

IRAMAYA RODRIGUES CALDAS VIANA

ESTUDO LONGITUDINAL DA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS
RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS INFECÇÃO PELO
S. mansoni RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE - MG
1993

IRAMAYA RODRIGUES CALDAS VIANA

ESTUDO LONGITUDINAL DA RESPOSTA IMUNE DE INDIVÍDUOS
RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS INFECCÃO PELO
S. mansoni RESIDENTES EM ÁREA ENDÊMICA

Tese submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de mestre.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE - MG
1993

Apoio Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES)

UNDP / World Bank / WHO - Special Program for Research and
Training in Tropical Diseases

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
(FAPEMIG)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq)

À Daniella

Quero expressar os meus agradecimentos a todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a execução deste trabalho. Em especial, agradeço:

Ao Prof. Giovanni Gazzinelli, meu Orientador, pelo apoio compreensão e acima de tudo pelo exemplo;

Ao Rodrigo Corrêa Oliveira, pelas valiosas sugestões;

Ao Dr. Daniel G. Colley, pesquisador do Center for Disease Control. Atlanta, Georgia;

Aos Professores do Curso de Pós Graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, na pessoa do seu coordenador, Prof. José Augusto Nogueira Machado;

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, na pessoa do seu diretor, Dr. Naftale Katz;

Aos Amigos e Colegas do laboratório, pela convivência e colaboração, em particular à Maria José Morato, pela leitura cuidadosa deste manuscrito, ao Andy pelas preciosas críticas e Ana, Dílcia e Antônio Leides pelo inestimável apoio técnico;

Ao Omar dos Santos Carvalho e Cristiano Lara Massara do Laboratório de Helmintoses do CPqRR, pela amizade e pelo estudo parasitológico e malacológico da área endêmica;

À Coordenadoria de medicamentos Básicos (CEME), na pessoa de sua coordenadora, Dra. Rosa Maria da Conceição e Silva;

Aos Professores Enrico Colosimo e Marta Afonso Freitas do Instituto de Ciências Exatas da UFMG e Ana Cláudia de Oliveira, pela análise estatística destes resultados;

Às Dras Silvana M. Elói Santos, Andréa M. Rocha de Oliveira, Letícia Gazzinelli e Adélia A.M Santos, pelo carinho e exame clínico dos paciente;

Aos Moradores de Siqueira, que se dispuseram participar este estudo mesmo sem compreender a sua finalidade. Sinto-me gratificada pelos vínculos afetivos que por fim surgiram em nosso relacionamento ;

Agradeço a minha família e aos meus amigos pelo compreensão, paciência e encorajamento durante a realização deste trabalho.

91

" Se em horas de encontros pode haver tantos desencontros, que a hora da separação seja, tão somente, a hora de um verdadeiro, profundo e coletivo encontro. De tudo ficam três coisas: A certeza de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de ser interrompido antes de terminar. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro."

(Fernando Sabino)

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
1.0 Descrição da área endêmica.....	19
2.0 Estudo de caramujos.....	19
3.0 Grupo de indivíduos estudado.....	20
4.0 Técnica de avaliação do contato com águas naturais....	23
5.0 Exame parasitológico de fezes.....	24
6.0 Preparação de antígenos.....	24
7.0 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico.....	25
8.0 Ensaio de proliferação celular.....	26
9.0 ELISA (Enzime Linked Immunosorbent Assay).....	28
10.0 Teste Estatístico.....	30
RESULTADOS	
1.0 Distribuição do hospedeiro intermediário na área endêmica.....	33
2.0 Prevalência e intensidade de infecção na população....	36
3.0 Característica da população estudada imunologicamente.....	43
4.0 Motivo e frequência do contato com águas naturais....	45
5.0 Resposta de proliferação de PBMC de pacientes.....	49
susceptíveis e resistentes estimulados in vitro com antígenos e mitógeno.....	53
6.0 Determinação dos níveis de anticorpos específicos dos isotipos IgA, IgM, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em pool de soros dos pacientes SUS e RES.....	55
7.0 Comparação entre o nível de anticorpos específicos dos grupo controle, SUS e RES.....	55
8.0 Isotipo IgA.....	58
9.0 Isotipo IgM.....	60
10.0 Isotipo IgE.....	62
11.0 Isotipo IgG1.....	64
12.0 Isotipo IgG2.....	66
13.0 Isotipo IgG3.....	68
14.0 Isotipo IgG4.....	70
15.0 Comparação dos níveis de anticorpos IgG4 e IgE anti-STEG no soro do grupo SUS e RES.....	72
16.0 Correlação entre anticorpos anti-SEA e anti-STEG do soro do grupo SUS e RES.....	74
17.0 Correlação entre a carga parasitária e o nível de anticorpos IgG4, IgM e IgG2 anti-SEA.....	76
DISCUSSÃO.....	77
ANEXO.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa cadastral da comunidade de Siqueira.....	31
Figura 2. Distribuição da população de acordo com sexo faixa etária.....	32
Figura 3. Número de caramujos capturados e porcentagem de caramujos infectados.....	33
Figura 4. Precipitação pluviométrica e temperatura.....	34
Figura 5. Curvas de prevalência e intensidade de infecção antes do tratamento.....	38
Figura 6. Curvas de prevalência após o tratamento.....	39
Figura 7. Curvas de intensidade após o tratamento.....	40
Figura 8. Porcentagem de reinfeção após o tratamento.....	41
Figura 9. Relação entre o grau de exposição e a intensidade de infecção.....	46
Figura 10. Grau de contato médio com águas naturais da população.....	47
Figura 11. Grau de contato médio com águas naturais dos grupos SUS e RES.....	48
Figura 12. Média da resposta de proliferação de PBMC dos grupos SUS e RES estimuladas com antígenos SEA, SWAP e CERC antes e após o tratamento.....	51
Figura 13. Média da resposta de proliferação de PBMC dos grupos SUS e RES estimuladas com mitógeno PHA antes e após o tratamento.....	52
Figura 14. Titulação do "pool" de soros de pacientes SUS e RES dos diferentes isotipos dos anticorpos contra SEA, SWAP e CERC.....	54
Figura 15. Média dos níveis de anticorpos IgA específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC nos soros dos pacientes dos grupos SUS e RES antes e após tratamento.....	59
Figura 16. Média dos níveis de anticorpos IgM específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC nos soros dos pacientes dos grupos SUS e RES antes e após tratamento.....	61

Figura 17. Média dos níveis de anticorpos IgE específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC nos soros dos pacientes dos grupos SUS e RES antes e após tratamento.....	63
Figura 18. Média dos níveis de anticorpos IgG1 específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC nos soros dos pacientes dos grupos SUS e RES antes e após tratamento.....	65
Figura 19. Média dos níveis de anticorpos IgG2 específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC nos soros dos pacientes dos grupos SUS e RES antes e após tratamento.....	67
Figura 20. Média dos níveis de anticorpos IgG3 específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC nos soros dos pacientes dos grupos SUS e RES antes e após tratamento.....	69
Figura 21. Média dos níveis de anticorpos IgG4 específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC nos soros dos pacientes dos grupos SUS e RES antes e após tratamento.....	71
Figura 22. Média dos níveis de anticorpos IgE e IgG4 específicos para o antígeno STEG nos soros dos pacientes dos grupos SUS e RES antes e após tratamento.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Prevalência de helmintoses em Siqueira.....	42
Tabela II. Análise descritiva da variável idade para os grupos SUS e RES.....	43
Tabela III. Frequência da distribuição dos sexo nos grupos SUS e RES.....	44
Tabela IV. Carga parasitária média dos grupo SUS e RES antes do tratamento.....	44
Tabela V. Análise de variância para o ensaio de blastogêneses.....	94
Tabela VI. Análise de correlação entre a medida da resposta de PHA com a medida da resposta do SEA, SWAP e CERC.....	94
Tabela VII. Diferentes isotipos anti-SEA dos grupos controle SUS e RES antes do tratamento.....	56
Tabela VIII. Diferentes isotipos anti-SWAP dos grupos controle SUS e RES antes do tratamento.....	56
Tabela IX. Diferentes isotipos anti-CERC dos grupos controle SUS e RES antes do tratamento.....	57
Tabela X. Análise de variância para IgA.....	95
Tabela XI. Análise de variância para IgM.....	95
Tabela XII. Análise de variância para IgE.....	96
Tabela XIII. Análise de variância para IgG1.....	96
Tabela XIV. Análise de variância para IgG2.....	97
Tabela XV. Análise de variância para IgG3.....	97
Tabela XVI. Análise de variância para IgG4.....	98
Tabela XVII. Correlação entre isotipos anti-SEA e IgE anti-STEG.....	75
Tabela XVIII. Correlação entre a carga parasitária e os isotipos IgM, IgG2, IgG4 anti-SEA e IgE	

INTRODUÇÃO

As parasitoses humanas constituem um grave problema médico sanitário. Estima-se que há mais de um bilhão de pessoas afetadas por alguma doença parasitária no mundo (Dorozynski et al., 1976).

Dentre as doenças parasitárias humanas, a esquistossomose apresenta-se como uma das maiores endemias contemporâneas e a sua patologia é decorrente da infecção pelo *Schistosoma*, um trematódeo digenético, que é encontrado na África, na região do Mediterrâneo Oriental, na Ásia, nas Antilhas e na América do Sul (Mott, 1984).

O gênero *Schistosoma* apresenta três principais espécies que podem infectar o homem: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum* (Jordan et al., 1982; Mahmoud et al., 1990).

Atualmente estima-se que duzentos milhões de pessoas no mundo são afetadas por alguma espécie de *Schistosoma*, seiscentos milhões constituem o grupo de risco de infecção e a transmissão ocorre em setenta e seis países (Berquist, 1991).

No Brasil estima-se que doze milhões de pessoas estão infectadas pelo *S. mansoni* distribuídos do Pará ao Paraná (Kloetzel, 1989).

A infecção pelo *S. mansoni* induz no hospedeiro vertebrado resposta imune de hipersensibilidade tardia, produzindo inflamação crônica em volta dos ovos do parasita. A maioria dos pacientes infectados pelo *S. mansoni* desenvolve, gradualmente a forma crônica, relativamente assintomática da doença. Esta forma clínica, a qual é chamada de intestinal está associada com

ocasionais desconfortos gastrointestinais. Em áreas de alta prevalência, onde a intensidade de infecção é mais elevada, cerca de 15 % da população progride para forma hepatointestinal e menos de 5% para a forma hepatoesplênica que é a forma grave da doença, caracterizada pelo crescimento do baço e fígado, aparecimento de hipertensão portal e varizes esofagianas. Eventualmente, indivíduos que vivem fora da área endêmica se infectam, apresentando a fase aguda da doença caracterizada por febre, diarreia, leucocitose e eosinofilia (Hiatt et al., 1979).

Um aspecto interessante na epidemiologia da esquistossomose é a curva de distribuição de número de ovos do S. mansoni em relação às diferentes faixas etárias do hospedeiro. Na maioria dos estudos constatou-se que, a carga parasitária aumenta progressivamente nas faixas etárias mais jovens e diminui discretamente ou acentuadamente após a segunda década de vida (Kloetzel, 1962a ; Polderman, 1979; Jordan et al, 1980). De fato, a medida que a idade aumenta, se o indivíduo permanece na área endêmica, aumentam as chances de reinfeções sucessivas com acúmulo de parasitas. Isto explicaria o crescimento progressivo da intensidade da infecção até a segunda década de vida. Após esta fase há um decréscimo contínuo da carga parasitária com a idade.

Duas hipóteses são consideradas como mais prováveis para explicar este fenômeno. A primeira sugere que haveria uma alteração nos hábitos dos indivíduos que apresentariam um contato menos frequente com águas contaminadas com cercárias. A segunda

sugere a possibilidade de residentes de áreas endêmicas desenvolverem resistência parcial a reinfeção.

Warren (1973) demonstrou que a diminuição do contato com águas por adultos nos sítios de infecção tem sido o fator que limita a carga parasitária muito mais do que a imunidade adquirida. Dalton & Pole (1978) observando a relação entre a frequência do contato com água e a intensidade de infecção com S. haematobium, concluíram que a diminuição da carga parasitária em indivíduos mais velhos, poderia ser satisfatoriamente explicada pela diminuição do contato com água.

Wilkins et al. (1984a,1984b) compararam a mudança de intensidade de infecção com o tempo, em duas comunidades no Gâmbia, sendo que em uma delas a transmissão foi interrompida por aplicação de moluscicida. Na área tratada houve um declínio da intensidade de infecção, durante o período de estudo, possibilitando a determinação do tempo de vida média do S. haematobium. Esta estimativa, possibilitou calcular o número de ovos depositado por vermes adultos adquiridos de novas reinfeções, na área não tratada, durante o mesmo período de tempo. A aquisição de novas infecções foi 1000 vezes maior em crianças que em adultos. Apesar de não ter havido uma investigação formal sobre o contato com água, esta diferença foi considerada muito grande para ser atribuída unicamente a diminuição de exposição a infecção.

Outras evidências a favor da hipótese de que a imunidade adquirida, seria um dos fatores determinantes da diminuição da

carga parasitária com a idade, foram obtidas através de alguns estudos de reinfecção após a quimioterapia, onde se tentou quantificar a exposição a infecção.

Katz et al. (1978) mostraram que a reinfecção de crianças era mais acentuada do que em adultos e uma análise da exposição a águas contaminadas através de questionário sugeriu que a diminuição do contato com água não explicava a menor taxa de infecção dos adultos. Os indivíduos mais velhos eram capazes de desenvolver resistência a reinfecção, em maior grau que o dos mais jovens, sugerindo também que a imunidade seria adquirida de maneira gradual após a infecção.

Em estudos realizados no Gâmbia, também foi observada uma diferença no nível de reinfecção em crianças, que não poderia ser explicada somente em termos de diminuição do contato com águas (Hagan et al., 1985b).

Estudos com um grupo de crianças infectadas com S.mansoni no Quênia, onde foram feitas observações minuciosas do contato com água, em focos monitorados para presença de hospedeiro intermediário infectado, os autores identificaram dois diferentes grupos de crianças. Um, considerado susceptível, apresentava índice elevado de contato com águas contaminadas e uma carga superior a 100 ovos / grama de fezes. O segundo, considerado resistente, apresentava um grau comparável de exposição porém, não se infectava ou adquiria carga parasitária baixa (<50 ovos / grama de fezes). A comparação entre estes dois grupos mostrou que as crianças resistentes eram significativamente mais velhas que

as susceptíveis, sugerindo ser a resistência adquirida um fenômeno dependente da idade (Butterworth 1984,1985)

Wilkins et al. (1987) estudaram aleatoriamente a reinfeção de um grupo de indivíduos com idade variável no Gâmbia . Para cada indivíduo foi calculado um índice de exposição a cercárias baseado em questionário, levando em conta o tipo de atividade e a freqüência do contato com águas; isto permitiu que os indivíduos fossem agrupados em categorias de acordo com o grau de exposição. Dentro de cada categoria a intensidade de exposição foi relacionada com a intensidade de infecção expressa em ovos /grama de fezes. Os indivíduos mais velhos sempre apresentaram uma menor intensidade de infecção em todas as categorias. Estes resultados, mais uma vez, confirmaram o desenvolvimento gradual da imunidade na esquistossomose.

Klotezel & Da Silva (1967) observaram que as curvas de intensidade e prevalência versus a duração da infecção pelo S. mansoni de um grupo de adultos imigrantes, que se deslocaram para uma área endêmica, era comparável aquela de indivíduos residentes em área endêmica desde criança. Baseado neste achado eles concluíram que a duração da infecção seria o fator preponderante na determinação da resistência adquirida.

Os resultados destes estudos sugerem que a resistência à reinfeção não pode ser adequadamente explicado com base somente na freqüência de exposição. Outros fatores, tais como a idade e duração da infecção também devem ser levados em consideração.

Alguns aspectos da resposta imune durante a infecção com

Schistosoma tem sido analisados por vários grupos, em modelos experimentais e em pacientes, na tentativa de identificar as bases imunológicas para resistência.

A maioria das informações sobre a resistência, bem como seus mecanismos imunológicos, resulta de estudos em diversos modelos experimentais.

O Camundongo é o modelo experimental amplamente utilizado no estudo da esquistossomose por ser susceptível à infecção e desenvolvendo, segundo alguns autores, quadro clínico semelhante à esquistossomose humana (De Witt & Warren, 1959). Nesses animais, a infecção primária pelo S. mansoni estimula uma imunidade que previne parcialmente a sobrevivência dos parasitas provenientes de uma reinfecção; ou seja, a resistência adquirida coexiste com a infecção que a induz, razão pela qual foi denominada de imunidade "concomitante" (Smithers & Terry, 1969a). Observações consistentes com a imunidade concomitante também foram feitas em infecções com outras espécies de Schistosoma em outros hospedeiros. (Taylor et al., 1976; Damian et al., 1974; Pearce & McLaren, 1984; Webbe and James, 1973; Vogel et al., 1953; Sher et al., 1974b)

A resistência parcial à infecção em camundongos pode também ser induzida pela vacinação com cercárias irradiadas (Minard et al., 1978). Este tipo de imunidade é dependente de linfócitos B e T e possui componente genético já que é variável a imunidade exibida pelas diferentes espécies de camundongos isogênicos (Sher et al., 1982; James & Sher, 1983; Correa-Oliveira et al., 1984).

A imunidade induzida pela vacinação não está associada com o estágio adulto do parasita, nem com a patologia induzida pelo ovo, uma vez que os esquistossômulos morrem em algum ponto, ao longo da via migratória, entre o sítio de penetração e o pulmão, antes de alcançarem a maturidade (Von Lichtenberg et al., 1985). Estes dois tipos de imunidade diferem quanto a especificidade, enquanto a imunidade concomitante não é espécie específica (Smithers & Doenhoff, 1982), a imunidade induzida por vacinação o é. (Bickle et al., 1985; Moloney & Webbe, 1987).

A imunidade na esquistossomose é um fenômeno complexo e vários mecanismos, dos quais participam anticorpos, células e complemento, já foram implicados na sua expressão.

