

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM Ciências da Saúde

***“Influência da Intensidade de Infecção pelo Schistosoma mansoni
sobre o Perfil de Marcadores Imunológicos da Resposta Celular e
Humoral na Forma Clínica Intestinal da Esquistossomose”***

por

Haroldo Dutra Lima

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do Título de Mestre em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira

Co-Orientador: Dr. Jeffrey Bethony

maio, 2005

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

CENTRO DE PESQUISAS RENÉ RACHOU

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Esta Dissertação intitulada:

“Influência da Intensidade de Infecção pelo Schistosoma mansoni sobre o Perfil de Marcadores Imunológicos da Resposta Celular e Humoral na Forma Clínica Intestinal da Esquistossomose”

apresentada por

Haroldo Dutra Lima

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Débora Aparecida Negrão-Corrêa

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho

Dissertação defendida e aprovada em 13 de maio de 2005

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmã e amigos do laboratório. À minha amada Nancy, que se fez presente em todos os momentos. A Jesus, sem o qual, nada do que está feito se fez.

Agradecimentos

Rendei graças ao Senhor, invocai o seu nome, fazei conhecidos, entre os povos, os seus feitos... Rendei graças ao Senhor, porque ele é bom; porque a sua misericórdia dura para sempre.

1 Crônicas 16, 8-34

Graças te dou meu Deus, pois, pelas suas misericórdias, sempre derrama bênçãos em minha vida. Em nome de Jesus, tomo posse.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira, meu orientador, que me recebeu muito bem e permitiu a realização deste trabalho sempre em condições excelentes. Obrigado pela confiança, pelo exemplo e pelo relacionamento de amizade.

Ao Dr. Jeffrey M. Bethony, pelo apoio fundamental para a realização deste trabalho.

À Dra. Iramaya Caldas, que sempre se dispôs a auxiliar-me em todos os momentos que precisei.

À Dra. Andréa Teixeira, pela disponibilidade em me ouvir nos momentos em que mais precisei, pela amizade e pelo exemplo profissional e humanitário.

Ao professor Giovanni, pela disponibilidade e atenção e sugestões para este trabalho. É muito importante ter um mentor científico para nos espelhar e guiar-nos em nossos estudos.

À Dra. Juliana Assis, pelo carinho e atenção com que sempre me acolheu.

À amiga Isabela Ribeiro, por todos os ensinamentos dentro do laboratório, sem os quais este trabalho não seria realizado. Você é uma ótima técnica e uma pessoa muito querida por mim.

À amiga Carol Campi, pela paciência e auxílio durante as disciplinas do curso.

Às amigas Vanessa Peruhype, Tiza e Luciana Lisboa, pelo carinho e pela ajuda na realização dos ensaios de CBA.

À amiga Glenda Cardoso, pelos ensinamentos sobre estatística.

Ao Dr. Mauro Teixeira e ao seu aluno Adriano, pela disponibilidade e auxílio nos ensaios de ELISA para quimiocina.

À Clari Gandra, pelo seu carinho, sua disponibilidade, competência e presteza. Você é uma pessoa muito boa.

Ao curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ.

Aos amigos, de hoje e de ontem, do laboratório de Imunologia Celular e Molecular do CPqRR, pelo agradável convívio, carinho e amizade. Agradeço imensamente o apoio da Eliane, Ariane, Lorena, Ramon, Solange, Alex, Luciana Maria, Denise, Daniela, Wesley, Pollyanna, Fernanda, Vladimir, Cristina, Lisiane, Simone, Fabrício, Luanda, Fernanda, Flávio, Zezé, Ane, Diana, e Jaqueline.

À Ana Pacheco, Michel, Rita, e Sérgio pelo imenso e importante trabalho de lavagem dos materiais, tornando a realização deste trabalho mais fácil e prazerosa.

“Respondeu-lhe Jesus: Eu sou o caminho, e a verdade, e a vida; ninguém vem ao pai senão por mim.... E tudo quanto pedirdes em meu nome, isso farei, a fim de que o Pai seja glorificado no Filho.

João 14, 6-13

“Ler torna o homem completo, ensinar lhe dá preparo e escrever o torna consciente”.

(Francis Bacon)

SUMÁRIO

<u>Lista de Figuras.....</u>	<u>10</u>
<u>Lista de Tabelas.....</u>	<u>13</u>
<u>Lista de Abreviaturas.....</u>	<u>14</u>
<u>Resumo.....</u>	<u>16</u>
<u>Abstract.....</u>	<u>17</u>
<u>1 INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
1.1.A Esquistossomose mansoni	1
1.2.A resposta imunológica celular	5
1.3.A resposta imunológica humoral	11
<u>2 OBJETIVOS.....</u>	<u>13</u>
2.1.Objetivo Geral	13
2.2.Objetivos Específicos	13
<u>3 POPULAÇÃO ESTUDADA.....</u>	<u>14</u>
3.1.Caracterização da população estudada	14
3.2.Caracterização dos grupos de estudo	15
<u>4 METODOLOGIA.....</u>	<u>16</u>
4.1.Coleta e exame parasitológico de fezes	17
4.2.Coleta e estoque do plasma	17
_____ 17	
4.3.Preparação dos antígenos de Schistosoma mansoni	17
4.4.Deteção dos níveis de anticorpos específicos contra antígenos de S. mansoni	18
4.5.Deteção dos níveis de eotaxina no plasma	19
4.6.Deteção do nível de citocinas plasmáticas	20
4.7.Aquisição e análise dos níveis plasmáticos de citocinas por citometria de fluxo	21
4.8.Determinação do número de eosinófilos no sangue periférico	23
4.9.Análise estatística dos dados	23

5. RESULTADOS.....	23
<u>5.1 Caracterização do perfil das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF-α e IFN-γ e da quimiocina eotaxina presentes no plasma dos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose</u>	<u>24</u>
<u>5.2 Análise da influência da intensidade de infecção pelo S. mansoni sobre o perfil das citocinas IL-10 e IL-5 e da quimiocina eotaxina, no plasma dos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose</u>	<u>26</u>
<u>5.3. Caracterização do perfil de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose</u>	<u>29</u>
<u>5.4. Análise da influência da intensidade de infecção pelo S. mansoni sobre o perfil de eosinófilos presentes no sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose</u>	<u>30</u>
<u>5.5. Análise das relações existentes entre IL-10, IL-5, eotaxina e eosinófilos no grupo Intestinal</u>	<u>32</u>
<u>5.6. Análise da influência da intensidade de infecção pelo S. mansoni nas relações de IL-10 com IL-5 e de IL-5 com o número de eosinófilos por mm³ de sangue</u>	<u>33</u>
<u>5.7. Análise das razões de IL-10 com TNF-α e de IL-10 com IFN-γ nos grupos Negativo e Intestinal</u>	<u>33</u>
<u>5.8. Análise da influência da intensidade de infecção pelo S. mansoni sobre a razão IL-10/TNF-α</u>	<u>35</u>
<u>5.9. Caracterização do perfil dos anticorpos IgG4 e IgE específicos contra antígenos do ovo (SEA) e do verme adulto (SWAP) no plasma dos pacientes com a forma clínica intestinal da esquistossomose</u>	<u>37</u>
<u>5.10. Análise da influência da intensidade de infecção pelo S. mansoni sobre o perfil dos anticorpos IgG4 e IgE específicos contra antígenos do ovo (SEA) e do verme adulto (SWAP) no plasma dos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose</u>	<u>40</u>
<u>5.11. Análise das correlações de IgG4 anti-SEA com IgE-anti-SEA e de IgG4 anti-SWAP com IgE anti-SWAP no grupo Intestinal</u>	<u>43</u>
<u>5.12. Análise da influência da intensidade de infecção pelo S. mansoni sobre as relações existentes de IgG4 anti-SEA com IgE-anti-SEA e de IgG4 anti-Swap com IgE anti-SWAP na forma clínica Intestinal da esquistossomose</u>	<u>45</u>

5.13. Análise das relações entre os marcadores imunológicos da resposta celular com os marcadores da resposta humoral	48
65 DISCUSSÃO.....	48
6.1. Resposta Imunológica Celular	49
6.2. Resposta Imunológica Humoral	54
6.3. Associação entre Resposta Imunológica Celular e Resposta Imunológica Humoral	58
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

Lista de Figuras

- Figura 1 – Média da intensidade de infecção pelo *Schistosoma mansoni* na população estudada. As letras “a” e “b” representam, respectivamente, diferenças de intensidade de infecção entre o grupo de faixa etária de 60 ou mais anos e os grupos de 9 a 19 ($p < 0,05$) e de 20 a 29 anos ($p < 0,01$). A intensidade de infecção foi avaliada através da média do logaritmo neperiano do número de ovos por grama de fezes + 1 ($\text{Ln}(\text{opg}+1)$).16**
- Figura 2 – Gráfico de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC)22**
- Figura 3 – Gráfico de fluorescência 4 (FL4) versus fluorescência 2 (FL2).....22**
- Figura 4 – Concentrações das citocinas IL-10 (Figura 4A) e IL-5 (Figura 4B) nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais das concentrações das citocinas, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações no grupo Negativo (IL-10 = 1,70 pg/ml e IL-5 = 2,18 pg/ml) e no grupo Intestinal (IL-10 = 2,16 pg/ml e IL-5 = 2,86 pg/ml). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Negativo e Intestinal nos níveis de IL-10 ($p=0,0315$) e de IL-5 ($p=0,0494$). 25**
- Figura 5 – Concentrações da quimiocina eotaxina nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais das concentrações de eotaxina, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações no grupo Negativo (559,50 pg/ml) e no grupo Intestinal (660,67 pg/ml). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0054$) entre os grupos Negativo e Intestinal.26**
- Figura 6 – Concentrações da citocina IL-10 por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0, X e + representam os valores individuais das concentrações de IL-10, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações nos grupos Negativo (1,70 pg/ml), INT $\text{opg} < 100$ (1,84 pg/ml) e INT $\text{opg} \geq 100$ (3,10 pg/ml). A letra “a” representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo INT $\text{opg} \geq 100$ e o grupo Negativo ($p < 0,0001$), enquanto as letras “b” e “c” representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos INT $\text{opg} \geq 100$ e INT $\text{opg} < 100$ ($p < 0,0001$).27**
- Figura 7 – Concentrações da citocina IL-5 por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0, X e + representam os valores individuais das concentrações de IL-5, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações nos grupos Negativo (2,18 pg/ml), INT $\text{opg} < 100$ (2,63 pg/ml) e INT $\text{opg} \geq 100$ (3,18 pg/ml). A letra “a” representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo INT $\text{opg} \geq 100$ e o grupo Negativo ($p < 0,05$).28**
- Figura 8 – Concentrações da quimiocina eotaxina por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0, X e + representam os valores individuais das concentrações de eotaxina, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações nos grupos Negativo**

(559,50 pg/ml), INT opg <100 (643,22 pg/ml) e INT opg ≥100 (697,29 pg/ml). A letra “a” representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo INT opg ≥ 100 e o grupo Negativo (p<0,05)..... 29

Figura 9 - Número de Eosinófilos no sangue periférico nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os números individuais de eosinófilos, enquanto as barras expressam a mediana desses valores no grupo Negativo (552 células/ mm³) e no grupo Intestinal (830 células/mm³). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa (p=0,0301) entre os grupos Negativo e Intestinal..... 30

Figura 10 – Número de eosinófilos por mm³ no sangue periférico dos pacientes por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os números individuais de eosinófilos, enquanto as barras expressam a mediana desses valores nos grupos Negativo (552/mm³), INT opg <100 (792/mm³) e INT opg ≥100 (918/mm³). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre os grupos INT opg ≥ 100 e Negativo.....31

Figura 11 – Razão IL-10/TNF-α nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IL10-10/TNF-α, enquanto as barras expressam a média em cada grupo (Negativo = 0,61 e Intestinal = 1,10). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa (p=0,0285) entre grupos..... 35

Figura 12 – Razão IL-10/TNF-α por grupo de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais da razão IL-10/TNF-α, enquanto as barras expressam a média em cada grupo (Negativo = 0,61; INT opg < 100 = 0,92; e INT opg ≥ 100 = 1,49) . A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa (p<0,01) entre os grupos INT opg ≥ 100 e Negativo..... 36

Figura 13 – Níveis dos anticorpos específicos contra antígenos do ovo (SEA) de Schistosoma mansoni nos grupos Negativo e Intestinal: IgG4 anti-SEA (figura A) e IgE anti-SEA (figura B). Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores no grupo Negativo (IgG4 anti-SEA = 0,636 e IgE anti-SEA = 0,285) e no grupo Intestinal (IgG4 anti-SEA = 1,088 e IgE anti-SEA = 0,24). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Negativo e Intestinal nos níveis de IgG4 anti-SEA e IgE anti-SEA (p<0.0001 e p=0,0447, respectivamente).....38

Figura 14 – Níveis dos anticorpos específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) de Schistosoma mansoni nos grupos Negativo e Intestinal: IgG4 anti-SWAP (figura A) e IgE anti-SWAP (figura B). Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores no grupo Negativo (IgG4 anti-SWAP = 0,341 e IgE anti-SWAP = 0,2075) e no grupo Intestinal (IgG4 anti-SWAP = 0,9545 e IgE anti-SWAP = 0,226). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de IgG4 anti-SWAP entre os grupos Negativo e Intestinal (p<0.0001)..... 39

Figura 15 – Níveis dos anticorpos específicos contra antígenos do ovo (SEA) de Schistosoma mansoni por grupos de carga parasitária: IgG4 anti-SEA (figura A) e IgE anti-SEA (figura B). Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores nos grupos Negativo (IgG4 anti-SEA = 0,64 e IgE anti-SEA = 0,29), INT opg<100 (IgG4 anti-SEA = 1,08 e IgE anti-SEA = 0,26) e INT opg ≥100 (IgG4 anti-SEA = 1,11 e IgE anti-SEA =

0,23). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Negativo ($p < 0.0001$ na figura A e $p < 0.05$ em B).....41

Figura 16 – Níveis dos anticorpos IgG4 específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores nos grupos Negativo (IgG4 anti-SWAP = 0,34), INT opg < 100 (IgG4 anti-SWAP = 0,77) e INT opg ≥ 100 (IgG4 anti-SWAP = 1,24). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa dos demais grupos em relação ao grupo Negativo ($p < 0,01$ em relação ao grupo INT opg < 100 e $p < 0,001$ em relação ao grupo INT opg ≥ 100). . 42

Figura 17 – Níveis dos anticorpos IgE específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores nos grupos Negativo (IgE anti-SWAP = 0,21), INT opg < 100 (IgE anti-SWAP = 0,23) e INT opg ≥ 100 (IgE anti-SWAP = 0,23).....43

Figura 18 – Razão entre IgE e IgG4 específicos contra SEA nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IgE/IgG4 anti-SEA, enquanto as barras expressam a média em cada grupo (médias: Negativo = 0,74 e Intestinal = 0,43). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa (0,0383) entre grupos..... 44

Figura 19 – Razão entre IgE e IgG4 específicos contra SWAP nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IgE /IgG4 anti-SWAP, enquanto as barras expressam a média em cada grupo (médias: Negativo = 1,25 e Intestinal = 0,55). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0068$) entre grupos..... 45

Figura 20 – Razão entre IgE e IgG4 específicos contra SEA por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IgE /IgG4 anti-SEA, enquanto as barras expressam a média em cada grupo (médias: Negativo = 0,74; INT opg < 100 = 0,53; INT opg ≥ 100 = 0,24). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos INT opg ≥ 100 e Negativo..... 46

Figura 21 – Razão entre IgE e IgG4 específicos contra SWAP por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IgE /IgG4 anti-SWAP, enquanto as barras expressam a média em cada grupo (médias: Negativo = 1,25; INT opg < 100 = 0,63; INT opg ≥ 100 = 0,33). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos INT opg ≥ 100 e Negativo..... 46

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características dos grupos de estudo em relação à idade e à intensidade de infecção.....	15
Tabela 2 - Distribuição dos grupos Intestinal e Negativo por sexo e por faixa etária.....	16
Tabela 3 - Correlações de Spearman entre os marcadores da resposta imunológica celular no grupo Intestinal.....	32
Tabela 4 - Correlações entre os marcadores da resposta imunológica celular por grupos de carga parasitária.....	33
Tabela 5 - Correlações de Spearman entre os marcadores da resposta imunológica humoral por grupos de carga parasitária.....	47

Lista de Abreviaturas

ADCC – Citotoxicidade celular dependente de anticorpo

BSA – Albumina bovina sérica

CBA - Cytometric Bead Array

CD4 – Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CD8 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CCR3 - Receptor de eotaxina

CONEP – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

CPqRR – Centro de Pesquisa René Rachou

EDTA – Etilenodiaminotetracético

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

FACScan – Fluorescence Activated Cell Sorter

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FL – Fluorescência

FSC – Forward Scatter (Tamanho celular)

ICAM – Molécula de adesão intercelular

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

INF- γ - Interferon gama

LFA – Leucocyte functional antigen-1

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

NK – Natural Killer

OMS – Organização Mundial de Saúde

PE - Ficoeritrina

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PBS – Tampão Fosfato Salínico (phosphate buffer saline)

PBS-T – Tampão Fosfato Salínico com Tween 20

pH- Potencial hidrogeniônico

rpm – rotação por minuto

SEA - Antígenos solúvel de ovo

SSC – Side Scatter (Granulosidade celular)

SWAP – Antígenos de verme adulto

Th0 - Células TCD4⁺ secretoras do padrão 1 e 2 de citocinas

Th1 – Células TCD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas

Th2- Células TCD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas

TNF- α - Fator de necrose tumoral tipo α

OMS– Organização Mundial de Saúde

Resumo

No Brasil a esquistossomose atinge cerca de 2,5 milhões de pessoas, sendo uma das principais helmintoses no país. A grande maioria dos pacientes infectados pelo *Schistosoma mansoni* desenvolve a forma clínica intestinal da doença e muitos estudos demonstram, “in vitro”, que, na fase crônica da infecção, ocorre o predomínio de uma resposta imunológica do tipo 2, sendo a intensidade de infecção um fator que influencia neste perfil de resposta. Entretanto, poucos são os estudos relacionados com a avaliação da influência da intensidade de infecção sobre o perfil geral de resposta imunológica dos pacientes portadores da fase crônica intestinal da esquistossomose mansoni. Neste estudo, avaliamos a influência da intensidade de infecção pelo *Schistosoma mansoni* sobre o perfil dos marcadores imunológicos da resposta celular: IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α , eotaxina e o número de eosinófilos; assim como sobre os marcadores da resposta humoral: IgG4 e IgE, específicos contra antígenos do ovo (SEA) e do verme adulto (SWAP), em pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni, residentes em área endêmica para a doença, situada na comunidade de Virgem das Graças, no município de Ponto dos Volantes, Minas Gerais, Brasil. Em relação à resposta celular, nossos resultados sugerem que, na forma clínica intestinal da doença, ocorre o predomínio de uma resposta do tipo 2, com aumento nos níveis de IL-5, IL-10, eosinófilos e eotaxina, estando a modulação da resposta imunológica relacionada com a produção de IL-10. Estes elementos estão sob influência da intensidade de infecção. Em relação à resposta humoral, nossos dados sugerem uma alteração no balanço IgE/IgG4, específicos contra SEA e SWAP, com aumento nos níveis de IgG4 e diminuição nos níveis de IgE. Nossos resultados sugerem ainda que este balanço pode estar sob influência de IL-10, em um contexto dependente da intensidade de infecção.

Abstract

Schistosomiasis affects approximately 2,5 million people in Brazil, being one of main parasitic helminthes in this country. The majority of the *S. mansoni*-infected individuals develop the intestinal clinical form of disease and many studies demonstrate, "in vitro", that, in the chronic phase of infection, occurs predominantly a type 2 immune response, being the infection intensity one of the factors that influence this response. However, few studies have evaluated the relationship between infection intensity and the immune response profile of patients with intestinal chronic schistosomiasis mansoni. Thus, we evaluated the influence of the intensity of infection with *S. mansoni* on the immunologic markers of the cellular response: IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ , TNF- α , eotaxin and eosinophils; and markers of the humoral response: IgG4 and IgE, against antigens of the egg (SEA) and adult worm (SWAP), in patients with intestinal clinical chronic schistosomiasis mansoni, residents in endemic area of Virgem das Graças, Ponto dos Volantes municipality, Minas Gerais, Brazil. As for the cellular response, our results suggest that, in intestinal clinical form of the disease, there is a predominance of a type 2 response, with an increase in the levels of IL-5, IL-10, eosinophils and eotaxin, being the immune response modulation related with IL-10 production and that these factors are influenced by infection intensity. As for the humoral response, our data suggest that, in the intestinal clinical form, occurs a change in IgE/IgG4 rate, specific against SEA and SWAP, with an increase in the levels of IgG4 and reduction in the levels of IgE. Our results suggest that these changes can be influenced by IL-10, in a context dependent on the infection intensity.

1 INTRODUÇÃO

1.1. A Esquistossomose mansoni

A esquistossomose humana é uma doença parasitária crônica que atinge cerca de 200 milhões de pessoas no mundo (WHO, 1998). Ela é causada por uma das cinco espécies de trematódeos do gênero *Schistosoma*: *Schistosoma haematobium* Bilharz, 1953; *S. japonicum* Katzurada, 1904; *S. mansoni* Sambon, 1907; *S. intercalatum* Fisher, 1934; *S. mekongi* Voge et al., 1978. No Brasil, esta infecção é causada pelo parasita *Schistosoma mansoni* e atinge cerca de 2,5 milhões de pessoas, em uma área endêmica que cobre 19 estados, correspondendo a 26 milhões de pessoas sob risco de infecção (Funasa, 1999).

O processo de infecção pelo *S. mansoni* se inicia com a penetração ativa, pela pele ou mucosas, das cercárias. Estas se transformam em esquistossômulos através de modificações bioquímicas e fisiológicas, que permitem a sua sobrevivência nas condições fisiológicas do indivíduo (Stirewalt et al., 1963; Gazzinelli et al., 1973; Howells et al., 1974; Ramalho-Pinto et al., 1975; Oliveira et al., 1975). Os esquistossômulos são levados, passivamente, até os pulmões pelo sistema circulatório sanguíneo ou linfático (Miller & Wilson, 1978), de onde migram para o sistema porta intra-hepático. Ali, os vermes adultos vivem acasalados, com a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho. Os vermes pareados migram até as veias mesentéricas inferiores, onde as fêmeas iniciam a postura dos ovos (Alisson et al., 1974). Estes seguem vias distintas: enquanto que, aproximadamente a metade atravessa a parede do intestino e é eliminada com as fezes, a outra metade é drenada para o fígado, instalando-se nos ramos intra-hepáticos mais finos da veia porta, onde os ovos se tornam alvos da resposta imune celular do hospedeiro, desenvolvendo uma reação granulomatosa típica em torno dos mesmos (Warren, 1967, Bogliolo, 1959). Os ovos eliminados com as fezes que forem lançados em coleções hídricas eclodem, estimulados pela temperatura (28°C), luz intensa e oxigenação da água, e liberam larvas ciliadas denominadas miracídeos (Neves, 1995). Estes miracídeos penetram no manto do molusco aquático do gênero *Biomphalaria* transformando-se em esporocistos que, por poliembrionia e expansão clonal, originam larvas de cauda bifurcada denominadas cercárias, que poderão penetrar na pele ou mucosa do hospedeiro vertebrado, fechando o seu ciclo biológico (Neves, 1995).

Logo após a penetração das cercárias, pode ocorrer um quadro de dermatite cercariana, caracterizado por dermatite urticariforme com eritema, edema e prurido. Decorridas três a sete semanas de exposição, podem aparecer os sintomas característicos da esquistossomose aguda com quadro de febre, anorexia, dor abdominal e cefaléia, além da hepatomegalia, sendo que esta fase raramente é encontrada em pessoas residentes em área endêmica (Bina & Prata, 1984). Com a deposição dos ovos nos tecidos inicia-se a cronificação da doença, podendo persistir por vários anos. Nesta fase, podem surgir sinais de progressão para vários órgãos, principalmente fígado, baço e intestino, chegando a atingir graus extremos de gravidade. As manifestações clínicas variam, dependendo da localização e intensidade do parasitismo, da capacidade de resposta do indivíduo à infecção ou ao tratamento. A doença pode apresentar-se sob a forma clínica intestinal, a mais freqüente, na qual a maioria dos pacientes é assintomática, mas podem surgir episódios ocasionais de diarreia com dor e desconforto abdominal; e sob a forma hepatointestinal, que além dos sintomas intestinais apresentam também hepatomegalia e esplenomegalia (Pessoa & Martins, 1986; Bina, 1981). Cerca de 5% dos pacientes portadores da esquistossomose apresentam os sintomas mais graves da doença, sendo a reação granulomatosa, resultante da resposta imunológica celular à presença dos ovos vivos nos tecidos, o principal fator desencadeador da patologia, envolvendo a deposição excessiva de matriz do tecido conectivo, principalmente com deposição de colágeno (Wyler et al., 1987). Embora a reação granulomatosa seja responsável pelos danos causados ao tecido, ela parece proteger o hospedeiro das conseqüências patológicas da infecção, seqüestrando os antígenos dos ovos (Litchemberg, 1964), em particular, uma hepatotoxina (Bryan et al., 1979, Dunne et al., 1981). Há, também, evidências de que o granuloma sirva como veículo para o ovo, auxiliando na sua transferência, através do tecido, para a luz intestinal, onde ele poderia alcançar o meio ambiente (Doenhoff et al., 1986). No entanto, esse quadro de reação granulomatosa conduz ao aparecimento de fibrose, que pode atingir diferentes graus de intensidade, desencadeando alterações hepáticas e esplênicas. O curso natural da fibrose periportal é lento e a maioria dos pacientes desenvolve uma forma clínica denominada hepatoesplênica compensada, onde os testes para avaliação da função hepática apresentam apenas pequenas anormalidades (Mousa et al., 1967). Contudo, alguns indivíduos desenvolvem a forma clínica hepatoesplênica descompensada, forma mais grave da doença, caracterizada por hipertensão portal com esplenomegalia, varizes esofagianas hemorrágicas, acompanhada de ascite e com provas de avaliação hepática significativamente alteradas. O baço se mostra aumentado, devido à

hipertrofia reticuloendotelial e congestão venosa portal. O órgão torna-se endurecido, fibrótico e sua superfície se mostra escurecida com folículos hipertrofiados apresentando infartos focais e hemorragias trabeculares, levando à formação de nódulos fibrosideróticos. O hiperisplenismo característico pode ser o resultado de todo o processo (Bogliolo, 1959; Bassily et al, 1979).

