribuídos em grupos de atópicos (n=129) e não-atópicos (n=146) com base nos marcadores de alergia (positividade em teste cutâneo de punção a alérgenos de ácaros e ELISA para IgE específica) ou em grupos soropositivos (n=116) e soronegativos (n=159) a *T. gondii* de acordo com marcadores sorológicos da infecção (positividade em ELISA para IgG anti-*T. gondii*). Indivíduos Tg-soropositivos apresentaram menor sensibilização alérgica (37%) aos ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e *Dermatophagoides farinae* (Df) em relação aos indivíduos Tg-soronegativos (54%). A razão de chances (*odds ratio*, OR) de pertencer a um grupo atópico com sorologia positiva para *T. gondii* foi 0,50 (95% IC: 0,31-0,81; $p < 0,05$) enquanto a associação de sorologia negativa para *T. gondii* e atopia resultou em OR=2,0 (95% IC: 1,23-3,26; $p < 0,05$). A resposta imune celular avaliada por respostas proliferativas e produção de citocinas após estimulação antigênica ou alérgica específicas demonstrou que a síntese de citocinas do perfil Th1 como IFN- γ predominou nos grupos de pacientes Tg-soropositivos, independente de serem atópicos ou não-atópicos. Em contraste, as citocinas do perfil Th2 como IL-5 prevaleceram nos grupos de atópicos comparado aos não-atópicos, independente da soropositividade a *T. gondii*. A resposta de citocinas reguladoras como IL-10 foi evidenciada em todos os grupos, marcadamente após estimulação com o alérgeno Df. Em conclusão, a associação negativa entre atopia e infecção por *T. gondii* foi evidenciada, indicando que a presença da infecção pelo parasito pode influenciar negativamente mais na indução da sensibilização alérgica do que no desencadeamento de respostas alérgicas, reforçando o papel protetor desta infecção, entre outras, no desenvolvimento de doenças alérgicas.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, doenças alérgicas, ácaros da poeira domiciliar, hipótese da higiene, anticorpos IgE, citocinas.

ABSTRACT

According to hygiene hypothesis, a lower exposure to infection is associated with the increase in allergic disease prevalence. This study aimed to investigate the association between atopy and *Toxoplasma gondii* (Tg) infection by analyzing the humoral and cellular immune responses in Tg-seropositive and -seronegative, atopic and non-atopic patients. A total of 275 individuals were assessed and divided into atopics (n=129) and non-atopics (n=146) based on markers of allergy (positive skin prick test and ELISA-IgE to mite allergens) or Tg-seropositive (n=116) and Tg-seronegative (n=159) groups according to infection serological markers (positive ELISA-IgG to *T. gondii*). Tg-seropositive individuals presented lower allergenic sensitization (37%) to *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) and *Dermatophagoides farinae* (Df) mite than Tg-seronegative subjects (54%). The odds ratio (OR) of belonging to an atopic group with positive serology to *T. gondii* was 0.50 (95% CI: 0.31-0.81; $p<0.05$) while the association between atopy and negative serology to *T. gondii* resulted in OR of 2.0 (95% CI, 1.23-3.26; $p<0.05$). Cellular immune response evaluated by proliferative responses and cytokine production after antigenic or allergenic stimulation showed predominant synthesis of Th1-cytokines as IFN- γ in Tg-seropositive patients, whether atopics or non-atopics. Conversely, Th2-cytokines as IL-5 prevailed in atopics compared to non-atopics, regardless the seropositivity to *T. gondii*. Response of regulatory cytokines, such as IL-10, was evidenced in all groups, markedly after stimulation with the Df allergen. Hence, the negative association between atopy and *T. gondii* infection was evidenced, indicating that the presence of parasite infection can influence negatively in the induction of allergenic sensitization rather than the manifestation of allergic symptoms, reinforcing the protective role of this infection in the development of allergic diseases.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, allergic diseases, house dust mites, hygiene hypothesis, IgE antibodies, cytokines.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Atopia e alergia

O termo atopia refere-se à tendência pessoal ou familiar de produzir anticorpos IgE em resposta às baixas doses de alérgenos ambientais, tais como proteínas antigênicas de ácaros, fungos e pólenes, e desenvolver doenças típicas, como asma, rinite ou dermatite atópica (JOHANSSON et al., 2001). A alergia é definida como o resultado de reações associadas a anticorpos IgE induzidos principalmente por alérgenos em indivíduos geneticamente predispostos e são evidenciadas clinicamente como respostas de hipersensibilidade do tipo I ou imediata (PLATTS-MILLS; SOLOMON, 1993; CRONWELL, 1997). Portanto, a alergia ou hipersensibilidade imediata é característica de indivíduos atópicos.

Há vários fatores que podem influenciar no desenvolvimento da atopia. Dentre eles, destacam-se os fatores genéticos como evidenciado pela maior ocorrência de atopia entre gêmeos univitelinos do que em gêmeos bivitelinos bem como a associação entre atopia e polimorfismos do receptor 1 de alta afinidade da IgE (FcεR1) no cromossomo 11q e do gene da interleucina-4 (IL-4) no cromossomo 5 humanos (COOKSON, 1999).

Asma e rinite alérgica são as principais doenças alérgicas respiratórias no Brasil e no mundo. A prevalência da asma varia de 1% a 30% entre a população de diferentes países e a da rinite alérgica de 10% a 25% da população geral, mas ambas as doenças têm apresentado uma crescente prevalência nas últimas décadas. A rinite alérgica está ganhando grande importância devido ao rápido aumento de sua prevalência mundial (VON MUTIUS, 1998; BEASLEY et al., 2000), afetando 30% a 40% de crianças e adolescentes (SKONER, 2001). No Brasil, a prevalência média de rinite foi de 27% e 34% em grupos de crianças e adolescentes com seis e sete anos e 13-14 anos, respectivamente, com maior prevalência nos centros urbanos (SOLÉ et al., 2004). Embora a rinite alérgica não seja uma doença grave, modifica a vida social de pacientes e afeta o desempenho escolar e a produtividade no trabalho (BOUSQUET; VAN CAUWENBERGE; KHALTAEV, 2002).

1.2 Fisiopatologia da resposta imune alérgica

O desencadeamento da resposta alérgica depende da natureza do estímulo antigênico e de várias etapas da resposta imune do hospedeiro. O processamento do alérgeno pela célula apresentadora de antígeno (APC) resulta na formação de peptídeos que são apresentados à

célula T CD4⁺ em associação com moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (MARONE, 1998).

O reconhecimento de peptídeos/MHC II pela célula T CD4⁺ reforçado pela ligação de moléculas co-estimulatórias (B7-1/B7-2 e CD28) leva à ativação de células Th (T *helper* ou T auxiliadora), particularmente do fenótipo Th2, o qual está associado com resposta imune a alérgenos e helmintos. Células Th2 ativadas secretam citocinas, tais como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que auxiliam as células B a produzirem anticorpos IgE e IgG4 bem como ativam eosinófilos, basófilos e mastócitos. A IL-5 é importante fator de crescimento seletivo para diferenciação terminal, ativação e manutenção dos eosinófilos nos tecidos. Entretanto, uma variedade de citocinas tem sido implicadas na modulação da síntese de IgE. A presença de IFN- γ e TNF- β produzidas por células do perfil Th1 inibem a síntese de IgE pelas células B, enquanto IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 estimulam sua síntese (WORM; HENZ, 1997). Subpopulações de células T CD4⁺CD25⁺ denominadas de células T reguladoras (Treg) produtoras de TGF- β e IL-10 têm sido reconhecidas com propriedades imunomoduladoras do perfil Th1 bem como estímulo para a produção de anticorpos da classe IgA (WEINER, 1997). Estudos têm mostrado que o mecanismo de supressão das respostas em diferentes condições patológicas (autoimunidade, respostas alérgicas e infecciosas, entre outras) é dependente da produção e secreção de mediadores como TGF- β e/ou IL-10 (PICCIRILLO et al., 2002).

Uma terceira subpopulação de células Th CD4⁺ distinta de Th1 e Th2, produtora de IL-17, tem sido caracterizada como Th17. Esta subpopulação se diferencia a partir da célula Th0 na presença de TGF- β , IL-6, IL-21 e IL-23 (INFANTE-DUARTE et al., 2000). Assim, células Th17 desempenham importantes funções na indução de inflamação tecidual pela indução de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, particularmente envolvendo o recrutamento e ativação de neutrófilos (OBOKI et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado que em pacientes asmáticos, a expressão de RNAm codificando para IL-17 foi aumentada em pulmões, escarro, lavado broncoalveolar e soro, e a gravidade da hiperssensibilidade das vias aéreas em pacientes correlaciona com os níveis de expressão de RNAm para IL-17, sugerindo que esta citocina possui um papel importante na inflamação alérgica (WANG; LIU, 2008; OBOKI et al., 2008).

Desta forma, no desenvolvimento da reação de hiperssensibilidade imediata, as principais etapas consistem de: (1) exposição ao alérgeno que estimula respostas imunes com padrão Th2 com conseqüente produção de IgE; (2) ligação do anticorpo IgE a receptores Fc ϵ nos mastócitos; (3) ligação cruzada de IgE e receptores Fc ϵ pelo alérgeno; (4) ativação de

mastócitos e liberação de mediadores pré-formados, como histamina e derivados de lipídeos, como os leucotrienos e prostaglandinas. As manifestações clínicas e patológicas da hipersensibilidade imediata consistem na reação vascular e da musculatura lisa, que se desenvolve rapidamente após a re-exposição ao alérgeno (reação imediata) ou como reação tardia representada principalmente por um processo inflamatório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Poucos minutos após o contato com o alérgeno, os mediadores pré-formados e os recém sintetizados iniciam sintomas característicos da rinite alérgica, incluindo espirro, coceira, coriza e congestão. Estas respostas da fase imediata são atribuídas à liberação de histamina, prostaglandinas e fatores quimiotáticos (WHITE; KALINER, 1992; TOGIAS, 2000). A resposta de fase tardia ocorre após 4 a 8 horas e os principais mediadores desta resposta são os leucotrienos, citocinas, sobretudo as interleucinas do tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-5 e IL-13) e as moléculas de adesão, tais como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina (GALLI; LANTZ, 1999; JANSON et al., 2005).

1.3 Ácaros e alérgenos da poeira domiciliar

A poeira domiciliar consiste de partículas em suspensão de fontes orgânicas e inorgânicas e é constituída por um aglomerado de fibras vegetais e de carpetes, partículas de móveis estofados, areia, terra, peças do vestuário, escamação humana, restos alimentares, resíduos químicos e produtos de vários microorganismos (bactérias, vírus e fungos) e macroorganismos (animais domésticos, insetos e ácaros) (SELTZER, 1994).

Dentre os ácaros da poeira domiciliar, destacam-se duas espécies da família Pyroglyphidae (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*) e uma da família Echimyopodidae (*Blomia tropicalis*) que são consideradas importantes fontes de alérgenos para sensibilização em pacientes geneticamente predispostos (MIRANDA; QUINTERO; ALMANZA, 2002; HART et al., 2007; JIMÉNEZ et al., 2007).

D. pteronyssinus e *D. farinae* são os ácaros mais encontrados na poeira domiciliar, sendo representados por 80 a 90% do total e são importantes fontes de alérgenos inaláveis ou aeroalérgenos em diferentes áreas geográficas, particularmente em países tropicais e subtropicais (ARLIAN et al, 1992; GELBER et al., 1993). A proliferação dos ácaros e sua sobrevivência são dependentes de diversas condições, principalmente da temperatura e umidade, os quais parecem ser os fatores decisivos e limitantes para o seu desenvolvimento (BOQUETE et al, 2006).

No Brasil, diversos estudos relatam a prevalência de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*. Na cidade de Uberaba-MG, Terra e colaboradores (2004) encontraram que *D. pteronyssinus* foi a espécie de maior frequência (15,3%), seguida por *D. farinae* (12,3%), por meio de identificação acarológica. Em um estudo realizado em São Paulo-SP por Arruda e colaboradores (1991), foi verificada alta frequência nos níveis de IgE específica a *D. pteronyssinus* na maioria das crianças estudadas (95%). Segundo um recente estudo realizado na cidade de Uberlândia-MG, a maioria dos pacientes sensibilizados a *B. tropicalis* também estão sensibilizados a *D. pteronyssinus* (89%), indicando alta sensibilização concomitante entre essas duas espécies (ALMEIDA et al., 2006). Em outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, os níveis de sensibilização aos ácaros *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis* na população de Uberlândia-MG foram, respectivamente, 61,7%, 59,9% e 54,7%, confirmando sua importância como fonte de alérgenos em pacientes desta região (SOARES et al., 2007).

1.4 Toxoplasmose e *Toxoplasma gondii*

Toxoplasmose é uma das mais comuns zoonoses parasitárias, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que acomete ampla faixa de hospedeiros, incluindo humanos, animais domésticos e aves. *T. gondii* é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao Filo Apicomplexa, com distribuição cosmopolita e que infecta todas as células nucleadas. É um dos parasitos mais intensamente estudados entre os coccídeos, não só por ser agente causal de uma zoonose como também pela sua importância médica e veterinária, já que pode causar abortos ou infecções congênitas em seus hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

A infecção por *T. gondii* tem sido alvo de crescente interesse em humanos pelo fato de causar a encefalite toxoplásmica, um dos mais sérios problemas de infecções oportunistas. Estas ocorrem em aproximadamente 30% de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e em pacientes com câncer ou transplantados sob terapia imunossupressora, principalmente devido à reativação de cistos teciduais (AMBROISE-THOMAS; PELLOUX, 1993). Estima-se que mais de um terço da população adulta no mundo tenha sido exposta ao parasito, embora a maioria das infecções seja assintomática em indivíduos adultos imunocompetentes. Ocasionalmente, sintomas moderados podem ser observados, sendo a linfadenopatia a manifestação clínica predominante. Entretanto, as infecções congênitas que geralmente ocorrem devido à infecção aguda durante a gravidez, resultando em graves

problemas ao feto (aborto, encefalite, retardo mental), constituem as mais sérias formas da doença. Além disso, *T. gondii* tem sido também reconhecido como importante causa de retinocoroidite, não só como seqüela de infecção congênita (ROTHOVA, 1993), mas também como resultado de uma infecção adquirida (SILVEIRA et al., 1988).