Dois principais mecanismos de imunidade foram evidenciados na infecção experimental. O primeiro em ratos, consiste na citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), envolvendo IgE ou IgG2a (Capron et al, 1981b; Grzych et al, 1982), ou ainda dependente de macrófago e / ou eosinófilos e plaquetas (Capron et al., 1975; Capron et al., 1979, 1981b). Este efeito é dirigido contra a superfície do esquistossômulo recém transformado. O segundo modelo em camundongos envolve a atuação de macrófagos ativadas, independente de anticorpos. Os antígenos causadores desta resposta não precisam estar necessariamente na superfície do parasita e podem ter como alvo organismos em estádios mais avançados de desenvolvimento (James, 1986a, 1986b).

A citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC) é o mecanismo primário de defesa contra o Schistosoma.

Contrário ao sistema de ADCC clássico, o qual envolve a colaboração de anticorpos e células linfóides K, na esquistossomose as células efetoras são macrófagos, eosinófilos e plaquetas. As classes e a especificidade dos anticorpos que participam da reação de ADCC na esquistossomose são também peculiares. Capron et al. (1985) usando absorção seletiva dos vários isotipos mostrou que anticorpos IgE anti-Schistosoma induzem a morte por fagócitos mononucleares, eosinófilos e plaquetas em humanos ou em ratos. O papel da IgE foi confirmado por Verwaerd et al. (1987), tanto in vivo como in vitro, pelo uso de anticorpos monoclonais IgE específico para o Schistosoma no modelo do rato. Estes monoclonais conferem em animais "naive" significante resistência a infecção.

Neutrófilos em presença de complemento e anticorpos da classe IgG, presentes no soros de ratos e cobaias imunes, também são capazes de mediar a morte de esquistossômulos (Dean et al., 1974 e 1975). Foi sugerido que o efeito dos neutrófilos poderia estar associado com a liberação de enzimas líticas na superfície do esquistossômulo.

O complemento, por si só, parece estar também envolvido nos mecanismos de imunidade na esquistossomose, lisando o parasita in vitro. Os esquistossômulos retêm, parcialmente, a capacidade de ativar o complemento pela via alternativa podendo ser lisado in vitro (Santoro et al., 1979) embora sua susceptibilidade seja incomparavelmente menor do que a da cercária (Ramalho-Pinto et al., 1978). Eles também podem ser lisados por uma via dependente

de complemento que requer a participação de anticorpo, e sua ativação ocorre pela via clássica. Este mecanismo foi inicialmente descrito por Clegg & Smithers (1972) quando observaram a morte do esquistossômulo na presença de soro de macaco Rhesus hiperimunizado com cercárias de S. mansoni. O anticorpo letal para esquistossômulo aparece na circulação de vários hospedeiros cerca de 4 meses após a infecção e pode ser detectado por vários anos, mesmo após a cura. Ele pertence a classe IgG e à subclasse IgG2 no camundongo e no rato (Peres, 1974; Ramalho-Pinto et al., 1974; Horta & Ramalho-Pinto, 1986).

Várias tentativas foram feitas no sentido de correlacionar o anticorpo letal com a proteção do hospedeiro contra o S. mansoni, mas os resultados são controversos (Sher et al., 1974a; Murrell et al., 1972; Horta & Ramalho-Pinto, 1984).

Recentemente a imunologia celular foi revolucionada pela demonstração de duas subpopulações distintas de linfócitos T CD4+ em modelos experimentais, que podem ser identificadas com base no padrão de produção de linfocinas (Mosmann et al., 1988). As células TH1 produzem preferencialmente interferon gama (IFN gama) e interleucina 2 (IL2) e linfotóxica e mediam a hipersensibilidade retardada, enquanto células TH2 produzem interleucina 4 (IL4), interleucina 5 (IL5) e interleucina 10 (IL10). Cada uma destas subpopulações de linfócitos possui capacidade diferente para estimular linfócitos B a secretar diferentes isotipos de imunoglobulinas.

Células de camundongo quando estimuladas *in vitro* com lipopolissacarídeo de bactéria (LPS), proliferam e diferenciam em células secretoras de imunoglobulinas. A adição de IL4 a cultura de células B estimuladas induz uma produção de IgE, aumenta a produção de IgG1 e inibe a síntese de IgG3 e IgG2. IFN gama, uma citocina que tem relação antagônica com IL4, aumenta a produção de IgG2 e não inibe a resposta de IgG1 e IgE neste sistema (Coffman et al., 1986; Snapper et al., 1987).

Atualmente um grande número de trabalhos tem evidenciado a importância destas interleucinas na infecção esquistossomótica experimental focalizando principalmente o papel destes fatores solúveis na imunidade de animais infectados ou vacinados com cercárias irradiadas.

A utilização de anticorpos monoclonais anti-IL4 e anti-IL5 para diminuir os níveis de IgE e eosinófilos circulantes ou de tecidos, não afeta a resposta protetora e nem a reação inflamatória contra esquistossômulos no pulmão de camundongos. Já o tratamento com anticorpos anti-IFN gama induz diminuição parcial na imunidade e aumento na reação inflamatória contra esquistossômulos no pulmão (Sher et al., 1990b).

Phillips et al. (1990a, 1990b) demonstraram respectivamente no modelo de infecção do camundongo e do rato, que a eliminação de células secretoras de IL2 aumentava o período de sobrevivência dos vermes e diminuía a resistência contra a infecção desafio, sugerindo a participação de células TH1 nos mecanismos que levam ao desenvolvimento da resistência.

Sher et al. (1991a) observaram que animais infectados produziam níveis mais elevados de IL5, enquanto animais imunizados com cercárias irradiadas apresentam níveis mais altos de IFN gama.

Todos estes resultados mostram que a indução predominante de determinadas subpopulações de linfócitos T CD4+ podem estar relacionadas com a susceptibilidade e / ou resistência à infecção experimental. Enquanto TH1 é induzida pela vacinação com cercárias irradiadas, a infecção experimental induz uma resposta predominantemente do tipo TH2. Admite-se que a presença de células de tipo TH2 está associada com a deposição de ovos do parasita nos tecidos, uma vez que a transferência de ovos do S. mansoni para animais vacinados altera o tipo de resposta de TH1 para TH2 (Vella et al., 1992).

As respostas celular e humoral de pacientes esquistossomóticos tem sido investigadas por vários grupos que utilizaram preparações antigênicas solúveis dos diferentes estádios evolutivos do parasita. No entanto poucos trabalhos têm demonstrado a relação entre a reatividade celular e a resistência a infecção ou reinfeção.

Colley et al. (1977a) mostraram que não havia correlação entre a intensidade de infecção e a resposta blastogênica de célula mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados com S. mansoni, estimuladas por antígeno solúvel de ovo (SEA), antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) e antígeno solúvel de cercária (CERC).

Estudo longitudinal realizado, no Egito, por Barsoun et al (1982) mostrou que, após a quimioterapia, a maioria dos pacientes apresentavam uma elevação da resposta celular frente aos antígenos SWAP e CERC. Abdel-Salan et al. (1981) obtiveram resultados similares após o tratamento de pacientes infectados pelo S. haematobium. A resposta celular estimulada pelo SEA, na maioria destes estudos após a quimioterapia, foi individualmente muito variada.

Colley et al. (1986a) mostraram que pacientes "Former" (tratados há 5 ou mais anos, e que não se reinfetaram) possuem vigorosa resposta a antígenos do Schistosoma.

Pacientes crônicos apresentam uma resposta modulada para SEA (Ellner et al., 1981; Rocklin et al., 1980; Colley et al., 1986a) em oposição a alta reatividade de PBMC de pacientes agudos ou em estágios iniciais da infecção (Colley et al., 1977a; Ottesen et al., 1978; Gazzinelli et al., 1985).

Colley et al. (1986a) estudando longitudinalmente, por um período de 2 anos, a resposta de linfócitos estimuladas por diferentes preparações antigênicas do parasita em um grupo de 18 indivíduos, infectados com S. mansoni no Egito, encontraram uma associação entre o nível de resposta a estes antígenos e a reinfecção. Indivíduos susceptíveis apresentavam uma resposta celular mais baixa ao antígeno de CERC e a SEA do que indivíduos resistentes após a quimioterapia. Observaram também que a resposta de PBMC de pacientes resistentes estimuladas com SEA frequentemente permanecia elevada após o tratamento.

Nogueira-Machado et al.(1983) demonstraram que células mononucleares de pacientes infectados com S. mansoni inibem a morte de esquistossômulos por granulócitos e complemento. Este efeito inibidor parece ser devido a liberação de fatores solúveis presentes nas células mononucleares de pacientes.

Embora a resposta celular de pacientes esquistossomóticos tenha sido amplamente estudada, pouco se conhece sobre o papel das citocinas produzidas pelas células no desenvolvimento da doença.

Butterworth et al.(1988c) analisando a produção de IFN gama por células de indivíduos infectados com S.mansoni no Quênia, não encontraram nenhuma diferença significativa entre o grupo de crianças resistentes e susceptíveis a infecção.

Consistente com resultados obtidos em camundongos, não houve nenhuma produção de IL2 e IFN gama em cultura de PBMC estimuladas por antígenos em indivíduos infectados (Zwingerberger et al.,1989 ;Bahia-Oliveira et al.,1992). Esta supressão pode ser devido a uma regulação específica, já que após a cura quimioterápica, há uma normalização progressiva da produção destas citocinas (Zwingerberger et al.,1989). Estes autores ainda observaram haver um desequilíbrio na relação IL4/IFN gama de pacientes infectados, que produziam elevados níveis de IL4 (Zwingerberger et al., 1991). Baseado nestes dados e outras evidências em diferentes infecções, sugere-se que na esquistossomose humana ocorre o mesmo balanço TH1/TH2 que é observado no camundongo (Wierenga et al.,1991; Salgame et al.,1991).

A resistência à reinfeção foi associada com o aumento do nível de eosinófilos circulantes em um grupo de crianças que não se infectavam com S. haematobium após tratamento, embora estes eosinófilos não fossem capazes de matar esquistossômulos in vitro (Hagan, 1985b).

Sturrock et al. (1983) demonstraram também que a eosinofilia podia estar relacionada à resistência a reinfeção pelo S. mansoni em escolares no Quênia. Detectaram altos níveis de anticorpos anti-esquistossômulo que podiam mediar a reação de citotoxicidade celular (ADCC). Entretanto, em outro estudo de resistência a reinfeção ao S. mansoni com crianças no Quênia, durante um período de 3 anos, Butterworth et al. (1984, 1985, 1988) não observaram nenhuma diferença no nível de eosinófilos entre crianças consideradas resistentes e susceptíveis a infecção.

O envolvimento de eosinófilos entre as células efetoras da resposta imune ao S. mansoni foi descrito inicialmente por Butterworth et al. (1975). Os autores observaram que o soro de indivíduos infectados, em presença de leucócitos do sangue periférico de indivíduos normais, induziam lesões no tegumento do esquistossômulo. Butterworth et al. (1977) utilizando o mesmo sistema de ensaio, demonstraram que uma preparação de células do sangue periférico de humanos contendo 98% de eosinófilos e ausência de neutrófilos, era citotóxica para esquistossômulos em presença de anticorpos específicos da classe IgG.

Os anticorpos citotóxicos para esquistossômulos, na presença de complemento, foram detectados pela primeira vez por Capron et

al. (1974) em pacientes infectados com S. mansoni. A atividade citotóxica do anticorpo era espécie-específica, uma vez que soros de pacientes portadores de infecção com S. haematobium apresentavam uma citotoxicidade significativamente mais baixa em relação aqueles de pacientes infectados com S. mansoni (Capron et al., 1977)

Os anticorpos, na ausência de complemento ou células, parecem não ter nenhum efeito direto sobre o parasita in vitro. A complexidade antigênica do S. mansoni induz uma resposta múltipla de anticorpos no curso da infecção aguda e crônica. Todos os estágios do Schistosoma são reconhecidos por anticorpos presentes no soro do homem (Butterworth et al., 1985; Simpson et al., 1985, 1986), mas nem todos os anticorpos são relevantes na imunidade e alguns podem, inclusive, prevenir a expressão da imunidade.

A hipótese de que alguns anticorpos podem bloquear a expressão da imunidade surgiu como uma possível explicação para o lento desenvolvimento da imunidade no homem. Um precedente para esta hipótese foi decorrente do estudo em rato, como modelo de infecção. Neste animal foi observado que um anticorpo monoclonal da subclasse IgG2a apresentando capacidade de mediar a morte de esquistossômulos, in vitro em presença de eosinófilos e capaz de conferir transferência passiva in vivo, podia ser bloqueado por um anticorpo monoclonal da subclasse IgG2c, com especificidade de ligação para antígeno de superfície de esquistossômulo. O IgG2c reconhecia também epitopos de carboidratos expressos na

superfície de ovos do parasita (Grzych et al., 1982, 1984). Várias evidências tem sido obtidas, mostrando que este fenômeno pode também ocorrer no homem.

Frações IgM de soros individuais inibem, *in vitro*, a morte de esquistossômulo dependente de eosinófilo, que é mediada por frações de IgG do mesmo soro. Estes anticorpos IgM estavam presentes em maior quantidade no soro de crianças susceptíveis do que nas resistentes (Khalife et al., 1986). Butterworth et al. (1987) encontraram uma correlação positiva entre a resposta de anticorpos anti-ovo que inibiam a ligação do monoclonal IgG2c de rato e a susceptibilidade a reinfeção após o tratamento.

Estes achados levaram à hipótese de que durante a infecção natural no homem, grande quantidade de antígenos eram liberados dos ovos do parasita que são estimuladores antigênicos potentes para o hospedeiro. Os anticorpos contra tais antígenos, e em especial contra epítopos de carboidratos, reagem com glicoproteínas ou polissacarídeos da superfície do esquistossômulo. Como estes anticorpos anti-ovo são de isotipos ineficientes (IgM, ou possivelmente algumas subclasses de IgG), então eles poderiam bloquear a atividade de anticorpos específicos para o mesmo epítopo ou epítopo adjacente na superfície do esquistossômulo (Butterworth 1989).

Duas séries de estudos em população humana forneceram maiores esclarecimentos para este balanço de anticorpos de diferentes isotipos, dirigidos contra antígenos do parasita, e sua implicação no desenvolvimento da resistência. Hagan et al.

(1991) observando a taxa de reinfecção após o tratamento em uma comunidade exposta a infecção com S. haematobium no Gâmbia, mostraram que os níveis de IgE contra antígenos do ovo e vermes adultos eram significativamente maiores em indivíduos com idade superior a 15 anos (menos susceptível a infecção), e os níveis de IgG4 contra os dois antígenos significativamente maiores entre crianças com idade de 10 a 14 anos (mais susceptíveis à reinfecção). Estes resultados sugerem a possibilidade de que o desenvolvimento gradual da imunidade pode, em parte, depender de mecanismos que envolvem IgE e que alguns destes mecanismos podem ser bloqueado por altos níveis de IgG4.

Níveis específicos de IgG4 tem sido associado com algumas infecções por helmintos, assim como altos níveis de IgE específicos e não específicos são característicos desta infecção em seres humanos. Iskander et al. (1981) estudando o nível de imunoglobulinas anti-Schistosoma no soro de indivíduos infectados com S. mansoni e / ou S. haematobium no Egito, encontraram que grande parte destes anticorpos, podia ser da subclasse IgG4. Os anticorpos IgG4 tem sido, também, a classe dominante durante a infecção com Wuchereria bancrofti (Ottesen et al., 1984). Mas o papel destas imunoglobulinas ainda não está claro. IgG4 é ineficiente na ativação do complemento e na ligação a receptores em monócitos e macrófagos. Tem sido sugerido que IgG4 pode interferir na ativação do complemento pelo IgG1 (Iskander et al., 1981) e pode também bloquear a degranulação de mastócitos por competição com IgE específica contra antígenos alergênicos do

verme (Stanworth & Smith, 1973).

Um outro grupo de pesquisadores também estudou o balanço entre IgE e anticorpos bloqueadores e seu envolvimento na resistência e susceptibilidade a infecção. Numa comunidade no Quênia, investigando a resposta imunológica de crianças infectadas com S. mansoni, eles mostraram que a imunidade protetora estava positivamente correlacionada com a existência de anticorpos IgE específicos para antígenos do Schistosoma (Capron et al., 1992; Butterworth et al., 1988b).

Os diversos aspectos considerados acima sugerem que mecanismos imunológicos exercem um papel importante na imunidade da esquistossomose. Dentro desta perspectiva, procuramos neste trabalho traçar o perfil imunológico de pacientes susceptíveis e resistentes à infecção pelo S. mansoni residentes em área endêmica, na tentativa de identificar os efetores imunológicos envolvidos na imunidade protetora no homem.

Baseado no exposto os nossos objetivos específicos foram os seguintes :

1. Caracterizar uma área endêmica para S. mansoni.
2. Identificar retrospectivamente os grupos de indivíduos susceptíveis e resistentes através da avaliação periódica da carga parasitária após o tratamento.
3. Traçar os perfis das respostas celulares dos dois grupos antes e após tratamento específico.
4. Determinar as alterações isotípicas de anticorpos específicos durante o período de observação.

MATERIAIS E MÉTODOS

1.0 DESCRIÇÃO DA ÁREA ENDÊMICA

Esta investigação foi realizada em Siqueira, uma pequena comunidade com cerca de duzentos e cinquenta habitantes, pertencente ao município de Sabará, que dista 40 Km ao nordeste de Belo Horizonte no estado de Minas Gerais.

O clima da região é caracterizado por dois períodos distintos de chuva e seca. O período de seca varia de Abril a Setembro e o período de chuva de Outubro a Março.

A principal atividade econômica da região é agricultura, sendo a plantação de banana a mais comum. Na comunidade não há escolas, posto médico e as condições sanitárias são precárias. A água utilizada na região é retirada dos dois córregos principais (Córrego do Barbosa e Córrego do Siqueira) que é usada pela população, para as diferentes atividades.

2.0 ESTUDO DE CARAMUJOS E OBSERVAÇÕES CLIMÁTICAS

Para determinar os sítios de transmissão em Siqueira foram realizadas coletas mensais de caramujos, nos córregos e principais valas que atravessam a localidade, começando em Março de 1989 até Novembro de 1990. Os caramujos encontrados em cada sítio eram colocados em saco plástico e trazidos para exame no Laboratório de Helmintoses Intestinais do Centro de Pesquisas René Rachou sob a chefia do Dr Omar dos Santos Carvalho.