Algumas considerações básicas sobre as características epidemiológicas da esquistossomose nos permitem conhecer como evoluiu a relação parasita-hospedeiro, através do processo de seleção natural. Elas são necessárias para compreendermos a extensão da adaptação deste helminto em seu hospedeiro definitivo, e a relevância da interação entre este parasita e a resposta imune do homem.

As considerações mais relevantes são: em área endêmica, a maioria das infecções é adquirida na infância e persiste por vários anos; o verme adulto pode sobreviver no hospedeiro por um período de 20 a 30 anos, embora a sobrevivência média, varie de 5-10 anos (Warren et al., 1974); as infecções são mantidas nos indivíduos cronicamente infectados através de constantes reinfecções; a imunomodulação, que diminui a reação granulomatosa ao redor dos ovos nos tecidos, reduz o nível de patologia e favorece a sobrevivência do parasita; o verme adulto não replica dentro do hospedeiro definitivo, portanto, o número de ovos que eles produzem é dependente do número de vermes adultos maduros dentro do hospedeiro; a distribuição dos vermes é ampla, mas irregular, ou seja, poucos indivíduos apresentam infecção maciça e doença grave; os vermes adultos não residem no lúmen do intestino, como a maioria dos outros parasitas metazoários, mas dentro dos vasos sanguíneos. O *Schistosoma* tem o homem como seu principal reservatório, embora tenha capacidade de infectar outros hospedeiros. Considerando estas restrições no ciclo de vida do parasita, e o fato de que a maioria dos ovos não é eliminada em ambiente adequado (águas contendo caramujos), a sobrevivência do parasita requer uma alta e contínua produção de ovos para assegurar a continuidade do ciclo.

Estas observações demonstram que há uma estabilidade na relação parasita-hospedeiro, e que essa se desenvolve para permitir uma longa sobrevivência do parasita com o mínimo de conseqüências para o hospedeiro, sendo crucial nesse processo a interação entre este parasita e a resposta imune do homem.

Outro aspecto interessante nessa endemia são as curvas de prevalência e intensidade de infecção em relação à idade, em diferentes áreas endêmicas. Estas duas curvas apresentam

um padrão comum, ou seja, elas aumentam progressivamente nas faixas etárias mais jovens, seguidas por um declínio após a segunda década de vida.

As faixas etárias até os 20 anos são as que apresentam a maior prevalência e as cargas parasitárias mais altas, o que parece estar relacionado ao sistema imunológico e aos aspectos comportamentais (Neves, 1995). Dentre os fatores comportamentais, observa-se uma mudança do padrão de contato com a água infestada por cercárias. Este padrão decresce com a idade, sendo, portanto, um fator que poderia estar determinando a diminuição da infecção nas faixas etárias mais elevadas (Warren, 1973; Dalton & Pole, 1978). Contudo, a queda da prevalência com o aumento da idade pode estar relacionado a mecanismos imunológicos adquiridos em decorrência a várias infecções ocorridas na infância (Butterworth et al., 1985a ; Wilkins et al., 1987).

Vários estudos foram realizados para o *S. mansoni* no Kenya (Sturrock et al., 1983 e 1987; Butterworth et al., 1984, 1985a, 1988), no Egito (Colley et al., 1986a) e no Brasil (Dessein et al., 1988, Gazzinelli et al., 2001, Bethony et al., 2001), e para o *S. haematobium* no Gâmbia (Hagan et al., 1987; Wilkins et al., 1987) na tentativa de elucidar a questão da imunidade versus exposição à infecção. Em todos estes trabalhos, há um consenso de que, embora ocorra uma pequena redução nos níveis de exposição com a idade, essa é insuficiente para explicar a grande redução que ocorre na intensidade de infecção/reinfecção, cuja causa é atribuída à resistência adquirida com a idade.

Conseqüentemente, esforços têm sido realizados no sentido de elucidar os possíveis mecanismos imunológicos envolvidos na resistência ao *Schistosoma*. Vários mecanismos de morte do parasita *in vitro* já foram identificados. Entre eles, a existência de anticorpos letais (Capron et al., 1974; Capron et al., 1977; Correa-Oliveira et al., 1982); a citotoxicidade de eosinófilos e de neutrófilos dependentes de anticorpos (Joseph et al., 1983); a citotoxicidade celular dependente de complemento (Capron et al., 1974) e a ativação de macrófagos (Capron et al., 1975).

Pode-se afirmar com certa segurança, que há uma associação entre os mecanismos imunológicos e o desenvolvimento da resistência à infecção e reinfecção pelo *S. mansoni*. No entanto, até o momento não se pode provar se esta associação é causal. Os mecanismos envolvidos nessa imunidade ainda não são bem conhecidos, mas certamente envolvem as respostas imunológicas celular e humoral.

Assim, frente ao grande número de pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose *mansoni* no Brasil e no mundo, bem como, a existência de lacunas na

compreensão da resposta imunológica, torna-se clara a necessidade do desenvolvimento de estudos que visem auxiliar na compreensão da relação entre a resposta imunológica e a infecção pelo *S. mansoni*.

1.2. A resposta imunológica celular

Vários estudos têm demonstrado que na esquistossomose mansoni diversos mecanismos, dentre eles a resposta celular e humoral do hospedeiro vertebrado, estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção da patologia ou resistência à infecção/reinfecção.

No que se refere à resposta imunológica celular, ela pode ser diferenciada em três fases. A primeira abrange o período de três a cinco semanas após a infecção, sendo caracterizada pela exposição do hospedeiro às cercárias e aos esquistossômulos que migram pelos tecidos (Cheever et al., 2000). Nesta fase, a resposta imunológica predominante é a do tipo Th1, observando-se a presença de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) produzindo grandes quantidades do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e das interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) (De Jesus et al., 2002). À medida que essas formas imaturas se desenvolvem, copulam e produzem ovos, após cinco a seis semanas de infecção, ocorre uma alteração considerável na resposta imunológica. A resposta imunológica que era predominantemente Th1 é substituída pelo predomínio da resposta Th2, induzida principalmente por antígenos do ovo do *Schistosoma mansoni*. A então predominante resposta Th2 é a responsável pela modulação da produção e das funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios (Cheever et al., 2000). Durante a fase crônica da infecção, a resposta inflamatória ao redor dos ovos diminui devido à modulação da resposta imunológica mediada principalmente pela interleucina-10 (IL-10), que desempenha um papel crucial durante este processo de modulação (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999).

A patologia esquistossomótica é desencadeada principalmente pelos granulomas, formados em função da reação imunológica em resposta aos ovos retidos nos tecidos do hospedeiro. Os antígenos solúveis do ovo induzem essa reação granulomatosa por meio do desencadeamento de uma resposta imunológica de hipersensibilidade retardada mediada por células T CD4+ ativadas (Mathew & Boros, 1986). Em modelos experimentais, o estágio inicial de formação do granuloma envolve a participação de moléculas de adesão,

principalmente entre a molécula de adesão celular-I (ICAM-I) e o seu receptor, denominado antígeno funcional de leucócitos-1 (LFA-1) (Ritter & Mckerrow, 1996). O aumento da expressão de ICAM-I é induzido por IL-1, interferon gama (IFN- γ) ou TNF- α (Dustin et al., 1986). Logo TNF- α e IFN- γ participam da ativação de linfócitos e, conseqüentemente, na formação dos granulomas.

Posteriormente, os linfócitos T CD4⁺ ativados secretam citocinas que promovem a formação e a regulação do granuloma (Weinstock & Blum, 1987). Em modelos experimentais, as citocinas mais abundantes são a interleucina-2 (IL-2) e a interleucina-4 (IL-4) (Yamashita & Boros, 1992). Nesta fase, o granuloma é predominantemente celular, formado principalmente por eosinófilos, macrófagos, linfócitos, alguns neutrófilos e células gigantes multinucleadas (Raso & Neves, 1965; Weinstock, 1992), sendo as migrações desses diversos tipos celulares, para o sítio de inflamação, controladas por citocinas e também quimiocinas (Boros, 1989; Pearce & Macdonald, 2002).

Na segunda fase de formação do granuloma, onde o seu diâmetro é maior, há um predomínio das citocinas IL-4 e IL-5 (Chensue et al., 1993). IL-4 desempenha um papel regulador na formação do granuloma (Yamashita & Boros, 1992), enquanto IL-5 aumenta o recrutamento de eosinófilos e a proliferação e diferenciação de células B (Weinstock, 1992; Sher et al., 1990). A resposta imunológica frente aos ovos de *Schistosoma mansoni* resulta, portanto, na formação de granulomas hepáticos e intestinais que podem desencadear um quadro de fibrose nesses tecidos.

Após a fase aguda da doença, o granuloma diminui de tamanho, resultante da redução da inflamação ao redor dos ovos, sendo esse processo denominado modulação (Andrade & Warren, 1964). Provavelmente, essa modulação da resposta imunológica e a hipossensibilidade aos antígenos do ovo ocorrem devido à modulação de células T (Stadecker & Flores-Villaneuva, 1992; Falcão et al., 1998). Nesse contexto, tem sido demonstrado que a IL-10 desempenha um papel importante nessa imunomodulação (Flores-Villanueva et al., 1993).

Em relação à patologia no homem, já se encontra bem estabelecido que a maioria dos pacientes infectados pelo *Schistosoma mansoni*, residentes em áreas endêmicas para a esquistossomose, desenvolvem uma forma crônica denominada intestinal. Vários estudos têm demonstrado que os pacientes apresentando essa forma clínica desenvolvem mecanismos que estão envolvidos na modulação da resposta imunológica contra a infecção. Diversos mecanismos envolvidos nesse controle já foram descritos, sendo que, dentre eles, podemos

citar a modulação da resposta de células T por anticorpos anti-idiotipos (Lima et al., 1986; Parra et al., 1991), a participação de células T CD8⁺ (Doughty et al 1982) e a regulação mediada por IL-10 (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999). A modulação da resposta imunológica durante a fase crônica da esquistossomose reduz drasticamente a resposta do tipo Th1, passando a existir o predomínio de uma resposta imunológica do tipo Th2, prevalecendo, portanto, as citocinas relacionadas a esse tipo de resposta, como IL-5 e IL-10, bem como a eosinofilia e a produção de anticorpos (Colley, 1975; Pearce & Macdonald, 2002). Os eosinófilos são leucócitos capazes de matar, por exemplo, através de potente ataque com nitrogênio reativo (NO) e intermediários de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003), ou imobilizar os estágios larvais do verme *Schistosoma mansoni* (McLaren, 1980) sendo, portanto, importantes no combate à infecção por este parasita. Esse aumento de eosinófilos está relacionado com a citocina IL-5 uma vez que ela aumenta o recrutamento dessas células (Weinstock, 1992; Sher et al., 1990).

As quimiocinas produzidas durante processos inflamatórios são determinantes da extensão, do tipo e da duração do processo migratório de células para o tecido, sendo a regulação celular da expressão dos receptores destas moléculas um fato importante no processo de migração (Sallusto et al., 2000). Estudos *in vitro* envolvendo a quimiocina eotaxina demonstraram que ela é uma molécula ativadora e quimioatraente de eosinófilos (Kita & Gleich, 1996; Jose et al., 1994). Teixeira (1998) em trabalhos realizados em modelos murinos demonstraram que as quimiocinas eotaxina e MIP-1 α induziram um significativo aumento no recrutamento de eosinófilos, sendo a eotaxina significativamente mais efetiva que MIP-1 α nesse recrutamento. O receptor humano para a eotaxina, CCR3, é expresso em eosinófilos, basófilos (Forssmann et al., 1997; Ugucioni et al., 1997), e em células do tipo Th2 (Sallusto et al., 1997). É concebível que, como parte de suas diferentes capacidades efectoras, células Th2 e Th1 expressem diferentes conjuntos de receptores de quimiocinas, permitindo-as a migrarem sob condições diferentes (Sallusto et al., 1998).

Estudos sobre a regulação da produção de citocinas do tipo Th2 em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, demonstraram que a produção de ovos pelos vermes adultos é o principal estímulo para a indução de uma potente resposta das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (Wynn et al., 1993). Outros autores (Grzych et al., 1991) demonstraram, também em modelos murinos, que a presença dos ovos era o principal estímulo para o desenvolvimento de uma resposta Th2. O desenvolvimento dessa resposta Th2 é responsável pela modulação

do padrão de resposta imunológica do tipo Th1 (Pearce et al., 1991), bem como pela modulação da produção e das funções efetoras dos mediadores pró-inflamatórios característicos da fase aguda da doença (Cheever et al., 2000), como TNF- α , IL-1 e IL-6 (De Jesus et al., 2002).

Dados da literatura indicam que a IL-10, ao atuar sobre a resposta Th1 e desviá-la para Th2, se opõe à síntese de IFN- γ e IL-2, que são importantes para a proliferação de células T e a ativação de macrófagos. A inibição da síntese dessas citocinas pela IL-10 parece ser indireta, ou seja, ela agiria sobre as células apresentadoras de antígenos (APC), especialmente monócitos e macrófagos, inibindo a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal do tipo II (MHC classe II) e co-estimulatórias como B7-2, o que resultaria na ausência, ou diminuição, da apresentação dos antígenos e, por conseguinte, falta de ativação celular e ausência na produção de IL-2 e IFN- γ (Fiorentino et al., 1989; Moore et al., 1990; Fiorentino et al., 1991). Dados obtidos em humanos (Waal-Malefyt et al., 1991) também sugerem que a IL-10 exerce atividade anti-proliferativa sobre células do tipo Th1, através da inibição da expressão de moléculas de MHC classe II em monócitos, suprimindo, por exemplo, a produção de IL-12 pelos macrófagos (Fiorentino et al., 1991). Um outro mecanismo relacionado à inibição da síntese de IFN- γ por IL-10 é que esta citocina é capaz de inibir a síntese de IFN- γ pelas células “Natural Killers” (NK), mecanismo essencial para a derivação da resposta imunológica para o tipo Th1 (Kos & Engleman, 1996).

Em humanos, a detecção de altos níveis de IL-10 está correlacionada com o desenvolvimento de formas menos graves de esquistossomoses (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997) e da filariose (King et al., 1993; Mahanty et al., 1995). Em modelos murinos, a ausência desta citocina foi correlacionada com aumento de fibrose hepática e esplenomegalia (Bosshardt et al., 1997). Em contra partida, altos níveis de TNF- α e IFN- γ e baixos níveis de IL-5 estão associados com a forma clínica hepatoesplênica da esquistossomose mansoni humana (Mwatha et al., 1997).

O efeito da intensidade de infecção pelo *Schistosoma mansoni* sobre a produção de IFN- γ , IL-10 e IL-13 por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos residentes em área endêmica para o *Schistosoma mansoni* foi avaliado por Silveira e colaboradores (2004). Estes autores observaram que os níveis de IFN- γ produzidos por PBMCs estimuladas com SEA diminuem gradualmente com o aumento da intensidade de infecção, e que esta intensidade de infecção é decisiva para a produção de IL-10 e dominância de uma resposta imunológica Th2. Estes autores não encontraram diferença estatisticamente

significativa nos níveis de IL-13 entre o grupo de pacientes ovo-negativo e o grupo de pacientes com exame parasitológico de fezes positivo para *S. mansoni*.

Grzych et al. (1991) demonstraram, em modelo murino, que a presença dos ovos foi o principal estímulo para o desenvolvimento de uma resposta Th2, o que também sugere a influência da intensidade de infecção no estabelecimento de uma resposta predominantemente Th2.

As citocinas também têm sido associadas, em alguns trabalhos, com a susceptibilidade e a resistência a infecções pelo *Schistosoma* no homem. Um estudo longitudinal realizado com alunos colegiais no Gabão sugeriu o envolvimento da citocina IL-10 como fator de risco para a reinfecção pelo *S. haematobium*, uma vez que as crianças com maior risco de reinfecção foram aquelas que apresentaram os níveis mais altos de IL-10 específica contra antígenos do ovo do parasita (van den Biggelaar et al., 2002). Estes altos níveis de IL-10 devem provocar uma diminuição mais vigorosa na resposta Th1 nestas crianças quando comparadas com as que produziram níveis menores desta citocina. Dessa forma, a menor capacidade de montar uma resposta protetora Th1 contra a invasão cercariana pode resultar em um maior risco de reinfecção. Contudo, a falha em uma via imunológica de proteção, mediada por IL-10, ainda não está esclarecida (van den Biggelaar et al., 2002).

Na esquistossomose humana urinária, King et al., 1996 propuseram um possível mecanismo de supressão de proliferação de células T e de produção de IFN- γ por IL-10 através da diminuição da expressão da molécula co-estimuladora B7 (King et al., 1996). O envolvimento de IL-10 na diminuição da expressão da molécula B7 em células apresentadoras de antígenos também foi demonstrado em modelo murino infectado com *Schistosoma mansoni* (Flores-Villanueva et al, 1994). Estes fatos reforçam o papel modulador de IL-10 durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

Outro estudo longitudinal, realizado no Quênia, investigou a resposta mediada por células em dois grupos de indivíduos: um de 9 a 13 anos e outro de 14 a 35 anos. A resposta blastogênica e a produção de citocinas (IL2, IL5, IL4, IFN- γ e TNF- α) foram medidas antes e após o tratamento. Ambos grupos se reinfetaram depois do tratamento, porém com intensidades diferentes. O grupo mais jovem apresentou intensidade de infecção mais alta, sendo, portanto, denominado suscetível, enquanto o grupo mais velho, com carga parasitária mais baixa, foi considerado resistente. Observou-se uma correlação inversa entre a resposta de proliferação celular a antígenos de vermes adultos e esquistossômulos, e a subsequente intensidade de reinfecção nos indivíduos mais velhos. Observou-se, ainda, que a citocina IL-5

apresentava-se mais elevada nos indivíduos resistentes, e que ela tinha uma relação inversa com os níveis de IFN- γ (Morven et al. 1993).

Medhat et al (1998) comparando a produção de citocinas entre pacientes resistentes ou susceptíveis à reinfeção, após quimioterapia, encontrou que o grupo de indivíduos resistentes apresentava maior frequência de linfócitos produtores de IL-4 e IL-5, e níveis aumentados dessas citocinas no sobrenadante de cultura de PBMC reativos aos antígenos de vermes adultos (SWAP).

Outro trabalho associou resistência a uma subpopulação específica de células T. Coussiner-Paris et al., 1995, isolaram de indivíduos residentes em área endêmica e considerados resistentes, 28 clones de linfócitos T específicos para o *S. mansoni*. Esses clones produziram grandes quantidades de IFN- γ e IL-4, quando comparados aos clones não específicos. Porém, a produção de IL-2 não diferiu entre eles. Os autores compararam então, os clones específicos dos indivíduos resistentes, com os clones de um indivíduo tratado e residente em uma área não endêmica. Os autores observaram que, enquanto os primeiros produziram mais IL4 (Th0/Th2) do que IFN γ , os clones do segundo grupo produziram mais IFN- γ (Th0/Th1) do que IL4, sugerindo que resistência à infecção estava associada com a razão IL-4/ IFN- γ .

Tem sido amplamente demonstrado que as interleucinas podem influenciar na seleção de classes e subclasses de imunoglobulinas (switch factors), produzidas por células B (Finkleman et al., 1990). A citocina IL-4, secretada pelas células Th2, induzem as células B a secretarem IgG1 (Snapper & Paul, 1987) e inibe a secreção de IgG2a, enquanto IFN- γ , citocina do tipo 1, aumenta a produção de IgG2a, mas inibe IgG1 (Stevens et al., 1988). Por outro lado, a IL-12, citocina do tipo 1, modula a produção de IgE nas infecções por helmintos, em parte via regulação quantitativa de IFN- γ e IL4, geradas por linfócitos antígeno-específicos. A IL12 parece não afetar diretamente as células B, podendo estimular indiretamente outras moléculas (ex; IFN- γ e IL8) que poderiam suprimir o switch ou secreção de IgE (King et al., 1995).

A produção dos anticorpos IgE e IgG4 depende inicialmente de IL-4 ou IL-13 produzidos por células Th2 (Akdis et al., 1997). Contudo, a produção de IgG4 também é regulada, em um contexto antígeno-específico, por IL-10 e IFN- γ produzidos por células Th0 (Gascan et al., 1991). Em um estudo realizado em pacientes sensíveis ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, a citocina IL-10 apresentou efeitos opostos na síntese de IgE e de IgG4, inibindo a síntese de IgE e aumentando a produção de IgG4 por células

mononucleares do sangue periférico estimuladas por IL-4. Os autores sugerem que a diminuição de IgE e o aumento de IgG4 provavelmente seja devido, respectivamente, à influência de IL-10 na inibição da “switch” de IgE e no aumento da “switch” de IgG4 induzidos por IL-4 (Jeannin et al., 1997).

Assim as interações entre citocinas e anticorpos em resposta à presença do *S. mansoni* demonstram a importância da resposta celular e humoral na definição dos mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção e à patologia causada por este helminto.

1.3. A resposta imunológica humoral

Do ponto de vista da resposta imunológica humoral, tem-se evidenciado que as classes e subclasses de anticorpos anti-*Schistosoma* variam com a idade, a intensidade de infecção e, provavelmente, com a duração da infecção (Jassim et al., 1987; Dunne et al., 1988). Alguns estudos têm demonstrado que a composição de isotipos de anticorpos anti-*Schistosoma* pode desempenhar uma influência marcante na eficiência de mecanismos efetores de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (A.D.C.C.) e conseqüentemente, na expressão da imunidade protetora ou na patologia (Dunne et al., 1993). Várias células efetoras, em presença de anticorpos anti-esquistossômulo, participam do mecanismo de A.D.C.C., dentre elas monócitos, eosinófilos e plaquetas (Joseph et al., 1983). Sabemos que ao contrário de IgG1, o isotipo IgG4 é ineficiente na ativação do complemento, (Iskander et al, 1981) e na ligação a receptores de imunoglobulinas presentes em monócitos e macrófagos. Além disso, compete com IgE específica na ligação a antígenos do verme nos sítios de ligação de mastócitos, bloqueando a sua degranulação (Stanworth & Smith, 1973). Portanto, o grau de resistência frente à infecção depende em parte do balanço entre dois efeitos antagônicos: a ação protetora de IgE e o efeito bloqueador de IgG4, uma vez que tem sido demonstrado na literatura, que IgG4 age como um anticorpo bloqueador para a função protetora mediada por IgE durante a A.D.C.C. (Rihet et al., 1992).

Neste contexto, os anticorpos anafiláticos têm sido associados com a expressão da imunidade. Estes anticorpos dos isotipos IgE e de algumas subclasses de IgG, estão, diretamente envolvidos na morte de esquistossômulos, *in vitro*, em associação com populações de células efetoras, tais como macrófagos, eosinófilos e plaquetas. Além disso, estes anticorpos induzem um alto nível de proteção contra as novas exposições às cercárias,

quando transferidos passivamente para ratos não infectados (Joseph et al., 1983; Verwaerde et al., 1987).

A associação entre resistência à reinfeção pelo *S. mansoni* e as diferentes classes de imunoglobulinas anti-esquistossomulo também foi observada quando a análise de regressão logística em presença de variáveis explicativas como contato com água, idade e sexo foram avaliadas. Dos isotipos testados, somente IgE, IgG4 e IgG2 mostraram uma associação com a resistência à reinfeção, sendo positiva para IgE e negativa para IgG4 e IgG2. O efeito oposto de IgE e IgG4 foi indissociável na análise, sugerindo que estes isotipos, provavelmente, têm funções antagônicas (Demeure et al, 1993).

Os anticorpos IgE contra antígenos do ovo e do verme adulto de *S. mansoni* aparecem em níveis significativamente maiores em indivíduos com mais de 15 anos, faixa etária menos susceptível, sugerindo que estes anticorpos possam ter um efeito protetor contra a infecção pelo *S. mansoni*. Ao contrário, os anticorpos IgG4 específicos contra antígenos do ovo e do verme adulto apresentaram-se em níveis significativamente mais altos em indivíduos com idade de 10 a 14 anos, faixa etária mais susceptível, sugerindo uma correlação entre níveis elevados destes anticorpos e a susceptibilidade à esquistossomose (Hagan et al, 1991).

A comparação dos níveis de IgE anti-esquistossômulo entre um grupo de adolescentes brasileiros resistentes à infecção e outro susceptível, mostrou que o nível de IgE no grupo resistente era, em média, 6 a 8 vezes maior. Os anticorpos IgG, que competiam com IgE para o antígeno larval foram detectados na maioria dos soros, e seu nível foi maior nos menos resistentes (Rihet et al, 1991).

Dunne et al. (1992) investigaram o papel de IgE anti-verme adulto, na resistência à esquistossomose e encontraram uma correlação positiva entre anticorpos IgE anti-vermes adultos e a idade, e negativa, com a reinfeção. Os anticorpos IgE contra outros estágios do parasita não mostraram nenhum tipo de correlação com a reinfeção e, também, outros isotipos contra vermes adultos não apresentaram nenhuma correlação com a imunidade ou susceptibilidade.