As principais vias de transmissão para o homem compreendem: (1) a ingestão de oocistos (eliminados nas fezes de gatos) através de água ou alimentos contaminados, ou por vetores mecânicos (cães, moscas, baratas, ratos); (2) a ingestão de cistos teciduais contidos em carnes cruas ou mal cozidas; e (3) a transferência de taquizoítas através da placenta ou secreções como saliva, urina, esperma e leite, ou ainda por órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (DUBEY, 1998).

A resposta imune a *T. gondii* envolve mecanismos da imunidade mediada por células, mas a resposta imune humoral também destrói muitos taquizoítas. Anticorpos IgM específicos podem ser detectados aos 7 dias após a infecção, alcançam títulos máximos em poucas semanas e gradualmente declinam. Anticorpos IgG específicos aparecem dentro de 1 a 2 semanas após a infecção, atingem títulos máximos em aproximadamente 6 semanas e declinam gradualmente até a persistência de baixos títulos durante toda a vida (CAMARGO et al., 1978). Estes anticorpos possuem importante papel inibitório da invasão de taquizoítas na célula hospedeira e na sua disseminação sistêmica (COUPER et al., 2005). Os taquizoítas que escapam da destruição se transformam em bradizoítas e ficam dentro de cistos. Desta forma, observa-se que a imunidade não determina o fim da infecção, mas impede a multiplicação de taquizoítas e a destruição da célula hospedeira. Assim, os anticorpos não são importantes para estabelecer a imunidade, mas podem prevenir a disseminação dos parasitos durante a infecção crônica (LIPSKA; WYSOCKA; TUROWSKI, 2000).

A toxoplasmose aguda pode ser caracterizada sorologicamente pela presença de anticorpos IgM e/ou IgA específicos. Por outro lado, altos títulos de IgG nem sempre indicam infecção recente e são característicos da fase de transição entre as fases aguda e crônica. Em infecções recentes, anticorpos IgG estão presentes mas apresentam baixa avidéz para os antígenos correspondentes. Com o transcorrer da infecção e a maturação da resposta imune, anticorpos IgG vão apresentando avidéz crescente de modo que nas infecções de longa duração encontra-se um predomínio marcante de anticorpos IgG de alta avidéz (CAMARGO et al., 1991).

O mais importante mecanismo de controle da infecção por *T. gondii* é a imunidade mediada por células, com a participação de células T CD4⁺ e T CD8⁺, macrófagos e células *natural killer* (NK) (KASPER; BOOTHROYD, 1993). Durante a infecção aguda por *T.*

gondii, IL-12 é produzida por macrófagos infectados e estimula células NK a produzirem IFN- γ induzindo a diferenciação de células T CD4⁺ na subpopulação Th1 produtora de IL-2 e IFN- γ , que são críticos para a sobrevivência do hospedeiro. Células T CD8⁺ contribuem para controlar as infecções agudas e crônicas por *T. gondii* devido à produção de IFN- γ em associação com macrófagos ativados. Desta forma, células infectadas seriam lisadas por células T CD8⁺ liberando taquizoítas livres no microambiente extracelular que seriam destruídos por macrófagos ativados por IFN- γ (DENKERS; GAZZINELLI; MARTIN, 1993).

Outra citocina importante na regulação da resposta imune celular a *T. gondii* é a IL-10, que é detectada em níveis aumentados na fase aguda da infecção (KHAN; MATSURRA; KASPER, 1995). Esta citocina tem efeitos inibitórios sobre a atividade microbicida de macrófagos ativados por IFN- γ , a diferenciação de clones Th1, a produção de IFN- γ por células NK e células T CD4⁺ e CD8⁺ e a produção de IL-12 por células acessórias. Em experimentos com camundongos infectados na ausência de IL-10 endógena, foi observado que estes animais apresentaram lesões hepáticas exacerbadas e mortalidade acelerada em consequência de excessivas produções de IL-12 e IFN- γ resultando em imunopatologia (GAZZINELLI et al., 1996). Um recente estudo demonstrou que *T. gondii* não induz a produção apenas de IFN- γ em células Th1 T-bet⁺, mas também IL-10 na fase aguda, indicando que o parasito induz atividades reguladoras (JANKOVIC et al., 2007). Assim, a regulação negativa induzida por IL-10 na fase aguda da infecção por *T. gondii* mostrou ser importante para a sobrevivência do hospedeiro.

1.5 Associação entre atopia e marcadores de infecção

A prevalência de doenças alérgicas como asma, rinite alérgica e dermatite atópica aumentou consideravelmente nos últimos 30 a 40 anos (ISAAC, 1998; SLY, 1999). Como as alterações nesta prevalência ocorreram em curto período de tempo, fatores ambientais têm sido relacionados a estas epidemias, embora a predisposição genética seja pré-requisito para o desenvolvimento da alergia (ISAAC, 1998). Inquéritos epidemiológicos relatam que a prevalência de doenças alérgicas é maior em países ocidentais desenvolvidos que em países em desenvolvimento ou na população rural (ISAAC, 1998; BRAUN-FAHRLANDER et al., 1999). Portanto, fatores relacionados aos diferentes estilos de vida estão associados com a prevalência crescente de alergias.

Os estilos de vida têm sofrido dramática mudança durante os últimos 30 anos. Atualmente, a maioria dos indivíduos permanece até 20 horas em ambientes internos domiciliares ou no trabalho (PLATTS-MILLS, 1994). Com este novo estilo de vida, muitas alterações têm ocorrido nos diferentes microambientes, ocasionadas pelo aumento da temperatura ambiental, diminuição da ventilação, utilização de carpetes e tapetes, presença de objetos decorativos que retêm a poeira bem como a utilização de condicionadores de ar. Todos estes fatores podem ocasionar aumento na quantidade de substâncias estranhas ou alérgenos que circulam nos ambientes de casa ou do trabalho e subseqüentemente são inalados pelos seus usuários. Conseqüentemente, estas alterações ambientais têm contribuído grandemente para aumentar a prevalência de doenças alérgicas respiratórias, particularmente asma e rinite (POLLART; WARD; PLATTS-MILLS, 1987; PLATTS-MILLS, 1994).

De acordo com a hipótese da higiene, menor exposição a certas infecções está associada com tendência crescente de doenças alérgicas (STRACHAN, 1989). Tal hipótese argumenta sobre a prevalência de doenças atópicas, dominadas por perfil de resposta imune Th2, ser reduzida como resultado de polarização para a resposta Th1 associada com tais infecções (SHEIKH; STRACHAN, 2004) ou alterações no balanço das respostas de células Th1, Th2 e Treg (GARN; RENZ, 2007). Assim, infecções bacterianas, particularmente aquelas causadas por *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis*, têm sido relacionadas com a proteção de doenças alérgicas. Estudos relataram que crianças vacinadas com BCG quando neonatos ou na infância ficam protegidos do desenvolvimento de doenças alérgicas, enfatizando que a idade da vacinação é um importante fator para esta proteção (MARKS et al., 2003; CUNHA et al., 2004).

Estudos em modelos experimentais também mostraram que a infecção ou imunização com BCG previne o desenvolvimento de hiper-reatividade das vias aéreas e induz redução parcial de anticorpos séricos IgE e IgG1 específicos a alérgenos em camundongos, ratos ou cobaias, associado com redução nos níveis de citocinas Th2 em lavado bronco-alveolar ou sobrenadante de culturas de células do baço e linfonodos de drenagem (TRUJILLO; ERB, 2004). Estes efeitos não foram observados em camundongos deficientes de IFN- γ , sugerindo um papel para respostas Th1. Entretanto, esta inibição foi associada com uma produção aumentada de IL-10 e não de IFN- γ por células T (TRUJILLO; ERB, 2004; SAYERS et al., 2004). Anticorpos neutralizantes contra IL-10 e/ou TGF- β bloquearam os efeitos antialérgicos, indicando mecanismo independente de Th1, possivelmente relacionado às células T reguladoras (ADAMS et al., 2004).

Infeções de origem alimentar ou transmitidas pela via orofecal, especialmente aquelas causadas por *T. gondii*, *Helicobacter pylori* e vírus da hepatite A podem proteger de doenças alérgicas (MATRICARDI et al., 2000, 2002; LINNEBERG et al., 2003). Estes dados se baseiam no fato que tais infecções induzem uma forte resposta Th1 com produção de IFN- γ que exerce efeitos inibitórios sobre as respostas Th2 predominantes em alergias. Assim, estes microorganismos têm sido considerados marcadores de precária higiene e associados com menor prevalência de alergia. Estudos relacionando as respostas sorológicas a estes microorganismos sugerem um papel para tais infecções ou para a falta de higiene, na inibição do desenvolvimento de respostas imunes alérgicas. Assim, alergia respiratória é menos freqüente em indivíduos expostos a estes microorganismos e a higiene ou dietas semi-esterilizadas podem facilitar atopia por influenciar o padrão de patógenos e comensais intestinais. Estes estimulam o tecido linfóide associado à mucosa intestinal (GALT), contribuindo assim para a epidemia de alergias respiratórias em países desenvolvidos (MATRICARDI et al., 2000). No entanto, é provável que a carga total do estímulo microbiano mais do que a própria infecção por si, possa direcionar o sistema imune para uma resposta polarizada tipo Th1 (VON MUTIUS, 2001).

Outro fator que também está relacionado com aumento na prevalência das doenças alérgicas é o uso indiscriminado de antibiótico nos primeiros anos de vida, pois altera a flora bacteriana intestinal, deslocando o perfil da resposta imunológica (JOHNSON et al., 2005). Evidência experimental demonstrou que a flora gastrointestinal de camundongos possui papel protetor no desenvolvimento de doenças alérgicas (SUDO et al., 1997). Um estudo recente comparando crianças que vivem em creches ou crianças que moram com seus pais, demonstrou que as primeiras possuem maiores níveis de hormônios relacionados ao estresse e menor prevalência de atopia. Dessa forma, o estresse seria um fator adicional na proteção contra o desenvolvimento de doenças atópicas, além das piores condições de higiene e menor uso de antibióticos (STELMACH et al., 2007).

Todos estes relatos sugerem que infecções podem proteger de doenças alérgicas, mas há numerosos dados contraditórios, particularmente relacionados com os vírus respiratórios como rinovírus (RV), vírus sincicial respiratório (RSV) e influenza A, que podem induzir ou exacerbar os sintomas de alergia respiratória, especialmente na asma (HERZ et al., 2000). Entretanto, dependendo do grau e do tempo de infecção, os efeitos antialérgicos podem ser observados, sugerindo que a gravidade, a freqüência e o tempo de instalação das infecções virais respiratórias podem também ser importantes em determinar o resultado final sobre o desenvolvimento de reações alérgicas (WOHLLEBEN et al., 2003; KONDO et al., 2004).

Alguns fatores inversamente relacionados às alergias respiratórias são aqueles relacionados à exposição a animais de fazenda e ao consumo de leite não pasteurizado (RIEDLER et al., 2001; WICKENS et al., 2002). Radon e colaboradores (2004) demonstraram que os principais fatores de risco para a infecção por *T. gondii* foram a moradia em fazenda durante os primeiros três anos de vida, o contato regular com estábulos de animais e o consumo de leite não pasteurizado durante a infância. Assim, exposição a ambientes rurais na infância pode prever a soropositividade a *T. gondii* e o contato regular com animais de fazenda pode ser considerado um preditor negativo para atopia em indivíduos que residem em fazendas.

De acordo com a hipótese da higiene, doenças alérgicas podem ser prevenidas por exposição a agentes infecciosos, particularmente durante a infância (MATHESON et al., 2009). Entretanto, tem sido especulado se a remoção desta proteção durante a vida adulta, por uma exposição reduzida a microorganismos, poderia favorecer o aparecimento de alergia em indivíduos geneticamente predispostos (MATRICARDI, 1997). Neste contexto, um estudo envolvendo imigrantes da Albânia para Itália mostrou que, apesar da baixa prevalência de doenças alérgicas e sensibilização em seu país de origem, houve prevalência crescente de sensibilização a alérgenos locais e sintomas respiratórios nos indivíduos após a imigração. Tal fato sugere o papel importante da exposição alergênica e fatores ambientais, como diferentes estilos de vida e conseqüente exposição reduzida a infecções, em influenciarem o aparecimento de doenças alérgicas (VENTURA et al., 2004).

Todas estas observações epidemiológicas têm evidenciado que (1) asma e atopia são mais prevalentes entre indivíduos que vivem em ambientes muito limpos (hipótese da higiene); (2) crianças que estão em contato com animais de fazenda geralmente não desenvolvem asma e atopia; e (3) a ocorrência de atopia ou asma é menor em casas que apresentam cães e gatos. Além disso, a natureza, a dose do alérgeno e infecções por vírus e a constituição da flora intestinal de um indivíduo são fatores determinantes para a progressão da doença alérgica (BABU; ARSHAD, 2003). Desta forma, a associação entre exposição a infecções e atopia tem sido intensamente investigada em estudos epidemiológicos, retrospectivos e de coorte, analisando os fatores de risco envolvidos nesta associação. Além disso, há informação limitada na literatura sobre a avaliação da resposta imune humoral e celular bem como o perfil de citocinas em pacientes atópicos soropositivos e soronegativos a *T. gondii*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Investigar a associação entre atopia e infecção por *T. gondii* em humanos.

2.2 Específicos

- Analisar a relação entre a resposta de anticorpos IgE específicos aos alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae* e a resposta de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em pacientes atópicos e não-atópicos, soropositivos e soronegativos a *T. gondii*;
- Avaliar a resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico de pacientes atópicos e não-atópicos, soropositivos e soronegativos a *T. gondii*, após estimulação com antígenos do parasito e alérgenos de ácaros;
- Determinar o perfil de citocinas secretadas por células mononucleares do sangue periférico de pacientes atópicos e não-atópicos, soropositivos e soronegativos a *T. gondii*, após estimulação com antígenos do parasito e alérgenos de ácaros.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente projeto engloba pacientes de estudos que já foram submetidos e aprovados junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos (Anexo 1). Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), estando cientes de todos os procedimentos adotados e responderam a um questionário clínico elaborado segundo ISAAC – *International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (1998), com algumas modificações (Anexo 3).