As coletas foram realizadas utilizando-se concha metálica com 25 cm de altura, com perfurações de 0.5 cm de diâmetro, nas laterais e no fundo, adaptada a uma haste de madeira com cerca de 1,20 m de comprimento. Adotou-se o critério de mergulhar a concha na coleção hídrica, a cada passo (Carvalho et al., 1975). Os moluscos recolhidos eram examinados no laboratório, por compressão entre placas de vidro, sob observação microscópica.

Os dados climáticos, apresentados neste trabalho, são da Grande BH e foram obtidos através do 5^o Distrito de Meteorologia do Ministério da Agricultura.

3.0 GRUPO DE INDIVÍDUOS ESTUDADOS

Na fase inicial do nosso estudo a área foi mapeada (Figura 1). A idade e o sexo dos membros da comunidade foi registrada, bem como a distribuição das pessoas em suas respectivas casas. Em Janeiro de 1989 a presença e a intensidade de infecção pelo Schistosoma mansoni e outros parasitas foram determinadas pelo método Kato Katz (Katz et al., 1972). Em Fevereiro todas pessoas foram submetidas ao exame clínico e os indivíduos infectados foram tratados com oxaminiquine na dose de 15 mg/Kg para adultos e 20mg/Kg para crianças. Foram coletadas amostras de 20 ml de sangue dos indivíduos para estudos imunológicos.

Nos períodos de 2, 9 e 21 meses após tratamento foram

realizados exames parasitológicos de fezes, retiradas amostras de sangue e oferecido tratamento aos infectados, independente da sua participação neste estudo. O consentimento dos pacientes, parentes, ou responsáveis era indispensável para que os mesmos participassem do projeto. Para os indivíduos da comunidade portadores de outras doenças foi oferecida assistência médica e tratamento quando necessário independentemente da doença estar relacionada com objeto de estudo e da participação do indivíduo neste programa.

O estudo longitudinal foi inicialmente realizado com um grupo de 162 pessoas, que foram acompanhadas por um período de 21 meses após o tratamento. A distribuição da população de acordo com sexo e a faixa etária está apresentada na Figura 2

A maior parte da população infectada era assintomática. Vinte e quatro pacientes apresentavam o fígado palpável e 5 apresentavam o fígado e baço palpáveis. Estes pacientes, entretanto, não apresentavam sinais nem sintomas de hipertensão porta ou hiperesplenismo. Após o tratamento da população e seguimento longitudinal com exames de fezes periódicos, foram identificados retrospectivamente dois grupos; um constituído de pacientes que se reinfectaram rapidamente após o tratamento - susceptíveis (SUS); e outro, resistentes (RES), constituído de pacientes com hábitos semelhantes ao grupo anterior com relação ao contato com águas contaminadas com cercárias, mas com exames de fezes negativos durante o período da investigação.

Classificamos como susceptíveis aqueles pacientes que após

o tratamento, apresentavam consecutivamente 2 exames de fezes negativos e o 3^o exame positivo ; e como resistentes aqueles que apresentavam após o tratamento exames de fezes persistentemente negativos. O esquema abaixo expressa a característica de cada grupo. Dos 162 indivíduos que participaram inicialmente deste estudo, selecionamos somente aqueles que se encaixavam nesta classificação e eram frequentes aos exames.

O esquema abaixo é uma forma representativa da classificação que usamos, apresentando também o número de indivíduos em cada grupo.

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz.

	1/89	3/89	9/89	11/90
	TX00	TX01	TX02	TX03
SUS	+ (21)	- (16)	- (13)	+ (18)
RES	+ (21)	- (17)	- (11)	- (19)

+/- Resultado parasitológico de fezes para *S. mansoni*

() Número de indivíduos

TX00 Antes de tratamento; TX01, 02, 03 representam 2, 9 e 21 meses após o primeiro tratamento

4.0 TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DO CONTATO COM ÁGUAS NATURAIS

A frequência de contato com águas foi avaliada através de questionário adaptado de modelo previamente utilizado por Lima e Costa (1983) e aplicados à população (anexo 1). Todas as pessoas residentes em Siqueira responderam ao questionário individualmente. Quando se tratava de crianças menores a mãe ou responsável ajudava no preenchimento destes. Foram considerados somente os contatos com águas naturais da região.

A frequência de contato com águas naturais foi classificada em Diário (contatos pelo menos uma vez por dia), Semanal (pelo menos uma vez por semana), Quinzenal (pelo menos duas vezes por mês) e Mensal (uma vez ou menos por mês). Com relação aos motivos de contato foi adotada a seguinte classificação : Lavar roupa, buscar água, lavar vasilhas de uso doméstico, tomar banho, lazer (nadar, pescar, etc.) e outros (atravessar ou retirar areia do córrego, lavar carro, regar horta ou lavoura, etc.). Para determinar o grau de contato com águas naturais foi atribuído pesos aos motivos e a frequência dos mesmos. O grau de contato foi calculado, usando-se a seguinte fórmula:

$\Sigma (m \times f)$; onde m = peso do motivo do contato

f = peso da frequência do contato

foi considerado alto grau de contato aqueles que somaram mais de 100 pontos e de baixo contato aqueles com menos de 100 pontos.

5.0 EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES

A presença e o número de ovos do parasita por grama de fezes foram determinados através de exames de duas lâminas de amostras de fezes de cada paciente de acordo com método Kato-Katz (Katz et al., 1972). Eram coletadas três amostras fecais de cada paciente. Os exames foram rotineiramente executados pelo Laboratório de Helmintoses Intestinais do Centro de Pesquisas René Rachou.

6.0 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS

Os antígenos solúveis do Schistosoma mansonii foram preparados segundo o método descrito por Gazzinelli et al. (1983b). Os vermes adultos e ovos foram coletados de camundongos albinos "swiss" infectados com cercárias da cepa LE de Schistosoma mansonii mantidas em nosso laboratório. Vermes adultos, ovos e cercárias foram triturados separadamente em homogenizador com pistão de teflon (Potter) em salina 1.7%. O homogenato resultante centrifugado a 50.000 g durante 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra salina fisiológica durante 48 horas a 4°C e esterelizados utilizando filtro de 0.45µm (filter millex -HA- Millipore Products Division, Bedford, MA). A dosagem de proteína foi feita utilizando o

método descrito por Lowry et al. (1951). As cercárias foram transformadas em esquistossômulos in vitro pelo método descrito por Ramalho-Pinto et al. (1974). O tegumento esquistossomular (STEG) foi obtido pelo tratamento do esquistossômulo com CaCl 0,3M. Os esquistossômulos foram gentilmente agitados no vórtex durante 7 minutos, após a agitação foram centrifugados por 15 segundos a 240 x g. O sobrenadante desta centrifugação foi coletado e novamente centrifugado a 20,000 x g durante 1 hora a 4⁰ C. Desta centrifugação o sobrenadante era desprezado e o pellet ressus-pondido em salina fisiológica e então dialisado. A dosagem de proteína era determinada segundo o método descrito por Lowry et al. (1951).

7.0 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano foram separadas segundo procedimento descrito por Gazzinelli et al. (1983). Sobre 9,0ml de LSM (Lymphocyte Separation medium, Litton Biometrics, Kensington, MD) adicionavam-se no mínimo 20 ml de sangue periférico (Heparin, Sigma; 300 U de heparina /20 ml de sangue). O sangue era adicionado lentamente pelas paredes do tubo (25 x 150 mm, Pyrex Laboratory Glassware) com o auxílio da pipeta de 10 ml estéril. Em seguida, os tubos eram centrifugados a 400 x g durante 40 minutos a 18⁰ C (Model j-6b Centrifuge, Beckman). O anel de células mononucleares era

coletado com auxílio de pipeta Pasteur (Thomas Laboratory Specialities, Philadelphia, PA) e transferido para tubos cônicos siliconizados (Centrifuge Tube 50 ml; Pyrex Laboratory glassware). As células eram lavadas 3 vezes sendo : A primeira vez com cerca de 30 ml de meio MEM (Minimum Essential Medium, GIBCO) e duas vezes com cerca de 15 ml de MEM. Em seguida eram centrifugadas a 400 x g durante 10 minutos a 4⁰C e ressuspendidas em 2,0 ml de RPMI-1640 (RPMI-medium 1640, GIBCO). Diluía-se uma alíquota de células em suspensão de Turok's e contava-se o número de células com auxílio de microscópio ótico e câmara de Neubauer. A concentração de células era ajustada para obtenção de 10 x 10⁶ células por mililitro de RPMI-1640. Toda a manipulação era realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar.

8.0 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

O ensaio de proliferação celular (blastogênese) era realizado segundo procedimento descrito por Gazzinelli et al., (1983a) com algumas modificações aqui descritas. O meio de cultura para o cultivo de células continha 1,6% de L-glutamina (Solução estoque : 200mM, GIBCO, Grand Island, NY, USA) e 5% de antibiótico antimicótico (Solução de estoque: 10.000 unidades de penicilina, 100.000 ug de estreptomicina e 25Íg de fungizona por mililitro) em RPMI-1640 (GIBCO). O cultivo era feito em placas de 96 poços de fundo chato (Linbro, Flow laboratories,

Inc., Mclean, VA). A cada poço contendo meio de cultura acrescentavam-se 25 ul de RPMI contendo 40% de soro humano normal AB+ inativado pelo calor (30 minutos a 56⁰ C, concentração final de 5% de soro por cultura). Acrescentavam-se 25 ul de células mononucleares, ressuspendidas em RPMI na concentração de 10 x 10⁶ células por mililitro, de modo a conter 250.000 células em cada poço. As preparações antigênicas, em diversas concentrações, eram diluídas em RPMI-1640. 25 ul destas preparações eram adicionados em cada poço e nas culturas controle 25ul de RPMI-1640. As placas eram mantidas em incubadoras com ar úmido contendo 5% de CO₂ (Forma Scientific, Marietta, OH, USA) por 6 dias. No último dia de cultivo adiciona-se, em cada poço 0,2 µCi de (³ H)-timidina em RPMI e reincubava-se as placas por 6 horas. As células eram então coletadas em papel de fibra de vidro (Whatman Inc., Clifton, NJ, USA), com auxílio de um coletor automático de células (modelo M24V, Biomedical Research and Development Laboratories, Rockville, MD, USA). O papel de fibra de vidro contendo células radioativas era secado e colocado em frascos de cintilação líquida. Acrescentavam-se 3.5 ml de coquetel de cintilação contendo 5 g de PPO (2,5, difeniloxazole, Scintanalysed PP FISHER Scientific Company, Fair lawn, NJ, USA) e 0,1 g de POPOP (1,4-bis 2-(5-feniloxazolil) -benzeno; fenil-oxazolilfenil-oxazolil-fenil, Scintanayzed POPOP, FISHER } em um litro de tolueno. Determinava-se radioatividade incorporada em cintilador BECKMAN LS100C. Contavam-se as amostras por 2 minutos, com canais de ³H e C abertos. Os resultados eram expressos por contagem por minutos

(CPM). Toda manipulação das células era realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar.

Células mononucleares do sangue periférico dos pacientes susceptíveis e resistentes, antes e após o tratamento, foram testadas quanto a sua capacidade de proliferar in vitro, quando estimuladas com antígenos preparados dos diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni* (SEA, SWAP e CERC) e com mitógeno Phitoemaglutinina A (PHA). O nível de proliferação foi medido através de incorporação de timidina triciada. O valor foi expresso em ACPM (o valor de incorporação da cultura estimulada com antígeno diminuído do valor de incorporação da cultura sem estímulo antigênico).

Durante todo o estudo os indivíduos integrantes dos grupos de pacientes SUS e RES foram os mesmos, sendo que em determinados exames, alguns indivíduos destes grupos não compareceram.

9.0 ELISA (ENZIME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Os ensaios de ELISA com soros humanos foram realizados segundo o protocolo descrito por Lunde et al. (1979) com pequenas modificações. Usaram-se placas de fundo chato (Immunlon II, Dynatech laboratories, Inc., Alexandria, VA). Em cada poço eram adicionados 100 ul de antígenos solúvel de Schistosoma mansoni nas concentrações adequadas diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6. As placas eram então mantidas por 18 h a

4⁰ C. O excesso de antígenos não ligados as placas eram descartados por inversão e todos os poços das placas bloqueados com 200 ul de uma solução com tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6, contendo 2% de albumina de soro bovino (BIOBRAS, Montes Claros, MG Brasil) por noventa minutos, à temperatura ambiente. Lavavam-se as placas por 10 vezes com tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Os soros eram diluídos em várias concentrações em solução de PBS-T e 100 ul dos soros diluídos eram adicionados a cada poço. As placas eram incubadas a 37⁰ C por 1 h e então novamente lavadas com PBS-T. Adicionavam-se as placas os anticorpos anti imunoglobulina humana ligada a biotina e novamente as placas eram incubadas por 1 h a 37⁰ C. Após esta incubação era adicionado as placas avidina conjugada com peroxidase (Avidin-Peroxidase, SIGMA) diluída 1:4000. As placas eram novamente incubadas a 37⁰C por 1h e lavadas sucessivamente com tampão PBS-T. Distribuía-se 100 ul/poço de substrato ABTS (Kirkegaard & Perry) e a reação era interrompida com 50 ul de SDS 10% e a densidade ótica medida em leitor automático utilizando-se filtro de 405 nm (BIORAD, model 2550 EIA Reader). Foram utilizados os seguintes isotipos: anti-IgA humana ; anti-IgM humana e anti-IgG1 produzidas em cabra e conjugados a biotina (Southern Biotechnology Associates, Inc Birmingham, USA). Estes anticorpos eram diluídos 1:10.000. anti-IgG2, anti-IgG3, anti-IgG4 e anti-IgE eram anticorpos monoclonais de camundongo conjugados a biotina (Southern Biotechnology Associates, Inc Birmingham, USA). Estes anticorpos foram diluídos 1:2000.

10.0 TESTES ESTATÍSTICOS

A análise estatística deste trabalho foi realizada pelo serviço de assessoria estatística do ICEX sob a orientação dos professores Enrico A. Colosimo e Marta Afonso Freitas e com assistência técnica da estagiária Ana Cláudia de Oliveira Couto.

Este estudo foi baseado em um planejamento de medidas repetidas, ou seja, foram tomadas medidas na mesma unidade experimental (paciente) em 4 tempos diferentes. Portanto, além de estudar o efeito de cada grupo (Susceptível e Resistente) na resposta e necessário avaliar o efeito do tempo, bem como a interação entre o grupo e tempo. Este estudo foi feito através de uma análise de variância. Onde foi identificado de alguns fatores estudados (grupo, tempo e grupo-tempo), foram feitas comparações múltiplas para avaliar qual era este efeito através do teste LSD (Least Significant Difference).

Análise de correlação utilizada foi a de Pearson.