Todos estes resultados evidenciam a importância do papel dos anticorpos da classe IgE na proteção e de IgG4 na susceptibilidade à esquistossomose em humanos. Porém, os mecanismos que regulam as alterações isotípicas, bem como o papel destes anticorpos, observados durante a infecção, ainda necessitam de maiores esclarecimentos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da intensidade de infecção pelo *Schistosoma mansoni* sobre o perfil de marcadores imunológicos da resposta celular e humoral na forma clínica intestinal da esquistossomose.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o perfil dos marcadores da resposta celular IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , IFN- γ , eotaxina e o número de eosinófilos em pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni.
- 2) Avaliar a influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre o perfil dos marcadores da resposta celular na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni.
- 3) Avaliar o perfil dos marcadores da resposta humoral IgG4 e IgE, específicos contra antígenos do ovo e do verme adulto na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni.
- 4) Avaliar a influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre o perfil dos marcadores da resposta humoral na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni.
- 5) Avaliar a relação entre a resposta celular e resposta humoral na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni.

3 POPULAÇÃO ESTUDADA

3.1. Caracterização da população estudada

Os indivíduos participantes deste estudo são residentes de área endêmica para a esquistossomose, situada na localidade de Virgem das Graças, no município de Ponto dos Volantes, Minas Gerais, Brasil.

O estudo atual não necessitou de novos recrutamentos de moradores da área endêmica, pois, utilizamos apenas plasmas congelados, dados demográficos e dados parasitológicos obtidos em estudo anteriormente realizado pelo nosso grupo, submetido e aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Todas as famílias residentes foram esclarecidas quanto aos objetivos do estudo e incluídas após a assinatura de consentimento informado, aprovado pelo CONEP. Essas famílias receberam um número único de identificação (HHID) e cada membro residente no mesmo núcleo familiar recebeu um número de identificação próprio (PID). Os dados demográficos como nome completo e data de nascimento foram coletados a partir de certidões de nascimento ou casamento, enquanto os dados parasitológicos foram obtidos a partir de exame parasitológico de fezes, avaliação clínica e exame ultrassonográfico. Os exames parasitológicos de fezes foram realizados anteriormente à coleta de sangue segundo método Kato-Katz (Katz et al. 1972). A avaliação clínica e os exames ultrassonográficos foram realizados por nossa equipe. O diâmetro das veias porta e mesentéricas, tamanho do fígado e do baço e o espessamento das paredes dos ramos portais e periféricos foram avaliados segundo Abdel-Wahab et al., 1993 e Doehring-Schwerdtfeger et al., 1990. Foi adotada a classificação da Organização Mundial de Saúde – WHO (1991) para categorizar a morbidade pela infecção pelo *S. mansoni*: grau zero (ausência de fibrose), espessamento das paredes dos ramos periportais menor que 0,3cm; grau I (fibrose leve), espessamento entre 0,3 e 0,5cm; grau II (fibrose moderada), espessamento 0,5 a 0,7cm; e grau III (fibrose acentuada), espessamento superior a 0,7cm. Todos os dados estão armazenados no Centro de Pesquisas René Rachou, em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Partindo dessas informações demográficas e parasitológicas armazenadas, nosso estudo utilizou os seguintes critérios de inclusão:

- a- Pacientes com grau de fibrose zero, independente do resultado do exame parasitológico de fezes;
- b- Que não haviam sido tratados para *S. mansoni* nos últimos dois anos; e
- c- Residiam na área endêmica estudada.

3.2. Caracterização dos grupos de estudo

Nosso estudo avaliou dois grupos de pacientes: um grupo Negativo, formado por indivíduos com ausência de ovos de *S. mansoni* ao exame parasitológico de fezes e sem alterações hepáticas ou esplênicas ao exame ultrassonográfico; e um grupo Intestinal, composto por pacientes cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, identificados pela presença de ovos nas fezes, sem alterações hepáticas ou esplênicas ao exame ultrassonográfico.

O grupo negativo foi formado por um total de 33 indivíduos (15 homens e 18 mulheres) com idade variando entre 14 e 82 anos, enquanto o grupo intestinal foi formado com um total de 96 pacientes (38 homens e 58 mulheres) com idade variando de 9 a 92 anos. Este grupo intestinal foi dividido em dois sub-grupos de acordo com a intensidade de infecção: um com carga parasitária menor que 100 ovos por grama de fezes, formado por 65 pacientes (25 homens e 40 mulheres) com idade variando de 13 a 92 anos; e outro grupo, com carga parasitária maior ou igual a 100 ovos por grama de fezes, formado por 31 pacientes (13 homens e 18 mulheres) com idade variando de 9 a 71 anos (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos grupos de estudo em relação à idade e à intensidade de infecção.

Grupo		Sexo		Idade (anos) - Mediana
Negativo		♂	15	35,0
		♀	18	
Intestinal	opg <100	♂	25	38,0
		♀	40	
	opg ≥100	♂	13	25,0 ^a
		♀	18	

^aDiferença significativa de idade entre os sub-grupos opg < 100 e opg ≥ 100 (p=0,0237)

Não houve diferença estatisticamente significativa de idade entre o grupo intestinal e o grupo negativo. Porém, dentro do grupo intestinal, os pacientes com opg maior ou igual a 100 foram estatisticamente mais jovens que os pacientes com menos de 100 ovos por grama de fezes, existindo, também, uma correlação negativa estatisticamente significativa entre a idade

e a intensidade de infecção (opg) dos pacientes avaliados neste estudo (Spearman $r = -0,222$, $p = 0,011$, $n = 129$).

As médias da intensidade de infecção nas faixas etárias de 9-19 e de 20-29 anos foram estatisticamente maiores do que a média de intensidade de infecção na faixa etária maior de 60 anos. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa de intensidade de infecção entre os sexos em nenhuma faixa etária (FIG. 3).

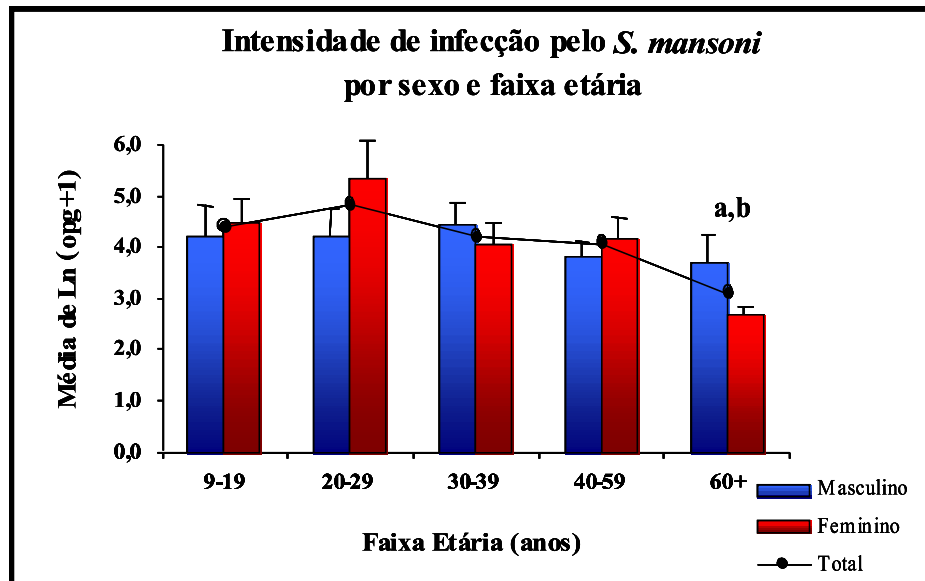


Figura 1 – Média da intensidade de infecção pelo *Schistosoma mansoni* na população estudada. As letras “a” e “b” representam, respectivamente, diferenças de intensidade de infecção entre o grupo de faixa etária de 60 ou mais anos e os grupos de 9 a 19 ($p < 0,05$) e de 20 a 29 anos ($p < 0,01$). A intensidade de infecção foi avaliada através da média do logaritmo neperiano do número de ovos por grama de fezes + 1 ($\text{Ln}(\text{opg}+1)$).

A distribuição dos pacientes do grupo intestinal e do grupo negativo por faixa etária está representada na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos grupos Intestinal e Negativo por sexo e por faixa etária.

Faixa etária (anos)	Grupo Intestinal			Grupo Negativo		
	♂	♀	Total	♂	♀	Total
9-19	11	16	27	2	4	6
20-29	7	9	16	2	6	8
30-39	6	8	14	1	4	5
40-59	5	12	17	6	1	7
60+	9	13	22	4	3	7
Total	38	58	96	15	18	33

4 METODOLOGIA

4.1. Coleta e exame parasitológico de fezes

A presença e a intensidade de infecção foram determinadas através da presença e da contagem do número de ovos do parasita por grama de fezes (epg), obtidos através do método de Kato-Katz (Katz et al., 1972). Três amostras de fezes para cada indivíduo foram coletadas em dias consecutivos e o número de ovos por grama de fezes determinado através da média aritmética destas amostras. Os exames foram rotineiramente executados pelo nosso grupo, em colaboração com a Escola de Enfermagem da Universidade de Minas Gerais.

Os exames parasitológicos de fezes foram realizados antes da coleta de sangue e anteriormente à administração de quimioterápicos, sendo que todos os indivíduos portadores da infecção foram tratados com Praziquantel, independentes de sua participação, ou não, neste estudo.

4.2. Coleta e estoque do plasma

O presente estudo utilizou apenas amostras de um banco de plasmas congelados, obtidos anteriormente por nosso grupo, de amostras de sangue total coletadas em tubos com heparina. Os plasmas foram separados das células através de centrifugação a 800g por 10 minutos e transferidos para tubos estéreis de 1ml (Nunc cryotubes), que foram rotulados com o número de identificação (PID) e estocados a -70° C.

4.3. Preparação dos antígenos de *Schistosoma mansoni*

Os antígenos solúveis do *S. mansoni* foram preparados pelo nosso grupo segundo o método descrito por Gazzinelli et al.(1983). Os vermes adultos e ovos foram coletados de camundongos albinos suíços infectados com cercárias da cepa LE de *S. mansoni*. Vermes adultos e ovos foram ressuspensos separadamente em salina 1,7% e triturados em homogenizador com pistão de teflon (WIRTS, DTL). O homogenato resultante foi centrifugado a 50.000 g durante 1 hora a 4° C. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra PBS 0,05M, pH 7,4 (reagentes SIGMA. E.U.A), durante 48 horas a 4° C e filtrado em filtro de

0.45 μ m (Filter millex -HA- Millipore Products Division, Bedford, MA). As dosagens de proteínas dos antígenos de vermes adultos (SWAP) e do ovo (SEA), foram determinadas segundo o método descrito por Lowry et al. (1951). As soluções antigênicas obtidas foram fracionadas em alíquotas e conservadas a -20°C , para uso posterior.

4.4. Detecção dos níveis de anticorpos específicos contra antígenos de *S. mansoni*

Os níveis de anticorpos específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) e do ovo (SEA) foram determinados no plasma através de ensaios de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Foram utilizadas placas de poliestireno de fundo chato de 96 poços (Maxisorb; Nunc, Roskild, Denmark), sendo adicionados, a cada poço, 100 μ l de antígenos solúveis de *S. mansoni* SWAP ou SEA na concentração de 5 μ g/ml, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6. As placas foram vedadas e incubadas em geladeira durante a noite a 4°C . No dia seguinte, as placas foram lavadas cinco vezes com salina tampão-fosfato 0,15M (PBS, pH 7,2), vertidas e a cada poço foram adicionados 200 μ l da solução de bloqueio 0,15M PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma, St Louis, MO, (PBS-T) e 10% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas durante uma hora à temperatura ambiente, vertidas e foram adicionados 100 μ l de plasma diluídos 1:100 para a dosagem dos anticorpos IgE e 1:640 para a dosagem de IgG4. Todos os ensaios foram feitos em duplicata. As determinações das diluições dos plasmas foram obtidas a partir de uma curva com diferentes concentrações de um pool de plasmas. Após a adição dos plasmas, as placas foram vedadas e incubadas durante a noite em geladeira a 4°C . No dia seguinte, as placas foram lavadas por 5 vezes com tampão 0,15M PBS-T e foram adicionados 100 μ l por poço do anticorpo anti-imunoglobulina humana IgG4 conjugado com biotina (Zymed, San Francisco, CA) diluído 1:1000. As placas foram incubadas por 90 minutos a temperatura ambiente e lavadas por cinco vezes com tampão PBST. Cem microlitros de 1:1000 de streptavidin horseradish peroxidase (Amersham, Piscataway, NJ) foram então adicionados a cada poço e as placas incubadas por 90 minutos a temperatura ambiente. Cem microlitros de o-phenylenediamine (OPD) (Sigma, St. Louis, MO) contendo 0,03% de hidrogênio peroxidase foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas ao abrigo da luz. A reação foi interrompida após uma hora com a adição de 50 μ l de ácido sulfúrico a 12,5% em cada poço. A densidade ótica foi medida em

leitor automático (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) utilizando-se filtro de 450 nm. As condições para a detecção dos anticorpos IgE específicos contra SWAP e SEA foram as mesmas descritas acima, exceto que 100µl de anticorpo anti-IgE conjugado com fosfatase alcalina (Pharmingen, San Diego, CA) diluídos 1:500 foram adicionados a cada poço, as placas foram incubadas por 90 minutos a temperatura ambiente e, então, lavadas por cinco vezes com PBST. Em seguida, foram adicionados, a cada poço, 100µl de 10% diethanolamine em 0,01% MgCl₂ (pH 9,8) contendo 1mg/ml de p-nitrophenylphosphate. Após uma hora de incubação ao abrigo da luz, a reação foi interrompida e a leitura das placas efetuada.

4.5. Detecção dos níveis de eotaxina no plasma

Os níveis plasmáticos da quimiocina eotaxina foram determinados através de ensaios de ELISA sanduíche (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Para a realização destes ensaios, as amostras de plasmas foram processadas segundo o protocolo descrito por Falcão et al (2002). Este processamento foi realizado com a finalidade de remover o excesso de proteínas do plasma, diminuindo as possíveis interferências no ensaio. A 200µl de cada amostra de plasma foram acrescentados duzentos microlitros de ácido trifluoracético 1,2% (1,35M NaCl), sendo as amostras homogeneizadas e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 minutos a 4°C. A 300µl, retirados do sobrenadante, foram acrescentados 1200µl da solução neutralizante. As amostras foram então homogeneizadas e o pH ajustado para 7,4 com a adição de NaOH 0,5M ou HCl 0,1M (reagentes SIGMA. E.U.A). Foram acrescentados 10µl de BSA 10% (SIGMA. E.U.A) a cada amostra, sendo elas, após homogeneização, armazenadas a -20°C.

Para a quantificação dos níveis de eotaxina foram usados os anticorpos do KIT R&D Systems, sendo a metodologia utilizada adaptada do protocolo original indicado pelo fabricante. A placas de fundo chato de 96 poços (Maxisorb; Nunc, Roskild, Denmark), foram adicionados, a cada poço, 100µl do anticorpo de captura (R&D Systems) na concentração de 2µg/ml em salina tampão-fosfato 0,15M (PBS, pH 7,4) (SIGMA. E.U.A). As placas foram vedadas e incubadas em geladeira a 4°C durante a noite e, no dia seguinte, lavadas três vezes com 300µl por poço de PBS, pH 7,4. A cada poço, foram acrescentados 200µl da solução de bloqueio (0,15M PBS com 0,5% de Tween20, pH7,4) e as placas então incubadas por uma

hora a temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas quatro vezes com 300µl por poço da solução 0,15M PBS com 0,05% de Tween20, pH 7,4 (PBST 0,05%). Foram preparadas sete soluções dos padrões de eotaxina (Kit R&D Systems) nas concentrações 1000pg/ml (1:1), 500pg/ml (1:2), 250pg/ml (1:4), 125pg/ml (1:8), 62,5pg/ml (1:16), 31,25pg/ml (1:32) e 15,625pg/ml(1:64), todas diluídas em 0,15M PBS com 0,05% de Tween20, pH 7,4. Cem microlitros de cada solução do padrão foram então adicionados, em duplicatas, aos poços das duas primeiras colunas das placas. Aos dois últimos poços destas colunas foram adicionados 100µl de 0,15M PBS com 0,05% de Tween20, pH 7,4 como controle negativo. Aos demais poços das placas foram acrescentados, também em duplicatas, 100µl das amostras de plasmas processadas. As placas foram novamente vedadas e incubadas em geladeira a 4°C durante a noite e, no dia seguinte, lavadas quatro vezes com 300µl por poço de PBST 0,05%, pH 7,4. Foram adicionados 100µl de anticorpo de detecção biotilado (Kit R&D Systems) na concentração de 100ng/ml em PBST 0,05% em todos os poços das placas, sendo estas incubadas por uma hora, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, cem microlitros de streptavidin horseradish peroxidase (Amersham, Piscataway, NJ) diluída 1:1000 em PBST 0,05% foram adicionados a cada poço das placas, sendo estas incubadas por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após este período de incubação, as placas foram novamente lavadas por quatro vezes com PBST 0,05% e, a cada poço, foram acrescentados 100µl de TMB. Ao abrigo da luz e a temperatura ambiente, as placas foram incubadas por 30 minutos, sendo a reação interrompida com a adição de 50µl de ácido sulfúrico a 12,5% em cada poço. A densidade ótica foi medida em leitor automático (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) utilizando-se filtro de 450 nm. As concentrações de eotaxina das amostras foram então determinadas segundo um modelo de ajustamento através da curva de 4-parâmetros, definida a partir das concentrações conhecidas dos padrões.

4.6. Detecção do nível de citocinas plasmáticas

Os níveis plasmáticos das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ foram quantificados através de citometria de fluxo, utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) (Becton Dickinson-BD), segundo metodologia adaptada dos protocolos originais descritos por Chen R, et al (1999). Trezentos microlitros de cada amostra de plasma foram centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos. Duzentos microlitros do centrifugado foram

coletados, sem o sedimento e sem a camada superior de gordura, e estocados a -20°C . No dia seguinte, as alíquotas de plasma foram descongeladas em banho maria a 37°C e novamente centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos. Vinte e cinco microlitros do sobrenadante foram coletados e transferidos para tubos de poliestireno de 5ml (Falcon nº 2052). Foram preparadas também, alíquotas de 25 μl de padrões em diluições seriadas com diluente G (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit) nas concentrações 5000pg/ml (1:1), 2500pg/ml (1:2), 1250pg/ml (1:4), 625pg/ml (1:8), 312,5pg/ml (1:16), 156pg/ml (1:32), 80pg/ml (1:64), 40pg/ml (1:128) e 20pg/ml (1:256). Uma alíquota de 25 μL contendo apenas o diluente G foi preparada como controle. Todas as alíquotas foram feitas em tubos de poliestireno de 5mL. Foram adicionados 15 μl da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit) a todos os tubos, sendo estes homogeneizados e incubados por 90 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μL de tampão de lavagem F (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit), centrifugadas a 600 x g, por 7 minutos a 18°C , o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram homogeneizadas e re-incubadas com 20 μl do reagente B (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit) durante 90 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Este reagente é uma mistura de anticorpos monoclonais anti-citocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2). Após a incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 500 μl da solução F, centrifugadas a 600 x g, por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 μl de reagente F e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD).

4.7. Aquisição e análise dos níveis plasmáticos de citocinas por citometria de fluxo

A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD). Embora as esferas marcadas com fluorocromo, presentes no kit CBA, sejam desenhadas para serem excitadas com o laser a 488nm, comum a todos os citômetros de fluxo da BD, elas também podem ser excitadas pelo uso do segundo laser (“red diodo laser”) e as fluorescências emitidas pelas esferas possíveis de serem detectadas no canal FL-4. Esta abordagem durante o processo de aquisição foi obtida através da utilização do “Dual Laser CBA Template” e simplificou o ajuste do citômetro por reduzir a necessidade de compensações nas

fluorescências. Assim, um total de 1.800 eventos foram adquiridos na janela “R1” selecionado em um gráfico de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC)(FIG. 1).

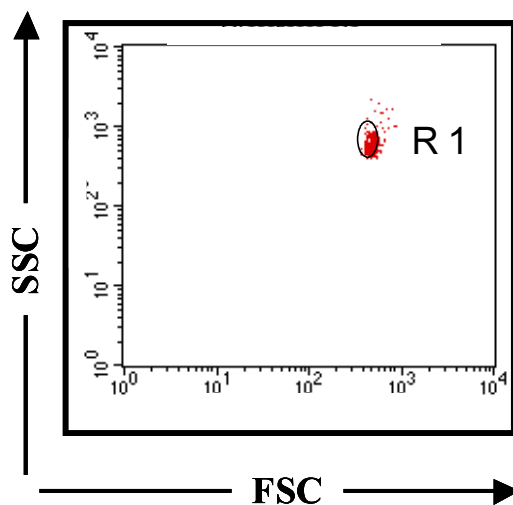


Figura 2 – Gráfico de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC)

As seis citocinas analisadas foram separadas e quantificadas em gráficos de canais de fluorescências FL-2 x FL-4, onde as seis esferas com suas intensidades de fluorescência distintas foram separadas no eixo Y (FL-4) e quantificadas através do deslocamento das mesmas no eixo X (FL-2) (FIG. 2A e B).

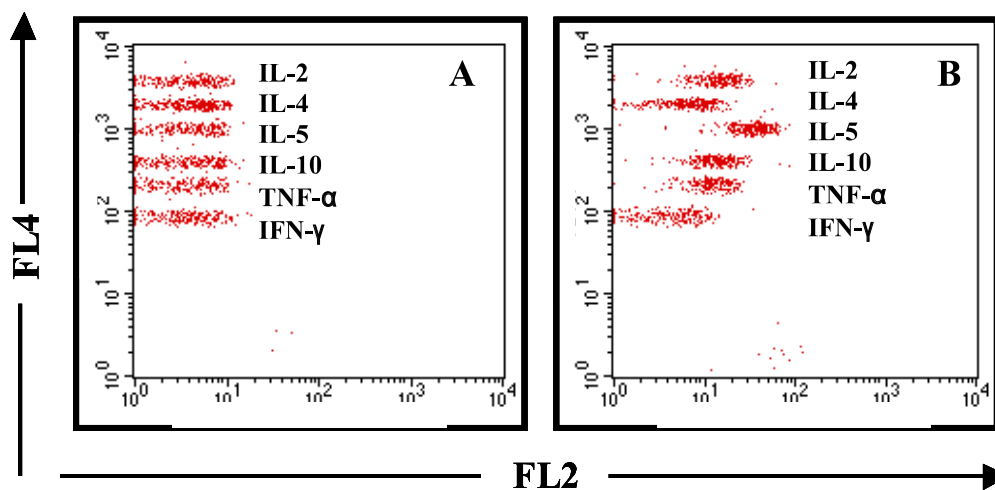


Figura 3 – Gráfico de fluorescência 4 (FL4) versus fluorescência 2 (FL2)

A: Representa a leitura do controle negativo. **B:** Representa a leitura positiva de uma amostra de plasma.

Para análise dos dados, uma curva padrão foi construída utilizando-se padrões de citocinas de concentrações conhecidas (20pg/ml – 5000pg/ml). As concentrações de citocinas das amostras foram então determinadas segundo um modelo de ajuste através da curva do 4-

parâmetros, que permite o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras que não caíam dentro dos limites da curva padrão. Quando a amostra apresentou uma concentração de citocina inferior ao limite de detecção, o valor zero foi usado.

4.8. Determinação do número de eosinófilos no sangue periférico

Para a determinação do número de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes foi realizado o hemograma sendo o número dessas células determinado a partir da avaliação de lâminas de esfregaço sangüíneo. O número absoluto de eosinófilos foi determinado em relação à global de leucócitos a partir da sua porcentagem encontrada em cem leucócitos contados no corpo de cada lâmina.

4.9. Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa PRISMA, versão 3,0 (E.U.A). Avaliamos as medianas dos dados não paramétricos, sendo utilizados para tal, os testes de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunns, para comparações envolvendo mais de dois grupos e o teste Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. Ainda para o conjunto de dados não paramétricos foi utilizada, quando necessária, a correlação de Spearman.

Para os dados paramétricos, avaliamos as médias dos grupos, utilizando para isso a análise de variância (ANOVA) seguida do teste Bonferroni, quando comparamos mais de dois grupos, o teste T de Student, nas comparações envolvendo apenas dois grupos e a correlação de Pearson, quando necessária.

Independente da avaliação estatística empregada, os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor que 0,05.

5. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em três partes distintas: na primeira, caracterizamos o perfil dos marcadores da resposta imunológica celular estudados e analisamos a influência da intensidade de infecção neste perfil; na segunda, caracterizamos o perfil dos marcadores da resposta imunológica humoral estudados e a influência da intensidade de infecção sobre este perfil; e na terceira parte, avaliamos as relações entre os marcadores imunológicos da resposta celular e os marcadores imunológicos da resposta humoral.

Primeira parte: Caracterização do perfil dos marcadores da resposta imunológica celular de pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose e avaliação da influência da intensidade de infecção sobre este perfil identificado

5.1 Caracterização do perfil das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina eotaxina presentes no plasma dos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose

Vários trabalhos da literatura demonstram que o predomínio da resposta imunológica do tipo 1 durante a fase aguda da esquistossomose mansoni é alterada, com o progresso da infecção para a fase crônica, que passa a apresentar um predomínio de resposta do tipo 2 (Cheever et al., 2000), sendo essa modulação mediada principalmente pela citocina IL-10 (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999). Entretanto, poucos são os estudos relacionados à determinação do perfil geral de resposta imune dos indivíduos durante a fase crônica intestinal da esquistossomose mansoni. Dessa forma, através da avaliação das concentrações plasmáticas de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ e da quimiocina eotaxina em um grupo de pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni e em um grupo de indivíduos negativos, nós caracterizamos o perfil da resposta imunológica, referente a estas moléculas.

Nossos resultados demonstraram uma elevação estatisticamente significativa dos níveis plasmáticos de IL-10 e IL-5 ($p=0,0315$ e $p=0,0494$, respectivamente) no grupo Intestinal, quando comparados com o grupo Negativo (FIG. 4A e 4B). Entretanto, os níveis de IL-2, IL-4, TNF- α e IFN- γ não diferiram estatisticamente entre os grupos analisados ($p>0,05$).