3.2 Pacientes

Um total de 275 indivíduos foram selecionados e distribuídos em grupos de pacientes atópicos (n=129) e não-atópicos (n=146) com base em marcadores de alergia. Os pacientes atópicos, de ambos os gêneros e idade entre 18 e 60 anos, foram selecionados no Ambulatório de Alergia e Imunologia Clínica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Os critérios de inclusão para a seleção destes pacientes foram: (1) história clínica de sintomas respiratórios relacionados com exposição à poeira domiciliar; (2) teste cutâneo de puntura (TCP) positivo a pelo menos um dos alérgenos inaláveis de ácaros da poeira domiciliar, *D. pteronyssinus* (Dp) e *D. farinae* (Df) e (3) presença de IgE sérica específica aos alérgenos determinada por ELISA. Os critérios de exclusão para o estudo foram: (1) uso de anti-histamínicos ou corticosteróides, por via oral ou tópica, na semana anterior ao teste; (2) uso de corticosteróides sistêmicos por período de tempo prolongado; (3) presença de lesões dermatológicas na área de realização do teste cutâneo.

Os indivíduos não-atópicos, de ambos os gêneros e idade entre 18 e 60 anos, foram selecionados entre os alunos dos cursos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários da UFU e de membros da população de Uberlândia. Os critérios de inclusão foram ausência de sintomas e de antecedentes pessoais de doenças alérgicas e TCP negativo a um painel de extratos alergênicos inaláveis.

3.3 Teste cutâneo de puntura (TCP)

O TCP foi realizado de acordo com Ownby (1988), utilizando um painel de extratos alergênicos inaláveis: extratos brutos dos ácaros *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *Blomia tropicalis* (preparados como descrito no item 3.5); extratos comerciais (Bayer Corporation, Spokane, EUA) de alérgenos de epitélio de cão (*Canis familiaris*), epitélio de gato (*Felis domesticus*), barata (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*) e fungo (*Alternaria alternata*). Para o controle positivo, utilizou-se cloridrato de histamina a 10 mg/mL (IPI/ASAC, São Paulo, Brasil) e para o controle negativo utilizou-se solução salina fisiológica em fenol 0,4% e glicerina diluída a 50% (SQUILLACE et al., 1997; OPPENHEIMER, NELSON, 2006). Após 15 minutos da realização do teste, as pápulas foram mensuradas e o teste foi considerado positivo quando as pápulas apresentaram diâmetro médio maior que 3 mm que aquelas do controle negativo (ANEXO 4).

3.4 Amostras de sangue

Paralelamente ao TCP, amostras de sangue (5 mL) foram coletadas de cada indivíduo por punção venosa na região do antebraço. As amostras foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos e os soros obtidos foram distribuídos em alíquotas e armazenados a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

3.5 Extratos alergênicos de ácaros

A extração dos alérgenos de ácaros foi realizada de acordo com o protocolo anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005). Em resumo, aproximadamente 200 g de material seco de cultivo dos ácaros, gentilmente cedido pelo Dr. Federico Montealegre (Immunochemistry Laboratory, Medical School of Ponce, Porto Rico, EUA), foram peneirados para separar corpos e fezes dos ácaros do restante do material de cultivo. Em seguida, 10 g do material peneirado foram misturados a 50 mL de solução salina tamponada com borato a 5 mM (pH 8,0) contendo inibidores de proteases (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA): leupeptina 1 µM, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, benzamidina 1 mM e aprotinina 10 µg/mL. Essa mistura foi macerada em nitrogênio líquido para ruptura dos ácaros e incubada durante 18 horas a 4°C em agitação orbital. Posteriormente, o material foi

centrifugado a 20.000 x g durante 45 minutos a 4°C e o sobrenadante (extrato total) foi concentrado e dialisado em Amicon (W.R. Grace & Co., Beverly, EUA) com membrana YM-10 (*cut off* de 10 kDa, Whatman International Ltd, Maidstone, Inglaterra) contra solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M, pH 7,2 (PBS). Os extratos alergênicos foram distribuídos em alíquotas, sua concentração protéica determinada (LOWRY et al., 1951) e armazenados a -20°C.

Uma parte dos extratos alergênicos dos ácaros foi utilizada no TCP, preparados a uma concentração protéica final de 2 mg/mL em PBS contendo 0,4% de fenol e 50% de glicerina e o restante foi utilizado nos testes sorológicos para detecção de anticorpos IgE anti-alérgenos.

3.6 Manutenção e obtenção de *T. gondii*

Parasitas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss através de passagens seriadas a intervalos de 48 a 72 horas de um inóculo de aproximadamente 10⁶ taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO et al., 1980). O exsudato peritoneal foi obtido por lavagem da cavidade abdominal com PBS estéril e após centrifugação a 720 x g por 10 minutos a 4°C, o sedimento foi lavado duas vezes com PBS e o sedimento final armazenado a -20°C para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii*.

3.7 Obtenção do antígeno solúvel de *T. gondii*

A obtenção do antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) foi realizada conforme anteriormente descrito (YAMAMOTO et al., 1991), com algumas modificações. Os sedimentos de taquizoítas de *T. gondii* foram ressuspensos em PBS contendo inibidores de proteases (PMSF a 1,6 mM, leupeptina a 50 µg/mL e aprotinina a 10 µg/mL) e submetidos a seis ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C seguidos por seis ciclos de ultra-som (Thorton – INPEC Eletrônica S/A, Santo Amaro, SP, Brasil) durante um minuto a 60 Hz em banho de gelo. Após centrifugação a 5.000 x g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado, sua concentração protéica determinada (LOWRY et al., 1951) e armazenado em alíquotas a -20°C, até ser utilizado como antígeno solúvel nos testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*.

3.8 Testes sorológicos

3.8.1 ELISA para detecção de anticorpos IgE específicos a alérgenos de ácaros

Ensaio imunoenzimático (ELISA) foram realizados para a detecção de anticorpos IgE contra alérgenos de ácaros em amostras de soros dos pacientes, como anteriormente descrito (PEREIRA et al., 2005), com algumas modificações. Placas de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com os extratos alergênicos de Dp e Df na concentração protéica de 20 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T contendo soroalbumina bovina (BSA, Sigma Chemical Co.) a 1% por uma hora à temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagens, as amostras de soros foram adicionadas na diluição 1:2 em PBS-T-BSA 1% e incubadas por 2 horas a 37°C. Em paralelo, soros controles negativos foram incluídos em cada placa.

Após um ciclo de seis lavagens, as placas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgE humana biotilado (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, EUA) diluído a 1:1000 em PBS-T-BSA 1% por 1 hora a 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:500 em PBS-T-BSA 1%. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente e novas lavagens, as placas foram reveladas por meio da adição do substrato enzimático (2,2'-diazino-bis-3-ethyl-benzothiazoline sulfonic acid [ABTS] a 0,01 M em tampão citrato-fosfato a 0,07 M, pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂).

Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de placas de microtitulação (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405 nm. Os níveis de anticorpos IgE foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE), conforme proposto por Silva e colaboradores (2002), segundo a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / \text{cut off}$, onde *cut off* foi calculado como a média da DO de soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos para excluir valores de reatividade limítrofes próximos a valores de $IE = 1,0$.

3.8.2 ELISA para detecção de IgE sérica total

ELISA para detecção de IgE sérica total foi realizada segundo a técnica descrita anteriormente (SILVA et al., 2001). Placas de alta afinidade (Immulon 2, Dynatech Laboratories Inc., Chantilly, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IgE humana (clone GE-1; Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:5.000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente. As amostras de soro foram diluídas a 1:5, 1:50 e 1:500 em PBS-T-BSA 1% e incubadas por 2 horas a 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado o anticorpo secundário biotilado anti-IgE humana (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc.) na diluição de 1:4000 e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Etapas subseqüentes (conjugado estreptavidina-peroxidase e substrato enzimático) foram similares ao ELISA para detecção de IgE específica aos alérgenos. Os resultados foram expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL) de acordo com uma curva controle obtida por diluições duplas seriadas de um soro humano (LHY) subpadronizado que continha 500 UI/mL de IgE sérica total.

3.8.3 ELISA para detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii*

ELISA para a detecção de anticorpos IgG anti-*T.gondii* em soros humanos foi realizado conforme descrito anteriormente (MINEO et al., 1980). Placas de microtitulação de poliestireno de baixa afinidade (Kartell SPA, Milão, Itália) foram sensibilizadas com STAg a 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. As placas foram incubadas com amostras de soros, em duplicata, na diluição de 1:64 em PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-T-M) durante 1 hora a 37°C. Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. Após um ciclo de seis lavagens com PBS-T foi adicionado o conjugado anti-IgG humana marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição de 1:2000 e incubado por 1 hora a 37°C. Após novo ciclo de lavagens, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático (ortofenilenodiamina [OPD] em tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0 contendo H₂O₂ a 0,03%). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2 N e a leitura determinada a 492 nm. Títulos de anticorpos foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE) como acima descrito e os soros com IE>1,2 foram considerados positivos.

3.9 Avaliação da resposta imune celular

Para avaliar a resposta imune celular aos alérgenos de ácaros e antígeno de *T. gondii* foram selecionados aleatoriamente 20 pacientes atópicos (10 soropositivos e 10 soronegativos a *T. gondii*) e 20 indivíduos não-atópicos (10 soropositivos e 10 soronegativos a *T. gondii*).

Para a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), foi coletado um volume de aproximadamente 20 mL de sangue heparinizado (10 UI heparina/mL sangue). Adicionou-se PBS estéril (v/v) e, após completa homogeneização, foi adicionado Ficoll-Paque (d=1,077; Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia), na proporção 1:5 (Ficoll-Paque:sangue diluído) e centrifugado a 1000 x g a 15°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e a nuvem celular (PBMC) foi coletada com pipeta Pasteur e transferida para um tubo, completando-se com PBS estéril gelado. A suspensão celular foi centrifugada a 300 x g por 10 minutos a 4°C e lavada com PBS estéril por duas vezes. O sedimento celular foi ressuspensão com 5 mL de meio de cultura completo (meio RPMI contendo gentamicina a 40 µg/mL e soro fetal bovino a 5%) e a suspensão celular mantida em banho de gelo até a contagem das células viáveis, utilizando o corante azul de Tripán 0,4% (Sigma), em câmara hemocitométrica de Neubauer.

3.9.1 Resposta proliferativa

A resposta proliferativa de linfócitos T a partir de PBMC foi avaliada de acordo com o protocolo descrito anteriormente (LOZANO et al., 2004), com algumas modificações. Em resumo, placas de cultura de 96 poços (Corning Incorporated Costar®) foram cultivadas com 2×10^5 células/poço/200µL (em triplicata) e estimuladas com mitógeno (fitohemaglutinina – PHA a 5 µg/mL), alérgenos (extratos totais de Dp ou Df a 10 µg/mL) ou antígeno (STAg a 10 µg/mL). Células não estimuladas (somente meio de cultura) foram incluídas como controle. As células foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C durante 5 dias. Aproximadamente 8 horas precedentes ao término do período de estimulação, as células foram pulsadas com 0,5 µCi de timidina tritiada [³H] (New England Nuclear, Boston, EUA) por poço e, em seguida, coletadas em filtro de fibra de vidro (Cambridge Technology, Watertown, EUA) por meio de coletor de células (Cell Harvester - Cambridge Technology Inc., Cambridge, EUA). A leitura da incorporação da timidina tritiada pelo DNA das células foi avaliada em um contador β de cintilação líquida (Packard, Downers Grove, EUA) em contagem por minuto (c.p.m.).

3.9.2 Análise de citocinas

A análise da produção de citocinas foi avaliada conforme anteriormente descrito (SLUNT et al., 1996), com algumas modificações. Placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporated Costar®) foram cultivadas com 1×10^6 PBMC/poço/1000 μ L e estimuladas com mitógeno (PHA: 5 μ g/mL), alérgenos (Dp ou Df: 10 μ g/mL) ou antígeno (STAg: 10 μ g/mL). Células não estimuladas (somente meio de cultura) foram incluídas como controle. As células foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C e os sobrenadantes de cultura foram coletados, de poços independentes, após 3 dias de estimulação. Os sobrenadantes foram armazenados a -70°C para posterior análise das citocinas.

As citocinas IFN- γ , IL-5, IL-10 foram mensuradas em sobrenadantes de cultura por ELISA *sandwich*, segundo protocolo recomendado pelos fabricantes (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Em resumo, placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®) foram sensibilizadas com os respectivos anticorpos de captura por 18 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T e bloqueio com as soluções bloqueadoras apropriadas por 1 hora à temperatura ambiente, os sobrenadantes de cultura foram adicionados, não diluídos, em duplicata. Paralelamente, curvas padrões das respectivas citocinas humanas recombinantes foram realizadas em diluições duplas seriadas. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos de detecção biotinizados por 2 horas à temperatura ambiente. Após novas lavagens, foi adicionado o conjugado estreptavidina-peroxidase e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após o último ciclo de lavagens, as placas foram reveladas com a adição do substrato enzimático (H₂O₂ a 0,03% e tetrametilbenzidina [TMB]). A densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 450 nm e filtro de referência a 570 nm. Os valores de DO obtidos foram convertidos em pg/mL de acordo com a curva padrão, utilizando-se o *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, EUA). O limite de detecção obtido para cada análise foi 31 pg/mL (IFN- γ), 15 pg/mL (IL-5) e 31 pg/mL (IL-10). Os coeficientes de variação intra-análise e inter-análise foram abaixo de 10% e 20%, respectivamente.

3.10 Análise estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). A comparação entre os dados obtidos nos diversos grupos foi analisada por testes não paramétricos, uma vez que as variáveis analisadas não apresentaram distribuição normal pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Foram utilizados os testes de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis, quando apropriado, e o teste de comparação múltipla de Dunn foi empregado para examinar as comparações entre pares de grupos. A associação entre a positividade de anticorpos IgE contra alérgenos e IgG contra *T. gondii* foi analisada pelo teste χ^2 e a razão de chances (*odds ratio*, OR) foi calculada com intervalo de confiança (IC) de 95% . Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

3.11 Normas de biossegurança

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).

4. RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes

Os 275 indivíduos analisados (129 atópicos e 146 não-atópicos) foram distribuídos em dois grupos, de acordo com os marcadores sorológicos para *T. gondii*: TG+ (116 pacientes soropositivos) e TG- (159 pacientes soronegativos) (Tabela 1). A porcentagem de indivíduos soropositivos (42%) foi menor que a dos soronegativos (58%) ($\chi^2=13,45$; $p=0,0002$) e a maioria dos indivíduos soropositivos apresentaram infecção assintomática. Os pacientes soropositivos TG+ apresentaram idade (mediana=29 anos) significativamente maior que aquela do grupo TG- (mediana=22 anos) ($p<0,0001$). Não houve diferença significativa quanto ao gênero entre os dois grupos de pacientes ($\chi^2=0,22$; $p=0,6379$). Os resultados do TCP aos alérgenos dos ácaros Dp e Df revelaram taxas de positividade significativamente maiores no grupo de pacientes TG- (54%) quando comparado ao grupo TG+ (37%) ($\chi^2=7,80$; $p=0,0052$). Embora os níveis de IgE sérica total no grupo de pacientes TG+ (mediana=39 UI/mL) fossem menores que nos pacientes TG- (mediana=78 UI/mL), estas diferenças não foram significativas ($p=0,2204$).

4.2 IgE contra alérgenos de ácaros em pacientes soropositivos e soronegativos a *T. gondii*

Na figura 1 estão demonstrados os níveis de anticorpos IgE anti-Dp (Figura 1A) e anti-Df (Figura 1B) em relação aos grupos de pacientes soropositivos (TG+) e soronegativos (TG-) a *T. gondii*. Os níveis de IgE anti-Dp foram significativamente maiores no grupo TG- (média geométrica [gm]: 1.9; 95% IC: 1.6-2.2) do que no grupo TG+ (gm: 1.3; 95% IC: 1.0-1.5; $p=0,0056$). Resultados similares foram observados para níveis de IgE anti-Df (gm: 2.2; 95% IC: 1.8-2.6 vs gm: 1.4; 95% IC: 1.2-1.7; $p=0,001$). As porcentagens de amostras positivas para IgE anti-Dp e anti-Df foram significativamente maiores no grupo TG- (54%) do que no grupo TG+ (37%) ($\chi^2=7,80$; $p=0,0052$).

Tabela 1. Características demográficas e imunológicas dos indivíduos do estudo distribuídos de acordo com a sorologia para *Toxoplasma gondii*.

Características	Grupos		
	TG+	TG-	Valor de <i>p</i>
Número de indivíduos (%)	116 (42%)	159 (58%)	0,0002*
Idade (anos)			
Mediana (25-75%)	29 (23-42)	22 (20- 28)	<0,0001*
Gênero (Masculino/Feminino)	42/74	62/97	0,6379
TCP positivo a Dp e Df (n, %) [§]	43 (37%)	86 (54%)	0,0052*
IgE sérica total (UI/mL) [#]			
Mediana (25-75%)	39 (12-136)	78 (14-234)	0,2204

TG+: pacientes soropositivos para *Toxoplasma gondii*;

TG-: pacientes soronegativos para *Toxoplasma gondii*;

[§] Positividade ao teste cutâneo de puntura (TCP) a alérgenos de *D. pteronyssinus* (Dp) e *D. farinae* (Df) foi determinada a partir do diâmetro médio da pápula e estabelecida como ≥ 3 mm em relação ao controle negativo da reação.

* Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

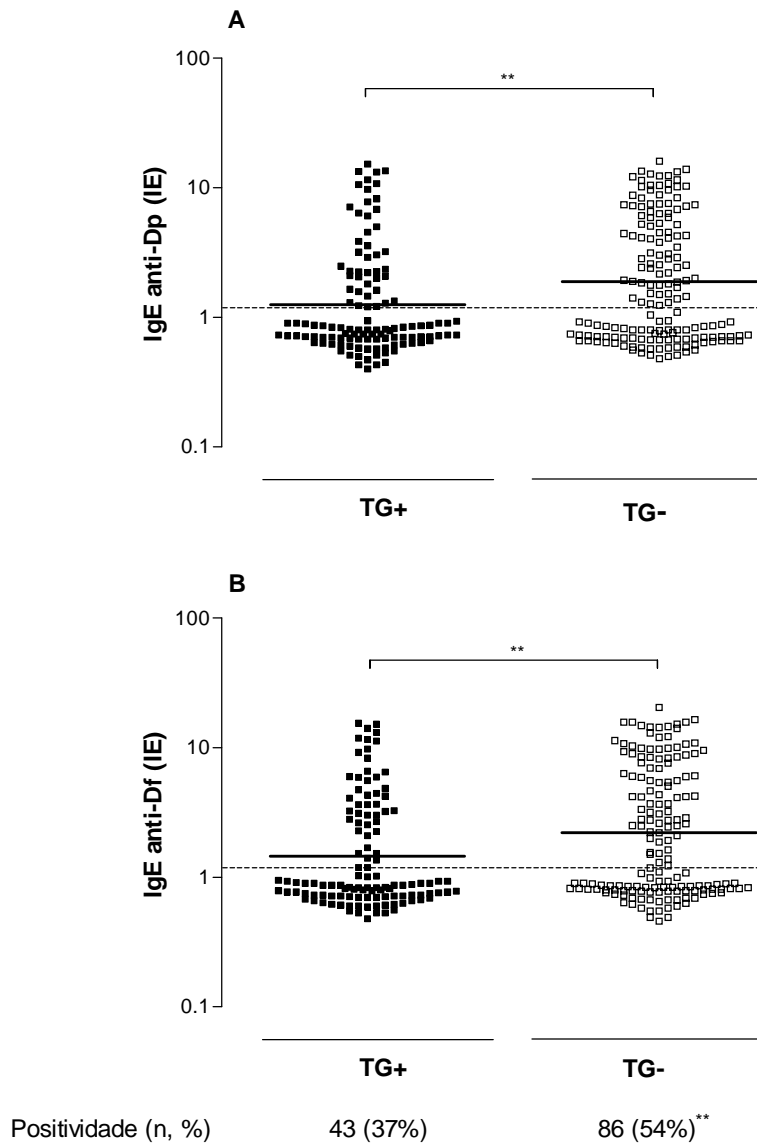


Figura 1. Níveis de anticorpos IgE, expressos em índice ELISA (IE), específicos a alérgenos de *D. pteronyssinus* (Dp, **A**) e *D. farinae* (Df, **B**) em amostras de soros de pacientes soropositivos (TG+, n=116) e soronegativos (TG-, n=159) a *T. gondii*. As barras horizontais representam a média geométrica obtida para cada grupo e a linha pontilhada indica o *cut off* da reação (IE>1,2). A frequência absoluta (n) e relativa (%) de amostras positivas para IgE contra cada alérgeno também estão indicadas. ** $p<0,01$.

4.3 IgG anti-*T. gondii* em pacientes atópicos e não-atópicos

Os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* entre os 129 pacientes atópicos e 146 indivíduos não-atópicos estão demonstrados na figura 2. Os níveis de IgG anti-*T. gondii* foram significativamente maiores nos indivíduos não-atópicos (gm: 2.4; 95% IC: 1.9-3.0) do que nos pacientes atópicos (gm: 1.5; 95% IC: 1.2-1.9; $p=0,0038$). Da mesma forma, a soropositividade para *T. gondii* foi significativamente maior nos indivíduos não-atópicos (50%) em relação aos atópicos (33%) ($\chi^2=7,80$; $p=0,0052$).

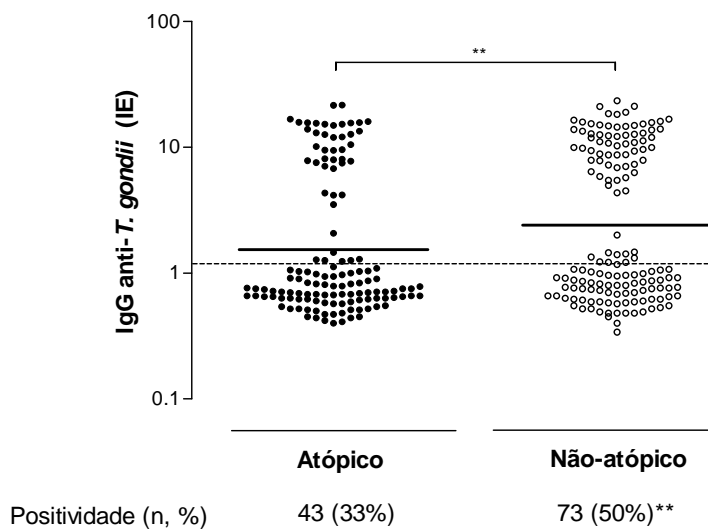


Figura 2. Níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii*, expressos em índice ELISA (IE), em amostras de soros de pacientes atópicos (n=129) e não-atópicos (n=146). As barras horizontais representam a média geométrica obtida para cada grupo e a linha pontilhada indica o *cut off* da reação (IE>1,2). A frequência absoluta (n) e relativa (%) de amostras positivas para IgG anti-*T. gondii* também estão indicadas. ** $p<0,01$.

4.4 IgE sérica total em pacientes soropositivos e soronegativos a *T. gondii*

Como demonstrado na figura 3, os níveis de IgE sérica total foram significativamente maiores nos indivíduos atópicos (mediana=198,5 UI/mL) que nos não-atópicos (mediana=26,0 UI/mL) dentro do grupo soropositivo a *T. gondii* ($p<0,0001$). O mesmo foi observado no grupo TG-, onde os pacientes atópicos apresentaram maiores níveis de IgE sérica total (mediana=187,3 UI/mL) que os não-atópicos (mediana=14,9 UI/mL) ($p<0,0001$). Não houve diferença significativa nos níveis de IgE sérica total entre os indivíduos soropositivos e soronegativos a *T. gondii*, quer sejam atópicos ou não-atópicos.

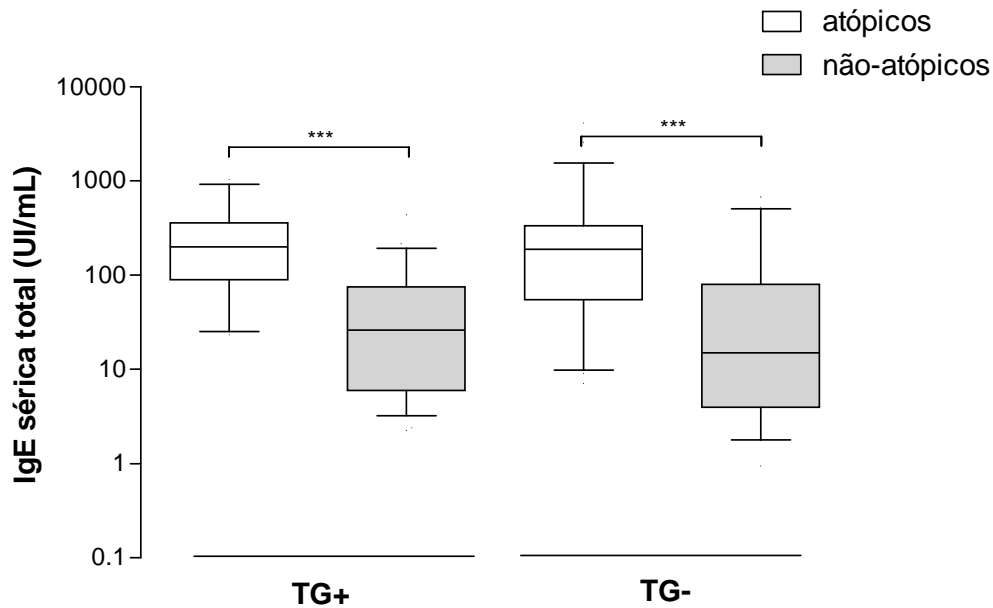


Figura 3. Níveis de IgE sérica total, expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL), em amostras de soros de pacientes soropositivos (TG+, n=116) e soronegativos (TG-, n=159) a *T. gondii*. Dados são representados em *box-plot* com mediana e percentis de 5-95%. *** $p < 0,0001$.

4.5 Associação entre atopia e infecção por *T. gondii*

Foi observada uma proporção significativamente maior de indivíduos não-atópicos (63%) em relação aos atópicos (37%) dentro do grupo TG+ ($\chi^2=15,52$; $p < 0,0001$), enquanto nenhuma diferença significativa foi encontrada entre atópicos e não-atópicos dentro do grupo TG- ($\chi^2=2,12$; $p=0,1448$) (Figura 4A). Entre os pacientes atópicos, houve uma maior proporção de indivíduos soronegativos a *T. gondii* (54%) em relação aos soropositivos (37%) ($\chi^2=7,8$; $p=0,0052$). Em contraste, a proporção de indivíduos soropositivos (63%) foi significativamente maior que a dos soronegativos a *T. gondii* (46%) entre os não-atópicos ($\chi^2=7,8$; $p=0,0052$). A razão de chances (OR) calculada para associação entre atopia e sorologia positiva para *T. gondii* foi 0,50 (95% IC: 0,31-0,81; $p < 0,05$), enquanto a associação entre atopia e sorologia negativa para *T. gondii* resultou em OR = 2,0 (95% IC: 1,23-3,26; $p < 0,05$).

Analisando todos os grupos de pacientes conjuntamente (Figura 4B), a proporção global das amostras de soros de pacientes TG+ atópicos (16%) foi significativamente menor que a dos TG+ não-atópicos (26%) ($\chi^2=9,83$; $p=0,0017$) como também em relação aos TG- atópicos (31%) ($\chi^2=18,73$; $p < 0,0001$). Nenhuma diferença significativa foi observada na proporção entre pacientes atópicos e não-atópicos soronegativos a *T. gondii* ($\chi^2=1,49$; $p=0,2214$).

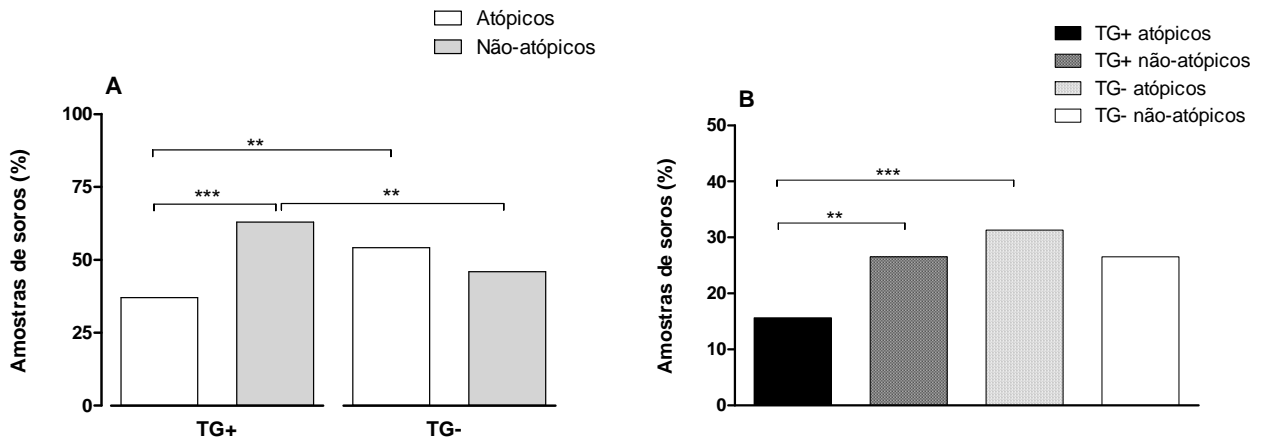


Figura 4. Associação entre atopia e infecção por *T. gondii*. (A) Proporção (%) de indivíduos atópicos e não-atópicos entre os grupos soropositivos (TG+) e soronegativos (TG-) a *T. gondii*. (B) Proporção (%) global de pacientes atópicos e não-atópicos, soropositivos e soronegativos a *T. gondii*.