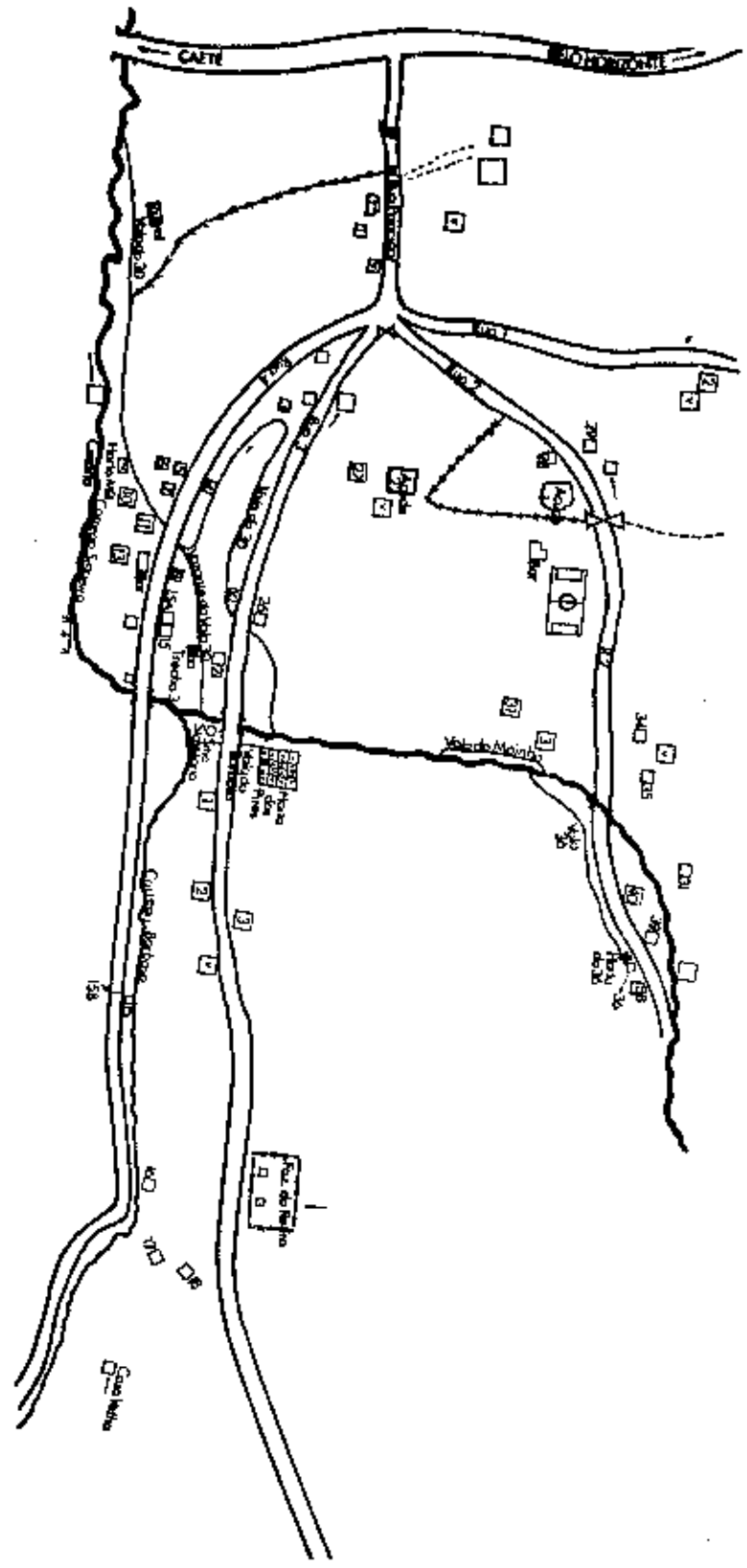


Figura 1. Mapa cadastral da comunidade de Siqueira

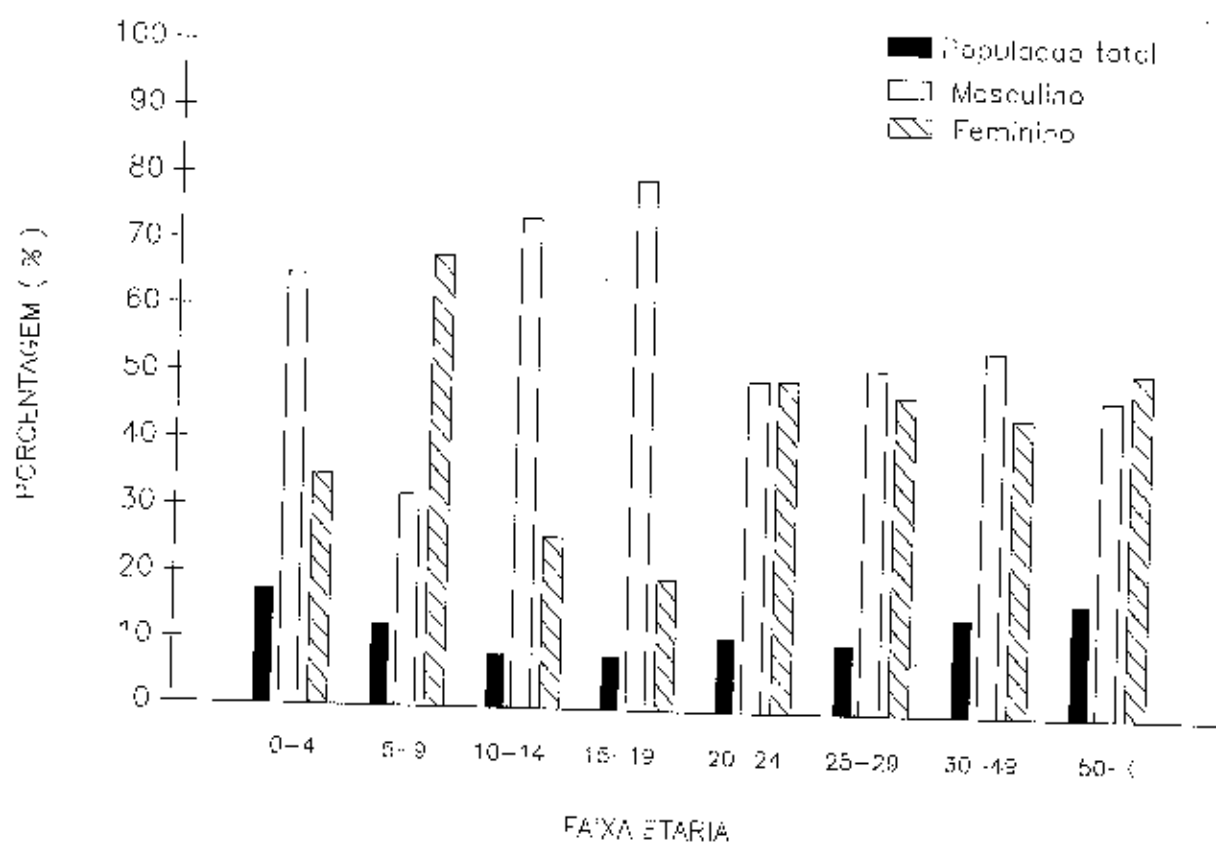


Figura 2. Distribuição da população de acordo com o sexo e faixa etária

RESULTADOS

1.0 DISTRIBUIÇÃO DO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO NA ÁREA ENDÊMICA

A espécie de caramujo hospedeiro do S. mansoni coletada em Siqueira foi Biomphalaria glabata com tamanho variando de 0,3 a 30mm. O número de caramujos coletados e as observações climáticas estão sumarizados nas Figuras 3 e 4. Constata-se que no período de chuva houve uma redução na população de caramujos, provavelmente levados pelas enxurradas, seguindo-se uma gradual repopulação dos focos. O número de caramujos infectados capturados foi maior nos meses de Março (1,1%) e Agosto (1,6%) de 1989 e em Fevereiro (1,0%) e Agosto (1,0%) de 1990, nos outros meses este número foi pequeno. Estes caramujos eram capturados principalmente nas valas. Dentre os principais sítios de infecção encontrados durante o nosso estudo, podemos destacar a Vala do Trinta e a Vala da Horta dos Pires (Assinalados no mapa - Figura 1).

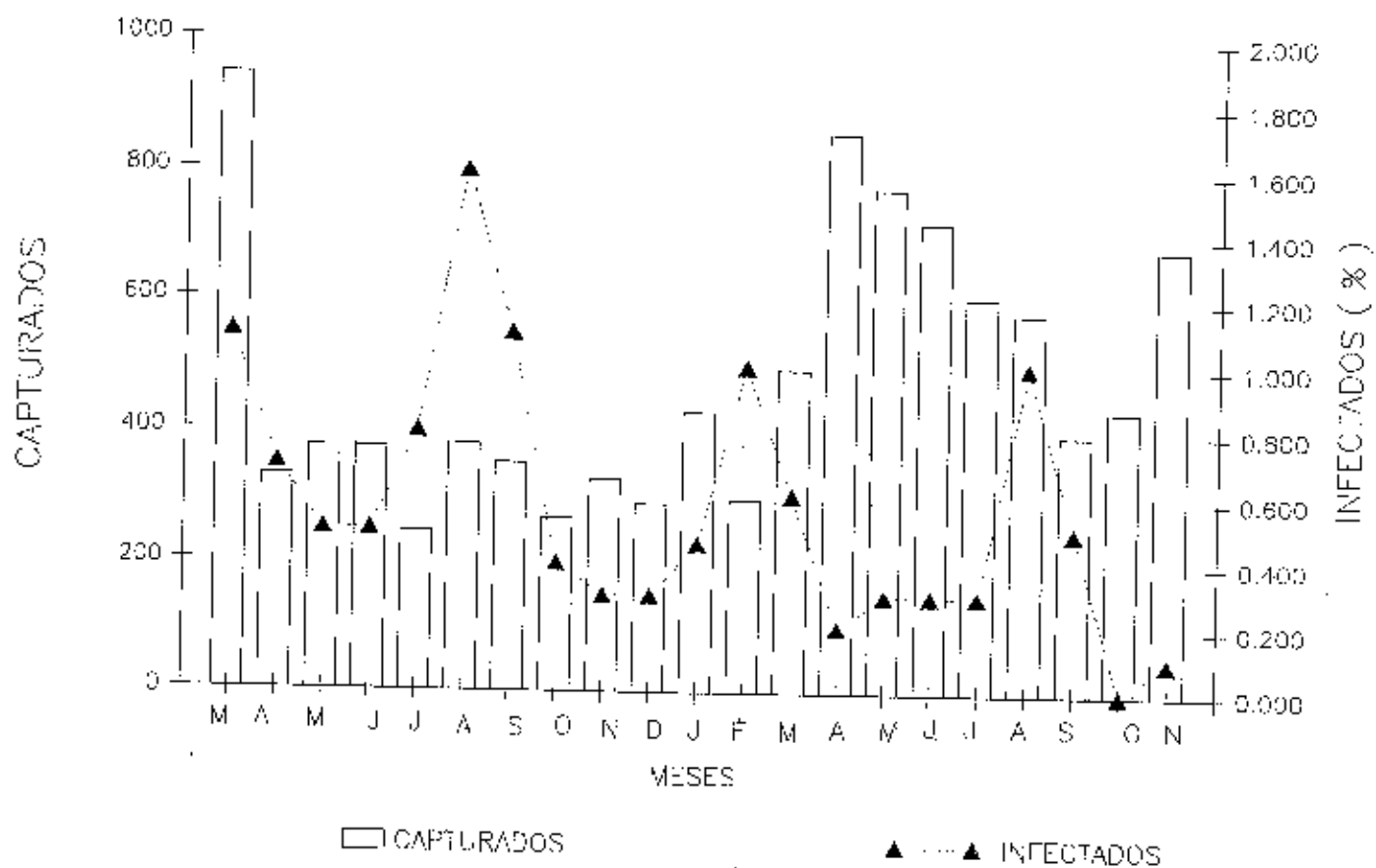


Figura 3. Número de caramujos capturados e a porcentagem de caramujos infectados durante o período de estudo

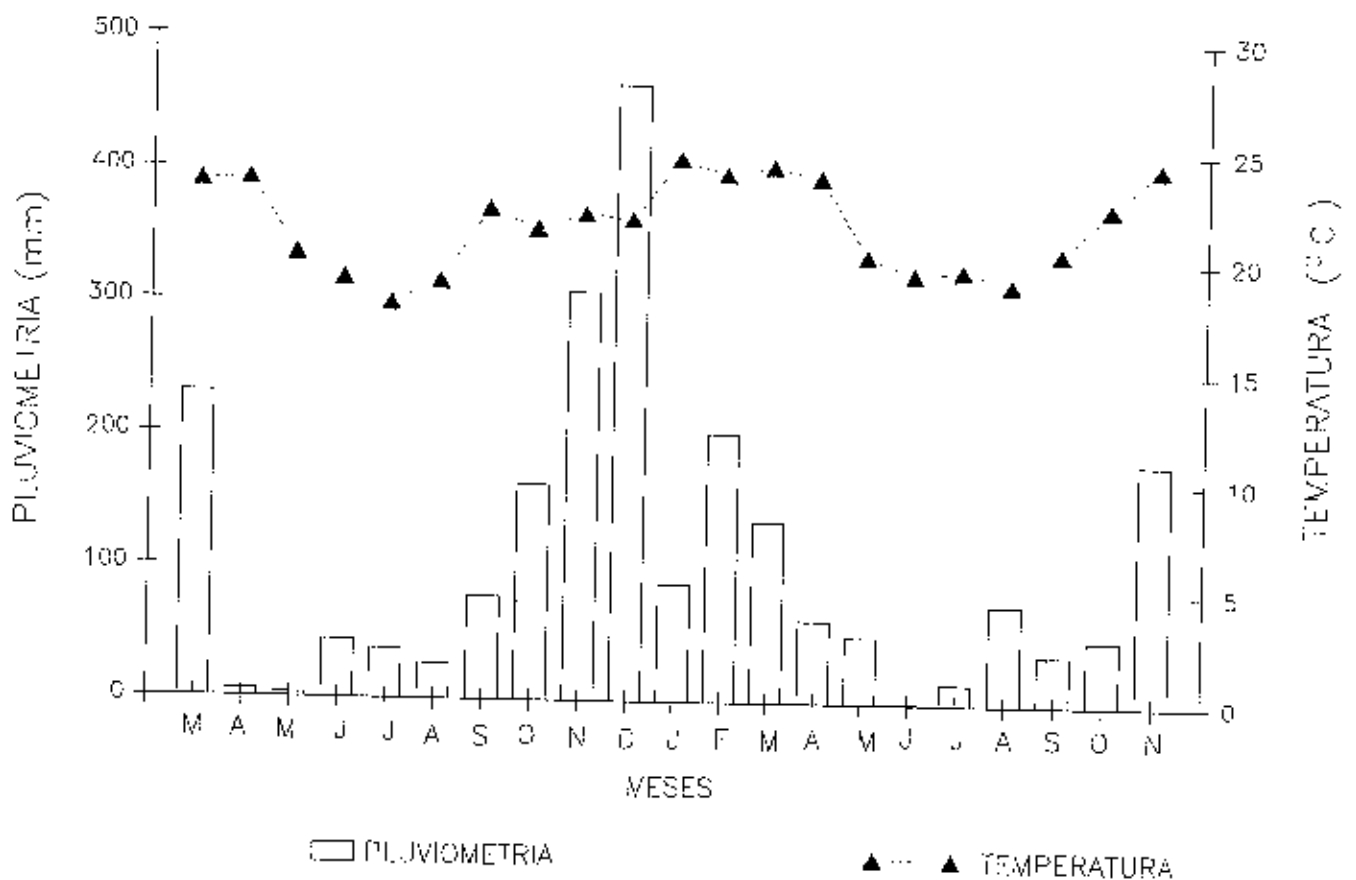


Figura 4. Dados fornecidos pelo 5^o Distrito de Meteorologia do Ministério da Agricultura referentes a precipitação pluviométrica e temperatura da região da grande B.H. durante o estudo.

2.0 PREVALÊNCIA E INTENSIDADE DE INFECÇÃO NA POPULAÇÃO

Os resultados de exames de fezes quantitativo da população antes do tratamento mostraram que a prevalência ou seja, a porcentagem de indivíduos infectados foi de 68% e a média geométrica de ovos do parasita nas fezes foi de 62 ovos / grama de fezes (Figura 5). A maior prevalência ocorre entre os indivíduos do sexo masculino com um pico na faixa de 10 - 19 anos (76,0 %) e uma menor nas crianças de 0 - 9 anos (22,0 %) e nos pacientes com mais de 50 anos de idade (26,9%) ; nas outras faixas etárias este índice variou de 33,3 a 45,8%.

A média geométrica do número de ovos de S. mansoni, ou seja, intensidade de infecção, cresceu progressivamente até a segunda década de vida, quando atingiu o valor máximo de 237,46 ovos /grama de fezes nos pacientes na faixa de 20-24 anos do sexo masculino,caindo acentuadamente nos pacientes acima de 30 anos (Figura 5).

Dois meses após o primeiro tratamento a prevalência foi reduzida para 10,55 % e a intensidade para 27,3 ovos/grama de fezes (Figuras 6 e 7). No 3^o exame de fezes quantitativo da população, 21 meses após o tratamento, a prevalência praticamente não se alterou (12,0 %) mas a intensidade de infecção reduziu de 27,3 para 16,37 ovos /grama de fezes (Figura 6). Decorrido 21 meses após o 1^o tratamento observamos que houve um ligeiro aumento na prevalência (36,2%) em relação aos

2 exames anteriores, mas ainda permaneceu abaixo da prevalência inicial (68%). Já a intensidade de infecção aumentou ligeiramente (23,1 ovos/ grama de fezes) em relação ao último exame, permanecendo ainda em nível baixo com relação a intensidade antes do tratamento (Figura 7).

Comparando a taxa de reinfeção nas diferentes faixas etárias, observamos que esta foi de 79% em crianças de 10-14 anos decrescendo acentuadamente após esta idade (Figura 8).

Os exames de fezes ainda revelaram a presença de outros parasitas tais como Ascaris lumbricoides, Ancilostomídeos, Trichocephalus trichiurus e Enterobius vermicularis. A Tabela I mostra a distribuição da porcentagem de indivíduos examinados com relação a infecção pelo S. mansoni e as outras parasitoses, antes do tratamento.

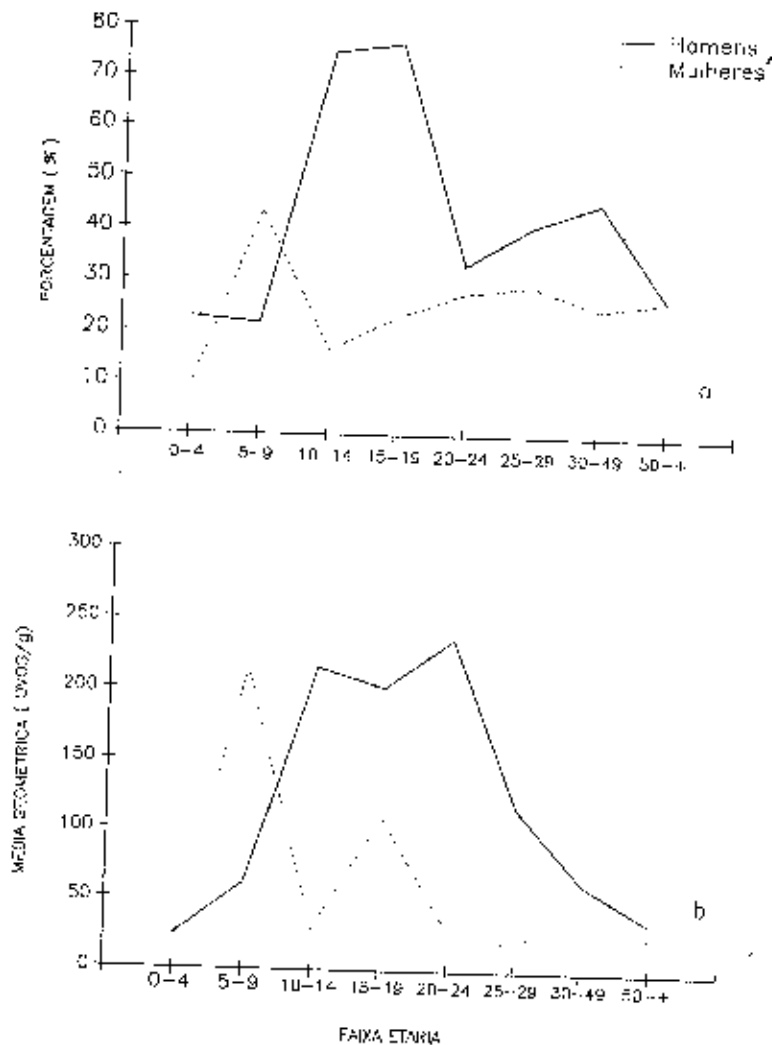


Figura 5. Porcentagem de indivíduos infectados (a) e média geométrica do número de ovos do *S. mansoni* (b) de acordo com a faixa etária e sexo, antes do tratamento (TX00).