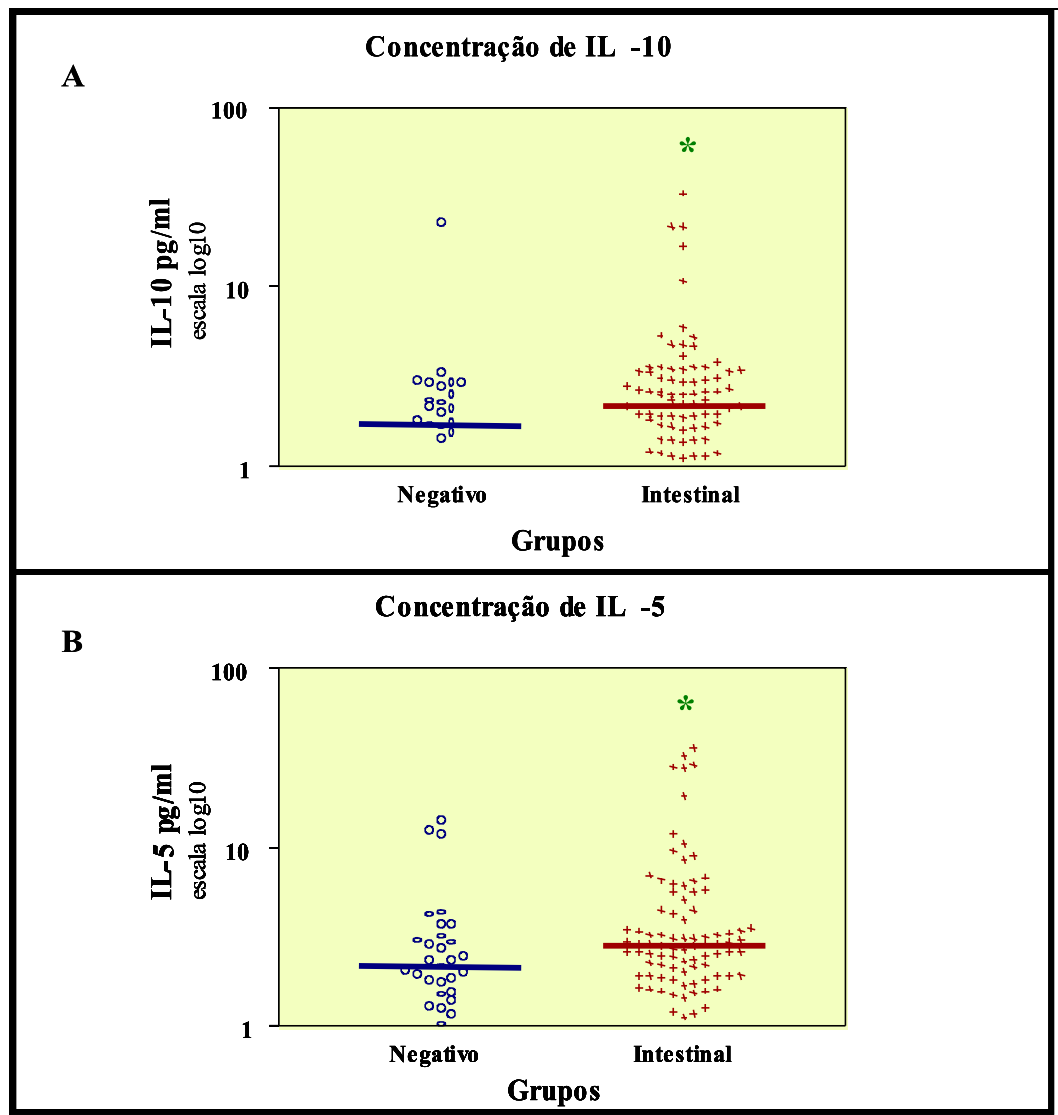


Figura 4 – Concentrações das citocinas IL-10 (Figura 4A) e IL-5 (Figura 4B) nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais das concentrações das citocinas, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações no grupo Negativo (IL-10 = 1,70 pg/ml e IL-5 = 2,18 pg/ml) e no grupo Intestinal (IL-10 = 2,16 pg/ml e IL-5 = 2,86 pg/ml). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Negativo e Intestinal nos níveis de IL-10 ($p=0,0315$) e de IL-5 ($p=0,0494$).

Em relação à eotaxina, nossos resultados demonstraram níveis plasmáticos estatisticamente mais elevados ($p=0,0054$) desta molécula no grupo Intestinal, em relação ao grupo Negativo (FIG. 5).

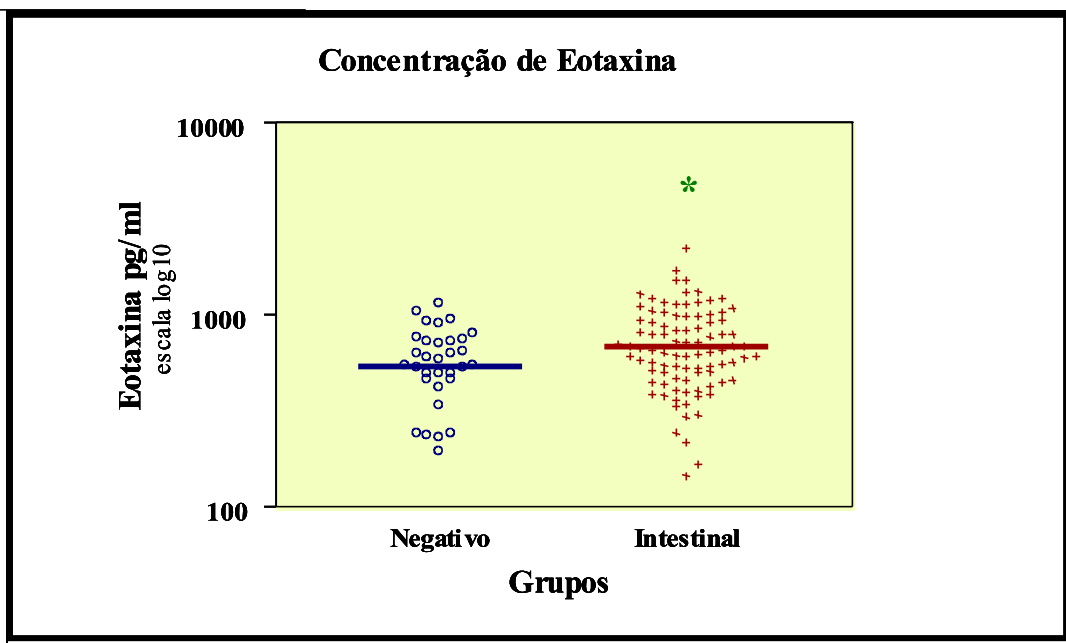


Figura 5 – Concentrações da quimiocina eotaxina nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais das concentrações de eotaxina, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações no grupo Negativo (559,50 pg/ml) e no grupo Intestinal (660,67 pg/ml). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0054$) entre os grupos Negativo e Intestinal.

Portanto, encontramos as concentrações de IL-10, IL-5 e eotaxina estatisticamente maiores no grupo Intestinal, demonstrando um perfil de resposta imunológica tipo 2, durante a fase crônica intestinal da esquistossomose mansoni.

5.2 Análise da influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre o perfil das citocinas IL-10 e IL-5 e da quimiocina eotaxina, no plasma dos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose

Uma vez que encontramos um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-10, IL-5 e eotaxina no grupo Intestinal, em relação ao grupo Negativo, nós avaliamos a influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre o perfil destas citocinas. Para tal, dividimos o grupo de pacientes portadores da forma clínica intestinal em dois subgrupos de acordo com a carga parasitária: um formado por pacientes com menos que 100 ovos por grama de fezes (INT opg < 100), e outro composto por pacientes contendo 100 ou mais ovos por grama de fezes (INT opg \geq 100). Em seguida, nós comparamos o perfil das citocinas IL-

10 e IL-5 e da quimiocina eotaxina destes subgrupos entre si e com o grupo Negativo, assim como, avaliamos as correlações destas moléculas com o número de ovos por grama de fezes.

Os níveis plasmáticos de IL-10 mostraram-se significativamente mais elevados no grupo com carga parasitária com 100 ou mais ovos por grama de fezes (INT opg \geq 100), tanto em relação ao grupo com menos de 100 ovos por grama de fezes (INT opg $<$ 100), quanto em relação ao grupo Negativo (ambos com $p < 0,001$) (FIG. 6). Observamos ainda, a existência de uma correlação positiva e estatisticamente significativa (Spearman $r = 0,4420$ e $p < 0,0001$) entre os níveis de IL-10 e opg.

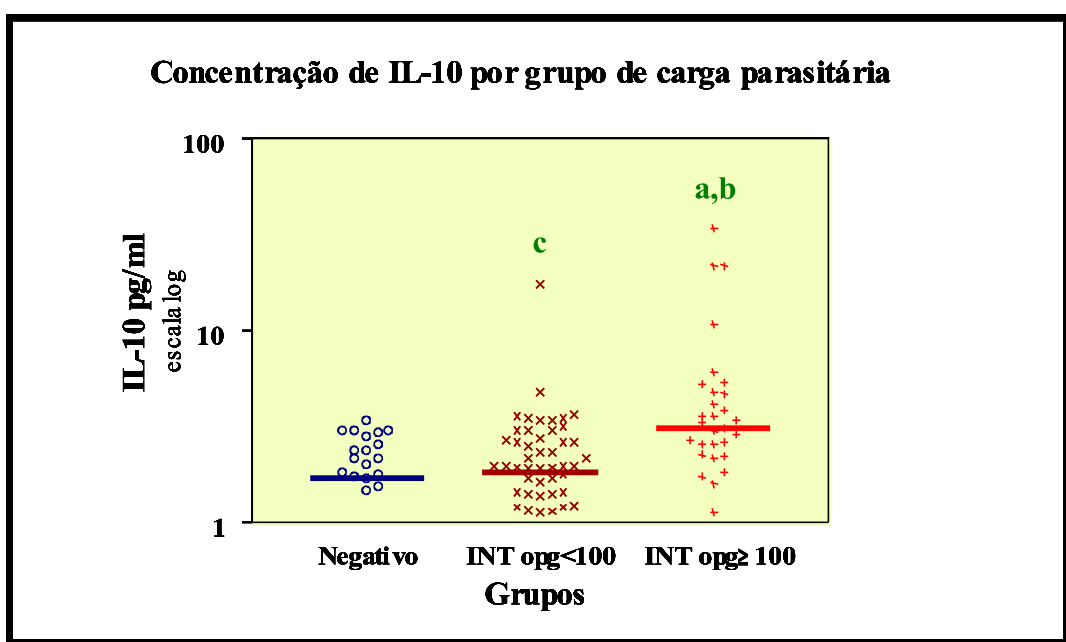


Figura 6 – Concentrações da citocina IL-10 por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0, X e + representam os valores individuais das concentrações de IL-10, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações nos grupos Negativo (1,70 pg/ml), INT opg $<$ 100 (1,84 pg/ml) e INT opg \geq 100 (3,10 pg/ml). A letra “a” representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo INT opg \geq 100 e o grupo Negativo ($p < 0,0001$), enquanto as letras “b” e “c” representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos INT opg \geq 100 e INT opg $<$ 100 ($p < 0,0001$).

Em relação à IL-5, nossos dados demonstraram uma elevação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) nos níveis plasmáticos desta molécula nos pacientes do grupo INT opg \geq 100 em relação ao grupo Negativo, mas não em relação ao grupo INT opg $<$ 100. Também não observamos diferença estatisticamente significativa entre o grupo INT opg $<$ 100 e o grupo Negativo, conforme demonstrado na Figura 7. Por outro lado, de forma semelhante ao observado para a citocina IL-10, nós também observamos a existência de uma correlação positiva e estatisticamente significativa (Spearman $r = 0,2571$ e $p < 0,0001$) entre os níveis de IL-5 e o número de ovos por grama de fezes dos pacientes estudados.

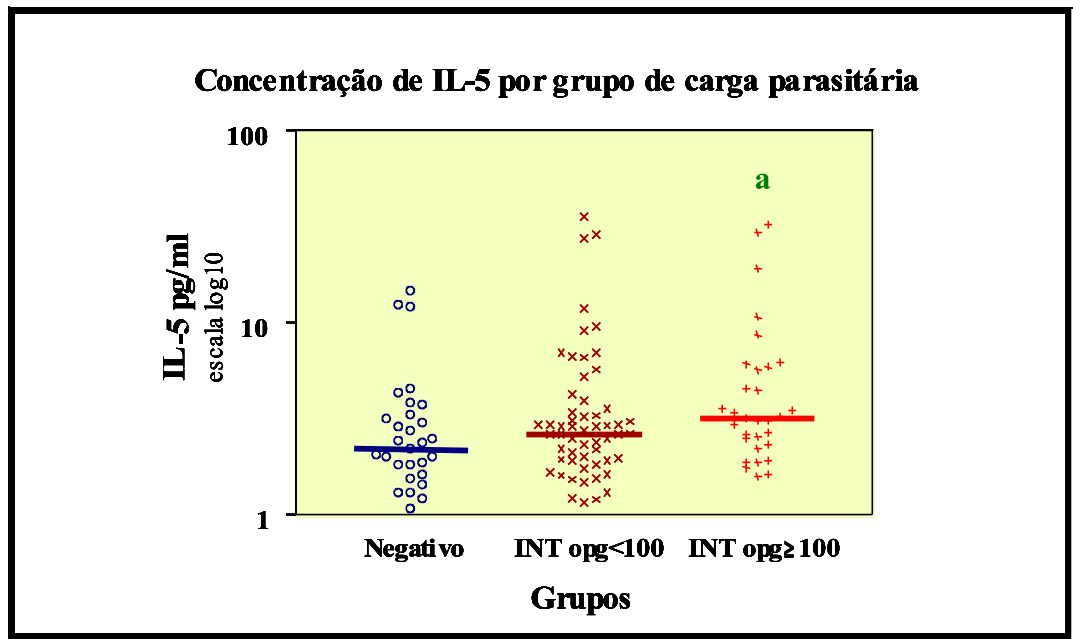


Figura 7 – Concentrações da citocina IL-5 por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0, X e + representam os valores individuais das concentrações de IL-5, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações nos grupos Negativo (2,18 pg/ml), INT opg < 100 (2,63 pg/ml) e INT opg ≥ 100 (3,18 pg/ml). A letra “a” representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo INT opg ≥ 100 e o grupo Negativo ($p < 0,05$).

Nós avaliamos também a influência da intensidade de infecção sobre o perfil das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-4, e não observamos diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos níveis destas citocinas entre os dois grupos de carga parasitária avaliados. Também não encontramos correlações estatisticamente significativas destes marcadores com o número de ovos por grama de fezes.

Em relação à eotaxina, nossos resultados demonstraram uma elevação estatisticamente significativa ($p < 0,001$) nos níveis plasmáticos desta quimiocina apenas no grupo INT opg ≥ 100 em relação ao grupo Negativo conforme demonstrado na Figura 8. Entretanto, não observamos a existência de correlação estatisticamente significativa entre os níveis de eotaxina e o número de ovos por grama de fezes dos pacientes estudados.

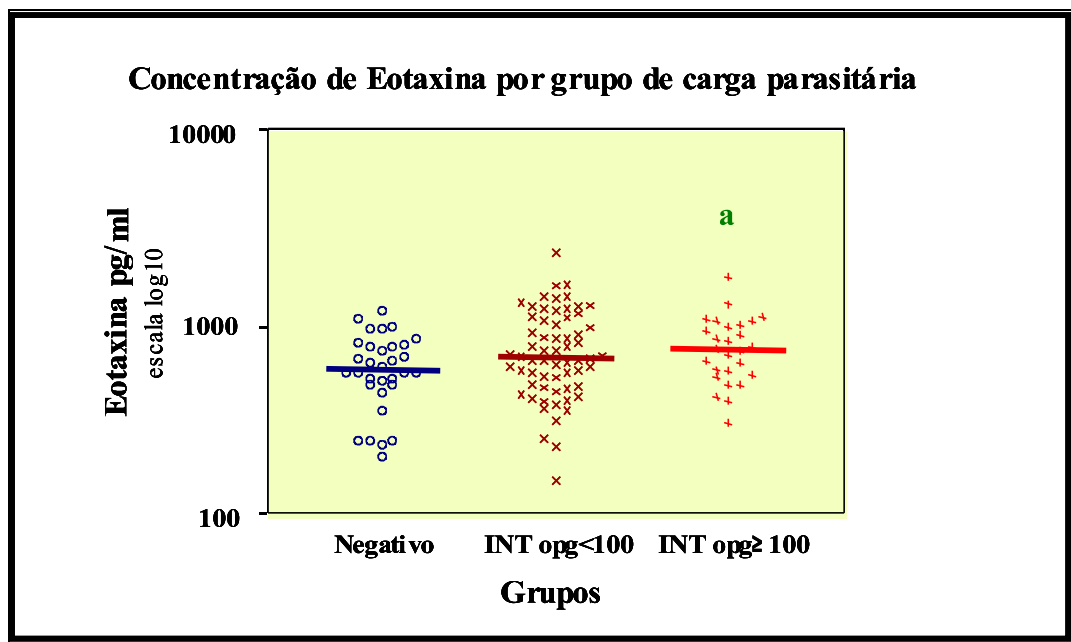


Figura 8 – Concentrações da quimiocina eotaxina por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0, X e + representam os valores individuais das concentrações de eotaxina, enquanto as barras expressam a mediana dessas concentrações nos grupos Negativo (559,50 pg/ml), INT opg < 100 (643,22 pg/ml) e INT opg ≥ 100 (697,29 pg/ml). A letra “a” representa diferença estatisticamente significativa entre o grupo INT opg ≥ 100 e o grupo Negativo ($p < 0,05$).

Portanto, nossos dados sugerem que as produções de IL-10, IL-5 e eotaxina sofrem influência da intensidade de infecção em pacientes com a forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni.

5.3. Caracterização do perfil de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose

Nossos resultados demonstraram que, na forma clínica intestinal, ocorrem elevações estatisticamente significativas nos níveis plasmáticos de eotaxina, de IL-5 e IL-10. Uma vez que IL-5 está associada ao aumento do número de eosinófilos (Weinstock, 1992; Sher et al., 1990) e que a eotaxina é uma quimiocina que contribui efetivamente para a mobilização dessas células (Kita & Gleich, 1996; Jose et al., 1994), nós avaliamos o número absoluto dessas células presentes no sangue periférico dos pacientes do grupo Intestinal e do grupo Negativo.

O número absoluto de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes foi estatisticamente mais elevado ($p=0,0301$) no grupo Intestinal (830 células/mm^3), em relação ao grupo Negativo (552 células/mm^3), conforme demonstrado na figura 9.

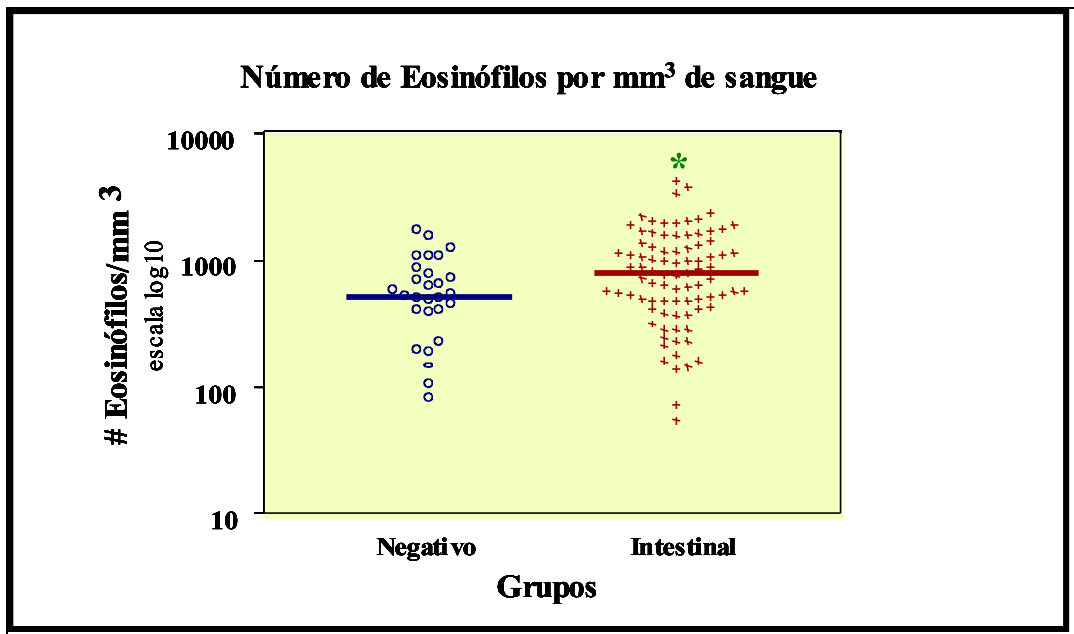


Figura 9 - Número de Eosinófilos no sangue periférico nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os números individuais de eosinófilos, enquanto as barras expressam a mediana desses valores no grupo Negativo (552 células/mm^3) e no grupo Intestinal (830 células/mm^3). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0301$) entre os grupos Negativo e Intestinal.

Observamos também, a presença de eosinofilia (acima de $700 \text{ eosinófilos/mm}^3$) (Jonhson, 1982) no grupo Intestinal, o que não ocorreu no grupo Negativo.

5.4. Análise da influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre o perfil de eosinófilos presentes no sangue periférico de pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose

Nós observamos um aumento estatisticamente significativo do número absoluto de eosinófilos no grupo Intestinal, em relação ao grupo Negativo, o que nos conduziu à avaliação da influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre o número dessas células em pacientes portadores da forma clínica intestinal da doença.

Nossos resultados demonstraram que o número absoluto de eosinófilos no sangue periférico dos pacientes foi significativamente mais elevado apenas no grupo INT opg \geq 100 em relação ao grupo Negativo ($p < 0,05$), conforme demonstrado na figura 10.

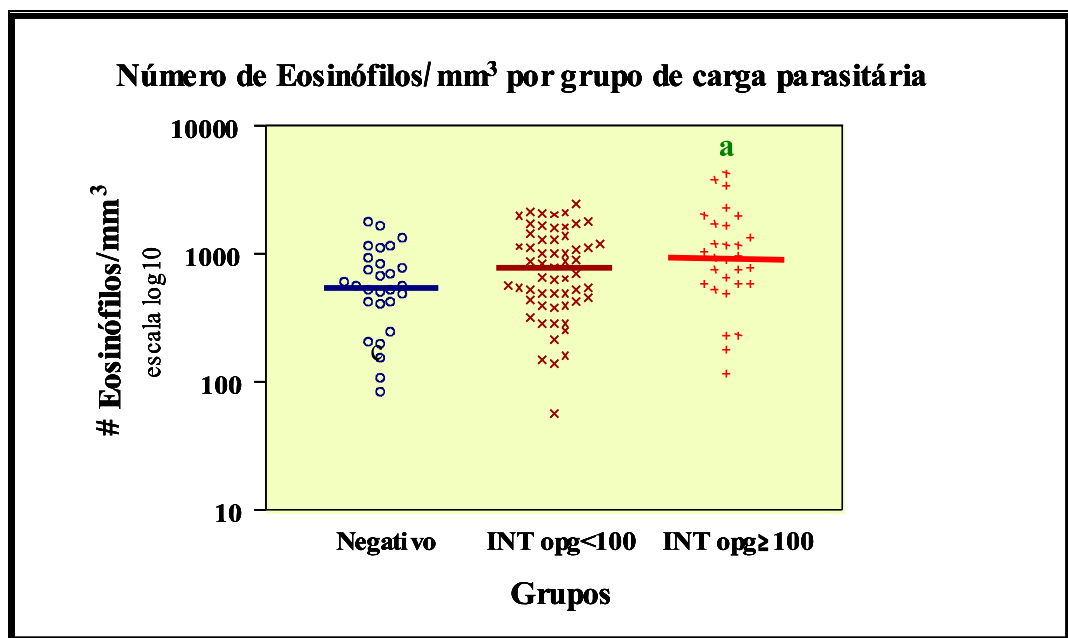


Figura 10 – Número de eosinófilos por mm³ no sangue periférico dos pacientes por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os números individuais de eosinófilos, enquanto as barras expressam a mediana desses valores nos grupos Negativo (552/mm³), INT opg < 100 (792/mm³) e INT opg \geq 100 (918/mm³). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos INT opg \geq 100 e Negativo.

Nós observamos também, uma correlação positiva e estatisticamente significativa (Spearman $r = 0,2127$ e $p = 0,0219$) entre o número de eosinófilos e o número de ovos por grama de fezes (opg) dos pacientes analisados neste estudo, assim como encontramos correlação semelhante entre IL-5 e opg (Spearman $r = 0,2571$ e $p < 0,0001$), sugerindo que IL-5 é uma citocina importante na mobilização de eosinófilos durante a infecção.

Portanto, o número de eosinófilos do sangue periférico é influenciado pela intensidade de infecção em pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose.

5.5. Análise das relações existentes entre IL-10, IL-5, eotaxina e eosinófilos no grupo Intestinal

Vários autores reportam a ação de IL-10 como mediadora do desvio da resposta imunológica do tipo 1, predominante na fase aguda, para uma resposta do tipo 2, na fase crônica (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999). Uma vez que nossos dados demonstraram um aumento dos níveis de IL-10 e IL-5 na forma clínica intestinal da doença, decidimos avaliar a correlação entre estas moléculas no grupo Intestinal.