4.6 Resposta proliferativa

Respostas proliferativas foram analisadas em 40 indivíduos distribuídos uniformemente em quatro grupos: (TG+ AT) soropositivos a *T. gondii* atópicos, (TG+ NA) soropositivos a *T. gondii* não-atópicos, (TG- AT) soronegativos a *T. gondii* atópicos e (TG- NA) soronegativos a *T. gondii* não-atópicos (Figura 5).

A resposta proliferativa induzida pelo STAg foi significativamente maior em pacientes dos grupos TG+, atópicos e não-atópicos, em relação aos grupos TG- ($p < 0,0001$). Além disso, somente pacientes dos grupos TG+ mostraram resposta proliferativa significativamente elevada em relação ao controle (meio) ($p < 0,0001$).

Após estimulação com alérgeno Dp, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos ($p > 0,05$), embora em todos os grupos foi observada maior resposta proliferativa em relação ao meio ($p < 0,05$). A resposta proliferativa ao alérgeno Df foi significativamente maior em pacientes atópicos que não-atópicos do grupo TG- ($p < 0,0001$), mas somente pacientes atópicos do grupo TG- mostraram respostas significativamente maiores em relação ao meio ($p < 0,0001$).

Após estimulação mitogênica, respostas proliferativas foram significativamente maiores em todos os grupos de pacientes em relação ao meio ($p < 0,0001$), particularmente nos grupos TG- ($p < 0,05$).

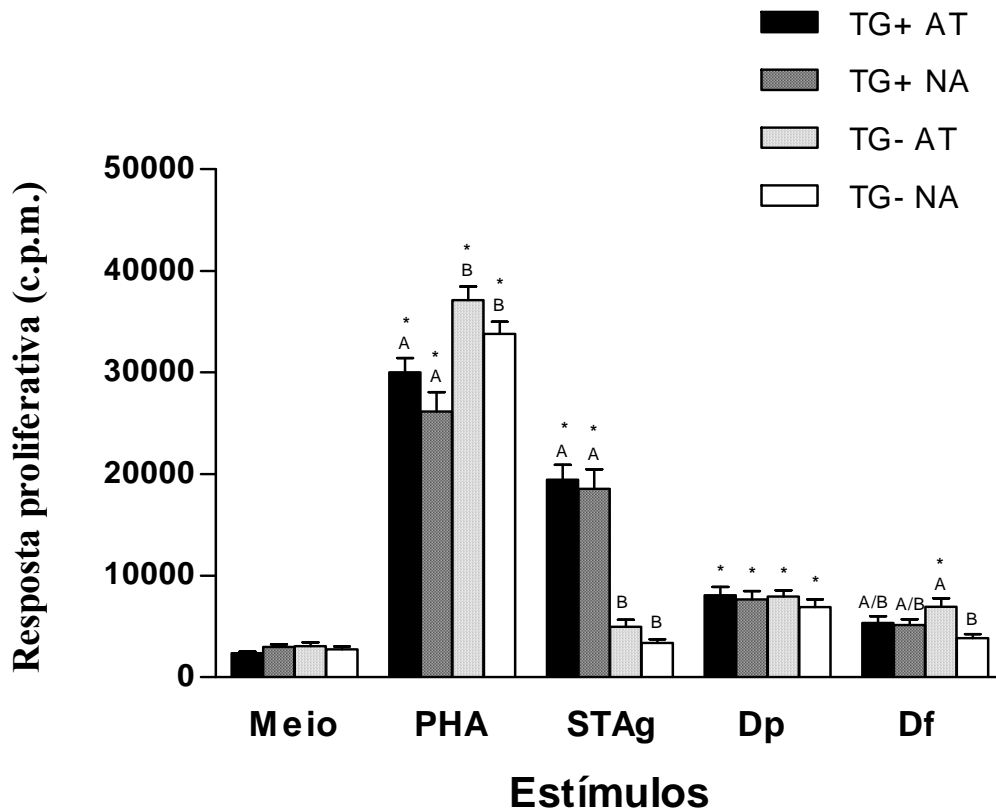


Figura 5. Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico de 40 pacientes distribuídos uniformemente em quatro grupos: soropositivos a *T. gondii* atópicos (TG+ AT), soropositivos a *T. gondii* não-atópicos (TG+ NA), soronegativos a *T. gondii* atópicos (TG- AT) e soronegativos a *T. gondii* não-atópicos (TG- NA). Células foram estimuladas com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA; 5 µg/mL) ou antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg; 10 µg/mL) ou extratos alergênicos de *D. pteronyssinus* (Dp; 10 µg/mL) e *D. farinae* (Df; 10 µg/mL). Dados são expressos em média e erro padrão da média (SEM). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para cada estímulo. *Diferença significativa em relação ao meio (controle) para cada grupo ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn).

4.7 Perfil de citocinas

Níveis das citocinas IFN- γ , IL-5 e IL-10 foram mensuradas em sobrenadantes de cultura de PBMCs estimuladas com o antígeno de *T. gondii* (STAg), extratos alergênicos de ácaros (Dp e Df) ou controles positivo (PHA) e negativo (meio) (Figura 6).

Após estimulação com STAg, níveis de IFN- γ foram significativamente elevados e maiores nos grupos TG+, atópicos e não-atópicos, em relação aos grupos TG- ($p < 0,0001$). Após os estímulos com Dp ou Df, os níveis de IFN- γ foram baixos com nenhuma diferença significativa entre os grupos de pacientes em relação ao meio ($p > 0,05$) (Figura 6A). Por outro lado, após estimulação mitogênica, todos os grupos mostraram níveis significativamente elevados de IFN- γ em relação ao meio ($p < 0,0001$), sem diferenças significativas entre os grupos.

Baixos níveis de IL-5 foram detectados após estimulação com STAg, embora significativamente maiores nos grupos TG+, atópicos e não-atópicos, em relação aos grupos TG- ($p<0,05$) (Figura 6B). Por outro lado, após estimulação com Dp, níveis de IL-5 foram mais altos e significativamente maiores nos grupos de pacientes atópicos em relação aos não-atópicos, independente da soropositividade a *T. gondii*, bem como em relação ao meio ($p<0,01$). Resultados similares foram observados após estimulação com Df, embora com menores níveis de IL-5 quando comparado com aqueles detectados após a estimulação com Dp ($p<0,05$). Após estimulação com PHA, todos os grupos mostraram níveis significativamente elevados de IL-5 em relação ao meio ($p<0,0001$), sem diferenças significativas entre os grupos.

Altos níveis de IL-10 foram detectados após estimulação com Df em todos os grupos de pacientes em relação ao meio ($p<0,0001$), embora com menores níveis no grupo de pacientes atópicos TG- em relação ao TG+ ($p<0,05$) (Figura 6C). Após estimulação com STAg, níveis de IL-10 foram significativamente maiores nos pacientes dos grupos TG+, atópicos e não-atópicos, em relação ao grupo de atópicos TG- bem como em relação ao meio ($p<0,001$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos após estimulação com Dp ou PHA ($p>0,05$), embora todos os grupos mostrassem níveis elevados de IL-10 em relação ao meio ($p<0,05$).

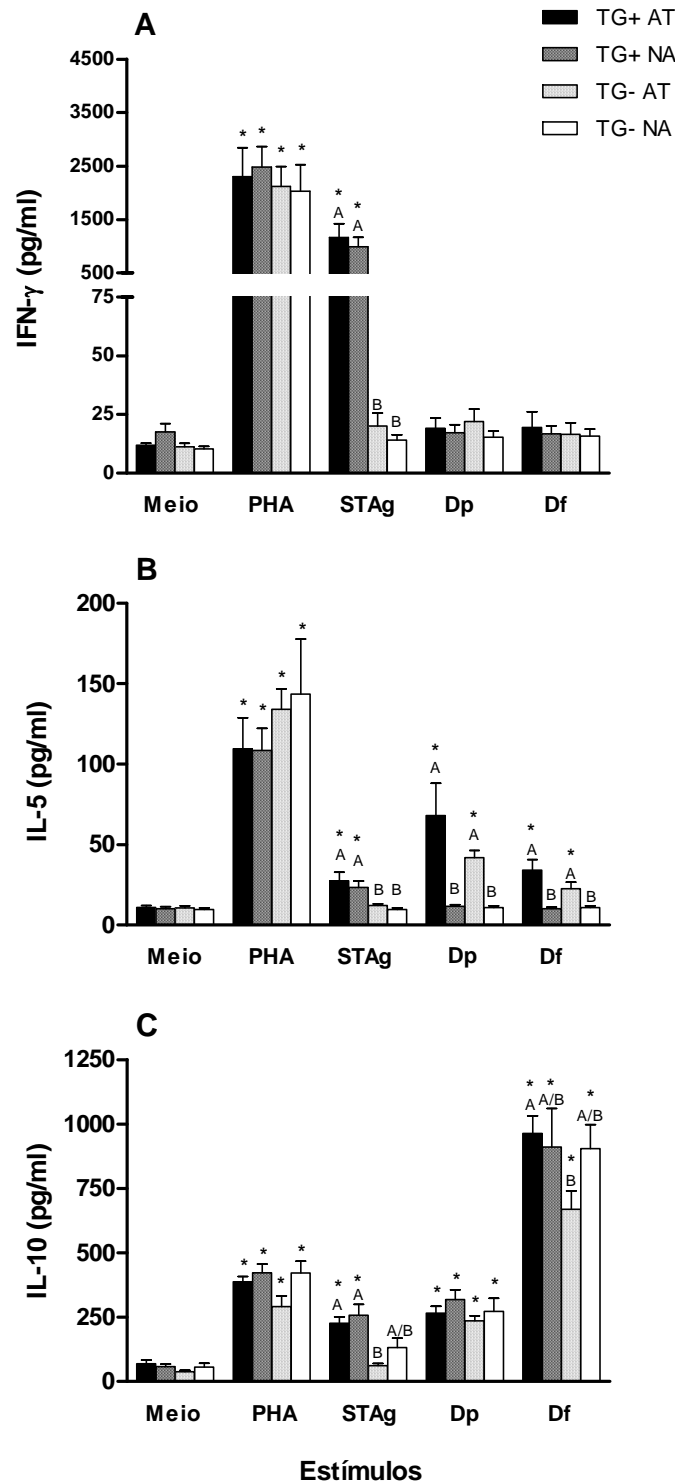


Figura 6. Níveis de IFN- γ (A), IL-5 (B) e IL-10 (C) em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico de 40 pacientes distribuídos uniformemente em quatro grupos: soropositivos a *T. gondii* atópicos (TG+ AT), soropositivos a *T. gondii* não-atópicos (TG+ NA), soronegativos a *T. gondii* atópicos (TG- AT) e soronegativos a *T. gondii* não-atópicos (TG- NA). Células foram estimuladas com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA; 5 μ g/mL) ou antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg; 10 μ g/mL) ou extratos alergênicos de *D. pteronyssinus* (Dp; 10 μ g/mL) e *D. farinae* (Df; 10 μ g/mL). Dados são expressos em média e erro padrão da média (SEM). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para cada estímulo. *Diferença significativa em relação ao meio (controle) para cada grupo ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn).

5. DISCUSSÃO

A crescente prevalência de doenças alérgicas como asma, rinite alérgica e dermatite atópica observada em países ocidentais, nas últimas décadas, tem sido associada à complexa interação de fatores genéticos e ambientais relacionados com os estilos de vida modernos (GARN; RENZ, 2007). Populações de áreas urbanizadas apresentam maiores índices de sensibilização a ácaros da poeira domiciliar e fungos que aquelas de áreas tipicamente rurais, reforçando a hipótese da influência da poluição urbana no aumento de alergias respiratórias (GALVÃO; KALIL; CASTRO, 2002).

Outro fator que tem merecido especial atenção enfoca o uso indiscriminado de antibióticos nos primeiros anos de vida. A colonização do trato gastrointestinal por bactérias comensais é pré-requisito para o desenvolvimento normal da resposta imune local e sistêmica. A diminuição da flora bacteriana intestinal está associada com resposta imune alterada e predominância de respostas antiinflamatórias do tipo Th2 (GORE; CUSTOVIC, 2004; VERCELLI, 2006). Desta forma, há crescente evidência, embora não conclusiva, a favor da hipótese da higiene, relacionando altos padrões sócio-econômicos de vida e condições higiênicas com menor exposição a infecções e componentes microbianos, e conseqüentemente, com um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças alérgicas.

As infecções do trato gastro-intestinal parecem desempenhar um papel protetor no desenvolvimento de alergias e *T. gondii* é um candidato considerado como marcador de precária higiene e associado com uma menor prevalência de doenças alérgicas devido às suas características peculiares: (1) é um protozoário intracelular obrigatório com distribuição mundial; (2) a infecção pelo parasito induz uma forte imunidade mediada por células caracterizada por respostas Th1 altamente polarizadas em estágios precoces que se mantêm durante a infecção crônica; e (3) a resposta imune é geralmente predominante e direciona o tipo de resposta em co-infecções com outros parasitos (FENOY et al., 2009).

No presente estudo, nós avaliamos a associação entre atopia e infecção por *T. gondii*, analisando as respostas imunes humoral e celular em quatro grupos de indivíduos de acordo com marcadores de alergia e infecção. A soropositividade a *T. gondii* de 42% na população estudada, particularmente em grupos com maior faixa etária e independente do gênero, está em concordância com relatos anteriores estimando que aproximadamente 1/3 da população mundial está infectada e refletindo a maior exposição ao parasito com o avançar da idade (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; SILVEIRA-LACERDA et al., 2005).