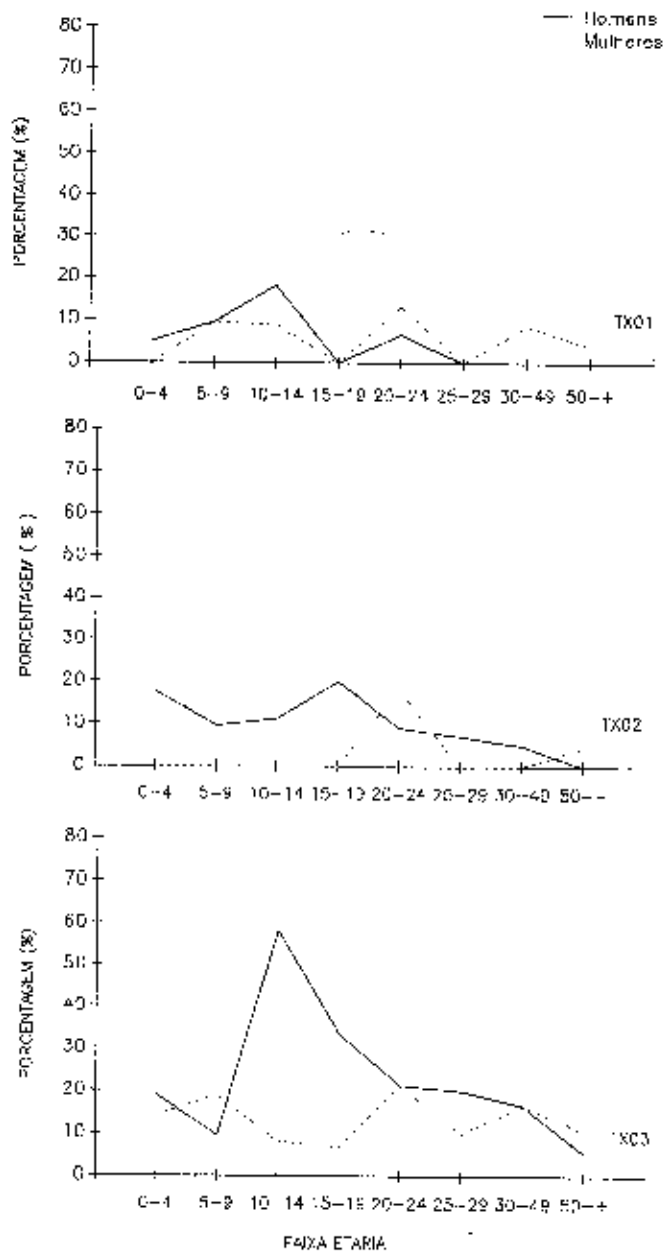


Figura 6. Curvas de prevalência da população de acordo com a faixa etária e sexo nos tempos TX01, TX02 e TX03 (2, 9 e 21 meses após o tratamento, respectivamente)

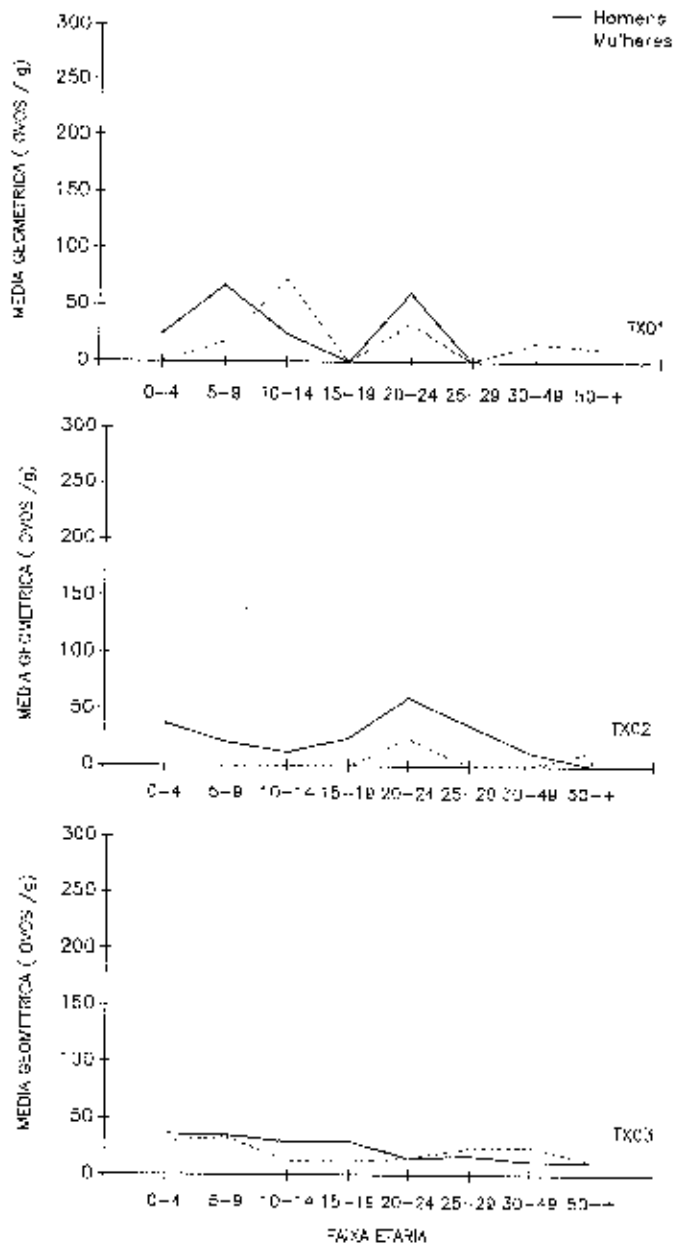


Figura 7. Curvas de intensidade de infecção da população de acordo com a faixa etária e sexo nos tempo TX01, TX02 e TX03 (2, 9 e 21 meses após o tratamento respectivamente)

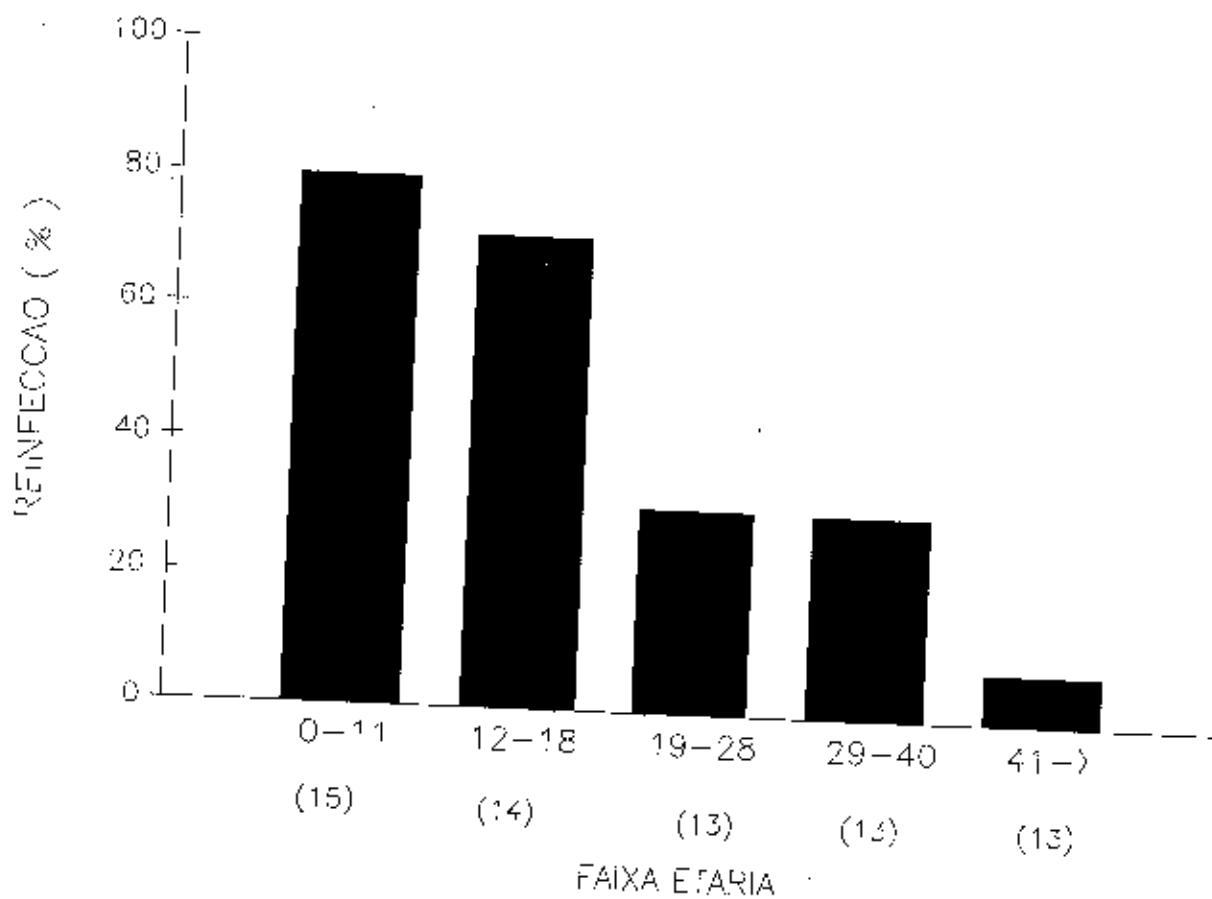


Figura 8. Porcentagem de pacientes reinfectedados com relação a faixa etária.
Em parênteses o número de indivíduos

TABELA I

Prevalência de Helmitoses em Siqueira

PARASITAS	%	N
<u>S. mansoni</u>	31,0	26
<u>S. mansoni</u> + <u>A. lumbricoides</u>	14,3	12
<u>S. mansoni</u> + Ancilostomideo	38,1	32
<u>S. mansoni</u> + <u>T. trichiurus</u>	1,2	01
<u>S. mansoni</u> + <u>A. lumbricoides</u> + <u>T. trichiurus</u>	4,8	04
<u>S. mansoni</u> + Ancilostomideo + <u>T. trichiurus</u>	1,2	01
<u>S. mansoni</u> + <u>A. lumbricoides</u> + Ancilostomideo	11,9	10

N Corresponde o número de indivíduos

A IDADE, SEXO E CARGA PARASITÁRIA

Observar-se através da Tabela II as diferenças entre os dois grupos com relação a idade. Como esperado, os pacientes do grupo RES possui a média de idade maior do que aqueles do grupo SUS. No grupo RES 63% dos pacientes possui idade superior a 30 anos, enquanto no SUS 52% possui idade inferior a 15 anos.

TABELA II

Estatística descritiva da variável idade para os grupos SUS e RES

GRUPO	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MIN	MAX
SUS	21	16.47	9.80	3	33
RES	21	39.19	17.20	16	77

A Tabela III mostra a distribuição da frequência dos sexos nos dois grupos. Há uma distribuição homogênea dos sexos no grupo RES e uma predominância do sexo masculino no grupo SUS.

TABELA III

Frequência da distribuição dos sexos pelos grupos SUS e RES

GRUPO	MASCULINO		FEMININO		TOTAL
	N	%	N	%	N
SUS	13	61.9	8	38.1	21
RES	11	52.38	10	47.62	21

A Tabela IV mostra a carga parasitária dos grupos SUS e RES antes do tratamento. Observa-se que os indivíduos SUS apresentam uma carga parasitária maior que os indivíduos RES.

TABELA IV

Carga parasitária média dos grupos SUS e RES antes do tratamento

GRUPO	INTENSIDADE DE INFECCÃO	DESVIO PADRÃO
SUS	78.10	5.16
RES	47.75	4.75

4.0 MOTIVO E FREQUÊNCIA DO CONTATO COM ÁGUAS NATURAIS

As observações foram feitas, antes do tratamento, com 141 membros da comunidade isto é 87,0% dos que haviam se submetido a coproscopia. Entre os entrevistados 94% (131 pessoas) relataram ter contato com águas naturais na localidade ; 80% destes contatos eram diários e 60% referiam-se a atividades obrigatórias (lavar roupas, buscar água e / ou lavar vasilhas e tomar banho). Tomar banho (36,2%), buscar água e / ou lavar vasilhas (34,3%), lavar roupa (33,8%) e lazer (29,1%) constituíram, nesta ordem, os motivos mais frequentes de contato com águas naturais pela população entrevistada.

Os pacientes que relatavam contato pouco intenso com águas naturais, ou seja grau de contato com água inferior a 100, apresentavam menores contagem de ovos de S. mansoni nas fezes e aqueles que relatavam contatos intensos com águas infectadas, apresentavam um maior número de ovos nas fezes. Com relação a crianças até 9 anos, não houve correspondência entre o grau de contato e a carga parasitária. (Figura 9).

Observa-se na Figura 10 que os indivíduos da faixa etária de 0-14 apresentaram um grau contato médio com águas infectadas inferior ao das outras faixas.

Quando comparamos o grau de contato com águas naturais entre os grupos de pacientes SUS e RES não encontramos nenhuma diferença significativa (Figura 11).

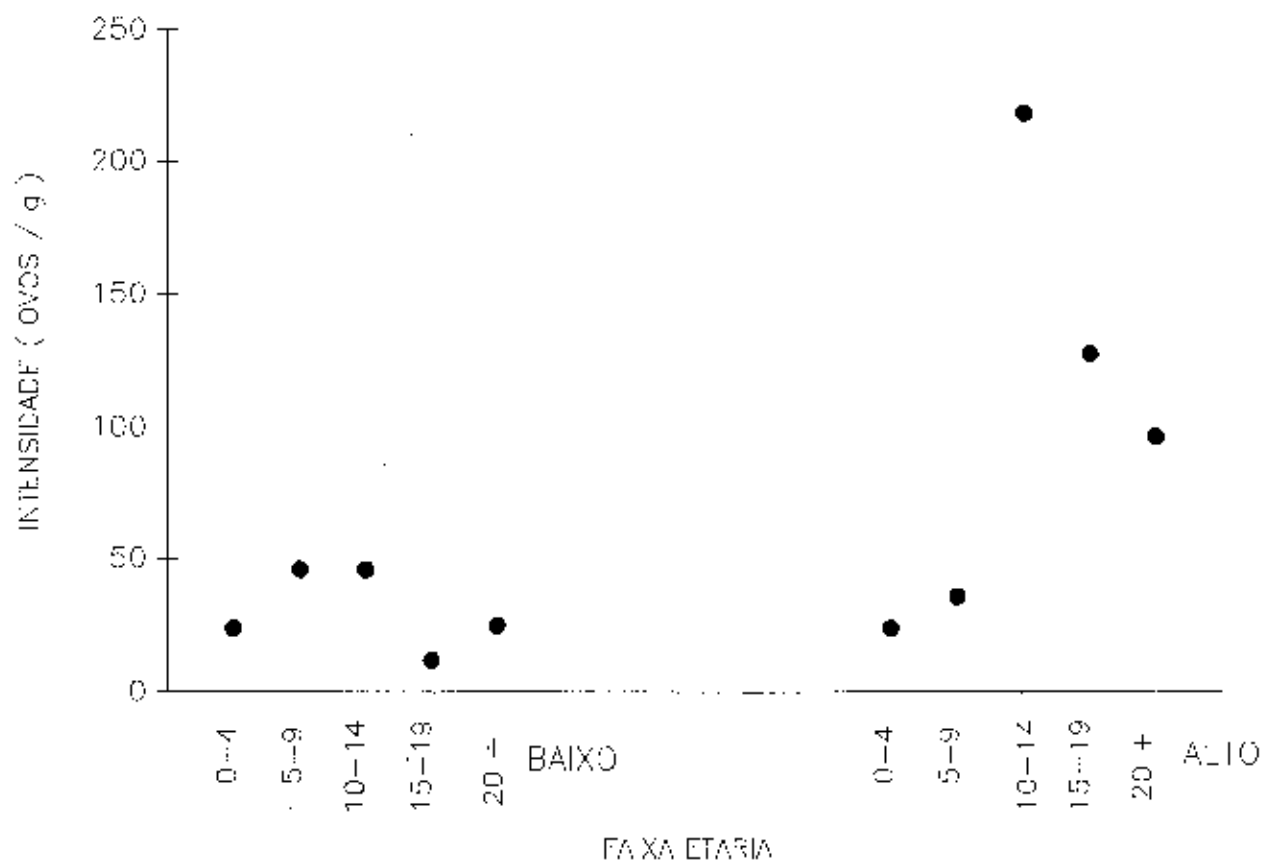


Figura 9. Relação entre o grau de exposição e intensidade de infecção em diferentes faixas etárias antes do tratamento

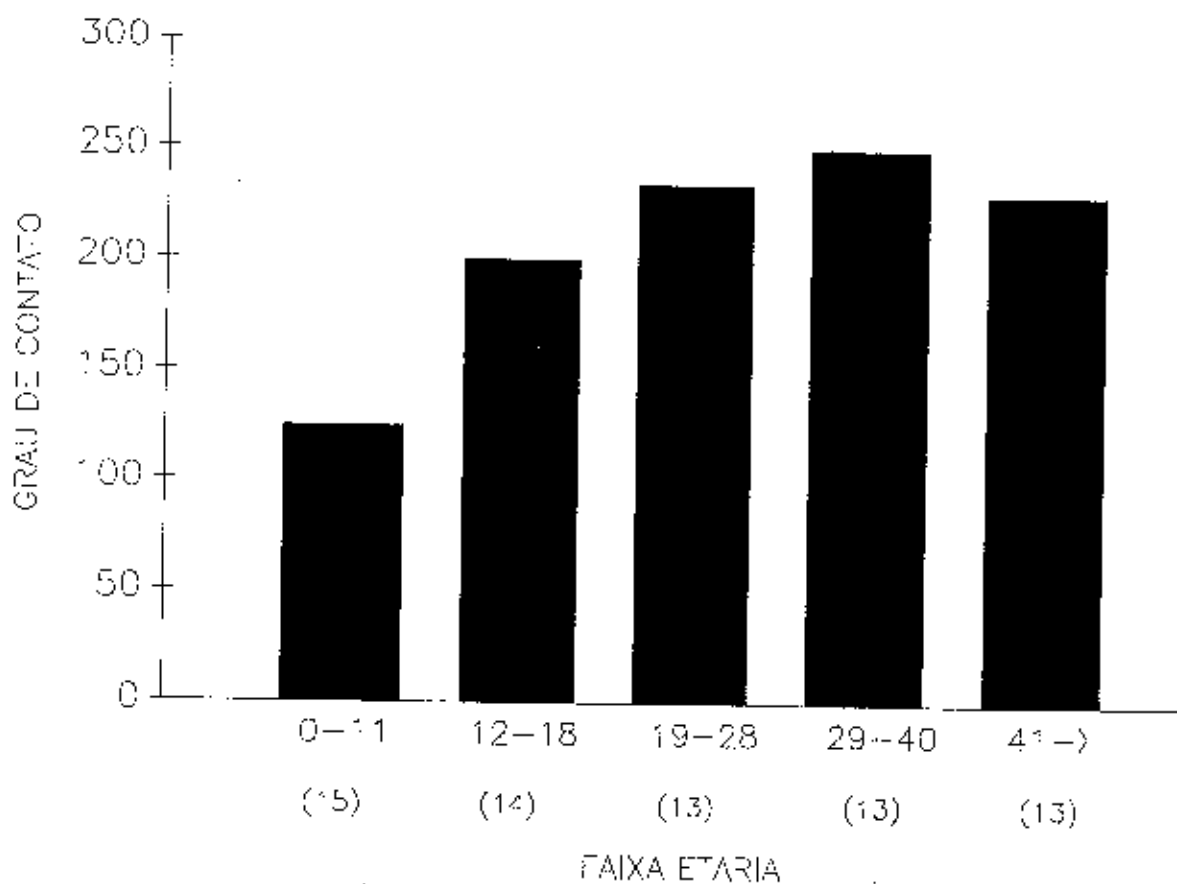


Figura 10. Média do grau de contato com águas naturais em diferentes faixas etárias da população, antes do tratamento
Em parênteses o número de indivíduos