Outros estudos demonstram que a IL-5 está associada ao aumento do número de eosinófilos (Weinstock, 1992; Sher et al., 1990) e que a eotaxina é ativadora e quimioatraente para essas células (Kita & Gleich, 1996; Jose et al., 1994). Visto que nossos resultados demonstraram a ocorrência de elevações estatisticamente significativas nos níveis da quimiocina eotaxina, da citocina IL-5 e do número absoluto de eosinófilos, nos pacientes com a forma clínica intestinal, avaliamos as correlações entre estes marcadores, no grupo de indivíduos portadores da forma clínica intestinal.

Nossos resultados, dispostos na Tabela 3, demonstraram que a IL-10 apresentou uma correlação positiva significativa com a IL-5 ($r=0,4018$ e $p<0,0001$), não correlacionando estatisticamente com eotaxina ou com o número de eosinófilos. De forma interessante, IL-5 apresentou uma correlação positiva significativa com eosinófilos ($r=0,4271$ e $p<0,0001$), contudo, não observamos correlação de IL-5 com eotaxina. Por sua vez, a eotaxina não se correlacionou significativamente com nenhum dos marcadores avaliados.

Tabela 3 - Correlações de Spearman entre os marcadores da resposta imunológica celular no grupo Intestinal.

Marcadores	IL-5	Eotaxina	Eosinófilos/mm ³
IL-10	r = 0,4018 p < 0,0001	r = -0,0171 p = 0,8777	r = 0,09683 p = 0,3898
IL-5	--	r = 0,03091 p = 0,7789	r = 0,4271 p < 0,0001
Eotaxina	--	--	r = 0,04117 p = 0,7134

Os valores destacados em negrito correspondem a correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

5.6. Análise da influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* nas relações de IL-10 com IL-5 e de IL-5 com o número de eosinófilos por mm³ de sangue

Ao encontramos correlações estatisticamente significativas entre IL-10 com IL-5 e entre IL-5 com o número absoluto de eosinófilos no grupo Intestinal, perguntamos se haveria influência da intensidade de infecção sobre essas correlações. Assim, analisamos estas correlações nos grupos: Negativo, INT opg < 100 e INT opg ≥ 100.

Nossos resultados dispostos na tabela 4 demonstraram as correlações entre esses marcadores nos grupos, Negativo, INT opg < 100 e INT opg ≥ 100. Observamos que a correlação de IL-10 com IL-5 foi mais forte no grupo INT opg ≥ 100 (Spearman r = 0,481 e p = 0,006), em relação ao grupo INT opg < 100 (Spearman r = 0,317 e p = 0,014).

Observamos ainda, que a correlação de IL-5 com eosinófilos foi mais forte no grupo INT opg ≥ 100 (Spearman r = 0,664 e p = 0,001) em relação ao grupo INT opg < 100 (Spearman r = 0,348 e p = 0,012).

Nossos resultados demonstraram que não existiram correlações estatisticamente significativas entre IL-10 e IL-5 ou IL-5 e eosinófilos no grupo Negativo.

Tabela 4 - Correlações entre os marcadores da resposta imunológica celular por grupos de carga parasitária.

Grupos	Correlações*	
	IL-10 com IL-5	IL-5 com Eosinófilos/mm ³
Negativo	Spearman r = 0,321 Valor de p = 0,084	Spearman r = 0,279 Valor de p = 0,167
INT opg < 100	Spearman r = 0,317 Valor de p = 0,014	Spearman r = 0,348 Valor de p = 0,012
INT opg ≥ 100	Spearman r = 0,481 Valor de p = 0,006	Spearman r = 0,664 Valor de p < 0,001

Os valores destacados em negrito correspondem a correlações estatisticamente significativas.

5.7. Análise das razões de IL-10 com TNF-α e de IL-10 com IFN-γ nos grupos Negativo e Intestinal

Figura 11 – Razão IL-10/TNF- α nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IL-10/TNF- α , enquanto as barras expressam a média em cada grupo (Negativo = 0,61 e Intestinal = 1,10). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0285$) entre grupos.

5.8. Análise da influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre a razão IL-10/TNF- α

Uma vez que encontramos uma diferença estatisticamente significativa na razão IL-10/TNF- α entre os grupos Negativo e Intestinal, nós avaliamos a influência da intensidade de infecção sobre esta relação, através da análise das razões IL-10/TNF- α nos grupos Negativo, INT opg < 100 e INT opg \geq 100.

A razão IL-10/TNF- α foi estatisticamente maior apenas no grupo INT opg \geq 100 em relação ao grupo Negativo ($p < 0,01$), sendo ela maior que 1 (1,49) no grupo INT opg \geq 100 e menor que 1 nos grupos INT opg < 100 e Negativo (0,92 e 0,61, respectivamente), conforme demonstrado na figura 12.

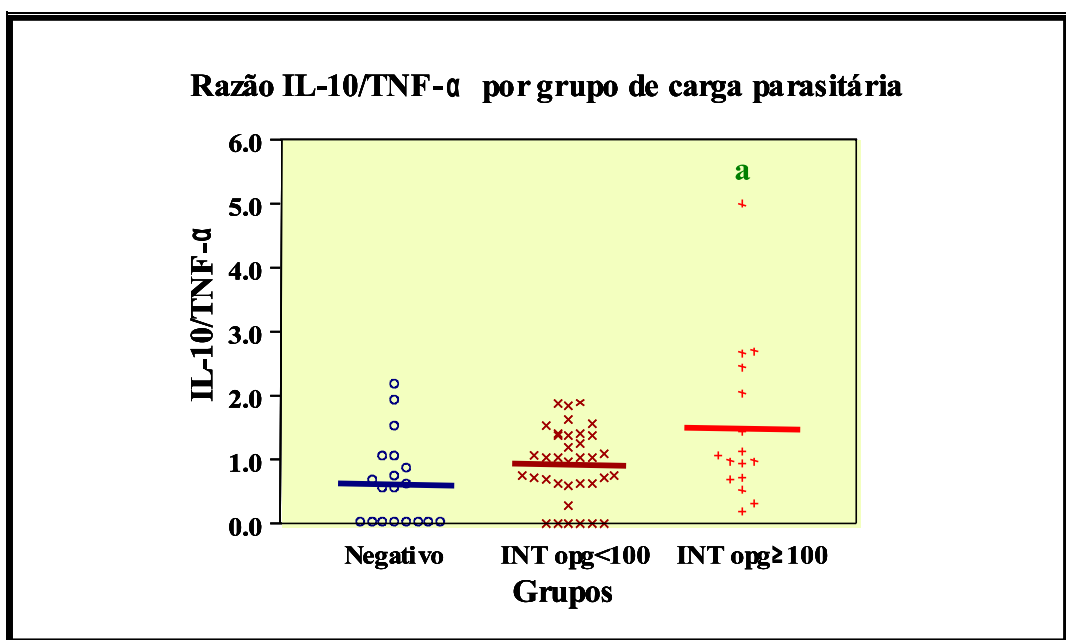


Figura 12 – Razão IL-10/TNF- α por grupo de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais da razão IL-10/TNF- α , enquanto as barras expressam a média em cada grupo (Negativo = 0,61; INT opg < 100 = 0,92; e INT opg \geq 100 = 1,49) . A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os grupos INT opg \geq 100 e Negativo.

Como já observado anteriormente para outros parâmetros imunológicos avaliados, estes resultados demonstraram que a razão IL-10/TNF- α também é influenciada pela intensidade de infecção durante a forma clínica intestinal da esquistossomose.

Segunda parte: Caracterização do perfil dos marcadores da resposta humoral em plasma de pacientes portadores da forma clínica intestinal e avaliação da influência da intensidade de infecção neste perfil

5.9. Caracterização do perfil dos anticorpos IgG4 e IgE específicos contra antígenos do ovo (SEA) e do verme adulto (SWAP) no plasma dos pacientes com a forma clínica intestinal da esquistossomose

Uma vez que vários estudos demonstraram a importância da relação entre os níveis de anticorpos IgG4 e IgE sobre a resposta imunológica contra a infecção pelo *S. mansoni* (Joseph et al., 1983; Verwaerde et al., 1987; Rihet et al., 1992; Demeure et al., 1993; Viana et al., 1995), caracterizamos o perfil de IgG4 e IgE específicos contra SEA e SWAP em pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose.

Os níveis plasmáticos dos anticorpos IgG4 específicos contra SEA foram estatisticamente mais elevados no grupo Intestinal, quando comparados àqueles obtidos para o grupo Negativo ($p < 0,0001$). No entanto, o perfil dos anticorpos IgE específicos contra SEA apresentou uma relação contrária, sendo os seus níveis plasmáticos estatisticamente menores ($p = 0,0447$) no grupo Intestinal (FIG. 13).

Em relação aos anticorpos IgG4 específicos contra SWAP, encontramos seus níveis plasmáticos estatisticamente mais elevados nos pacientes do grupo Intestinal em relação aos indivíduos de grupo Negativo ($p < 0,0001$). Porém, não observamos diferença estatisticamente significativa no perfil dos anticorpos IgE específicos contra SWAP entre estes grupos (FIG. 14).

Portanto, nossos resultados demonstraram que na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni, ocorreu uma elevação dos níveis de IgG4 anti-SEA e anti-SWAP, e uma diminuição dos níveis de IgE anti-SEA, sugerindo efeitos opostos dos isotipos IgG4 e IgE no controle e/ou estabelecimento/desenvolvimento dessa forma clínica.

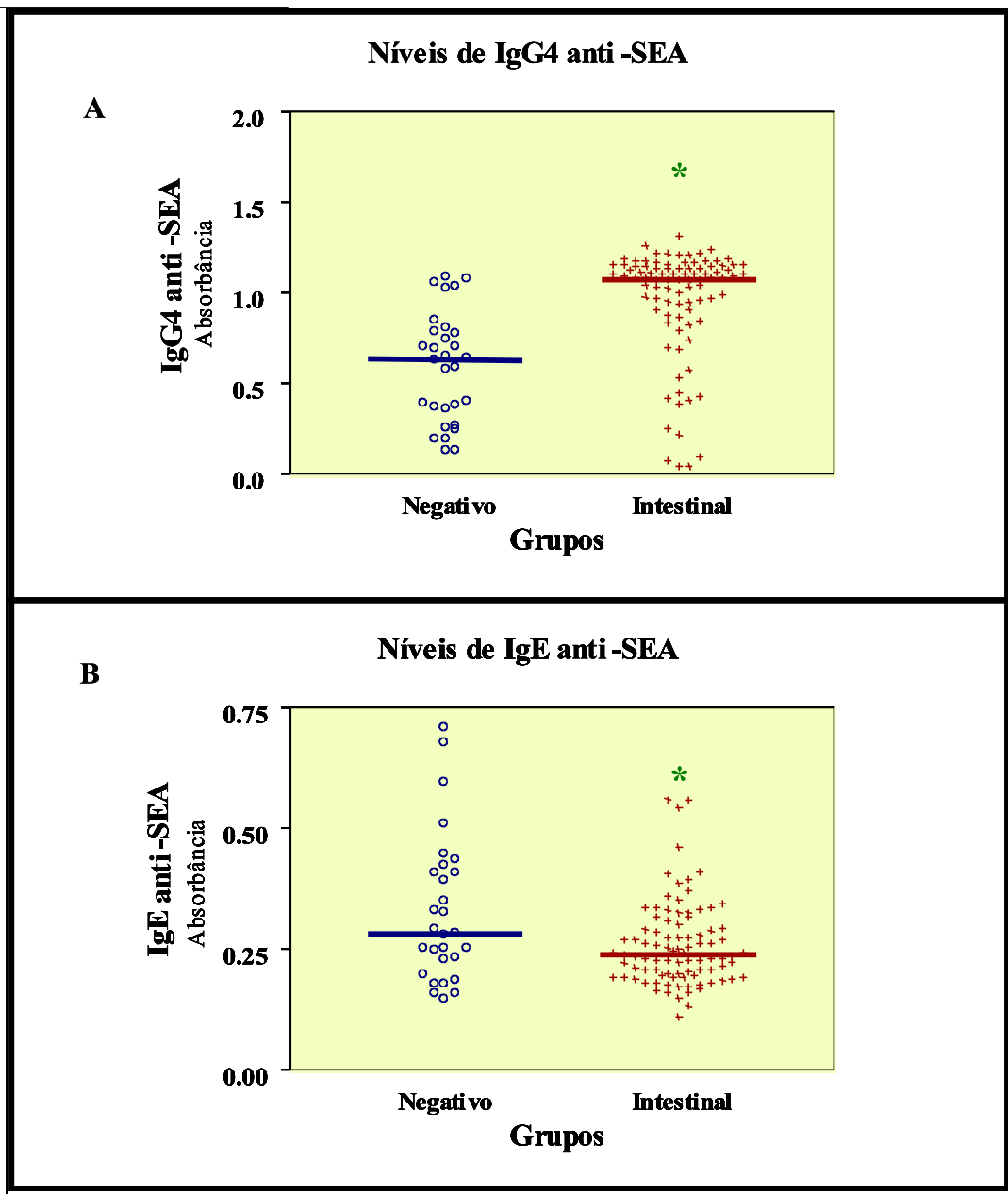


Figura 13 – Níveis dos anticorpos específicos contra antígenos do ovo (SEA) de *Schistosoma mansoni* nos grupos Negativo e Intestinal: IgG4 anti-SEA (figura A) e IgE anti-SEA (figura B). Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores no grupo Negativo (IgG4 anti-SEA = 0,636 e IgE anti-SEA = 0,285) e no grupo Intestinal (IgG4 anti-SEA = 1,088 e IgE anti-SEA = 0,24). Os asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos Negativo e Intestinal nos níveis de IgG4 anti-SEA e IgE anti-SEA ($p < 0,0001$ e $p = 0,0447$, respectivamente).

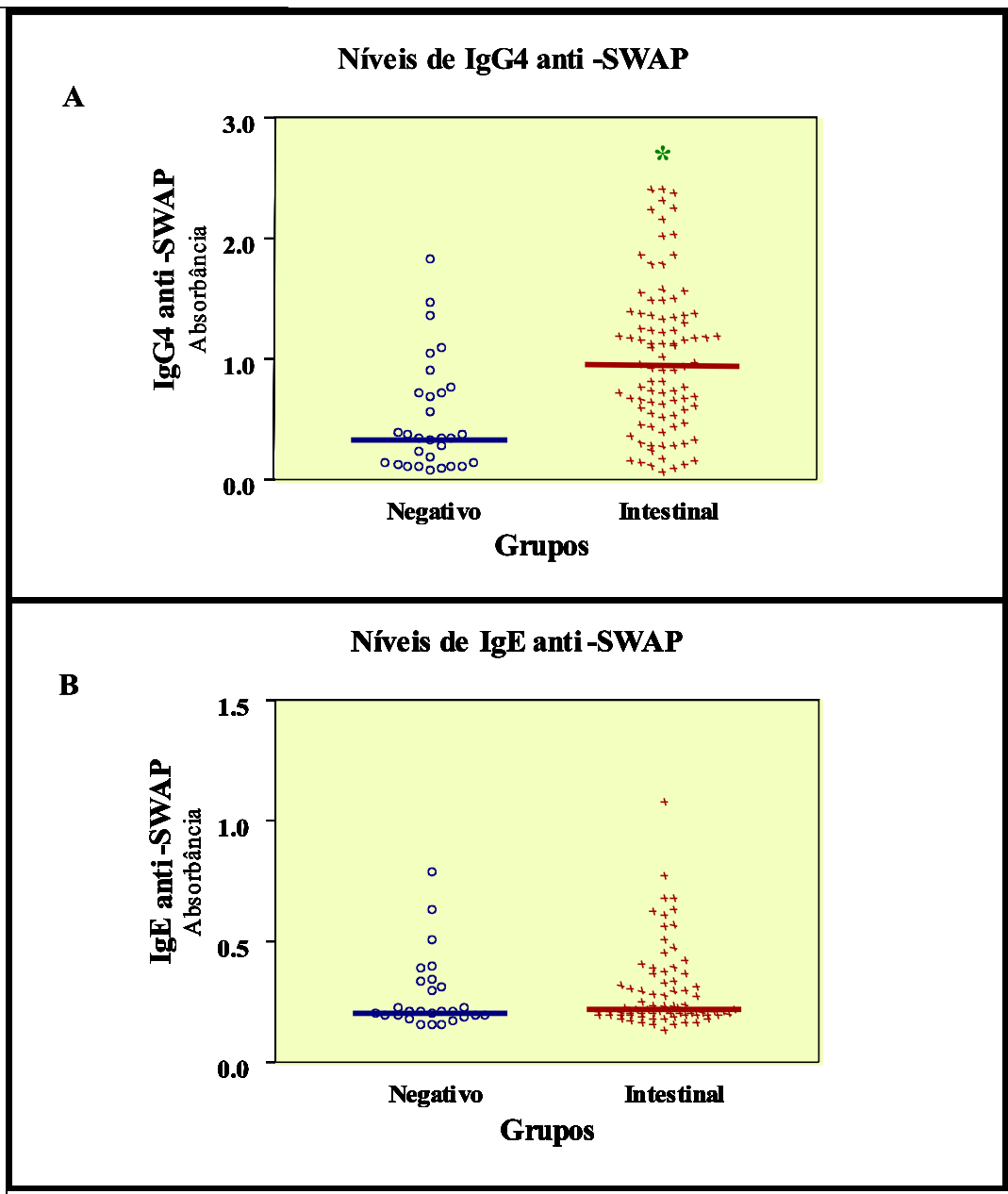


Figura 14 – Níveis dos anticorpos específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) de *Schistosoma mansoni* nos grupos Negativo e Intestinal: IgG4 anti-SWAP (figura A) e IgE anti-SWAP (figura B). Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores no grupo Negativo (IgG4 anti-SWAP = 0,341 e IgE anti-SWAP = 0,2075) e no grupo Intestinal (IgG4 anti-SWAP = 0,9545 e IgE anti-SWAP = 0,226). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de IgG4 anti-SWAP entre os grupos Negativo e Intestinal ($p < 0.0001$).

5.10. Análise da influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre o perfil dos anticorpos IgG4 e IgE específicos contra antígenos do ovo (SEA) e do verme adulto (SWAP) no plasma dos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose

Uma vez que nossos resultados demonstraram diferenças nos perfis dos anticorpos IgG4 anti-SEA, IgG4 anti-SWAP e IgE anti-SEA entre os grupos Intestinal e Negativo, avaliamos a influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre o perfil dos anticorpos IgG4 e IgE específicos contra SEA e contra SWA. no plasma dos indivíduos dos grupos Negativo, INT opg < 100 e INT opg ≥ 100.

Os níveis plasmáticos dos anticorpos IgG4 específicos contra SEA foram estatisticamente maiores nos grupos INT opg < 100 e INT opg ≥ 100 ($p < 0.001$ em ambos), quando comparados ao grupo Negativo. Não houve diferença estatística no perfil deste isotipo entre os pacientes pertencentes aos grupos INT opg < 100 e INT opg ≥ 100 (FIG. 15A). Por outro lado, encontramos uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre os níveis de IgG4 anti-SEA e o número de ovos por grama de fezes nos pacientes estudados (Spearman $r = 0,5952$ e $p < 0,0001$).

Em relação ao perfil plasmático dos anticorpos IgE específicos contra SEA, verificamos níveis estatisticamente menores desses anticorpos nos grupos INT opg < 100 e INT opg ≥ 100 ($p < 0,05$ em ambos), quando comparados ao grupo Negativo. Não houve diferença no perfil deste isotipo entre os grupos INT opg < 100 e INT opg ≥ 100 (FIG. 15B). No entanto, nós identificamos uma correlação negativa significativa entre os níveis de IgE anti-SEA e o número de ovos por grama de fezes dos pacientes estudados (Spearman $r = -0,2057$ e $p = 0,0242$).

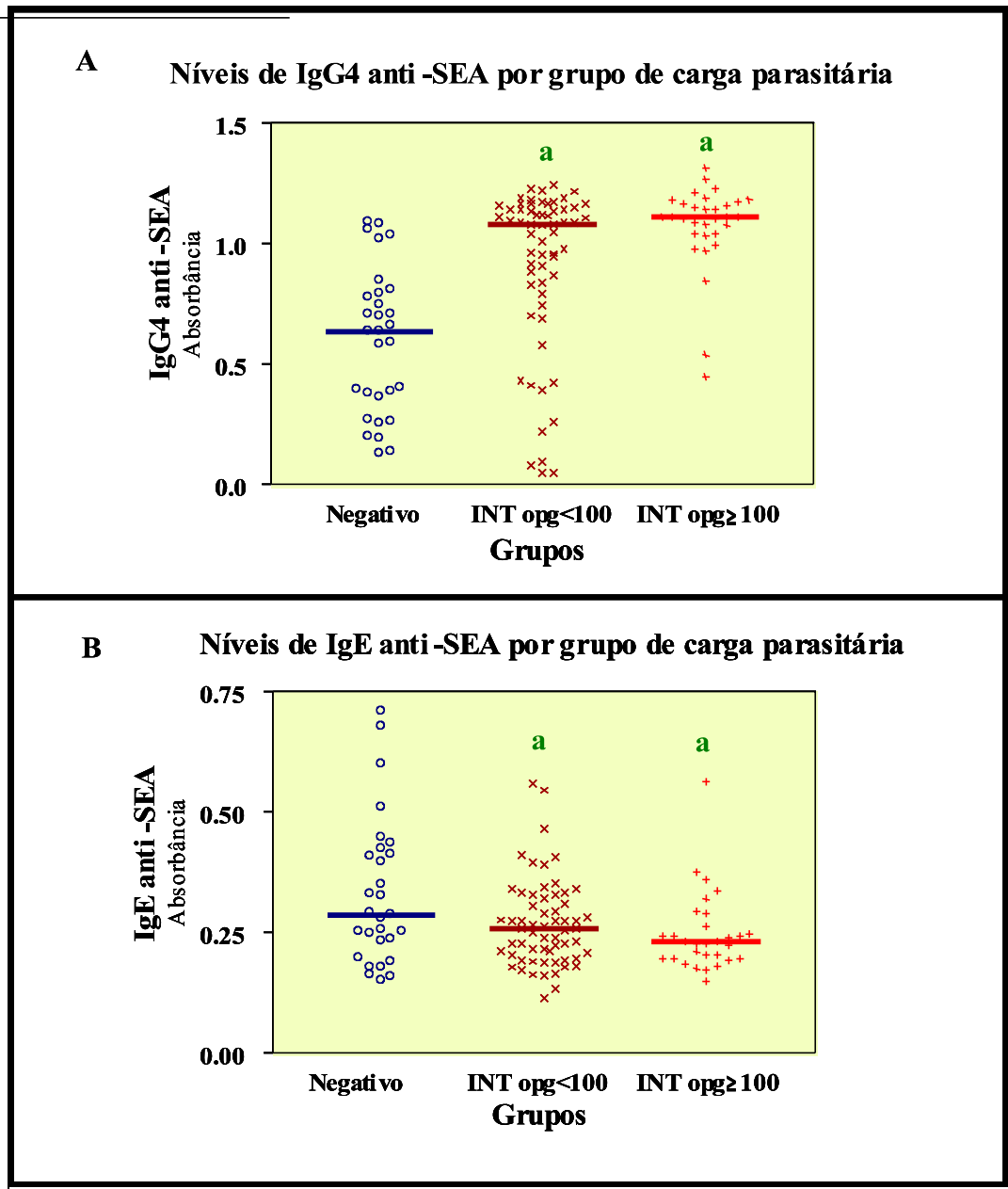


Figura 15 – Níveis dos anticorpos específicos contra antígenos do ovo (SEA) de *Schistosoma mansoni* por grupos de carga parasitária: IgG4 anti-SEA (figura A) e IgE anti-SEA (figura B). Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores nos grupos Negativo (IgG4 anti-SEA = 0,64 e IgE anti-SEA = 0,29), INT opg < 100 (IgG4 anti-SEA = 1,08 e IgE anti-SEA = 0,26) e INT opg ≥ 100 (IgG4 anti-SEA = 1,11 e IgE anti-SEA = 0,23). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo Negativo ($p < 0.0001$ na figura A e $p < 0.05$ em B).

Em relação aos níveis plasmáticos dos anticorpos IgG4 específicos contra SWAP, identificamos níveis estatisticamente mais elevados nos grupos INT opg < 100 ($p < 0,01$) e INT opg ≥ 100 ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo Negativo. Identificamos também, níveis estatisticamente maiores desse isotipo no grupo INT opg ≥ 100 em relação ao grupo INT opg < 100 ($p < 0,05$) (FIG. 16). Observamos ainda, uma correlação positiva significativa

entre os níveis de IgG4 anti-SWAP e o número de ovos por grama de fezes dos pacientes estudados (Spearman $r = 0,4858$ e $p < 0,0001$).