Analisando os marcadores de alergia entre os indivíduos soropositivos e soronegativos a *T. gondii*, a maior porcentagem de TCP positivo aos alérgenos de ácaros (Dp e Df) no grupo de pacientes TG- indica a associação negativa entre atopia e infecção por *T. gondii* na população em estudo. Da mesma forma, os resultados de IgE sérica específica aos alérgenos Dp e Df mostrando uma maior sensibilização aos ácaros no grupo de pacientes TG- reforça a relação inversa entre a infecção por este microrganismo e a sensibilização alérgica. Como esperado, níveis séricos de IgE total em pacientes atópicos foram maiores que em não-atópicos. Entretanto, a resposta de IgE sérica total não mostrou diferenças significativas entre os indivíduos soropositivos e soronegativos a *T. gondii*, indicando que a infecção pelo parasito parece não exercer influência sobre os níveis de IgE sérica total, ao contrário do que foi observado com IgE sérica específica aos alérgenos de ácaros. Estudos têm demonstrado que indivíduos infectados por *T. gondii* podem produzir anticorpos IgE específicos ao parasito na fase aguda da infecção, sem provocar alterações significativas nos níveis de IgE sérica total (VILLENA et al., 1999; FOUDRINIER et al., 2003). Portanto, a resposta de IgE sérica total não mostrou ser bom indicador para qualquer associação entre atopia e infecção na população em estudo.

Analisando os marcadores de infecção entre os indivíduos atópicos e não-atópicos, a resposta imune humoral contra *T. gondii* mostrando maiores níveis de IgG específica ao parasito e maior soropositividade entre indivíduos não-atópicos enfatiza que a presença de um marcador sorológico de infecção crônica na toxoplasmose foi inversamente relacionada à sensibilização alérgica. Neste contexto, ficou evidente a maior proporção de não-atópicos que atópicos entre indivíduos do grupo TG+, enquanto esta diferença não foi encontrada entre os indivíduos do grupo TG-. Em uma análise global, os pacientes atópicos predominaram no grupo TG-, enquanto os indivíduos Tg-soropositivos predominaram no grupo de não-atópicos. Estes achados reforçam que a infecção pelo parasito e o tipo de resposta imune induzida por um patógeno gastrointestinal como *T. gondii* podem exercer efeitos inibitórios sobre a indução de sensibilização alérgica a ácaros da poeira domiciliar.

Resultados contraditórios têm sido relatados em diversos estudos epidemiológicos enfocando a associação entre a infecção por *T. gondii* e doenças atópicas (BODNER et al., 2000; MATRICARDI et al., 2000, 2002; LINNEBERG et al., 2003; RADON et al., 2004; BIRGISDOTTIR et al., 2006; JANSON et al., 2007). Nossos achados concordam com aqueles relatos de menor prevalência de infecção por *T. gondii* em pacientes atópicos quando comparado com não-atópicos (MATRICARDI et al., 2000, 2002; LINNEBERG et al., 2003; JANSON et al., 2007; ELLERTSEN; HETLAND; LOVIK, 2008), reforçando a hipótese que

maior exposição a *T. gondii* reduz a sensibilização em nível populacional. Por outro lado, outros estudos não encontraram qualquer associação entre soropositividade a *T. gondii* e atopia (BODNER et al., 2000; RADON et al., 2004; BIRGISDOTTIR et al., 2006). Uma provável explicação para estes achados contraditórios pode estar na seleção dos critérios utilizados para definição de atopia (ELLERTSEN; HETLAND; LOVIK, 2008). Como a prevalência de doenças alérgicas respiratórias aumenta linearmente com o aumento nos níveis de IgE sérica específica (SIMPSON et al., 2005), a utilização de maiores valores de *cut off* para IgE específica permite melhor associação com alta probabilidade de atopia. No presente estudo, atopia foi definida pela presença concomitante de TCP e ELISA-IgE positivos aos alérgenos de Dp e Df, com valores de IE > 1,2, ou seja, 20% acima dos valores limítrofes do *cut off*. Do mesmo modo, os relatos concordantes aos nossos resultados utilizaram altos valores de IgE específica (> 3,49 kU/l, classes 3-6; Phadiatop, Pharmacia Diagnostics).

Outras possíveis diferenças entre os estudos têm sido relacionadas com a idade e o gênero dos pacientes analisados. No presente estudo, nós analisamos indivíduos adultos de ambos os gêneros, com alta soropositividade a *T. gondii* (42%) e crescente com a idade. Por outro lado, um recente estudo analisou recrutas militares jovens (ao redor de 20 anos de idade), preferencialmente do gênero masculino e com baixa soropositividade a *T. gondii* (8%) (ELLERTSEN; HETLAND; LOVIK, 2008). Entretanto, em ambos os estudos, os resultados foram concordantes, mostrando uma associação inversa entre atopia e infecção, indicando que a maior prevalência de infecção por *T. gondii* em pacientes não-atópicos não depende de gênero ou idade. Tal fato pode ser atribuído às características típicas da resposta imune humoral a *T. gondii* em induzir imunidade de longa duração.

Analisando a resposta imune celular, uma forte resposta proliferativa associada com elevada síntese de IFN- γ foi observada após estimulação com STAg somente nos grupos de pacientes soropositivos a *T. gondii*, independente de serem atópicos ou não-atópicos. Estes achados demonstram uma predominância da imunidade dependente de células T específicas ao parasito, caracterizada por uma resposta imune polarizada do tipo Th1 com produção de altos níveis de IFN- γ mesmo na fase crônica da infecção (DENKERS; GAZZINELLI; MARTIN, 1993). Recentemente, foi demonstrada evidência experimental da hipótese que *T. gondii* contribui na proteção contra atopia em modelo murino de inflamação alérgica, verificando que ambas as infecções aguda e crônica bloqueiam o desenvolvimento de inflamação das vias aéreas, estando relacionado a altas concentrações de citocinas do tipo Th1 (FENOY et al., 2009). Por outro lado, a sensibilização alérgica também parece exercer efeitos inibitórios na resposta imunológica ao parasito, como foi relatado em um estudo

anterior realizado pelo nosso grupo (WELTER et al., 2006). Os autores demonstraram a interferência de respostas imunes Th2 induzidas pela infecção por *Myocoptes musculus*, um ácaro da sarna de camundongos, no resultado da infecção experimental com *T. gondii*. Neste modelo murino de alta susceptibilidade à infecção por *T. gondii* com uma vigorosa produção de resposta imune Th1, foi observado que a coinfeção com *M. musculus* e *T. gondii* prolongou a sobrevivência e melhorou as lesões intestinais, em associação com queda significativa nos níveis séricos de IFN- γ , sugerindo interações imunomoduladoras entre os organismos não-relacionados (WELTER et al., 2006).

No presente estudo, as citocinas típicas do perfil Th2 como IL-5 prevaleceram nos grupos de atópicos comparado aos não-atópicos, independente da soroprevalência a *T. gondii*. A estimulação com os alérgenos Dp ou Df induziu fraca resposta proliferativa em todos os grupos de pacientes, embora o alérgeno Df foi capaz de induzir significantes respostas proliferativas somente em pacientes atópicos soronegativos a *T. gondii*. Estes achados poderiam refletir a utilização de concentrações sub ótimas de alérgenos de ácaros para estimulação *in vitro*, principalmente para o alérgeno Dp. Entretanto, níveis significantes de IL-5 foram produzidos após estimulação com o alérgeno Dp e, em menor extensão ao alérgeno Df, somente nos grupos de pacientes atópicos, independente da soropositividade a *T. gondii*. Estes achados indicam que células de pacientes atópicos estão prontas a produzir citocinas do perfil Th2 após re-estimulação alérgênica (HALES et al., 2008), mesmo na presença de infecções concomitantes. Além disso, pacientes soropositivos a *T. gondii* também produziram níveis detectáveis de IL-5 em resposta ao STAg, embora seja evidente a alta razão IFN- γ /IL-5 após estimulação antigênica específica.

A resposta de citocinas reguladoras como IL-10 foi evidenciada em todos os grupos, marcadamente após estimulação com o alérgeno Df. Estudos têm demonstrado que PBMC de pacientes atópicos produzem maiores níveis de IL-10 que os não-atópicos após re-estimulação alérgênica (HALES et al., 2008). Por outro lado, análises *in vitro* encontraram maior proporção de células produtoras de IL-10 em indivíduos não-atópicos comparado aos atópicos após 12 horas de estimulação alérgênica (AKDIS et al., 2004). Portanto, resultados contraditórios podem ser devido aos diferentes tempos de estimulação e de detecção das citocinas nos sobrenadantes de cultura. Adicionalmente, no presente estudo, células de pacientes soropositivos a *T. gondii* também produziram maiores níveis de IL-10 que os Tg-soronegativos após estimulação com STAg, confirmando relatos anteriores que a infecção por *T. gondii* não induz a produção apenas de IFN- γ , mas também de IL-10 com atividades reguladoras (JANKOVIC et al., 2007). Como as respostas inflamatórias de células Th1 para

eliminar patógenos intracelulares podem causar imunopatologias, IL-10 parece controlar estes efeitos deletérios. Neste contexto, infecções podem proteger contra o desenvolvimento de alergias por induzir a produção de citocinas reguladoras como IL-10 e TGF- β , que controlam ambas as respostas Th1 e Th2, reduzindo as manifestações de patologias e danos ao hospedeiro (ROBINSON; LARCHÉ; DURHAM, 2004; ROMAGNANI, 2006). Além disso, níveis de IL-10 têm sido correlacionados inversamente com a incidência ou gravidade de doenças alérgicas (AKDIS et al., 2004). Vale destacar, entretanto, que no presente estudo, os indivíduos definidos como atópicos não apresentavam sintomas clínicos de reação alérgica no momento das análises e, portanto, a associação inversa entre infecção e atopia pode ser mais representativa para a prevenção da sensibilização e reduzida para a doença clínica (ELLERTSEN; HETLAND; LOVIK, 2008). Os mecanismos imunológicos envolvidos nesse efeito protetor da exposição a infecções permanecem ainda controversos. Eles poderiam ser mediados, pelo menos em parte, por citocinas do tipo Th1 como IFN- γ , induzidas pelos patógenos, levando a alterações no balanço Th2/Th1, mas o papel de citocinas reguladoras como IL-10 não deve ser negligenciado.

Em conclusão, uma associação negativa entre atopia e infecção por *T. gondii* foi evidenciada pela primeira vez na população de Uberlândia, MG, Brasil, demonstrando que a presença da infecção pelo parasito pode influenciar negativamente mais na indução da sensibilização alérgica do que no desencadeamento de respostas alérgicas. Assim, este estudo vem reforçar o papel protetor de infecções no desenvolvimento de doenças alérgicas e contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos participantes na resposta imunoreguladora a aeroalérgenos.

6. CONCLUSÕES

- A associação negativa entre atopia e infecção por *T. gondii* foi evidenciada pela primeira vez na população de Uberlândia, MG, Brasil.
- A resposta imune celular avaliada por respostas proliferativas e produção de citocinas após estimulação antigênica ou alérgica específicas demonstrou que a síntese de citocinas do perfil Th1 como IFN- γ predominou nos grupos de pacientes soropositivos a *T. gondii*, independente de serem atópicos ou não-atópicos.
- As citocinas do perfil Th2 como IL-5 prevaleceram nos grupos de atópicos comparado aos não-atópicos, independente da soropositividade a *T. gondii*.
- A resposta de citocinas reguladoras como IL-10 foi evidenciada em todos os grupos, marcadamente após estimulação com o alérgeno de *D. farinae*.
- A presença da infecção por *T. gondii* parece influenciar negativamente mais na indução da sensibilização alérgica do que no desencadeamento de respostas alérgicas, reforçando o papel protetor desta infecção no desenvolvimento de doenças alérgicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6 ed. Philadelphia, USA: Saunders, 2008. 562 p.
- ADAMS, V.C.; HUNT, J.R.; MARTINELLI, R.; PALMER, R.; ROOK, G.A.; BRUNET, L.R. *Mycobacterium vaccae* induces a population of pulmonary CD11c⁺ cells with regulatory potential in allergic mice. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 34, n. 3, p. 631-638, Fev. 2004.
- AKDIS, M.; VERHAGEN, J.; TAYLOR, A.; KARAMLOO, F.; KARAGIANNIDIS, C.; CRAMERI, R.; THUNBERG, S.; DENIZ, G.; VALENTA, R.; FIEBIG, H.; KEGEL, C.; DISCH, R.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 199, n. 11, p. 1567–75, Jun, 2004.
- ALMEIDA, K. C.; SILVA, D. A. O; GENNARI-CARDOSO, M. L.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Responses of IgE, IgG1 and IgG4 to concanavalin A-binding *Blomia tropicalis* antigens in allergic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 39, p. 1445-1454, Nov. 2006.
- AMBROISE-THOMAS, P.; PELLOUX, H. Toxoplasmosis – Congenital and in immunocompromised patients: a parallel. **Parasitology Today**, Amsterdam v. 9, n. 2, p. 61-63, Fev. 1993.
- ARLIAN, L.G.; BERNSTEIN, D.; BERNSTEIN, I.L.; FRIEDMAN, S.; GRANT, A.; LIEBERMAN, P.; LOPEZ, M.; METZGER, J.; PLATTS-MILLS, T.; SCHATZ, M. Prevalence of dust mites in the homes of people with asthma living in eight different geographic areas of the United States. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 90, n. 3, p. 292-300, Set. 1992.
- ARRUDA, L. K.; RIZZO, M. C.; CHAPMAN, M. D.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; BAGGIO, D.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; NASPITZ, C. K. Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 433-439, Jul. 1991.
- BABU, K.S.; ARSHAD, S.H. The role of allergy in the development of airway inflammation in children. **Paediatric Respiratory Reviews**, London, v. 4, n. 1, p. 40-46, Mar. 2003.

BEASLEY, R.; CRANE, J.; LAI, C. K.; PEARCE, N. Prevalence and etiology of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 105, n. 2, p. 466-472, Fev. 2000.

BIRGISDÓTTIR, A.; ASBJÖRNSDÓTTIR, H.; COOK, E.; GISLASON, D.; JANSSON, C.; OLAFSSON, I.; GISLASON, T.; JOGI, R.; THJODLEIFSSON, B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Sweden, Estonia and Iceland. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v. 38, n. 8, p. 625-631, Ago. 2006.