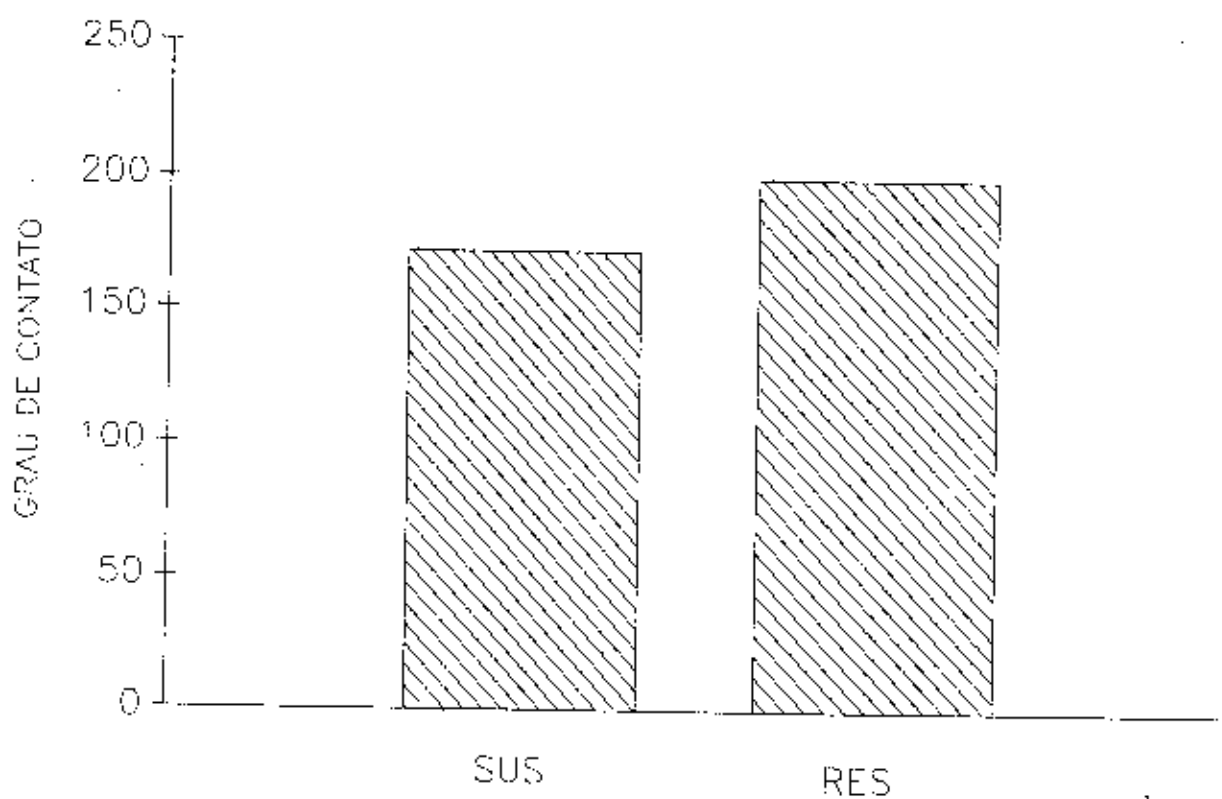


Figura 11. Grau de contato médio com águas naturais dos pacientes dos grupos SUS e RES

5.0 RESPOSTA DE PROLIFERAÇÃO DE PBMC DE PACIENTES SUSCETÍVEIS E RESISTENTES ESTIMULADOS IN VITRO COM ANTÍGENOS E MITÓGENO

Os perfis de resposta de proliferação de PBMC aos antígenos SEA, SWAP e CERC dos pacientes SUS e RES estão representados na Figura 12. Com relação ao SEA não foi observada nenhuma diferença significativa entre os dois grupos durante o estudo. Antes do tratamento os grupos apresentam uma resposta baixa a este antígeno (em torno de 2000 cpm), se comparadas aos outros antígenos SWAP e CERC. Esta baixa resposta ao SEA foi mantida durante os 9 meses após o tratamento, porém a partir do tempo TX03 observou-se um aumento na reatividade celular a estes antígeno nos dois grupos.

Com relação a resposta ao SWAP durante o estudo, o grupo SUS apresentou somente uma pequena variação da resposta, com uma leve queda nos tempos TX01 e TX02, que foram comuns aos outros dois antígenos, posteriormente, no tempo TX03 a resposta deste indivíduos voltou ao seu nível inicial. O grupo do RES apresentou inicialmente uma resposta de proliferação celular inferior ao grupo SUS, porém esta situação se inverteu no último tempo (TX03), onde o grupo RES apresentou maior reatividade. Entretanto, a análise estatística comparando a resposta destes dois grupos, mostrou uma diferença significativa somente no tempo TX00.

Com relação ao antígeno CERC observou-se que o grupo RES apresentou, em média, uma reatividade celular menor que o grupo

SUS. Observou-se, ainda, que os indivíduos RES apresentaram um aumento progressivo da resposta celular durante o estudo, enquanto os pacientes SUS apresentaram uma pequena variação, com uma queda nos tempos TX01 e TX02 que foram comuns aos outros dois antígenos. Nos resultados da análise estatística para esta variável, observou-se que houve uma diferença significativa somente no tempo TX00, onde o grupo SUS apresentou uma resposta mais elevada.

A análise estatística destas variáveis está representados na Tabela V. (Ver no anexo 2)

Os perfis da resposta de proliferação celular de pacientes SUS E RES estimulados com mitógeno PHA estão representados na Figura 13. Não há diferença significativa entre os 2 grupos durante o estudo. Observa-se ainda um ligeiro decréscimo da resposta celular para ambos grupos, nos tempos TX01 e TX02, com recuperação do nível inicial no tempo TX03. Embora o perfil de resposta observada com o mitógeno durante o estudo apresentasse certa semelhança com o perfil obtido com os antígenos os resultados da Tabela VI (Ver anexo 2) mostram apenas uma fraca correlação com SEA no tempo TX02 e com o SWAP nos tempos TX02 e TX03.

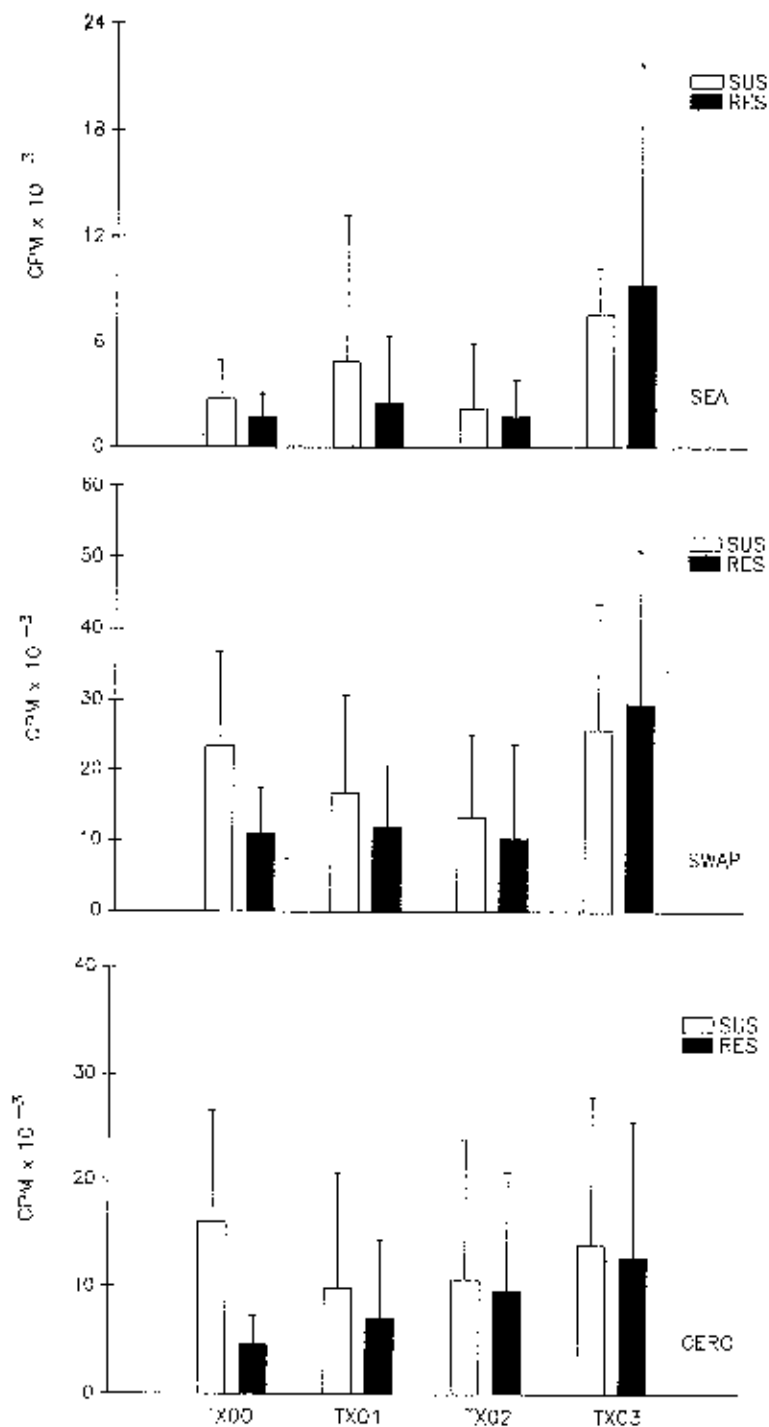


Figura 12. Média da resposta de proliferação de PBMC dos pacientes dos grupo SUS e RES estimuladas com os antígenos SEA, SWAP e CERC nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento, 2, 9 e 21 meses após tratamento, respectivamente). A reatividade aos antígenos de SWAP e CERC foi, significativamente diferente entre os dois grupos no tempo TX00 [(P<0.003) e (P<0.01) respectivamente].

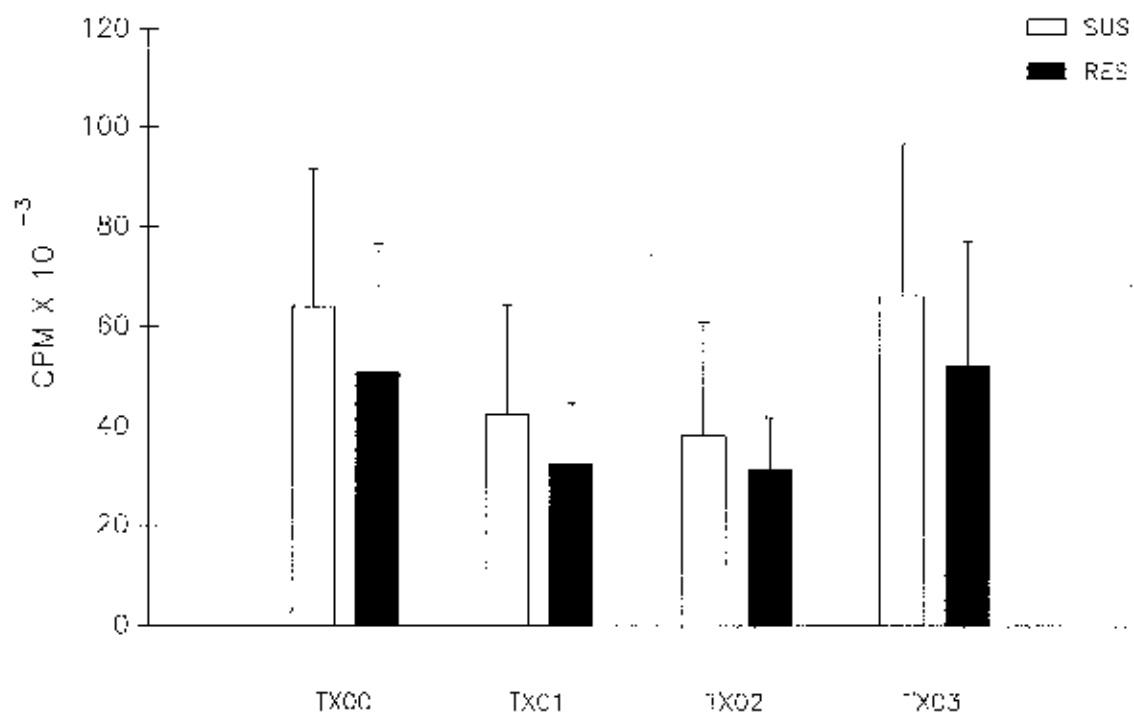


Figura 13. Média da resposta de proliferação de PBMC dos grupos SUS e RES estimuladas com o mitógeno PHA nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento 2, 9 e 21 meses após o tratamento, respectivamente)

6.0 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS DOS
ISOTIPOS IgA, IgM, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 E IgG4 EM "POOL"
DE SOROS DOS PACIENTES SUS E RES

Com o objetivo de determinar a diluição ideal dos soros individuais para comparação da concentração relativa dos diferentes isotipos, preparamos, inicialmente, diluições sucessivas de um "pool" proveniente de todos os pacientes dos grupos SUS e RES, para o ensaio de ELISA contra os antígenos de SEA, SWAP e CERC. Este critério foi adotado devido a limitações técnicas para titulação simultânea de um grande número de amostras.

Baseado nas curvas de absorvância encontradas para os diferentes isotipos (Figura 14). Escolhemos a diluição 1:100 para os isotipos IgA, IgE, IgG2 e IgG3, e 1:640 para IgM, IgG1 e IgG4.

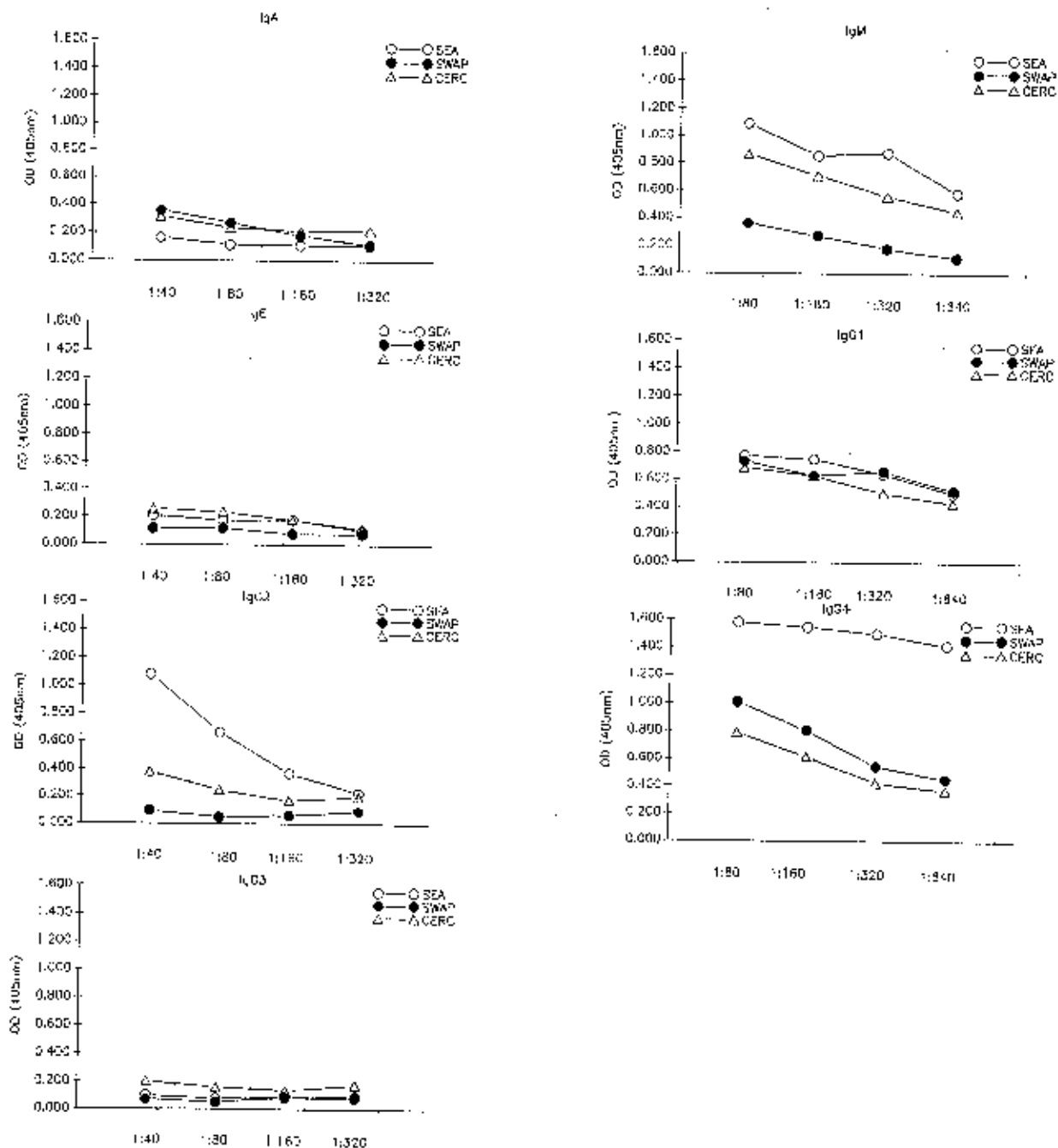


Figura 14. Titulação do " pool " de soros de pacientes SUS e RES dos diferentes isotipos dos anticorpos contra SEA, SWAP e CERC, pela técnica de ELISA.