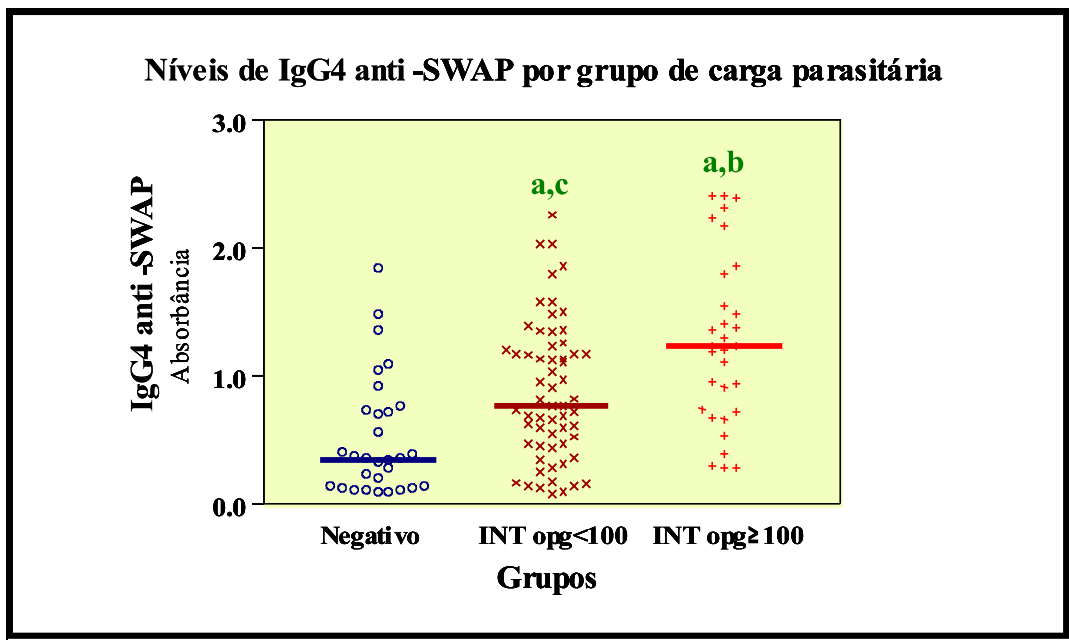


Figura 16 – Níveis dos anticorpos IgG4 específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores nos grupos Negativo (IgG4 anti-SWAP = 0,34), INT opg < 100 (IgG4 anti-SWAP = 0,77) e INT opg ≥ 100 (IgG4 anti-SWAP = 1,24). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa dos demais grupos em relação ao grupo Negativo ($p < 0,01$ em relação ao grupo INT opg < 100 e $p < 0,001$ em relação ao grupo INT opg ≥ 100).

Os níveis plasmáticos de IgE específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos analisados, não tendo sido encontrada também, nenhuma correlação entre os níveis de IgE anti-SWAP e o número de ovos por grama de fezes dos pacientes estudados (FIG. 17).

Portanto, nossos resultados demonstraram que a intensidade de infecção pelo *S. mansoni* influencia o perfil dos anticorpos IgG4 específicos contra SEA e SWAP, e de IgE anti-SEA.

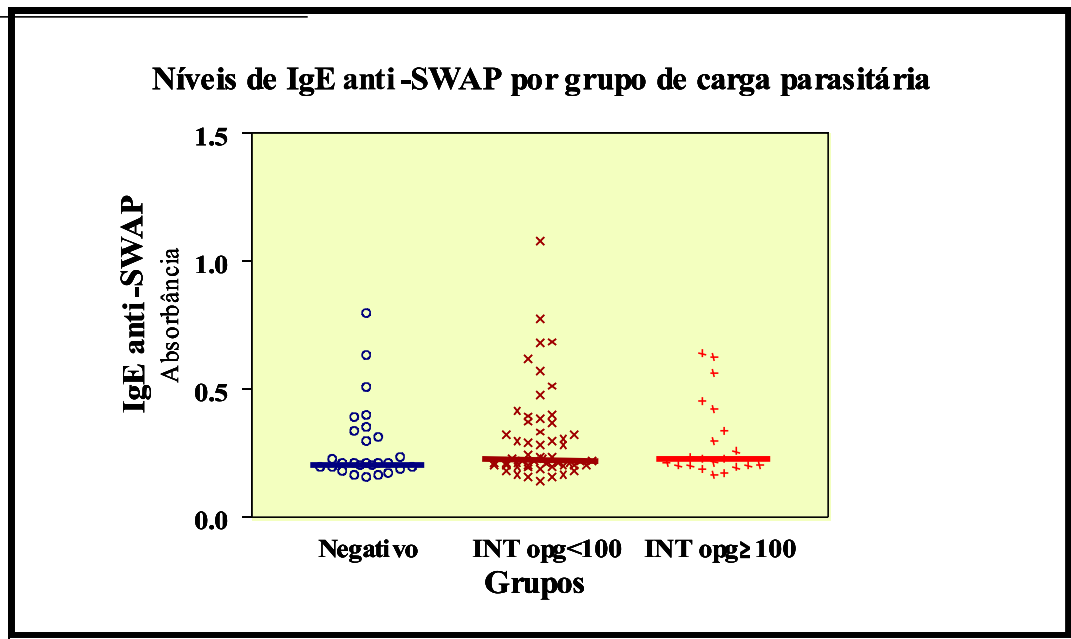


Figura 17 – Níveis dos anticorpos IgE específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais de absorbância, enquanto as barras expressam a mediana desses valores nos grupos Negativo (IgE anti-SWAP = 0,21), INT opg < 100 (IgE anti-SWAP = 0,23) e INT opg ≥ 100 (IgE anti-SWAP = 0,23).

5.11. Análise das correlações de IgG4 anti-SEA com IgE-anti-SEA e de IgG4 anti-SWAP com IgE anti-SWAP no grupo Intestinal

Dados na literatura demonstraram que anticorpos do isotipo IgG4 são ineficientes na ativação do complemento, (Iskander et al, 1981) e, além disso, compete com IgE específica na ligação a antígenos alérgenos do verme nos sítios de ligação de mastócitos, bloqueando a sua degranulação (Stanworth & Smith, 1973). Neste caso, a resistência contra a infecção/reinfecção pelo *S. mansoni* depende em parte do balanço entre os dois efeitos antagônicos: a ação protetora de IgE e o efeito bloqueador de IgG4 (Butterworth et al., 1988; Capron et al., 1992).

Para avaliarmos o balanço entre IgE e IgG4 específicos, tanto contra SEA como SWAP na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni, analisamos as correlações entre estes marcadores, comparativamente entre o grupo Intestinal e o grupo Negativo.

Embora não tenhamos encontrado, no grupo Intestinal, uma correlação estatisticamente significativa entre IgE e IgG4 específicos contra SEA, identificamos um valor médio estatisticamente menor ($p=0,0383$) das razões IgE/IgG4 específicos contra SEA no grupo Intestinal (0,43), em relação ao grupo Negativo (0,74) (FIG. 18).

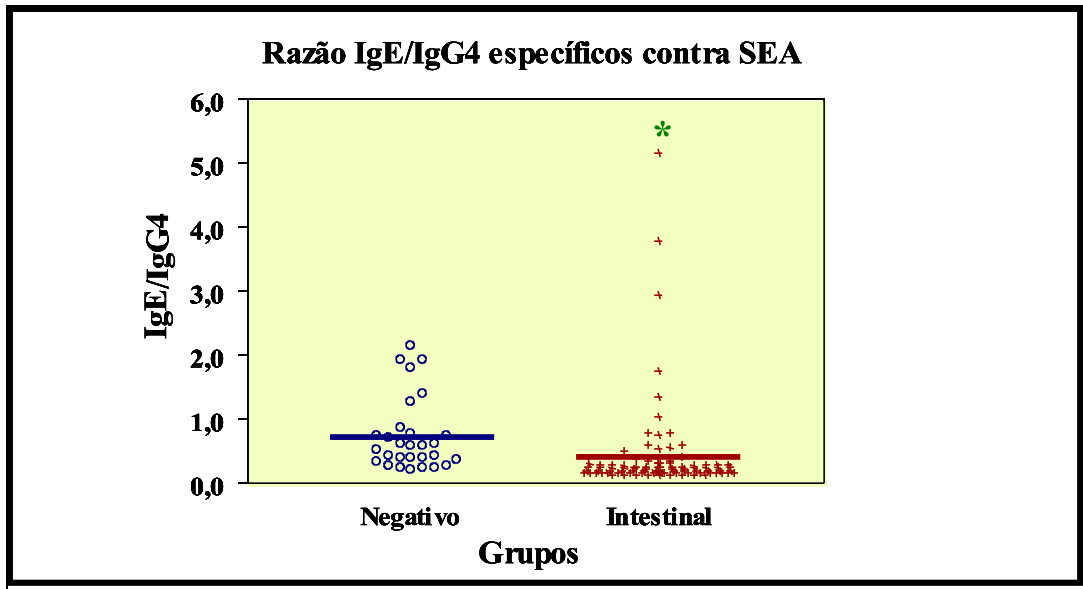


Figura 18 – Razão entre IgE e IgG4 específicos contra SEA nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IgE/IgG4 anti-SEA, enquanto as barras expressam a média em cada grupo (médias: Negativo = 0,74 e Intestinal = 0,43). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa (0,0383) entre grupos.

Em relação a IgE e IgG4 específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP), identificamos no grupo intestinal uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre estes dois isotipos (Spearman $r= 0,4429$ e $p<0.0001$). Observamos também, um valor estatisticamente menor ($p=0,0068$) das razões IgE/IgG4 específicos contra SWAP no grupo Intestinal (0,55) em relação ao grupo Negativo (1,25) (FIG. 19).

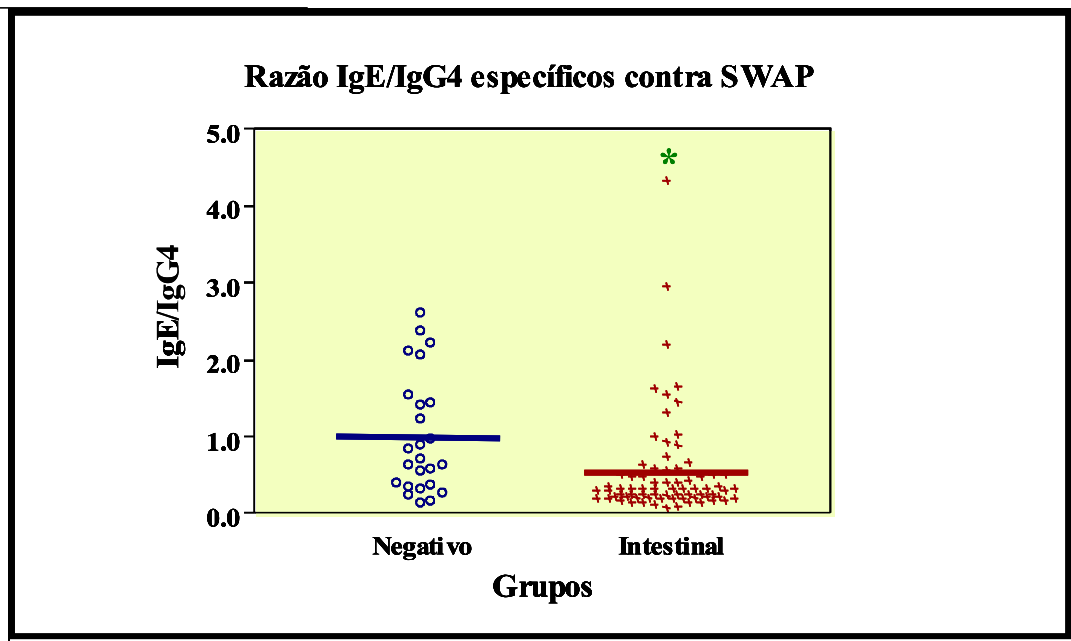


Figura 19 – Razão entre IgE e IgG4 específicos contra SWAP nos grupos Negativo e Intestinal. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IgE /IgG4 anti-SWAP, enquanto as barras expressam a média em cada grupo(médias: Negativo = 1,25 e Intestinal = 0,55). O asterisco representa uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0068$) entre grupos.

Estes resultados demonstraram que na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni há uma diminuição da razão IgE/IgG4 específicos tanto contra SEA, quanto contra SWAP, sugerindo mais uma vez a importância do balanço destes isotipos no controle e/ou estabelecimento da infecção.

5.12. Análise da influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre as relações existentes de IgG4 anti-SEA com IgE-anti-SEA e de IgG4 anti-SWAP com IgE anti-SWAP na forma clínica Intestinal da esquistossomose

Nossos resultados demonstraram diferenças nas razões IgE/IgG4, específicos contra SEA e SWAP, entre os grupos Intestinal e Negativo. Demonstraram, também, uma correlação positiva e significativa entre IgE e IgG4 específicos contra SWAP no grupo intestinal. Assim, nós avaliamos a influência da intensidade de infecção pelo *S. mansoni* sobre essas correlações e razões nos grupos Negativo, INT opg < 100 e INT opg \geq 100.

Nós observamos valores de razão entre IgE e IgG4 específicos contra antígenos do ovo (SEA) estatisticamente menores ($p < 0,05$) no grupo INT $\text{opg} \geq 100$, quando comparados ao grupo Negativo (FIG. 20).

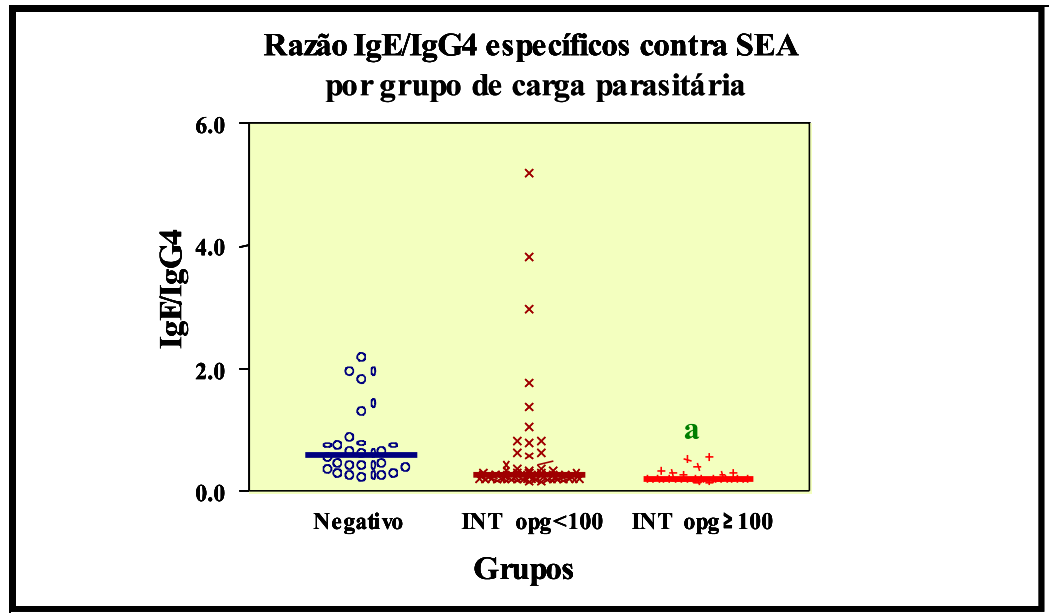


Figura 20 – Razão entre IgE e IgG4 específicos contra SEA por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IgE /IgG4 anti-SEA, enquanto as barras expressam a média em cada grupo (médias: Negativo = 0,74; INT $\text{opg} < 100$ = 0,53; INT $\text{opg} \geq 100$ = 0,24). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos INT $\text{opg} \geq 100$ e Negativo.

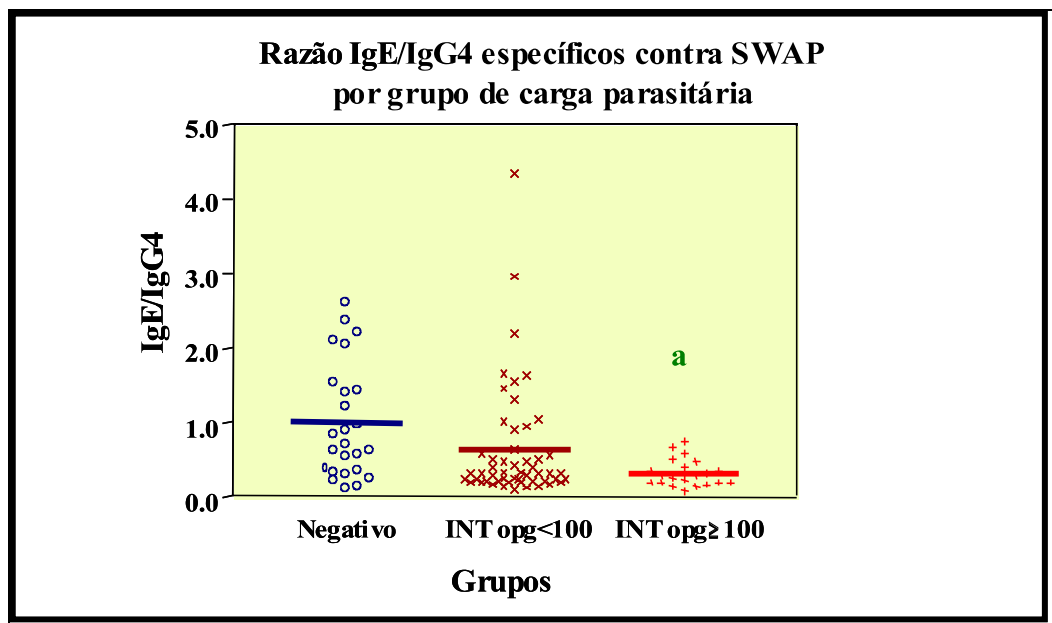


Figura 21 – Razão entre IgE e IgG4 específicos contra SWAP por grupos de carga parasitária. Os símbolos 0 e + representam os valores individuais razão IgE /IgG4 anti-SWAP, enquanto as barras expressam a média em cada grupo (médias: Negativo = 1,25; INT $\text{opg} < 100$ = 0,63; INT $\text{opg} \geq 100$ = 0,33). A letra “a” representa uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupos INT $\text{opg} \geq 100$ e Negativo.

Em relação à média das razões entre IgE e IgG4 específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) encontramos valores estatisticamente menores no grupo INT opg \geq 100 ($p < 0,05$), quando comparada com a média do grupo Negativo (FIG. 21).

As correlações de Spearman entre IgE e IgG4 específicos contra SEA e SWAP nos grupos Negativo, INT opg $<$ 100 e INT opg \geq 100 são mostradas na tabela 5.

Observamos que a correlação entre IgE e IgG4 específicos contra antígenos do ovo (SEA) foi estatisticamente significativa apenas no grupo INT opg \geq 100, enquanto as correlações entre IgE e IgG4 específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) foram significativas tanto no grupo INT opg \geq 100 como no grupo INT opg $<$ 100. Observamos também, a existência de uma diferença importante entre os grupos INT opg \geq 100 e INT opg $<$ 100 nas correlações de IgE com IgG4 anti-SWAP em cada grupo (TAB. 5).

Tabela 5 - Correlações de Spearman entre os marcadores da resposta imunológica humoral por grupos de carga parasitária.

Grupos	Correlações*	
	IgE com IgG4 anti-SEA	IgE com IgG4 anti-SWAP
Negativo	Spearman r = 0,185 Valor de p = 0,335	Spearman r = 0,088 Valor de p = 0,669
INT opg $<$ 100	Spearman r = 0,061 Valor de p = 0,641	Spearman r = 0,354 Valor de p = 0,010
INT opg \geq 100	Spearman r = 0,417 Valor de p = 0,022	Spearman r = 0,626^a Valor de p $<$ 0,002

* Os valores destacados em negrito correspondem a correlações estatisticamente significativas. A letra em vermelho corresponde a uma correlação 1,77 vezes maior no grupo INT opg \geq 100 em relação ao grupo INT opg $<$ 100.

Nossos resultados demonstraram, portanto, que ocorreu uma diminuição da razão IgE/IgG4, específicos tanto contra SEA como contra SWAP, apenas nos pacientes portadores da forma clínica intestinal com 100 ou mais ovos por grama de fezes. Isto sugere que, na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni, o favorecimento de IgG4 sobre IgE está relacionado com a intensidade de infecção.

Terceira parte: Associação entre os marcadores imunológicos da resposta celular com os marcadores da resposta humoral

5.13. Análise das relações entre os marcadores imunológicos da resposta celular com os marcadores da resposta humoral

Tem sido amplamente demonstrado que as interleucinas podem influenciar na seleção de classes e subclasses de imunoglobulinas produzidas por células B (Finkleman et al., 1990). Entretanto, existem poucos estudos associando a resposta imunológica celular com a resposta humoral na esquistossomose mansoni humana. Dessa forma, avaliamos as relações existentes de duas citocinas polares na resposta imunológica contra a infecção pelo *S. mansoni*, IFN- γ e IL-10, com os isotipos IgG4 e IgE específicos contra SEA e SWAP, na forma clínica intestinal da esquistossomose.

De forma interessante, nossos resultados demonstraram a existência de uma correlação positiva estatisticamente significativa entre IL-10 e IgG4 anti-SEA (Spearman $r = 0,2323$ e $p = 0,0324$) no grupo Intestinal. Encontramos também, correlações negativas e estatisticamente significativas entre IFN- γ e os anticorpos IgG4 anti-SEA (Spearman $r = -0,2346$ e $p = 0,0307$) e IgG4 anti-SWAP (Spearman $r = -0,2841$ e $p = 0,0084$) no grupo Intestinal, porém, estas correlações não existiram no grupo Negativo.

Nós encontramos ainda correlações positivas e estatisticamente significativas entre o número de eosinófilos/mm³ e os anticorpos IgG4 anti-SWAP (Spearman $r = 0,2460$ e $p = 0,0241$) e IgE anti-SEA (Spearman $r = 0,2535$ e $p = 0,0208$). Estas correlações também não existiram no grupo Negativo.

Em conjunto, esses dados sugerem que o perfil de anticorpos produzidos por pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni está diretamente correlacionado com o efeito da citocina IL-10 durante a infecção pelo *S. mansoni*.

65 DISCUSSÃO

6.1. Resposta Imunológica Celular

Em relação à patologia no homem, já se encontra bem estabelecido que a maioria dos pacientes infectados pelo *S. mansoni*, residentes em áreas endêmicas para a esquistossomose, desenvolvem na fase crônica uma forma clínica denominada intestinal. Vários estudos têm demonstrado que estes pacientes desenvolvem mecanismos que estão envolvidos na modulação da resposta imunológica contra a infecção. A modulação da resposta imunológica durante essa fase reduz drasticamente a resposta do tipo 1, passando a existir o predomínio de uma resposta do tipo 2, prevalecendo as citocinas relacionadas a esse tipo de resposta, como IL-4, IL-5 e IL-10, bem como eosinofilia e a produção de anticorpos específicos (Colley, 1975; Malaquias et al., 1997; Pearce & Macdonald, 2002). Os eosinófilos são leucócitos capazes de destruir os parasitas através de vias que utilizam o nitrogênio reativo (NO) e intermediários de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003), ou imobilizar os estágios larvais do verme *S. mansoni* (McLaren, 1980) através de mecanismos mediados por anticorpos, sendo, portanto, consideradas células importantes no combate à infecção por este parasito.

Nossos dados corroboram com os dados da literatura, uma vez que encontramos níveis plasmáticos estatisticamente maiores de IL-5 e IL-10 ($p=0,0494$ e $p=0,0315$, respectivamente) no grupo Intestinal, quando comparados com o grupo Negativo (FIG. 4), indicando uma predominância da resposta do tipo 2 na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni. Em relação aos eosinófilos, nossos dados também concordam com as afirmativas anteriores (Colley, 1975; Malaquias et al., 1997; Pearce & Macdonald, 2002), pois, encontramos um número estatisticamente maior ($p=0,0301$) dessas células no sangue periférico dos pacientes do grupo Intestinal (830 células/ mm^3 de sangue), demonstrando a presença de eosinofilia nesse grupo, o que não ocorreu no grupo Negativo (552 células/ mm^3 de sangue) (FIG. 9). Essa elevação no número de eosinófilos pode ser justificada pelo aumento observado de IL-5, uma vez que esta citocina aumenta o recrutamento dessas células (Weinstock, 1992; Sher et al., 1990). A correlação positiva estatisticamente significativa ($r=0,4271$ e $p<0,0001$) entre IL-5 e eosinófilos encontrada em nossos dados (tabela 3), reforça a relação entre estes marcadores.

As quimiocinas produzidas durante processos inflamatórios são determinantes na extensão, na composição e na duração do infiltrado celular, sendo a regulação da expressão

dos seus receptores um fato importante no processo de migração celular (Sallusto et al., 2000). O receptor para a quimiocina eotaxina, CCR3, é expresso em eosinófilos, basófilos (Forssmann et al., 1997; Ugucioni et al., 1997), e em células Th2 (Sallusto et al., 1997). É concebível que, como parte de suas diferentes atividades efectoras, células Th2 e Th1 expressem diferentes conjuntos de receptores de quimiocinas, permitindo-as migrarem sob condições diferentes (Sallusto et al., 1998). Estudos *in vitro* envolvendo a eotaxina demonstraram que ela é uma molécula ativadora e quimioatraente para eosinófilos (Kita & Gleich, 1996; Jose et al., 1994). Em trabalho realizado com o modelo murino, foi demonstrado que a eotaxina e a MIP-1 α induzem um aumento significativo no recrutamento de eosinófilos, sendo a eotaxina significativamente mais efetiva que a MIP-1 α nesse processo (Teixeira, 1998).

Devido às relações existentes entre eotaxina, eosinófilos e células Th2, avaliamos os níveis plasmáticos desta quimiocina e encontramos seus níveis estatisticamente maiores ($p=0,0054$) no grupo Intestinal, em relação ao grupo Negativo (FIG. 5). No entanto, não encontramos uma correlação significativa entre eotaxina e o número de eosinófilos (Tabela 3), não tendo sido, portanto, evidenciada a relação eotaxina/eosinófilos. Acreditamos que esta relação exista, mas que seja detectável apenas no microambiente intestinal, não sendo refletida no sangue periférico e no plasma.

A elevação de IL-5, eosinófilos e eotaxina, associada ao aumento de IL-10 nos plasmas dos pacientes com a forma clínica intestinal evidencia um perfil de resposta imunológica tipo 2, acrescido de um ambiente responsável pela modulação da produção e das funções efectoras dos mediadores pró-inflamatórios durante a infecção (Cheever et al., 2000). Dados da literatura indicam que a IL-10 se opõe à síntese de IFN- γ e IL-2, que são importantes para a ativação de macrófagos e a proliferação de células T (Fiorentino et al., 1991). A inibição da síntese dessas citocinas pela IL-10 parece ser indireta, ou seja, ela agiria sobre as células apresentadoras de antígenos (APC), especialmente monócitos e macrófagos, inibindo a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal do tipo II (MHC classe II) e de moléculas co-estimuladoras, como B7-1 e B7-2. Isto resultaria na ausência, ou deficiência, na apresentação dos antígenos e, conseqüentemente, na falta de ativação de células T e ausência na produção de IL-2 e IFN- γ (Fiorentino et al., 1989; Moore et al., 1990; Fiorentino et al., 1991, Stadecker, 1992). Dados obtidos em humanos (Waal-Malefyt et al., 1991) também sugeriram que a IL-10 exerce uma atividade anti-proliferativa nas células Th1 através da inibição da expressão de moléculas de MHC classe II em

monócitos. Suprimindo, por exemplo, a produção de IL-12 pelos macrófagos, a IL-10 bloqueia o direcionamento da resposta imunológica para o tipo 1 (Fiorentino et al., 1991). Outro mecanismo relacionado com a inibição da síntese de IFN- γ por IL-10 é que esta citocina é capaz de inibir a síntese de IFN- γ pelas células “Natural Killers” (NK), mecanismo essencial para a derivação da resposta imunológica para o tipo 1 (Kos & Engleman, 1996).