BRAUN-FAHRLANDER, C.; GASSNER, M.; GRIZE, L.; NEU, U.; SENNHAUSER, F.H.; VARONIER H.S.; VUILLE, J.C.; WUTHRICH, B. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 28-34, Jan. 1999

BODNER, C.; ANDERSON, W. J.; REID, T. S.; GODDEN, D. J. Childhood exposure to infection and risk of adult onset wheeze and atopy. **Thorax**, London, v. 55, p. 383-7, Mai, 2000.

BOQUETE, M.; IRAOLA, V.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; VILLAROEL, L. A.; CARBALLADA, F. J.; de la CUESTA, C. G.; LOPEZ-RICO, M. R.; ORJALES, R. N.; PARRA, A.; SOTO-MERA, M. T.; VARELA, S.; VIDAL, C. House Dust Mite Species and Allergen Levels in Galicia, Spain: a Cross-Sectional, Multicenter, Comparative Study. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**; Barcelona, v. 16, n. 3, p. 169-176, Mai/Jun. 2006.

BOUSQUET, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; KHALTAEV, N. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA). **Allergy**, Copenhagen. v. 57, n. 9, p. 841-855, Set. 2002.

CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidez de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 213-218, Mai/Jun. 1991.

CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; MINEO, J. R.; TAKIGUTI, C. K.; NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infection and Immunity**, Washington, v. 21, n.1, p. 55-58, Jul. 1978.

COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, London, v. 402, n. 25, p. 5-11, Nov. 1999.

COUPER, K. N.; ROBERTS, C. W.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J.; JOHNSON, L. L. *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin M Limits Parasite Dissemination by Preventing Host Cell Invasion. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 73, n. 12, p. 8060-8068, Dez. 2005.

CROMWELL, O. Biochemistry of allergens. In: KAY, A. B. **Allergy and allergic diseases**, Oxford, 1. ed., v. 2, p. 797-810, 1997.

CUNHA, S.S.; CRUZ, A.A.; DOURADO, I.; BARRETO, M.L.; FERREIRA, L.D.; RODRIGUES, L.C. Lower prevalence of reported asthma in adolescents with symptoms of rhinitis that received neonatal BCG. **Allergy**, v.59, n.8, p.857-862, Jul. 2004.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; MARTIN, D. Emergence of NK1.1+ cells as effectors of IFN- γ dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class 1-deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 178, n. 5, p. 1465-1472, Nov. 1993.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, Jul. 1998.

ELLERSTEN, L. K.; HETLAND, G.; LOVIK, M. Specific IgE to Respiratory Allergens and IgG Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Streptococcus pneumoniae* in Norwegian Military Recruits, **Clinical Immunology**, St. Louis, v. 67, n. 5, p. 496-500, Mai, 2008.

FENOY, I.; GIOVANNONI, M.; BATALLA, E.; MARTIN, V.; FRANK, F. M.; PIAZZON, I.; GOLDMAN, A. *Toxoplasma gondii* infection blocks the development of allergic airway inflammation in BALB/c mice. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 275-284, Fev. 2009.

F. FOU DRINIER, I. VILLENA, R. JAUSSAUD, D. AUBERT, C. CHEMLA, F. MARTINOT, J. M. PINON, Clinical Value of Specific Immunoglobulin E Detection by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Cases of Acquired and Congenital Toxoplasmosis, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 4, p. 1681-1686, Abr. 2003.

GALLI, S. J.; LANTZ, C. S. Allergy. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, p. 1127-1174, 1999.

GALVÃO, C. E. S.; KALIL J.; CASTRO F. F. M. Sensibilização a aeroalérgenos em dois grupos escolares nas zonas rural e urbana de São Paulo, Brasil, **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 02-09, Jan/Fev. 2002.

GARN, H.; RENZ, H. Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 212, n. 6; p. 441-452, Jun, 2007.

GAZZINELLI, R. T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER, A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ cells and accompanied by over production of IL-12, IFN- γ and TNF- α . **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 2, p. 798-805, Jul. 1996.

GELBER, L. E.; SELTZER, L. H.; BOUZOUKIS, J. K.; POLLART, S. M.; CHAPMAN, M. D.; PLATTS-MILLS, T. A. Sensitization and exposure to indoor allergens as risk factors for asthma among patients presenting to hospital. **The American Review of Respiratory Disease**, New York, v. 147, n. 3, p. 573-78, Mar. 1993.

GORE, C.; CUSTOVIC, A. Protective parasites and medicinal microbes? The case for hygiene hypothesis, **Primary care respiratory journal**, Edgbaston, v. 13, n. 2, p. 68-75, Jun. 2004.

HALES, B. J.; PEARCE, L. J.; KUSEL, M. M. H.; HOLT, P. G.; SLY, P. D.; THOMAS, W. R. Differences in the antibody response to a mucosal bacterial antigen between allergic and non-allergic subjects. **Thorax**, London, v. 63, n. 3.; p. 221-227, Mar, 2008.

HART, B. J.; CROWTHER, D.; WILKINSON, T.; BIDDULPH, P.; UCCI, M.; PRETLOVE, S.; RIDLEY, I.; ORESZCZYN, T. Reproduction and Development of Laboratory and Wild House Dust Mites (Acari: Pyroglyphidae) and Their Relationship to the Natural Dust Ecosystem. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 44, n. 4, p. 568-574, Jul. 2007.

HERZ, U.; LACY, P.; RENZ, H.; ERB, K. The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 12, n. 6, p. 632-640, Dec. 2000.

INFANTE-DUARTE, C.; HORTON, H. F.; BYRNE, M. C.; KAMRADT, T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 165, n. 11, p. 6107-6115, Dez. 2000.

ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: The international study of asthma and allergies in childhood (ISAAC) steering committee. **Lancet**, London, v. 351, n. 9111, p. 1225-1232, Apr. 1998.

JANKOVIC, D.; KULLBERG, M. C.; FENG, C. G.; GOLDSZMID, R. S.; COLLAZO, C. M.; WILSON, M.; WYNN, T. A.; KAMANAKA, M.; FLAVELL, R. A.; SHER, A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 204, n. 2, p. 273-283, Fev. 2007.

JANSON, C.; ASBJORNSDOTTIR, H.; BIRGISDOTTIR, R. B.; GUNNBJÖRNSDOTTIR, M.; GISLASON, D.; OLAFSSON, I.; COOK, E.; JÖGI, R.; GISLASON, T.; THJODLEIFSSON, B. The effect of infectious burden on the prevalence of atopy and respiratory allergies in Iceland, Estonia, and Sweden, **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 120, n. 3, p. 673-679, Jun, 2007.

JANSON, C.; LUDVIKSDOTTIR, D.; GUNNBJÖRNSDOTTIR, M.; BJÖRNSSON, E. H.; HAKANSSON, L.; VENGE, P. Circulating adhesion molecules in allergic and non-allergic asthma. **Respiratory Medicine**, London, v. 99, n. 1, p. 45-51, Jan, 2005.

JIMÉNEZ, S.; PUERTA, L.; MENDOZA, D.; CHUA, K. Y.; MERCADO, D.; CARABALLO, L. IgE Antibody Responses to Recombinant Allergens of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in a Tropical Environment. **Allergy and Clinical Immunology International**, Göttingen, v. 19, n. 6, p. 233-238, Nov. 2007.

JOHANSSON, S. G. O.; O'B-HOURUHANE, J.; BOUSQUET, J.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; DREBORG, S.; MYGIND, N.; RING, J.; VAN CAUWENBERGE, P.; VAN HAGE-HAMSTEN, M.; WÜTHRICH, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, Copenhagen, v. 56, n. 9, p. 813-824, Set. 2001.

JOHNSON, C. C.; OWNBY, D. R.; ALFORD, S. H.; HAVSTAD, S. L.; WILLIAMS, L. K.; ZORATTI, E. M.; PETERSON, E. L.; JOSEPH, C. L. M. Antibiotic exposure in early infancy and risk for childhood atopy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 115, n. 6, p. 1218-1224, Abr. 2005.

KASPER, L. H.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii* and Toxoplasmosis. In: Warren, K.S. **Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections**. Cambridge: Blackwell, p. 269-295, 1993.

KHAN, I. A.; MATSSURA, T.; KASPER, L. H. IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 185-195, Abr. 1995.

KONDO, Y.; MATSUSE, H.; MACHIDA, I.; KAWANO, T.; SAEKI, S.; TOMARI, S.; OBASE, Y.; FUKUSHIMA, C.; KOHNO, S. Effects of primary and secondary low-grade

respiratory syncytial virus infections in a murine model of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1307-1313, Ago. 2004.

LINNEBERG, A.; OSTERGAARD, C.; TVEDE, M.; ANDERSEN, L. P.; NIELSEN, N. H.; FROLUND, L.; DIRKSEN, A.; JORGENSEN, T. IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: the Copenhagen Allergy Study. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 111, n. 4, p. 847-853, Abr. 2003.

LIPSKA, A.; WYSOCKA, J.; TUROWSKI, D. Immune response and diagnostic aspects during *Toxoplasma gondii* infection. **Wiadomości parazytologiczne**, Warszawa, v. 46, n. 3, p. 315-325, 2000).

LOZANO, C. P.; CANO, J. M.; BONFANTE, L. H. Respuesta proliferativa de células mononucleares de sangre periférica al alérgeno recombinante BtM del ácaro del polvo casero *Blomia tropicalis*. **Allergologia et Immunopathologia**, Madrid, v. 32, n. 5, p. 247-251, Set/Out. 2004.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, Jan. 1951.

MARKS, G.B.; NG, K., ZHOU, J.; TOELLE, B.G.; XUAN, W.; BELOUSOVA, E.G.; BRITTON, W.J. The effect of neonatal BCG vaccination on atopy and asthma at age 7 to 14 years: an historical cohort study in a community with a very low prevalence of tuberculosis infection and a high prevalence of atopic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111, n.3, p.1541-549, Mar. 2003.

MARONE, G. Asthma: recent advances. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 5-9, Jan. 1998.

MATHESON, M. C.; WALTERS, E. H.; SIMPSON, J. A.; WHARTON, C. L.; PONSONBY, A. L.; JOHNS, D. P.; JENKINS, M. A.; GILES, G. G.; HOPPER, J. L.; ABRAMSON, M. J.; DHARMAGE, S. C. Relevance of the hygiene hypothesis to early vs. late onset allergic rhinitis. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 370-378, Jan. 2009.

MATRICARDI, P. M.; ROSMINI, F.; PANETTA, V.; FERRIGNO, L.; BONINI, S. Hay fever and asthma in relation to markers of infection in the United States. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 110, n. 3, p. 381-387, Set. 2002.

MATRICARDI, P. M.; ROSMINI, F.; RIONDINO, S.; FORTINI, M.; FERRIGNO, L. RAPICETTA, M.; BONINI, S. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. **British Medical Journal**, London, v. 320, n. 7232, p. 412-417, Fev. 2000.

MATRICARDI, P. M. Infections preventing atopy: facts and new questions. **Allergy**, Copenhagen, v. 52, n. 9, p. 879-882, Set. 1997.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1ª edição, ed. EDUFU, 2005. p. 81-111.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 27, n. 2, p. 283-287, Fev. 1980.

MIRANDA, R. J.; QUINTERO, D.; ALMANZA, A. House dust mites from urban and rural houses on the lowland Pacific slopes of Panama. **Systematic and Applied Acarology**, London, v. 7, n. 1, p. 23-30, Mar. 2002.

OBOKI, K.; OHNO, T.; SAITO, H.; NAKAE, S. Th17 and allergy. **Allergology International**, Tokyo, v. 57, n. 2, p. 121-134, Jun 2008.

OPPENHEIMER, J.; NELSON, Skin Testing. **Annals of Allergy and Asthma and Immunology**, McLean, v. 96, n. 1, p. 6-12, Fev. 2006.

OWNBY, D. R. Allergy testing: in vitro *versus* in vivo. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 35, n. 5, p. 995-1009, Out. 1988.

PEREIRA, E. A. L.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; ALMEIDA, K. C.; ALVES, R.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. IgE, IgG1, and IgG4 antibody responses to *Blomia tropicalis* in atopic patients. **Allergy**, Copenhagen, v. 60, n. 3, p. 401-406, Mar. 2005.

PICCIRILLO, C. A.; LETTERIO, J. J.; THORNTON, A. M.; McHUGH, R. S.; MAMURA, M.; MIZUHARA, H.; SHEVACH, E. M. CD24+CD25+ regulatory T cells mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor 1 production and responsiveness. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 196, n. 2, p. 237-245, Jul. 2002.

PLATTS-MILLS, T. A. E. How environment affects patients with allergic disease: Indoor allergens and asthma. **Annals of Allergy**, McLean, v. 72, n. 4, p. 381-384, Abr. 1994.

PLATTS-MILLS, T. A. E.; SOLOMON, W. R. Aerobiology and inhalant allergens. In: MIDDLETON, E. Jr.; REED, C. E.; ELLIS, E. F.; ADKINSON, N. F. Jr.; YUNGINGER, J. W.; BUSSE, W. W. **Allergy: principles and practice**, 4. ed. St. Louis: Mosby-Year Book, p. 469-528, 1993.

POLLART, S. M.; WARD G. W. Jr.; PLATTS-MILLS, T. A. E. House dust sensitivity and environmental control. **Immunology Allergy Clinical North America** Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 591-603, Set. 1987.

RADON, K.; WINDSTETTER, D.; ECKART, J.; DRESSEL, H.; LEITRITZ, L.; REICHERT, J.; SCHMID, M.; PRAML, G.; SCHOSSER, M.; VON MUTIUS, E.; NOWAK, D. Farming exposure in childhood, exposure to markers of infections and the development of atopy in rural subjects. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1178-1183, Ago. 2004.

RIEDLER, J.; BRAUN-FAHRLÄNDER, C.; EDER, W.; SCHREUER, M.; WASER, M.; MAISCH, S.; CARR, D.; SCHIERL, R.; NOWAK, D.; VON MUTIUS, E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. **The Lancet**, London, v. 358, n. 9288, p. 1129-1133, Out. 2001.

ROBINSON, D. S.; LARCHÉ, M.; DURHAN, S. R. Tregs and allergic disease. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Harbor, v. 114, n. 10, p. 1389-1397, Nov, 2004.