7.0 COMPARAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS DOS GRUPOS CONTROLE, SUS E RES

As Tabelas VII, VIII e IX mostram os resultados dos isotipos de indivíduos normais (C), não residentes em área endêmica para S.mansoni e pacientes SUS e RES expressos em unidades.

Com exceção de IgE anti-SEA há um aumento generalizado dos demais isotipos dos grupos RES e SUS com relação ao controle.

Os resultados dos níveis dos isotipos específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC dos soros dos pacientes SUS e RES são apresentados separadamente nas Figuras de 15 a 22.

TABELA VII

Diferentes isotipos anti-SEA dos grupos SUS, RES e Controle antes do tratamento

	SUS	RES	Controle
ISOTIPOS	UNIDADES		
IgA	29,8 ± 20,5	22,5 ± 9,5	14,7 ± 8,2
IgM	364,8 ± 217,0	346,8 ± 221,0	81,2 ± 41,0
IgE	15,2 ± 5,1	15,1 ± 9,2	15,6 ± 6,3
IgG1	331,5 ± 124,0	305,2 ± 104,0	58,2 ± 22,4
IgG2	30,3 ± 32,5	28,4 ± 24,9	2,9 ± 0,8
IgG3	13,7 ± 8,3	20,4 ± 11,1	10,4 ± 4,5
IgG4	656,0 ± 230,0	657,9 ± 249,0	87,0 ± 31,2

Unidades correspondem ao valor da densidade ótica x 1/diluição

TABELA VIII

Diferentes isotipos anti-SWAP dos grupos SUS, RES e Controle antes do tratamento

	SUS	RES	CONTROLE
ISOTIPO	UNIDADES		
IgA	4,9 ± 4,1	3,6 ± 3,7	2,3 ± 1,1
IgM	40,9 ± 56,0	135,6 ± 89,0	30,0 ± 18,0
IgE	11,5 ± 5,3	14,0 ± 9,4	6,8 ± 2,1
IgG1	242,5 ± 150,0	159,3 ± 88,0	58,2 ± 28,7
IgG2	3,3 ± 2,8	6,5 ± 3,9	1,8 ± 0,5
IgG3	10,6 ± 5,0	11,4 ± 7,3	3,5 ± 1,1
IgG4	167,0 ± 159,0	112,8 ± 128,0	65,2 ± 28,4

Unidades correspondem ao valor da densidade ótica x 1/diluição

TABELA IX

Diferentes isotipos anti-CERC dos grupos SUS, RES e Controle antes do tratamento

	SUS	RES	CONTROLE
ISOTIPOS	UNIDADES		
IgA	41,4 ± 20,8	36,0 ± 14,6	5,4 ± 2,3
IgM	290,5 ± 134,0	316,0 ± 202,0	32,6 ± 17,8
IgE	59,0 ± 5,7	50,0 ± 17,0	6,6 ± 2,4
IgG1	395,5 ± 78,0	320,6 ± 70,4	71,6 ± 30,4
IgG2	52,6 ± 22,4	47,0 ± 12,6	1,6 ± 0,8
IgG3	37,6 ± 7,2	45,3 ± 8,3	9,4 ± 4,5
IgG4	241,9 ± 87,0	262,4 ± 108,8	109,4 ± 50,2

Unidades correspondem ao valor da densidade ótica x 1 / diluição

8.0 ISOTIPO IgA

A Figura 15 mostra os resultados da comparação de IgA específica para antígenos do *S. mansoni* no soro de pacientes SUS e RES. Para os antígenos SEA e SWAP nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de anticorpos IgA entre os grupos de pacientes. Entretanto os níveis de IgA anti-cerc do grupo RES, foi significativamente menor do que no grupo SUS, no tempo TX02.

Os resultados da análise estatística estão na Tabela X.
(Ver anexo 2)

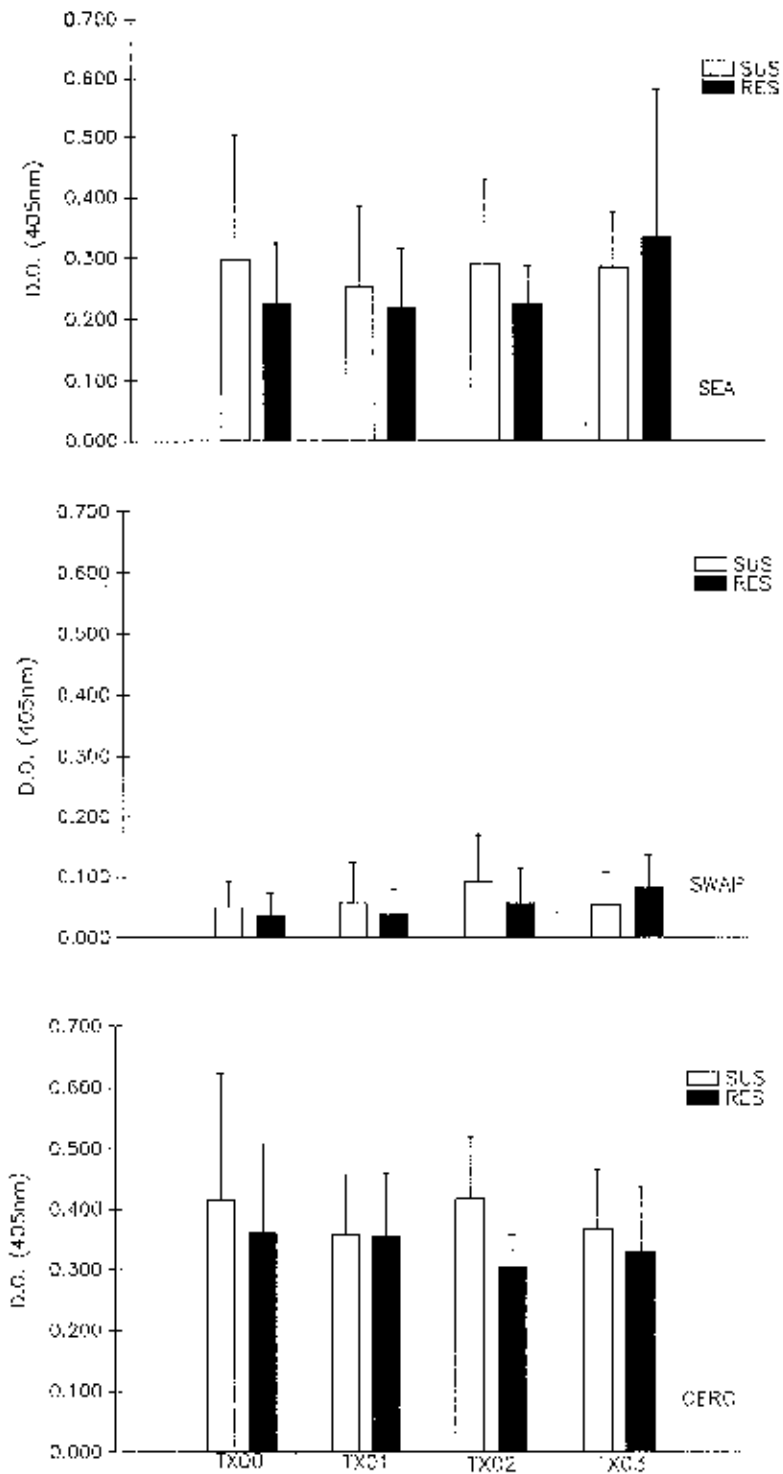


Figura 15. Média dos níveis de IgA específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC no soro dos pacientes dos grupos SUS e RES nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento e 2, 9 e 21 meses após o tratamento). Os grupos diferem no tempo TX02 para CERC ($P < 0.003$)

9.0 ISOTIPO IgM

Na Figura 16 estão sumarizados os resultados dos níveis de anticorpos IgM no soro de pacientes SUS e RES para antígenos do S. mansoni. Os anticorpos IgM anti-SEA dos grupos SUS e RES diferem estatisticamente somente no tempo TX02. Com relação ao SWAP os pacientes do grupo RES apresentaram níveis significativamente mais elevados de anticorpos durante todo estudo. Os anticorpos IgM anti-CERC dos dois grupos diferiram significativamente apenas no tempo TX03, embora o grupo RES apresentasse uma resposta maior durante todo estudo.

Os resultados da análise estatística estão na Tabela XI.

(Ver anexo 2)

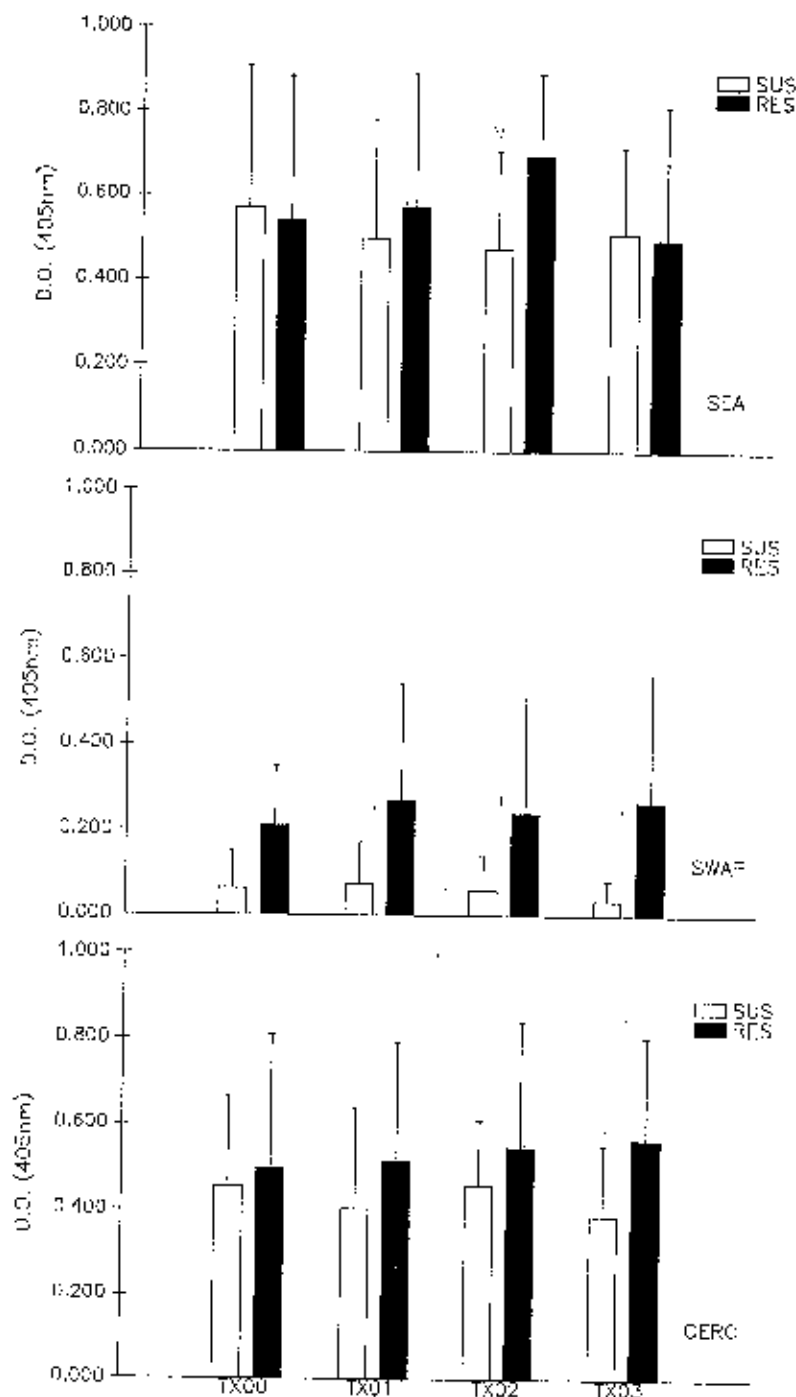


Figura 16. Média dos níveis de IgM específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC no soro dos pacientes dos grupos SUS e RES nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento e 2, 9 e 21 meses após o tratamento). Os grupos diferem no tempo TX02 para SEA ($P < 0.022$), em todos os tempos para SWAP [$(P < 0.002)$, $(P < 0.010)$, $(P < 0.032)$ e $(P < 0.002)$] e no tempo TX03 para CERC ($P < 0.013$)

10.0 ISOTIPO IgE

A Figura 17 mostra a comparação dos valores médios dos níveis de anticorpos IgE contra os antígenos do S.mansoni. Observou-se níveis elevados de anticorpos anti-CERC quando comparados com os outros antígenos. Com relação aos anticorpos anti-CERC observar-se uma inversão dos níveis de respostas entre os grupos SUS e RES nos tempos TX00 e TX02. Esta inversão foi devido a um aumento do nível de anticorpos no grupo RES, após o tratamento, enquanto que o nível de anticorpos do grupo SUS permaneceu estável. A análise estatística mostrou que as diferenças nos tempos TX00 e TX02 foram significativas. Os níveis de anticorpos IgE anti-SEA e anti-SWAP dos grupos SUS e RES diferiram significativamente somente no tempo TX03. O grupo SUS apresentou uma resposta maior anti-SEA e menor anti-SWAP do que o grupo RES.

os resultados da análise estatística estão na Tabela XII.
(Ver anexo 2)

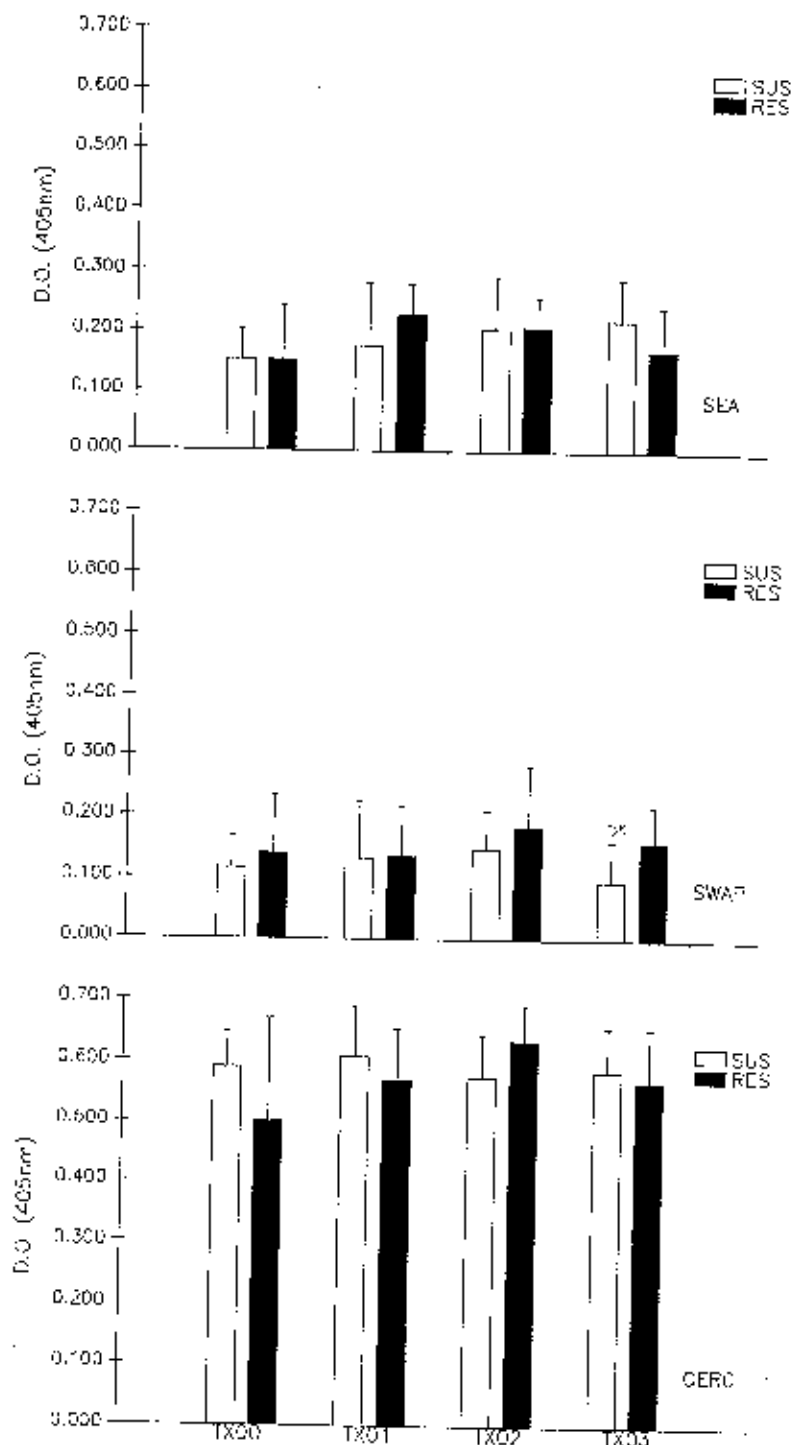


Figura 17. Média dos níveis de IgE específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC no soro dos pacientes dos grupos SUS e RES nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento e 2, 9 e 21 meses após o tratamento). Os grupos diferem no tempo TX03 para os antígenos SEA e SWAP ($P < 0.03$) e ($P < 0.005$) respectivamente e nos tempos TX00 e TX02 para CERC ($P < 0.02$) e ($P < 0.03$)

11.0 ISOTIPO IgG1

A Figura 18 mostra o nível de anticorpos IgG1 contra antígenos do S.mansoni. Nenhuma diferença foi observada no nível de anticorpos IgG1 anti-SEA entre os pacientes SUS e RES. O grupo RES apresentou em média uma resposta anti-SWAP e anti-CERC menor que pacientes do grupo SUS. A análise estatística dos resultados mostrou que estas diferenças foram significativas em todos os tempos para anticorpos anti-CERC e somente nos tempos TX00 e TX01 para os anticorpos anti-SWAP.