Silveira et al. (2004) sugeriram que a IL-10 é importante no controle da resposta de células Th1, durante a infecção humana pelo *S. mansoni*, alterando a resposta imunológica de Th0 nos indivíduos ovo-negativos de área endêmica, para uma resposta predominantemente Th2 em pacientes cronicamente infectados. Estes autores sugeriram ainda, que a IL-10 produzida por PBMCs estimuladas com SEA, aparentemente contribuiria para a deficiência na produção de IFN- γ por estas células, tendo eles encontrado uma correlação inversa entre essas duas citocinas. Nossos resultados não identificaram uma correlação estatisticamente significativa entre IL-10 e IFN- γ nos pacientes do grupo Intestinal. No entanto, acreditamos que o efeito imunomodulador de IL-10 não seja somente inibindo a produção de IFN- γ , mas, também, bloqueando os mecanismos induzidos por essa citocina. A ausência de correlação estatística entre IL-10 e IFN- γ pode ainda estar relacionada aos baixos níveis e, até mesmo, à ausência de IFN- γ nos plasmas dos pacientes estudados, sendo que, estes aspectos já foram descritos anteriormente, “in vitro”, em pacientes esquistossomóticos crônicos (Zwingenberger et al, 1989; Bahia-Oliveira et al., 1996; Gazzinelli et al., 1992). Esses baixos níveis de IFN- γ podem estar associados, também, com os baixos níveis de TNF- α encontrados nos plasmas dos pacientes deste estudo. Em modelo murino, infectados com *S. mansoni*, foi demonstrado que IFN- γ é um potente indutor na produção de TNF- α por macrófagos (Wilson, 1998).

Nossos dados sugerem que a IL-10 também está exercendo um papel regulador sobre a produção de TNF- α na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni, uma vez que encontramos a média das razões IL-10/TNF- α estatisticamente maior ($p = 0,0285$) no grupo Intestinal, em relação ao grupo Negativo, sendo ela menor que 1 no grupo Negativo (0,61) e maior que 1 no grupo Intestinal (1,10), indicando níveis maiores de IL-10 e menores de TNF- α em pacientes desse grupo (FIG. 11). Esses dados corroboram com o papel de IL-10 na polarização de uma resposta tipo 2 (Silveira et al., 2004) e na modulação sobre a resposta imunológica tipo 1 durante a infecção crônica intestinal pelo *S. mansoni*, em humanos.

O efeito da intensidade de infecção sobre a produção de IL-10, de IFN- γ e de IL-13 por PBMCs de indivíduos residentes em área endêmica para o *S. mansoni* também foi

avaliado por Silveira e colaboradores (2004). Estes autores observaram que os níveis de IFN- γ produzidos por essas células, estimuladas com SEA, diminuem gradualmente com o aumento da intensidade de infecção, sendo esta, decisiva para a produção de IL-10 e o predomínio de uma resposta imunológica Th2. Estes autores não encontraram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de IL-13 entre o grupo de indivíduos ovo-negativos e o grupo de pacientes com exame parasitológico de fezes positivo para *S. mansoni*.

Nossos dados relativos à IL-10 condizem com a afirmativa de que a intensidade de infecção seja um fator importante para a determinação dos níveis dessa citocina (Silveira et al., 2004), pois, encontramos seus níveis plasmáticos estatisticamente mais elevados no grupo INT opg \geq 100, tanto em relação ao grupo INT opg $<$ 100, quanto em relação ao grupo Negativo (ambas com $p < 0,001$) (FIG. 6). Observamos ainda, a existência de uma correlação positiva significativa (Spearman $r = 0,4420$ e $p < 0,0001$) entre os níveis de IL-10 e o número de ovos por grama de fezes dos pacientes analisados neste estudo. Nossos dados sugerem que os níveis de IL-10 elevam-se gradualmente com o aumento da carga parasitária, indicando que a intensidade de infecção pelo *S. mansoni* contribui para a elevação dos níveis desta citocina, em pacientes com a forma intestinal da doença.

O aumento dos níveis de IL-10 com o aumento da carga parasitária sugere um papel importante da intensidade de infecção no estabelecimento de uma resposta predominantemente Th2, conforme sugerido por outros autores (Silveira et al., 2004). Grzych e colaboradores (1991) demonstraram, em modelo murino, que a presença dos ovos foi o principal estímulo para o desenvolvimento de uma resposta Th2, o que, indiretamente, também sugere a influência da intensidade de infecção no estabelecimento do predomínio desse tipo de resposta. Nossos dados corroboram com essas afirmativas, uma vez que encontramos a média das razões IL-10/TNF- α estatisticamente maior no grupo INT opg \geq 100 apenas em relação ao grupo Negativo ($p < 0,01$) (FIG. 12). Observamos, também, que a razão IL-10/TNF- α é maior que 1 no grupo INT opg \geq 100 (1,49) e menor que 1 no grupo Negativo (0,61), ou seja, os indivíduos do grupo Negativo possuem níveis de IL-10 menores que os níveis de TNF- α , enquanto, no grupo com maior carga parasitária (INT opg \geq 100), ocorre uma inversão dessa relação, com os pacientes deste grupo apresentando níveis de IL-10 mais altos que os níveis de TNF- α . Esses dados mostram mais uma vez a influência da intensidade de infecção sobre o estabelecimento do predomínio de uma resposta imunológica do tipo 2 em pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni.

Estudos sobre a regulação da produção de citocinas do tipo 2 em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, demonstraram que a produção de ovos pelos vermes adultos é o principal estímulo para a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (Wynn et al., 1993), sugerindo que a intensidade de infecção seja um fator influenciador na produção destas citocinas em modelos murinos.

Nossos dados referentes à IL-5 sugerem que a intensidade de infecção pelo *S. mansoni* pode também estar influenciando a produção desta citocina em pacientes portadores da forma intestinal da doença, uma vez que, observamos níveis plasmáticos de IL-5 significativamente mais elevados no grupo INT opg ≥ 100 em relação ao grupo Negativo ($p < 0,001$) (FIG. 7); assim como identificamos também, uma correlação positiva significativa (Spearman $r = 0,2571$ e $p < 0,0001$) entre os níveis de IL-5 e o número de ovos por grama de fezes dos pacientes analisados neste estudo.

Nossos dados demonstram que, de maneira semelhante à IL-5, o número de eosinófilos/mm³ foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) no grupo com maior carga parasitária (INT opg ≥ 100), do que no grupo Negativo (FIG. 10). Este fato pode ser explicado pela relação existente entre IL-5 e essas células (Weinstock, 1992; Sher et al., 1990). Dessa forma, acreditamos que a intensidade de infecção, influenciando os níveis de IL-5, possa direcionar o aumento do número de eosinófilos no sangue periférico, em pacientes portadores da forma clínica intestinal. Outro resultado encontrado nesse estudo que corrobora com essa hipótese foi o fato de observarmos uma correlação de IL-5 com eosinófilos mais forte no grupo INT opg ≥ 100 (Spearman $r = 0,664$ e $p = 0,001$), do que no grupo INT opg < 100 (Spearman $r = 0,348$ e $p = 0,012$) (TAB. 4).

Apesar de não termos observado uma correlação estatisticamente significativa entre os níveis de eotaxina e o número de ovos por grama de fezes nos pacientes analisados, sugerimos que a intensidade de infecção possa estar influenciando os níveis desta quimiocina, pois seus níveis foram significativamente mais elevados apenas no grupo INT opg ≥ 100 em relação ao grupo Negativo ($p < 0,001$) (FIG. 8). Uma vez que células Th2 expressam o receptor para eotaxina (Sallusto et al., 1997) e que os níveis desta quimiocina são influenciados pela intensidade de infecção, é possível que o recrutamento dessas células também esteja sob influência da variação da carga parasitária. Este fato, mais uma vez, corrobora com a hipótese da influência da intensidade de infecção sobre o predomínio de uma resposta imunológica do tipo 2.

Portanto, nossos dados confirmam estudos anteriores, demonstrando que, na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni, ocorre o predomínio de uma resposta do tipo 2, com aumento nos níveis de IL-5, IL-10, eosinófilos e eotaxina, estando o aumento de eosinófilos relacionado com o aumento de IL-5 e a modulação da resposta imunológica relacionada com a produção de IL-10. É importante ressaltar que todos esses marcadores estão relacionados à intensidade de infecção.

6.2. Resposta Imunológica Humoral

A análise de regressão logística, em presença de variáveis explicativas como contato com água, idade e sexo, mostrou uma associação entre resistência à reinfeção pelo *S. mansoni* com diferentes classes de imunoglobulinas anti-esquistossômulo. Dos isotipos testados, somente IgE, IgG4 e IgG2 mostraram uma associação com a resistência à reinfeção, sendo positiva para IgE e negativa para IgG4 e IgG2. O efeito oposto de IgE e IgG4, sugeriu que estes isotipos, têm funções antagônicas (Demeure et al, 1993).

A comparação dos níveis de IgE anti-esquistossômulo entre um grupo de adolescentes brasileiros resistentes à infecção e outro susceptível, mostrou que o nível de IgE no grupo resistente era, em média, 6 a 8 vezes maior. Os anticorpos IgG que competiam com IgE para o antígeno larval foram detectados na maioria dos soros, e seu nível foi maior nos indivíduos susceptíveis (Rihet et al, 1991).

Dunne et al. (1992) investigaram o papel de IgE na esquistossomose e encontraram uma correlação positiva entre anticorpos IgE anti-vermes adultos e a idade, e negativa com a reinfeção. Os anticorpos IgE contra outros estágios do parasita não mostraram nenhum tipo de correlação com a reinfeção, sendo o mesmo observado para outros isotipos contra vermes adultos. Por outro lado, Viana et al. (1995) demonstraram que um grupo de indivíduos resistentes à reinfeção pelo *S. mansoni* apresentavam níveis de IgE anti-STEg (antígeno de tegumento) mais elevados do que aqueles dos indivíduos susceptíveis.

Alguns estudos demonstraram que a composição de isotipos de anticorpos anti-*Schistosoma* pode desempenhar uma influência marcante na eficiência de mecanismos efetores de citotoxicidade dependente de anticorpo (A.D.C.C.) e, conseqüentemente, na expressão da imunidade protetora ou na patologia das esquistossomoses (Dunne et al., 1993). Várias células efetoras, dentre elas monócitos, eosinófilos e plaquetas, participam do mecanismo de A.D.C.C. em presença de anticorpos anti-esquistossômulo (Joseph et al.,

1983). Sabe-se que ao contrário de IgG1, o isotipo IgG4 é ineficiente na ativação do complemento, (Iskander et al, 1981) e, além disso, compete com IgE específica na ligação a antígenos alérgenos do verme nos sítios de ligação de mastócitos, impedindo a sua degranulação (Stanworth & Smith, 1973). Neste contexto, o grau de resistência frente à infecção pelo *S. mansoni* depende, em parte, do balanço entre dois efeitos antagônicos: a ação protetora mediada por IgE e o efeito bloqueador de IgG4, durante a A.D.C.C. (Rihet et al., 1992; Nutten et al. 1997).

Em nosso estudo, encontramos níveis plasmáticos estatisticamente maiores dos anticorpos IgG4 ($p < 0,0001$) e estatisticamente menores de IgE ($p = 0,0447$), ambos específicos contra SEA, no grupo Intestinal, quando comparados ao grupo Negativo (FIG. 13). Em relação aos anticorpos específicos contra antígenos do verme adulto, encontramos níveis estatisticamente mais elevados de IgG4 anti-SWAP no grupo Intestinal em relação ao grupo Negativo. Não observamos diferença estatisticamente significativa quanto ao perfil dos anticorpos IgE anti-SWAP entre esses grupos (FIG. 14). Estes resultados mostram que na forma clínica intestinal ocorre uma elevação da produção dos isotipos IgG4 anti-SEA e anti-SWAP e uma diminuição da produção de IgE anti-SEA, não ocorrendo diferença nos níveis de IgE anti-SWAP, sugerindo que este perfil de anticorpos seja influenciado principalmente por antígenos presentes nos ovos de *S. mansoni*.

Os níveis mais elevados de IgE anti-SEA no grupo Negativo (FIG. 13B) pode ser explicado pela possível existência de antígenos comuns presentes em ovos e esquistossômulos (Harn et al., 1984). Estudos em modelos murinos também sugeriram a presença de antígenos comuns associados à superfície de cercárias, de esquistossômulos e de miracídeos (Thors & Linder, 2003). Dessa forma, nos possíveis contatos destes indivíduos negativos com águas infestadas por cercárias, os antígenos dos esquistossômulos comuns aos ovos poderiam estar induzindo uma elevada produção de IgE anti-SEA e uma baixa produção de IgG4 anti-SEA nestes indivíduos, o que possivelmente os protegeriam do desenvolvimento completo destes esquistossômulos, principal alvo da resposta imune (Capron et al., 1982), não permitindo o estabelecimento da infecção (Harn et al., 1984). Esta proteção pode ser devida, por exemplo, à ação de mecanismos relacionados à A.D.C.C. (Dunne et al., 1993). Possivelmente, o mesmo não aconteceria com os indivíduos positivos, que ao produzirem elevados níveis de IgG4 e baixos níveis de IgE, específicos contra SEA, estariam favorecendo o estabelecimento da infecção (Hagan et al., 1991; Demeure et al., 1993; Grogan et al., 1997). Um estudo realizado em área endêmica para a esquistossomose avaliou a resposta contra os antígenos SEA,

SWAP, STEG e CERC em grupos identificados como resistentes e susceptíveis, antes e após o tratamento (Caldas et al., 2000). Os autores observaram, em pacientes resistentes, após o tratamento, uma redução nos níveis de IgG4 anti-SEA e anti-STEG e uma elevação nos níveis de IgE anti-SWAP e anti-STEG. É importante salientar que, os antígenos do ovo poderiam variar significativamente em imunogenicidade de acordo com a genética de cada indivíduo, como sugerido em modelo murino por Asahi & Stadecker (2003).

Rihet et al. (1991), Hagan et al. (1991) e Caldas et al. (2000) sugerem que a imunidade contra o *S. mansoni* depende do balanço entre os anticorpos IgE e IgG4. Ao avaliarmos esse balanço de anticorpos identificamos que as razões IgE/IgG4, específicos tanto contra SEA, quanto contra SWAP, foram estatisticamente menores ($p=0,0383$ e $p=0,0068$) no grupo Intestinal em relação ao grupo Negativo. Identificamos, ainda, que no grupo Negativo a razão IgE/IgG4 anti-SEA foi próxima de 1 (0,74) e a razão IgE/IgG4 anti-SWAP foi maior que 1 (1,25), enquanto, no grupo Intestinal, estas razões foram menores que 1 (FIG. 18 e 19). Estes dados sugerem que na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni ocorra uma tendência de aumento nos níveis de IgG4 e uma diminuição nos níveis de IgE, induzidos principalmente por antígenos do parasita. Assim, os altos níveis de IgG4 anti-SEA e anti-SWAP, juntamente com os baixos níveis de IgE anti-SEA, identificados nos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni, possivelmente estão relacionados com o estabelecimento e manutenção da infecção nesta forma clínica da doença, através, por exemplo, da diminuição da eficiência de mecanismos de A.D.C.C. e a conseqüente diminuição da imunidade protetora contra o parasito (Dunne et al., 1993). Essa perda de imunidade protetora pode estar relacionada ao efeito bloqueador de IgG4 sobre IgE nos sítios de ligação a antígenos alérgenos do verme a mastócitos, impedindo a sua degranulação (Stanworth & Smith, 1973).

Viana et al. (1995) mostraram, previamente, que os níveis de IgG4 contra SEA estavam elevados em pacientes infectados com o *S. mansoni* e eram altamente dependentes da intensidade de infecção. Em nosso estudo encontramos níveis plasmáticos dos anticorpos IgG4 específicos contra SEA estatisticamente maiores nos grupos INT opg < 100 e INT opg \geq 100 ($p < 0.001$ em ambos), em relação ao grupo Negativo (FIG. 15A). Observamos ainda, uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre os níveis de IgG4 anti-SEA e o número de ovos por grama de fezes dos pacientes estudados (Spearman $r = 0,5952$ e $p < 0,0001$). Em relação aos anticorpos IgG4 específicos contra SWAP, nossos dados mostraram níveis plasmáticos deste isotipo estatisticamente mais elevados nos pacientes dos grupos INT

opg < 100 ($p < 0,01$) e INT opg ≥ 100 ($p < 0,001$), quando comparados ao grupo Negativo, e níveis estatisticamente maiores no grupo INT opg ≥ 100 em relação ao grupo INT opg < 100 ($p < 0,05$)(FIG. 16). Observamos também, uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre os níveis de IgG4 anti-SWAP e o número de ovos por grama de fezes (Spearman $r = 0,4858$ e $p < 0,0001$). Estes resultados sugerem que, na forma clínica intestinal da esquistossomose, a intensidade de infecção seja um fator influenciador não apenas dos níveis de IgG4 anti-SEA (Viana et al., 1995), mas também dos níveis de IgG4 anti-SWAP.

Em relação aos anticorpos IgE específicos contra SEA, encontramos níveis estatisticamente mais baixos desses anticorpos nos grupos INT opg < 100 e INT opg ≥ 100 ($p < 0,05$ em ambos), quando comparados ao grupo Negativo (FIG. 15B), e uma correlação negativa e estatisticamente significativa (Spearman $r = -0,2057$ e $p = 0,0242$) entre os níveis de IgE anti-SEA com o número de ovos por grama de fezes dos pacientes estudados. No entanto, os níveis plasmáticos de IgE específicos contra antígenos do verme adulto (SWAP) não foram estatisticamente diferentes em nenhum dos grupos analisados (FIG. 17). Não encontramos também, correlação entre os níveis de IgE anti-SWAP e o número de ovos por grama de fezes. Estes resultados sugerem que, na forma clínica intestinal da esquistossomose, a intensidade de infecção possa estar influenciando, principalmente, o perfil de IgE anti-SEA.

Em conjunto, nossos dados sugerem que, na forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni, os ovos do parasito desempenham um papel importante na determinação do balanço existente entre os anticorpos IgG4 e IgE.

Nossos resultados demonstraram ainda, que a intensidade de infecção influencia o balanço IgE/IgG4 anti-SEA, pois, apenas o grupo com maior intensidade de infecção (INT opg ≥ 100) apresentou esta razão estatisticamente menor ($p < 0,05$) que o grupo Negativo (FIG. 20). Em relação à influência da intensidade de infecção sobre o balanço entre IgE e IgG4 específicos contra SWAP, nossos resultados demonstraram uma situação semelhante à anterior, uma vez que, a razão entre IgE e IgG4 anti-SWAP foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) apenas no grupo INT opg ≥ 100 , em relação ao grupo Negativo (FIG. 21), sugerindo a influência da intensidade de infecção sobre este balanço. Como não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de IgE anti-SWAP entre os grupos INT opg ≥ 100 e Negativo (FIG. 17), bem como correlação entre os níveis deste isotipo e a intensidade de infecção (opg), sugerimos que as alterações observadas no balanço IgE/IgG4 anti-SWAP sejam em decorrência das variações, induzidas pela intensidade de infecção, nos níveis de IgG4 anti-SWAP, e não nos níveis de IgE anti-SWAP.

Em conjunto, nossos dados mostram que, em pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose, a intensidade de infecção influencia o perfil dos anticorpos IgG4 anti-SEA e anti-SWAP e de IgE anti-SEA, bem como o balanço IgE/IgG4, sugerindo, mais uma vez, a importância desse balanço no controle e/ou no estabelecimento da infecção pelo *S. mansoni*.

6.3. Associação entre Resposta Imunológica Celular e Resposta Imunológica Humoral

Identificamos, associado à forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni, um perfil da resposta celular do tipo 2 favorável ao desenvolvimento de mecanismos imunológicos de A.D.C.C., com aumento de IL-5, eosinófilos e eotaxina, e aparentemente sob os efeitos moduladores de IL-10. Contudo, o perfil da resposta imunológica humoral, nesta forma clínica, sugere o prejuízo destes mecanismos de A.D.C.C., uma vez que o balanço IgE/IgG4 demonstrou uma tendência de aumento nos níveis de IgG4 e uma diminuição dos níveis de IgE, de maneira dependente da intensidade de infecção. Esse paradoxo pode estar relacionado com a elevação dos níveis de IL-10, induzida principalmente pelos ovos do parasito.

Velupillai et al. (1994), demonstraram que oligossacarídeos não-antigênicos, presentes nos ovos de *S. mansoni*, podem estimular células B a produzirem IL-10, o que poderia auxiliar na supressão da produção de IFN- γ . O efeito modulador dos elevados níveis de IL-10, frente à infecção pelo *S. mansoni*, (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999, Silveira et al, 2004), além de estar envolvido no estabelecimento de formas menos graves da esquistossomose (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997), poderia estar também relacionado com o aumento nos níveis dos anticorpos IgG4.

Gascan et al., (1991) demonstraram que a produção de IgG4 também é regulada, em um contexto antígeno-específico, por IL-10 e IFN- γ produzidos por células Th0. Em um estudo realizado em pacientes sensíveis ao ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*, a IL-10 apresentou efeitos opostos na síntese de IgE e de IgG4, inibindo a produção de IgE e aumentando a de IgG4 por PBMCs estimuladas por IL-4 (Jeannin et al., 1997). Esses autores sugeriram que a diminuição de IgE e o aumento de IgG4 provavelmente seja devido, respectivamente, à influência de IL-10 na inibição da mudança de isotipo para IgE e no aumento da mudança para IgG4, induzidos por IL-4.

Em estudos sobre filariose linfática, Allen et al., (2001) demonstraram que a razão IgG4/IgE era modulada pela IL-10. Em estudos realizados em camundongos infectados com *Brugia malay*, MacDonald et al. (2003) demonstraram que os níveis de IgG4 diminuía abruptamente após a quimioterapia. Dessa forma, a presença dos parasitas mantinha os altos níveis de IgG4, talvez por intermédio dos altos níveis de IL-10 (Maizels et al., 2004).

Assim sendo, a elevação dos níveis de IL-10, induzida principalmente por antígenos do ovo, além de modular a resposta imunológica, poderia também estar relacionada com a indução da troca de isotipos para IgG4, o que, por exemplo, acarretaria prejuízos na eficiência dos mecanismos de A.D.C.C. (Dunne et al., 1993), levando a uma redução na expressão da imunidade protetora na esquistossomose (Dunne et al., 1993). Neste contexto a citocina IL-10 passaria a ser um fator de risco para o aumento na intensidade de infecção na esquistossomose mansoni. Van Den Biggelaar e colaboradores (2002) demonstraram em crianças em idade escolar infectadas com *S. hematobium*, monitoradas por 3 anos, que altos níveis de IL-10 foram associados como fator de risco para a reinfeção. Estes autores sugeriram que os elevados níveis de IL-10 deveriam regular a resposta Th1 destas crianças, o que resultaria em uma menor capacidade de montar uma imunidade protetora contra a invasão cercariana.

Nossos resultados corroboram com os destes estes autores, uma vez que encontramos uma correlação positiva estatisticamente significativa entre IL-10 e IgG4 anti-SEA nos pacientes do grupo Intestinal (Spearman $r = 0,2323$ e $p = 0,0324$) (tabela 6), sendo esta correlação inexistente no grupo Negativo (não demonstrado). Não encontramos correlação entre IL-10 e IgG4 anti-SWAP, o que pode estar relacionado com o fato dos ovos do parasito serem um dos principais indutores na produção de citocinas do tipo 2 (Grzych et al., 1991). Tem sido evidenciado, também, que antígenos solúveis do ovo induzem a diferenciação de células Th0, preferencialmente para células Th2 (Pearce et al., 1991; Stadecker et al, 1992; Wynn et al., 1995).

Identificamos também, correlações negativas e estatisticamente significativas de IFN- γ com os anticorpos IgG4 anti-SEA (Spearman $r = -0,2346$ e $p = 0,0307$) e IgG4 anti-SWAP (Spearman $r = -0,2841$ e $p = 0,0084$) no grupo Intestinal, porém, estas correlações não existem no grupo Negativo.

Em conjunto, nossos dados sugerem que, nos pacientes portadores da forma clínica intestinal, os elevados níveis de IL-10 possivelmente são induzidos pelos ovos de *S. mansoni*. Estes altos níveis de IL-10, ao modular a resposta imunológica evitariam a evolução para formas clínicas mais graves da doença. Por outro lado, a IL-10 induziria a troca de isotipos

para IgG4, acarretando uma redução na expressão da imunidade protetora, possivelmente através da diminuição da eficiência dos mecanismos de A.D.C.C., o que favoreceria o estabelecimento e o aumento da intensidade de infecção nos pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose mansoni.

CONCLUSÕES

- 1) A intensidade de infecção influencia no estabelecimento de uma resposta imunológica celular predominantemente do tipo 2, com o aumento nos níveis de IL-5, IL-10, eosinófilos e eotaxina, em pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose.