ROMAGNANI, S. Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders? **Allergy**, Copenhagen, v. 61, n. 1, p. 3-14, Jan. 2006.

ROTHOVA, A. Ocular involvement in toxoplasmosis. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 77, n. 6, p. 371-377, Jun. 1993.

SAYERS, I.; SEVERN, W.; SCANGA, C.B.; HUDSON, J.; LE GROS, G.; HARPER, J.L. Suppression of allergic airway disease using mycobacterial lipoglycans. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 114, n. 2, p. 302-309, Ago. 2004.

SELTZER, J. Biological contaminants. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 94, n. 2, p. 318-326, Aug. 1994.

SHEIKH, A.; STRACHAN, D. P. The Hygiene theory: fact of fiction? **Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, Philadelphia, v. 12, n. 3, p. 232-236, Jun. 2004.

SILVA, D. A. O.; GERVÁSIO, A. M.; SOPELETE, M. C.; ARRUDA-CHAVES, E.; ARRUDA, L. K.; CHAPMAN, M. D.; SUNG-SANG, J. S.; TAKETOMI, E. A. A sensitive reverse ELISA for the measurement of specific IgE to Der p 2, a major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, McLean, v. 86, n. 5, p. 545-550, Mai. 2001.

SILVEIRA, C.; BELFORT, R.; BURNIER, M.; NUSSENBLATT, R. Acquired toxoplasmic infection as the cause of toxoplasmic retinochoroiditis in families. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 106, n. 3, p. 362-364, Set. 1988.

SILVEIRA-LACERDA, E. P.; MACHADO, E. R.; ARANTES, S. C. F.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R. IgG and IgM antibody prevalence to *T. gondii* in blood donors of the Hemocentro Regional de Uberlândia, MG, Brazil, **Transfusion today**, Belo Horizonte, v. 63, n. 2, p. 25, Fev. 2005.

SIMPSON, A.; SODERSTROM, L.; AHRISTEDT, S.; MURRAY, C. S.; WOODCOCK, A.; CUSTOVIC, A.; IgE antibody quantification and the probability of wheeze in preschool children. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 116, n. 4, p. 744-749, Out, 2005.

SKONER, D. P. Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**; St Louis, v. 108, n. 1, p. s2-s8, Jul. 2001.

SLUNT, J. B.; TAKETOMI, E. A.; WOODFOLK J. A.; HAYDEN, M. L.; PLATTS-MILLS, T. A. E. The immune response to *Trichophyton tonsurans*: distinct T cell cytokine profiles to a single protein among subjects with immediate and delayed hypersensitivity. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 157, n. 11, p. 5192-5197, Dec. 1996.

SLY, R. M. Changing prevalence of allergic rhinitis and asthma. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 82, n. 3, p. 233-248, Mar. 1999.

SOARES, F. A. A.; SEGUNDO, G. R. S.; ALVES, R.; YNOUE, L. H.; RESENDE, R. O.; SOPELETE, M. C.; SILVA, D. A. O.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Perfil de sensibilização a alérgenos domiciliares em pacientes ambulatoriais. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 25-28, Fev. 2007.

SOLÉ, D.; CAMELO-NUNES, I. C.; VANA, A. T.; YAMADA, E.; WERNECK, F.; DE FREITAS, L. S.; SOLOGUREN, M. J.; BRITO, M.; ROSÁRIO FILHO, N. A.; STEIN, R. T.; NASPITZ, C. K. Prevalence of rhinitis and related-symptoms in schoolchildren from different cities in Brazil. **Allergologia et immunopathologia**, Madrid, v. 32, n. 1, p. 7-12, Jan./Feb. 2004.

SQUILLACE, S. P.; SPORKI, R. B.; RAKES, G.; COUTURE, N.; LAWRENCE, A.; MERRIAM, S.; ZHANG, J.; PLATTS-MILLS, A.E. Sensitization to dust mites as a dominant risk factor for asthma among adolescents living in central Virginia. Multiple regression analysis of a population-based study. **American journal of respiratory and critical care medicine**, New York, v. 156, n. 6, p. 1760-1764, Dec. 2007

STELMACH, I. S.; SMEJDA, K.; JERZYNSKA, J.; STELMACH, W.; MAJAK, P.; STELMACH, P.; KUNA, P. Decreased markers of atopy in children with presumed early exposure to allergens, unhygienic conditions, and infections. **Annals of Allergy, Asthma and Immunology**, Arlington, v. 99, p. 170-177, Abr. 2007.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **British Medical Journal**, London, v. 299, n. 6710, p. 1259-60, Nov, 1989.

SUDO, N.; SAWAMURA, S.; TANAKA, K.; AIBA, Y.; KUBO, C.; KOGA, Y. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 159, n. 4, p. 1739- 1745, Ago, 1997.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 30, n. 12-13, p. 1217-1258, Nov. 2000.

TERRA, S. A.; SILVA, D. A.; SOPELETE, M. C.; MENDES, J.; SUNG, S. J.; TAKETOMI, E. A. Mite allergen levels and acarologic analysis in house dust samples in Uberaba, Brazil. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, Barcelona, v. 14, n. 3, p. 232-237, Sep. 2004.

TOGIAS, A. Unique mechanistic features of allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 105, n. 6, p. S599-S604, Jun. 2000.

TRUJILLO, C.; ERB, K. J. Inhibition of allergic disorders by infection with bacteria or the exposure to bacterial products. **International Journal of Medical Microbiology**, Jen, v. 293, n. 2-3, p. 123-131, Nov. 2004.

VENTURA, M. T.; MUNNO, G.; GIANNOCCARO, F.; ACCETTURA, F.; CHIRONNA, M.; LAMA, R.; HOXHA, M.; PANETTA, V.; FERRIGNO, L.; ROSMINI, F.; MATRICARDI, P. M.; BARBUTI, S.; PRIFTANJI, A.; BONINI, S.; TURSI, A. Allergy, asthma and markers of infections among Albanian migrants to Southern Italy. **Allergy**, Copenhagen, v. 59, n. 6, p. 632-636, Jun. 2004.

VERCELLI, D. Mechanisms of the hygiene hypothesis – molecular and otherwise, **Current Opinion in Immunology**, London, v. 18, n. 6, p. 733-737, Set. 2006.

VILLENA, I.; AUBERT, D.; BRODARD, V.; QUEREUX, C.; LEROUX, B.; DUPOUY, D.; REMY, G.; FOUDRINIER, F.; CHEMLA, C.; GOMEZ-MARIN, J. E.; PINON, J. M. Detection of Specific Immunoglobulin E during Maternal, Fetal, and Congenital Toxoplasmosis, **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 11, p. 3487-3490, Nov. 1999.

VON MUTIUS, E. Infection: friend or foe in the development of atopy and asthma: the epidemiological evidence. **European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 18, n. 5, p. 872-881, Jul. 2001.

VON MUTIUS, E. The rising trends in asthma and allergic disease. **Clinical and experimental allergy**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 45-49, Nov, 1998

WEINER, H. L. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. **Immunology Today**, Amsterdam, v. 18, n. 7, p. 335-343, Jul. 1997.

WANG, Y.; LIU, Y. The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 20, n. 6, p. 697-702, Dez. 2008.

WELTER, A.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; LOURENÇO, E. V.; FERRO, E. A. V.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SILVA, N. M. An opposite role is exerted by the acarian *Myocoptes musculus* in the outcome of *Toxoplasma gondii* infection according to the route of the protozoa inoculation. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 11, p. 2618-2628, Set. 2006.

WHITE, M. V., KALINER, M. A. Mediators of allergic rhinitis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 90, n. 4, p. 699-704, Oct. 1992.

WICKENS, K.; LANE, J. M.; FITZHARRIS, P.; SIEBERS, R.; RILEY, G.; DOUWES, J.; SMITH, T.; CRANE, J. Farm residence and exposures and the risk of allergic diseases in New Zealand children. **Allergy**, Copenhagen, v. 57, n. 12, p. 1171-1179, Dec. 2002.

WOHLLEBEN, G.; MULLER, J.; TATSCH, U.; HAMBRECHT, C.; HERZ, U.; RENZ, H.; SCHMITT, E.; MOLL, H.; ERB, K.J. Influenza A virus infection inhibits the efficient recruitment of Th2 cells into the airways and the development of airway eosinophilia. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 170, n. 9, p. 4601-4611, Mai. 2003.

WORM, M.; HENZ, B. M. Molecular regulations of human IgE synthesis. **Journal of Molecular Medicine**, Amsterdam, v. 75, n. 6, p. 440-447, Jun. 1997.

YAMAMOTO, Y.I.; SHIMIZU, S.H.; CAMARGO, M.E. A novel IgM-indirect hemagglutination test for the serodiagnosis of acute toxoplasmosis. **Journal of Clinical Laboratory Analyses**, New York, v. 5, n. 2, p. 127-132, Jan. 1991.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531

ANÁLISE FINAL Nº 111/07 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU: 056/07

Projeto Pesquisa: "Análise do perfil anticórpico e de citocinas específicos a diferentes frações de ácaros da poeira domiciliar e produção de anticorpos monoclonais"

Pesquisador Responsável: Ernesto Akio Taketomi

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

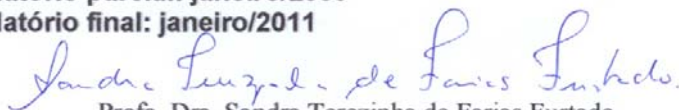
b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Data para entrega do **Relatório parcial: janeiro/2009**

Data para entrega do **Relatório final: janeiro/2011**

13 de abril de 2007.



Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU

Orientações ao pesquisador:

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.

ANEXO 2

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



Instituto de Ciências Biomédicas
 Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
 Av. Pará, 1720 – Campus Umuarama – Bloco 4C – CEP 38400-902 – Uberlândia – MG
 Telefone: (34) 3218-2195 – Fax: (34) 3218-2333

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, concordo em participar do projeto de pesquisa intitulado “**Análise do perfil anticórpico e de citocinas específicos a diferentes frações de ácaros da poeira domiciliar e produção de anticorpos monoclonais**”, cujos principais objetivos são analisar as respostas humoral e celular em pacientes alérgicos e produzir anticorpos monoclonais para uso em diagnóstico e terapia.

Estou ciente de todos os procedimentos abaixo relacionados aos quais serei submetido (a) e que serão realizados na Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica do Laboratório de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Campus Umuarama, Bloco 4C, a saber:

- realização de exames complementares tais como teste cutâneo com alérgenos inaláveis
- necessidade de coleta de sangue para dosagem de anticorpos específicos a aeroalérgenos

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação. Terei a liberdade de me retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar, sem a necessidade prévia de explicações.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.

Uberlândia, _____ de _____ de 200__.

 ASSINATURA

 TESTEMUNHA

ANEXO 3



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas
Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
Av. Pará, 1720, Campus Umuarama - Bloco 4C
Uberlândia, MG - Brasil - 38.400-902
Telefone: (34) 3218-2195 - TELEFAX: (34) 3218-2333

Nome: _____

Data: ___/___/___

Idade: _____ Data de nascimento: ___/___/___

Sexo: () Masculino () Feminino

Grau de escolaridade: () Primeiro grau () Segundo grau () Faculdade

Nível sócio-econômico (renda familiar):

- () até 1 salário mínimo () de 5 a 10 salários mínimos
() de 1 a 2 salários mínimos () mais de 10 salários mínimos
() de 2 a 5 salários mínimos

Questionário 1 (Módulo Asma)

1) Alguma vez na vida você teve sibilos (chiado no peito)?

() Sim () Não

Se você respondeu não, passe para a questão número 6.

2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)?

() Sim () Não

3) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos (chiado no peito) você teve?

- Nenhuma crise ()
1 a 3 crises ()
4 a 12 crises ()
mais de 12 crises ()

4) Nos últimos 12 (doze) meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?

- Nunca acordou com chiado ()
Menos de uma noite por semana ()
Uma ou mais noites por semana ()

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

() Sim () Não

6) Alguma vez na vida você teve asma?

() Sim () Não

7) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito após exercícios físicos?

() Sim () Não

8) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?

() Sim () Não

Questionário 2 (Módulo Rinite)

Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você **não** estava gripado ou resfriado

- 1) Alguma vez na vida você teve problemas com espirros ou coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?
 Sim Não
- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal), ou obstrução nasal, quando não estava gripado ou resfriado?
 Sim Não
- 3) Nos últimos 12 (doze) meses, este problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?
 Sim Não
- 4) Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema nasal ocorreu? (Por favor, marque em qual ou quais meses isto ocorreu).
 Janeiro Maio Setembro
 Fevereiro Junho Outubro
 Março Julho Novembro
 Abril Agosto Dezembro
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por este problema nasal?
Nada
Pouco
Moderado
Muito
- 6) Alguma vez na vida você teve rinite?
 Sim Não

Questionário 3 (Módulo Eczema)

- 1) Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses?
 Sim Não
Se você respondeu não, passe para a questão número 6
- 2) Nos últimos 12 (doze) meses, você teve essas manchas na pele (eczema)?
 Sim Não
- 3) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?
 Sim Não
- 4) Alguma vez essas manchas com coceira na pele (eczema) desapareceram completamente nos últimos doze meses?
 Sim Não
- 5) Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa dessa coceira na pele?
Nunca nos últimos 12 (doze) meses
Menos de uma noite por semana
Uma ou mais noites por semana
- 6) Alguma vez na vida você teve eczema?
 Sim Não

ANEXO 4

Universidade Federal de Uberlândia



Instituto de Ciências Biomédicas
 Unidade de Pesquisa em Alergia e Imunologia Clínica
 Av. Pará, 1720 – Campus Umuarama – Bloco 4C – CEP 38400-902 – Uberlândia – MG
 Telefone: (34) 3218-2195 – Fax: (34) 3218-2333

TESTE CUTÂNEO DE PUNTURA (Ácaros de poeira domiciliar)

Nº	Extrato	Tamanho da pápula (mm)	Tamanho do eritema (mm)
1	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
2	<i>Dermatophagoides farinae</i>		
3	<i>Blomia tropicalis</i>		
4	Controle positivo		
5	Controle negativo		

Valores de referência:

Positivo – diâmetros ortogonais maiores ou iguais a 3 mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Negativo – diâmetros ortogonais menores do que 3 mm, em relação ao controle negativo, medidos a partir do maior diâmetro.

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Responsável técnico