- 2) A intensidade de infecção influencia a resposta imunológica humoral alterando o balanço IgE/IgG4 através da elevação dos níveis dos anticorpos IgG4 anti-SEA e anti-SWAP e redução dos níveis de IgE anti-SEA em pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose. Este balanço possivelmente está sob influência de IL-10.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Wahab MF, Esmat G, Farrag A, el-Boraey Y, Strickland GT. Ultrasonographic prediction of esophageal varices in Schistosomiasis mansoni. **Am J Gastroenterol.** 1993 Apr;88(4):560-3.

Alisson ACM, Andrade Z, Brunner KT, Butterworth AE, Capron A, Cohen S, Colley DG, Coombs RRA, David JR, Davis A, Hoffman DB, Hopewood BCC, Hoube U, Jordan P, Lambert PH, Mahmoud AAF, Sher A, Smithers SR, Sturrock RF, Torrigian G, Warren KS, Webbe G, Weigle W. Immunology of schistosomiasis. **Bull. W.H.O.** 1974; 51: 553-95.

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Alkan SS, Wuthrich B, Heusser CH, Blaser K. Induction and differential regulation of bee venom phospholipase A2-specific human IgE and IgG4 antibodies in vitro requires allergen-specific and nonspecific activation of T and B cells. **J Allergy Clin Immunol.** 1997 Mar;99(3):345-53.

Allen JE, Loke P. Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. **Parasite Immunol.** 2001 Jul;23(7):345-52.

Andrade ZA, Warren KS: Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1964 Jan;58:53-7.

Araujo MI, de Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol.** 1996 Jun;26(6):1399-403.

Asahi H & Stadecker MJ. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. **Parasitol Int.** 2003 Dec; 52(4): 361-7.

Bahia-Oliveira LMG, Simpson AJG, Alves-Oliveira LF, Carvalho-Queiroz C, Silveira AMS, Viana IRC, Cunha-Melo J., Hagan P, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. Evidence that cellular

immune response to soluble and membrane associated antigens are independently regulated during human *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Immunol.** 1996; 18: 53-63.

Bassily S, Farid Z, Higashi GI, Watten RH. Low-dose niridazole in the treatment of *Schistosoma mansoni*. **Ann Trop Med Parasitol.** 1979 Jun;73(3):295-6.

Bethony J, Williams JT, Kloos H, Blangero J, Alves-Fraga L, Buck G, Michalek A, Williams-Blangero S, Loverde PT, Correa-Oliveira R, Gazzinelli A. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area in Brazil. II: household risk factors. **Trop Med Int Health.** 2001; 6: 136-45.

Bilharz T. Further observations concerning distotomun haematobium in the portal vein of man and its relationship to certain pathological formations. **Z Wiss Zool.** 1953; 4: 72-6.

Bina JC. Influência da terapêutica específica na evolução da esquistossomose mansoni. **Revista de Patologia Tropical.** 1981; 10: 221-67.

Bina JC & Prata A. A evolução natural da esquistossomose em uma área endêmica. In: **Aspectos peculiares da infecção por *Schistosoma mansoni***. Centro de Estudos e Doenças Regionais. Salvador: Centro editorial e didático da Universidade Federal da Bahia; 1984. p.13-33.

Bogliolo L. Patologia. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais.** 1959; XI (2-3): 359-423.

Boros DL. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clin Microbiol Rev.** 1989 Jul;2(3):250-69.

Bosshardt SC, Freeman GL, Secor WE, Colley DG. IL-10 deficit correlates with chronic hypersplenomegaly syndrome in male CBA/J mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol.** 1997; 8: 347-53.

Bryan JE, Doenhoff MJ, Musallan R, Brink LH, Lichtenberg FV. *Schistosoma mansoni* infections in T-cell deprived mice, and the ameliorating effect of administering homologous chronic infection serum. II Pathology. **Am J Trop Med Hyg.** 1979; 28: 274-85.

Butterworth AE, Capron M, Cordingley JS, Dalton PR, Dunne DW, Kariuki HC, Kimani G, Koech D, Mugambi M, Ouma JH, Prentice MA, Richardson BA, Arap Siongok TK, Taylor DW. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune response. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1985a; 79: 393-408.

Butterworth AE, Dalton PR, Dunne DW, Mugambi M, Ouma JH, Richardson BA, Arap Siongok TK, Sturrock RF. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. I. Study design, pretreatment observations and the results of treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1984; 78: 108-23.

Butterworth A, Dunne D, Fulford A, Capron M, Khalife J, Capron A, Koech D, Ouma J, Sturrock R. Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. **Biochimie.** 1988 Aug;70(8):1053-63.

Caldas IR, Correa-Oliveira R, Colosimo E, Carvalho OS, Massara CL, Colley DG, Gazzinelli G. Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. **Am J Trop Med Hyg.** 2000; 62(1): 57-64.

Capron A, Dessaint JP, Capron M, Joseph M, Torpier G. Effector mechanisms of immunity to schistosomes and their regulation. **Immunol Rev.** 1982; 61: 41-62.

Capron A, Capron M, Dupas H, Bout D, Petiprez A. Étude *in vitro* des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. I. Étude comparative *in vitro* de l'activité létale d'immunoserums sur les formes immatures et sur les adultes de *Schistosoma mansoni*. **Int J Parasitol.** 1974; 4: 613-23.

Capron A, Dessaint JP, Capron M, Bazin M. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Nature.** 1975; 253: 474-5.

Capron M, Camus D, Carlier Y, Figueredo JFM, Capron A. Immunological studies in human schistosomiasis. II. antibodies cytotoxic for *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Am Trop Med Hyg.** 1977; 26: 248-52.

Capron A & Dessaint JP. Immunologic aspects of schistosomiasis. **Annu Rev Med.** 1992; 43: 209-18.

Cheever AW, Hoffmann KF, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol Today.** 2000 Sep;21(9):465-6.

Chen R, Lowe L, Wilson JD, Crowther E, Tzeggai K, Bishop JE, Varro R. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. **Clin Chem.** 1999 Sep;45(9):1693-94.

Chensue SW, Warmington KS, Hershey SD, Terebuh PD, Othman M, Kunkel SL. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis. Th2 cells mediate secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8+ T cells *in vivo*. **J Immunol.** 1993 Aug 1;151(3):1391-400.

Colley DG. Immune responses to a soluble schistosomal egg antigen preparation during chronic primary infection with *Schistosoma mansoni*. **J Immunol.** 1975; 115: 150-56.

Colley DG, Barsoum IS, Dahawi HSS, Gamil F, Habbib M, El Alamy MA. Immune responses and immunoregulation in relation to schistosomiasis in Egypt. III. Immunity and longitudinal studies of in vitro responsiveness after treatment. **Trans R Soc Trop Med.Hyg.** 1986a; 80: 952-7.

Correa-Oliveira R, Mota-Santos TA, Gazzinelli G. *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo killing of antibody-coated schistosomula. **Am J Trop Med Hyg.**, 1982; 31: 991-8.

Coussiner-Paris P, Dessein AJ. *Schistosoma*-specific help T cell clones from subjects resistant to infection by *Schistosoma mansoni* are Th0/2. **Eur J Immunol.** 1995; 25: 2295-302.

Dalton PR & Pole D. Water-contact patterns in relation to *Schistosoma haematobium* infection. **Bull. WHO.** 1978; 56: 417-26.

de Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhaes A, de Jesus AA, de Almeida RP, Rego MA, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis.** 2002 Jan 1;185(1):98-105.

Demeure CE, Rihet P, Abel L, Outtara M, Bourgois A, Dessein AJ. Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: Influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. **J Infect Diseases.** 1993; 168: 1000-8.

Dessein AJ, Begley M, Demeure C, Caillol D, Fueri J, Galvao dos Reis J, Andrade ZA, Prata A, Bina J. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37-kDa larval surface antigen. **J Immunol.** 1988; 140: 2727-36.

Doenhoff MJ, Hassounah O, Murare H, Brayn J, Lucas S. The schistosoma egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or host survival. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1986; 80: 503-14.

Doehring-Schwerdtfeger E, Abdel-Rahim IM, Mohamed-Ali Q, Elsheikh M, Schlake J, Kardorff R, Franke D, Kaiser C, Ehrich JH. Ultrasonographical investigation of periportal fibrosis in children with *Schistosoma mansoni* infection: evaluation of morbidity. **Am J Trop Med Hyg.** 1990 Jun;42(6):581-6.

Doughty BL, Philips SM. Delayed hypersensitivity granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs in vitro. II. Regulatory T cell subsets. **J Immunol.** 1982; 133: 933-40.

Dunne DW, Grabowska AM, Fulford AJ, Butterworth AE, Sturrock RF, Koech D, Ouma JH. Human antibody responses to *Schistosoma mansoni*: the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. **Eur J Immunol.** 1988 Jan;18(1):123-31.

Dunne, D.W., Butterworth, A.E., Fulford, A.J.C., Kariuki, H.C., Langley, J.G., Ouma, J.H., Capron, A., Pierce, R.J., Sturrock, R.F. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **Eur J Immunol.** 1992; 22: 1483.

Dunne DW, Richardson BA, Jones FM, Clark M, Thorne KJ, Butterworth AE. The use of mouse/human chimaeric antibodies to investigate the roles of different antibody isotypes, including IgA2, in the killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by eosinophils. **Parasite Immunol.** 1993 Mar;15(3):181-5.

Dunne DW, Lucas S, Bickle Q, Pearson S, Madgwick L, Bain J, Doenhoff MJ. Identification and partial purification of antigen (Wi) from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1981; 75: 54-71.

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J Immunol.** 1986 Jul 1;137(1):245-54.

Falcao PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, Gazzinelli G, Coffman RL, Correa-Oliveira R. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. **Parasite Immunol.** 1998 Oct;20(10):447-54.

Falcão PL, Correa-Oliveira R, Fraga LA, Talvani A, Proudfoot AE, Wells TN, Williams TJ, Jose PJ, Teixeira MM. Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1alpha during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans. **J Infect Dis.** 2002 Jan; 186(11):1696-700.

Finkleman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JJ, Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu Rev Immunol.** 1990; 8: 303-15.

Fiorentino DF, Bound MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med.** 1989; 170(6): 2081-95.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'garra A. IL-10 inhibits cytokine productions by activated macrophages. **J Immunol.** 1991; 147(11): 3815-22.

Fisher AC. A study of the schistosomiasis of the Stanleyville district of the Belgian Congo. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg.** 1934; 3: 277-306.

Flores-Villanueva PO, et al. Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses in vitro and in vivo. **J Immunol.** 1993; 151: 3192-8.

Flores-Villanueva PO, Reiser H, Stadecker MJ. Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B& and B7-2 costimulatory molecules by macrophages. **J Immunol.** 1994; 153: 5190-9.

Forssmann U, Ugucioni M, Loetscher P, Dahinden CA, Langen H, Thelen M, Baggiolini M. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. **J Exp Med.** 1997; 185: 2171.

Gazzinelli A, Bethony J, Fraga LA, Loverde PT, Correa-Oliveira R, Kloos H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil. I: water contact. **Trop Méd Int Health.** 2001; 6: 126-35.

Gazzinelli, G., Katz, N., Rocha, R.S., Colley, D.G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. **J Immunol.** 1983; 130 : 2891-5.

Gazzinelli G, Oliveira CC, Figuredo EA, Pereira LH, Coelho PMZ, Pellegrino J. *Schistosoma mansoni*: biochemical evidence for morphogenetic change from cercariae to schistosomule. **Exp Parasitol.** 1973; 34:181-8.

Gazzinelli G, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, Queiroz CC, CarvalhoOdos S, Massara CL, Fraga LA, Colley DG, Correa-Oliveira R. Immunological profiles of patients from endemic areas infected with *Schistosoma mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 1992;87 Suppl 4:139-42.

Gascan H, Gauchat JF, Aversa G, Van Vlasselaer P, de Vries JE. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. **J Immunol.** 1991 Jul 1;147(1):8-13.

Grogan JL, Kremsner PG, Van Dam GJ, Deelder AM, Yazdanbakhsh M. Anti-schistosome IgG4 and IgE at 2 years after chemotherapy: infected versus uninfected individuals. **J Infect Dis.** 1997 Nov; 176(5): 1344-50.

Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol.** 1991; 146(4): 1322-7.

Hagan P, Blumenthal UJ, Chaudri M, Greenwood M, Hayes RJ, Hodgson J, Kelly C, Knight M, Simpson AJG, Smithers RS, Wilkins HA. Resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium* in Gambian children: analysis of their immune responses. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1987; 81: 938-43.

Hagan P, Blumenthal UJ, Dunne D, Simpson AJG, Wilkins HA. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. **Nature.** 1991; 6306: 243-5.

Harn DA, Mitsuyama M, David JR. *Schistosoma mansoni*. Anti-egg monoclonal antibodies protect against cercarial challenge in vivo. **J Exp Med.** 1984; 159:1371-87.

Howells RE, Ramalho-Pinto JF, Gazzinelli G, Figueiredo EA, Pelegrino J. *Schistosoma mansoni*: mechanism of cercarial tail loss and its significance to host penetration. **Exp Parasitol.** 1974; 36: 373-85.

Iskander R, Das PK, Aalberse RC. IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. **Int Archs Allergy Apply Immunol.** 1981; 66: 200-7.

Jassim A, Hassan K, Catty D. Antibody isotypes in human schistosomiasis mansoni. **Parasite Immunol.** 1987 Nov;9(6):627-50.

Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. **J Immunol.** 1998 Apr 1;160(7):3555-61.

Jonhson T.R. How growing up can alter lab values. **Diag Med.** 1982; 5(Special Issue):12-8.

Jose PJ, Griffiths-Johnson DA, Collins PD, Walsh DT, Moqbel R, Totty NF, Truong O, Hsuan JJ, Williams TJ. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. **J Exp Med.** 1994 Mar 1;179(3):881-7.

Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H, Viens P. A new function for platelets independent killing of schistosomes. **Nature.** 1983; 303: 810-5.

Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev Inst Med Trop. São Paulo,** 1972; 14: 397-400.

Katzurada F. *Schistosoma japonicum*, a new parasite of man by which an endemic diseases in various areas of japan is caused. **Annot Zool. Japan,** 1904; 5: 146-60.

King CL, Hakini J, Mohamed TS, Medhat A. IL12 regulation of parasite antigen-driven IgE production in human helminth infections. **J Immunol.** 1995; 155: 454-61.

King CL, Mahanty S, Kumaraswami V, Abrams JS, Regunathan J, Jayaraman K, Ottesen EA, Nutman TB. Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset. **J Clin Invest.** 1993; 92: 1667-73.

King CL, Medhat A, Malhotra I, Nafeh M, Helmy A, Khaudary J, Ibrahim S, El-Sherbiny M, Zaky S, Stupi RJ, Brustoski K, Shehata M, Shata MT. Cytokine control of parasite-specific

anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. **J Immunol.** 1996 Jun 15;156(12):4715-21.

Kita H, Gleich GJ. Chemokines active on eosinophils: potential roles in allergic inflammation. **J Exp Med.** 1996 Jun 1;183(6):2421-6.

Kos FJ, Engleman EG. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. **Immunol Today.** 1996 Apr;17(4):174-6.

Lima MS, Gazzinelli G, Nascimento E, Parra JC, Montesano MA, Colley DG. Immune responses during human *Schistosomiasis mansoni*. Evidence for antiidiotypic T lymphocyte responsiveness. **J Clin Invest.** 1986 Oct;78(4):983-8.

Litchenberg Fvon. Studies on granuloma formation. III antigen sequestration and destruction in the schistosomae pseudotubercle. **Am J Pathol.** 1964; 45: 75-94.

MacDonald AS, Loke P, Martynoga RA, Dransfield I, Allen JE. Cytokine-dependent inflammatory cell recruitment in the peritoneal cavity of mice exposed to the parasitic nematode, *Brugia malayi*. **Med Microbiol Immunol(berl).** 2003; 3: 3656-64.

Mahanty S, Nutman TB. Immunoregulation in human lymphatic filariasis: the role of IL-10. **Parasite Immunol.** 1995; 17: 385-92.

Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth parasites--masters of regulation. **Immunol Rev.** 2004 Oct;201:89-116.

Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nat Rev Immunol.** 2003 Sep;3(9):733-44.

Malaquias LC, Falcao PL, Silveira AM, Gazzinelli G, Prata A, Coffman RL, Pizziolo V, Souza CP, Colley DG, Correa-Oliveira R. Cytokine regulation of human immune response to

Schistosoma mansoni: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses. **Scand J Immunol.** 1997 Oct;46(4):393-8.

Malaquias LCC, Falcão PL, Correa-Oliveira R, Wilson RA. IL-10 is an important factor in controlling morbidity in schistosomiasis mansoni. **International Symposium on Schistosomiasis. Belo Horizonte, Brazil**, 1997, p.72.

Mathew RC, Boros DL. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. **Infect Immun.** 1986 Dec;54(3):820-6.

McLaren, D.J. *Schistosoma mansoni*: the Parasite Surface in Relation to Host immunity. **Research Studies Press.** Chichester, UK, 1980.

Medhat A, Shehata M, Bucci K, Mohamed S, Dief AD, Badary S, Galal H, Nafeh M, King CL. Increased interleukin-4 and interleukin-5 production in response to *Schistosoma haematobium* adult worm antigens correlates with lack of reinfection after treatment. **J Infect Dis.** 1998 Aug;178(2):512-9.

Miller AM, Wilson RA. Migration of schistosomulum of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitol.** 1978; 77: 281-302.

Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Teixeira KM, Coutinho EM, Brinkman J, Goncalves I, Domingues LA, Domingues AL, Sher A, Wynn TA. Cytokine production in acute versus chronic human *Schistosomiasis mansoni*: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis.** 1999 Jun;179(6):1502-14.

Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science**. 1990; 248(4960): 1230-4.

Morven R, Butterworth AE, Kimani G, Kamau T, Fulford AJC, Dunne DW, Ouma JH, Sturrock AF. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. **Inf Immunol**. 1993; 61: 4984-93.

Mousa AH, et al. Clinicopathological aspects of hepatosplenic bilharziasis. In: MOSTOFI, F.R. (ed). **Bilharziasis**, Heidelberg: International Academy of Pathology. Special Monograph, Springer, 1967, p.15-9.

Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, Mbugua GG, Ouma JH, Mumo J, Fulford AJ, Jones FM, Butterworth AE, Roberts MB, Dunne DW. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. **J Immunol**. 1998 Feb 15;160(4):1992-9.

Neves DP. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 9th ed. Brasil; 1995. p. 524.

Nutten S, Trottein F, Gounni AS, Papin JP, Capron A, Capron M. From allergy to schistosomes: role of Fc receptors and adhesion molecules in eosinophil effector function. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1997;92 Suppl 2:9-14.

Oliveira CC, Figueredo EA, Gazzinelli G, Howells RE Pellegrino J. Biochemical changes in the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae to schistosomules. **Comp Biochem Physiol**. 1975; 51: 417-20.

Parra JC, Gazzinelli G, Goes AM, Moyes RB, Rocha R, Colley DG, Doughty BL. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human

schistosomiasis. II. In vitro granuloma modulation induced by polyclonal idiotypic antibodies. **J Immunol.** 1991 Dec 1;147(11):3949-54.

Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med.** 1991 Jan 1;173(1):159-66.

Pearce EJ & Macdonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews.** 2002; 2: 499-511.

Pessoa SJ, Martins AV. Trematódeos parasitas do sistema sanguíneo – *Schistosoma mansoni*. In: **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 13th ed. Brasil; 1986. p.399-421.

Ramalho-Pinto JF, Gazzinelli G, Howells RE, Pellegrino J. Factors affecting surface changes in intact cercariae and cercarial bodies of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol.** 1975; 71: 19-21.

Raso P, Neves J. Contribuição ao conhecimento do quadro anatômico do fígado na forma toxêmica da esquistossomose mansoni através de punções-biópsias. **Anais da Faculdade de Medicina da UFMG.** 1965; 22: 147-65.

Rihet P, Demeure CE, Bourgois A, Prata A, Dessein AJ. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. **Eur J Immunol.** 1991; 21: 2679-89.

Rihet P, Demeure CE, Dessein AJ, Bourgois A. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. **Eur J Immunol.** 1992 Aug;22(8):2063-70.

Ritter DM, McKerrow JH. Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. **Infect Immun.** 1996 Nov;64(11):4706-13.

Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokines receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. **Immunol Today.** 1998; 19(12): 568-74.

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. **Science.** 1997; 277: 2005-7.

Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. **Annu Rev Immunol.** 2000;18:593-620.

Sambon LW. Remarks on *Schistosoma mansoni*. **J Trop Med Hyg.** 1907; 10: 303-4.

Sher A, Coffman RL, Hieny S, Scott P, Cheever AW. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1990 Jan;87(1):61-5.

Silveira AM, Gazzinelli G, Alves-Oliveira LF, Bethony J, Gazzinelli A, arvalho-Queiroz C, Alvarez MC, Lima-Silva FC, Prata A, LoVerde PT, Correa-Oliveira R. Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 2004 Sep;98(9):514-9.

Snapper CM & Paul WE. Interferon and cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science.** 1987; 236: 944.

Stadecker MJ, Flores-Villanueva PO. The role of T cell anergy in the immunomodulation in schistosomiasis. **Parasitol Today.** 1992; 15: 571-4.

Stanworth DR & Smith AK. Inhibition of reagin mediated PCA reactions in baboons by the human IgG4 subclass. **Clin Allerg.** 1973; 3: 37-41.

Stevens TL, Bossie A, Sanders VM, Fernandez-Botran R, Coffman RL, Mosmann TR, Vitetta ES. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature.** 1988; 334: 255-8.

Stirewalt MA. Cercariae vs Schistosomule (*Schistosoma mansoni*). Absence of the pericercarial envelope in vivo and the early physiological and histological metamorphosis of the parasite. **Exp Parasitol.** 1963; 13: 395-400.

Sturrock RF, Kimani R, Cottrell BJ, Butterworth AE, Seitz HM, Siongok TK, Houba V. Observations on possible immunity to reinfection among Kenyan schoolchildren after treatment for *Schistosoma mansoni*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1983; 77: 363-71.

Teixeira MM. Eosinophil-active chemokines: assessment of in vivo activity. **Braz J Med Biol Res.** 1998 Jan;31(1):19-24.

Thors C & Linder E. Localization and Identification of *Schistosoma mansoni*/KLH-crossreactive Components in Infected Mice. **J Histochem Cytochem.** 2003 Oct; 51(10): 1367-73.

Uguccioni M, Mackay CR, Ochensberger B, Loetscher P, Rhis S, Larosa GJ, Rao P, Ponath PD, Baggiolini M, Dahinden CA. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils: role in activation by eotaxin, MCP-4 and the others chemokines. **J Clin Invest.** 1997; 100:1137.

van den Biggelaar AH, Borrmann S, Kremsner P, Yazdanbakhsh M. Immune responses induced by repeated treatment do not result in protective immunity to *Schistosoma haematobium*: interleukin (IL)-5 and IL-10 responses. **J Infect Dis.** 2002 Nov 15;186(10):1474-82.

Velupillai P, Harn DA. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: A mechanism for regulation of CD4+ T-cells subsets. **Proc Nat Acad Sci USA.** 1994; 91: 18-22.

Verwaerd C, Joseph M, Capron M, Pierce RJ, Damonville M, Velge F, Auriault C, Capron A. Functional properties of a rat monoclonal IgG antibody specific for *Schistosoma mansoni*. **J Immunol.** 1987; 138: 4441-6.

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

Vogel M, Price Z, Brumfitt DA. Changes in the tegmental surface during development of *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol.** 1978; 64: 585-592.

Waal-Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De-Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **J Exp Med.** 1991; 174(5): 1209-20.

Warren KS. Regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man: immunology or ecology? **J Inf Dis.** 1973; 127: 595-609.

Warren KS, Domingo EO, Cowan RBT. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. **Am J Pathol.** 1967; 51: 735-56.

Warren KS, Mohamud AAF, Cummings P, Murphy OJ, Mouser DP. Schistosomiasis mansoni in Yemeni in California: duration of infection; presence of disease and therapeutic management. **Am Trop Med Hyg.** 1974; 23: 902-9.

Weinstock JV. The pathogenesis of granulomatous inflammation and organ injury in schistosomiasis: interactions between the schistosome ova and the host. **Immunol Invest.** 1992 Aug;21(5):455-75.

Weinstock JV, Blum AM. Modulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni by enteric exposure to schistosome ova: in vitro characterization of a regulatory mechanism within the granuloma. **Cell Immunol.** 1987 Sep;108(2):452-9.

Wilkins MA, Blumenthal P, Hagan P, Hayes RJ, Tulloch S. Resistance to reinfection after treatment of urinary schistosomiasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1987; 81: 29-35.

Wilson RA. Interferon gamma is a key cytokine in lung phase immunity to schistosomes but what is its precise role? **Braz J Med Biol Res.** 1998 Jan;31(1):157-61.

World Health Organization. Communicable diseases: control of schistosomiasis and soil-transmitted helminth infection (Report by the secretariat), Executive Board, 107th session, 27 October, 1998.

Wynn TA, Eltoun I, Cheever AW, Lewis FA, Gause WC, Sher A. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **J Immunol.** 1993 Aug 1;151(3):1430-40.

Wynn TA, Cheever AW. Cytokines regulations of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr Opin Immunol.** 1995; 7: 505-11.

Wyler D J. Fibroblast stimulation in schistosomiasis. VII. Egg granulomas secrete factors that simulate collagen and fibronectin synthesis. **J Immunol.** 1987 Mar; 138(5): 1581-6.

Yamashita T, Boros DL. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine *Schistosoma mansoni*. **J Immunol.** 1992; 149: 3659-65.

Zwingenberger K, Irschick E, Siqueira Vergetti JG, Correia Dacal AR, Janssen-Rosseck R, Bienzle U, Huber C, Feldmeier H. Release of interleukin 2 and gamma interferon by peripheral mononuclear cells in human *Schistosoma mansoni* infection normalizes after chemotherapy. **Scand J Immunol.** 1989 Oct;30(4):463-71.