Os resultados da análise estatística estão na Tabela XIII.
(Ver anexo 2)

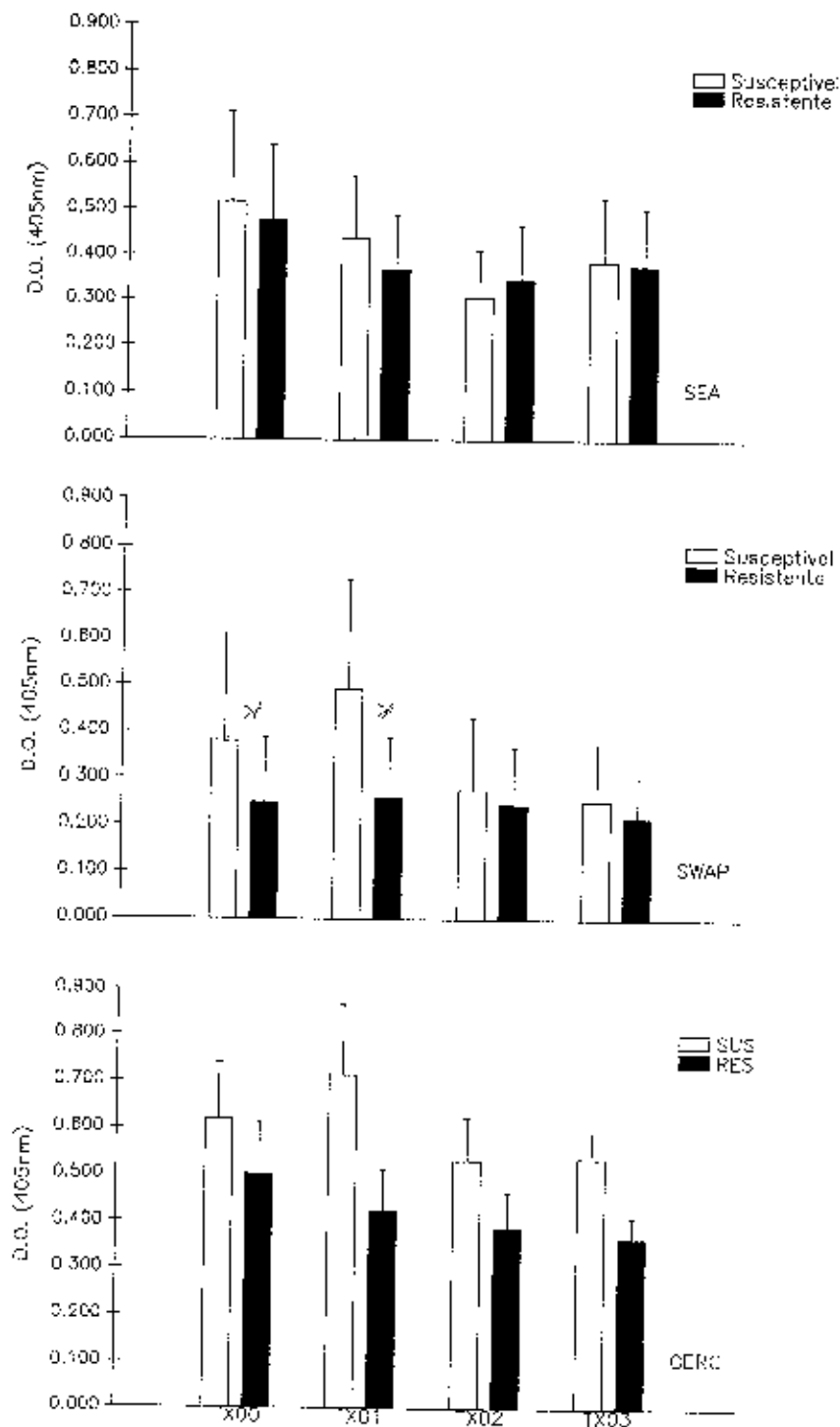


Figura 18. Média dos níveis de IgG1 específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC no soro dos pacientes dos grupos SUS e RES nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento e 2, 9 e 21 meses após o tratamento). Os grupo diferem nos tempos TX00 e TX01 para SWAP ($P < 0.03$) e ($P < 0.001$) respectivamente e para CERC em todos os tempos [($P < 0.002$) ($P < 0.0001$) ($P < 0.0004$) e ($P < 0.0001$) respectivamente]

12.0 ISOTIPO IgG2

Os resultados sumarizados na Figura 19 mostram uma comparação dos anticorpos IgG2 específicos para antígenos do S. mansoni entre os grupos SUS e RES. Observamos que, pequenas diferenças ocorreram entre os grupos, para os anticorpos anti-SEA e anti-CERC. A análise estatística mostrou que nenhuma destas diferenças foi significativa. O grupo RES apresentou níveis de anticorpos anti-SWAP maiores que o grupo SUS nos tempos TX00, TX01 e TX02, já no tempo TX03 ocorreu uma diminuição destes níveis. Estas diferenças foram significativas em todos os tempos. O baixo título de anticorpos anti-SWAP encontrado aumenta a possibilidade de erro no ensaio e por isso estes resultados devem ser analisados com cautela.

O resultado da análise estatística estão na Tabela XIV.
(ver anexo 2)

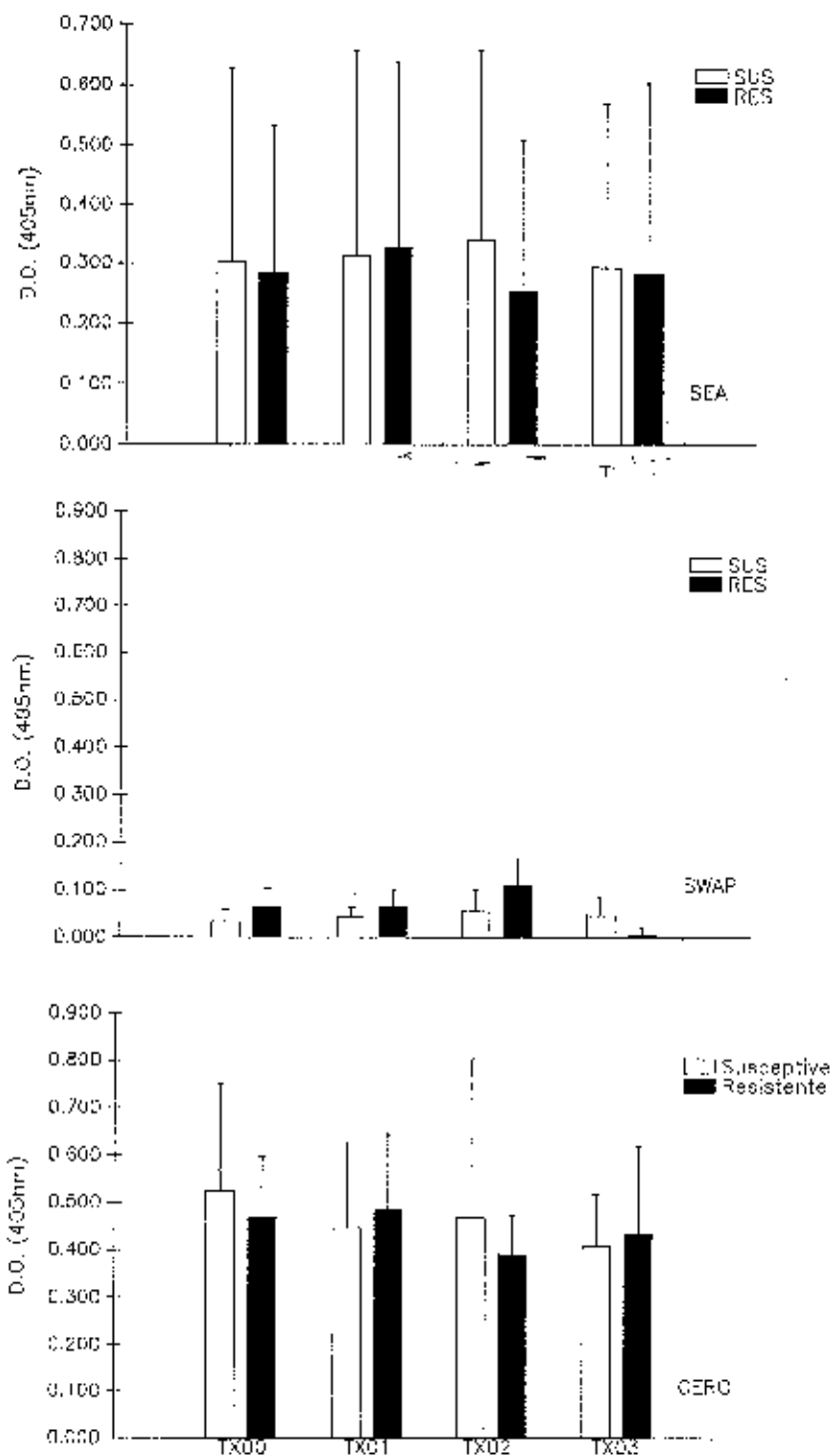


Figura 19. Média dos níveis de IgG2 específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC no soro dos pacientes dos grupos SUS e RES nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento e 2, 9 e 21 meses após o tratamento). Os grupos diferem em todos os tempos para SWAP [$P < 0.004$], [$P < 0.04$], [$P < 0.02$] e [$P < 0.0001$], respectivamente]

13.0 ISOTIPO IgG3

Na Figura 20 estão sumarizados os valores médios dos níveis de anticorpos IgG3 do soro de pacientes SUS e RES. Observou-se, com relação aos anticorpos anti-SEA, que somente antes do tratamento houve uma diferença significativa entre os grupos, sendo que pacientes RES apresentavam um nível mais elevado de anticorpos que o grupo SUS. Nenhuma diferença significativa foi observada com relação aos anticorpos anti-SWAP entre os grupos. Pacientes RES apresentaram, em média, níveis mais elevados de anticorpos IgG3 anti-CERC, do que pacientes SUS. A análise estatística mostrou que estas diferenças foram significativas em todos os tempos, exceto no tempo TX03.

Os resultados da análise estatística estão na Tabela XV.

(Ver anexo 2)

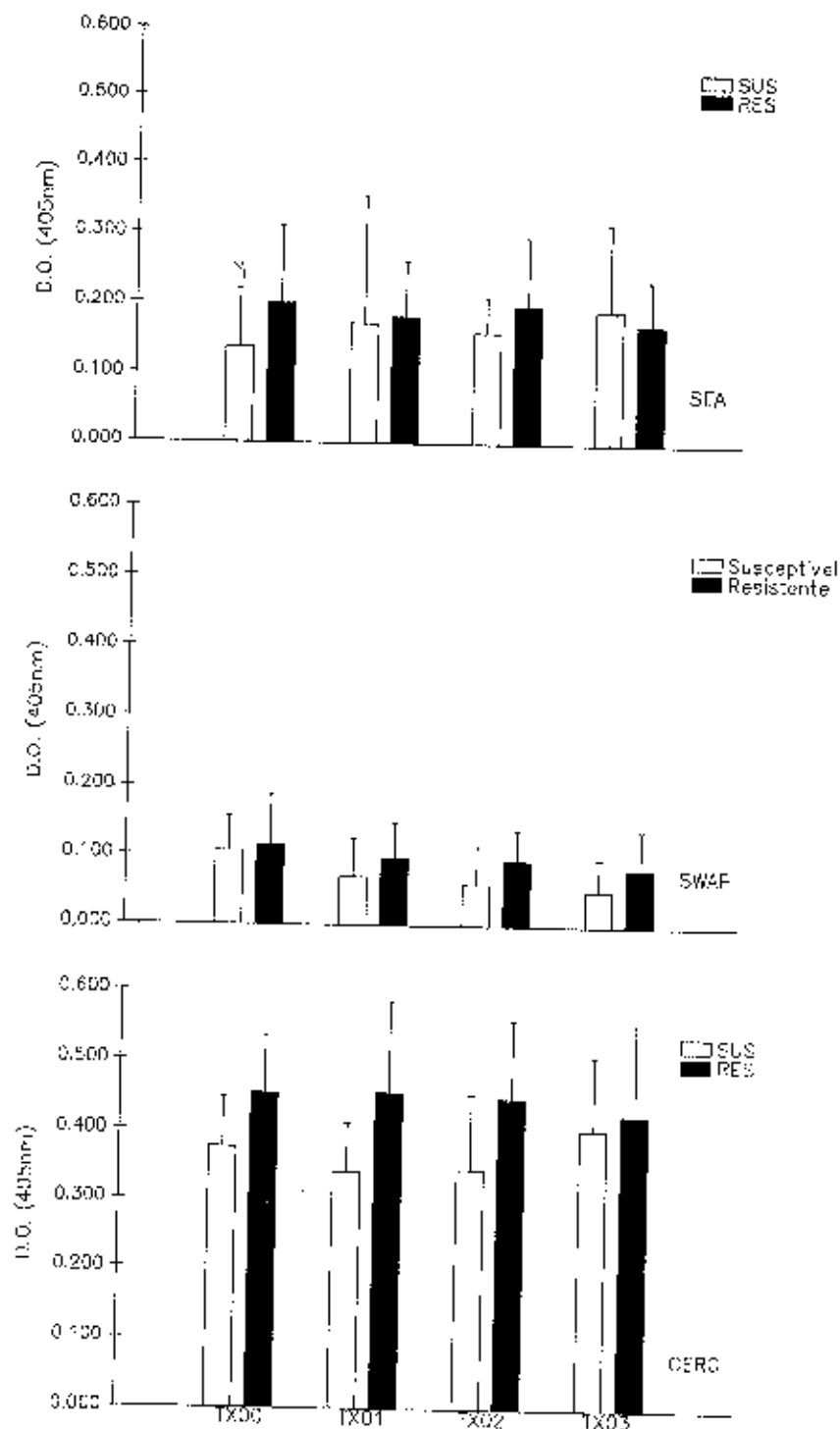


Figura 20. Média dos níveis de IgG3 específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC no soro dos pacientes dos grupos SUS e RES nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento e 2, 9 e 21 meses após o tratamento). Os grupos diferem no tempo TX00 para SEA ($P < 0.04$) e nos tempos TX00, TX01 e TX02 para CERC ($P < 0.002$), ($P < 0.004$) e ($P < 0.03$) respectivamente

14.0 ISOTIPO IgG4

Observa-se na Figura 21, que o nível de IgG4 anti-SEA dos soro de pacientes RES apresentou uma queda gradual mais acentuada logo após o tratamento que o soro dos pacientes SUS. A única diferença significativa entre os grupos foi no tempo TX03. Os níveis de anticorpos IgG4 anti-SWAP dos dois grupos diferiram significativamente, no tempo TX01, sendo que SUS apresentou uma resposta superior.

No tempo TX02 os níveis de anticorpos IgG4 anti-CERC do grupo RES foram significativamente maiores do que o grupo SUS.

Os resultados da análise estatística estão na Tabela XVI.
(Ver anexo 2)

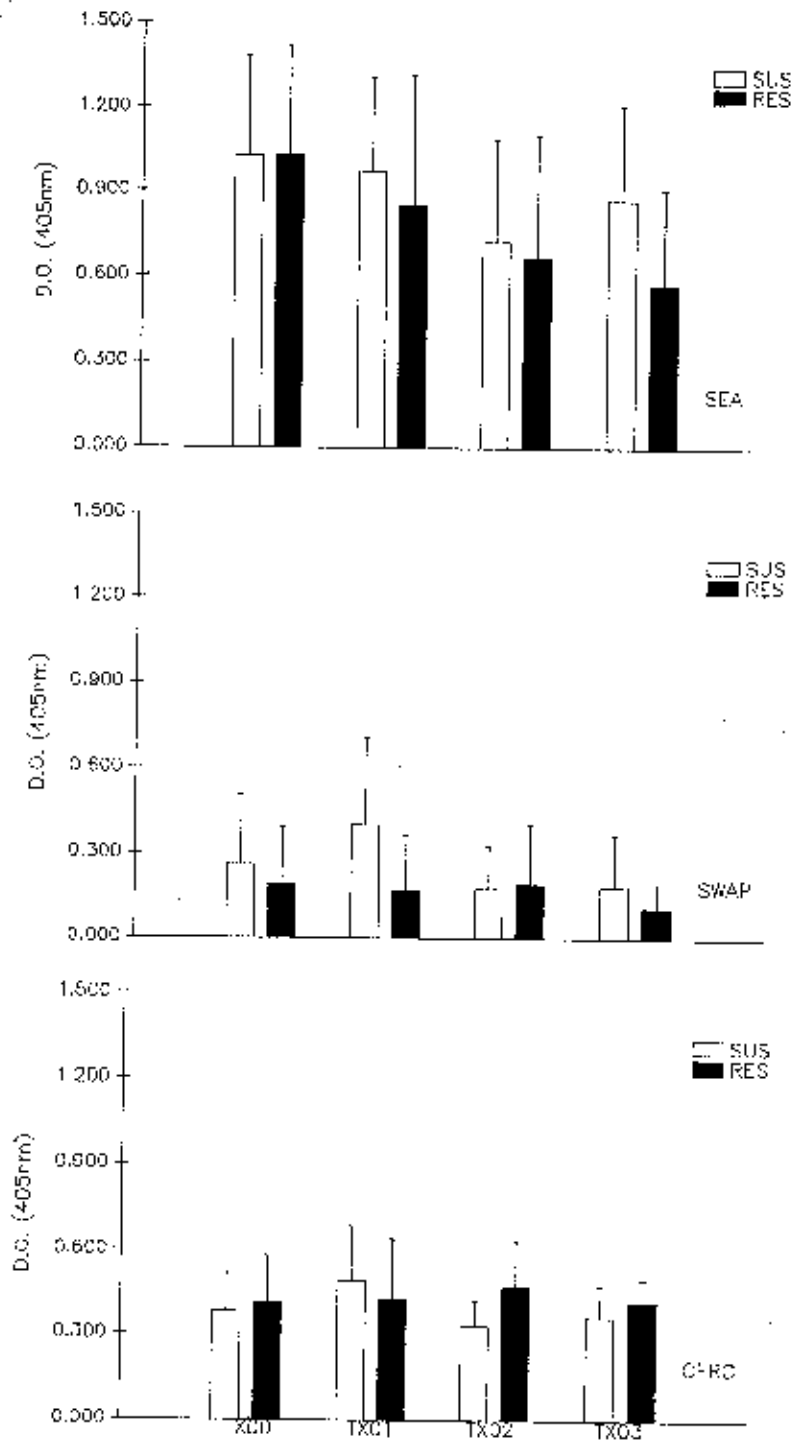


Figura 21. Média dos níveis de IgG4 específicos para os antígenos SEA, SWAP e CERC no soro dos pacientes dos grupos SUS e RES nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento e 2, 9 e 21 meses após o tratamento). Os grupos diferem no tempo TX03 para SEA ($P < 0.01$), no tempo TX01 para SWAP ($P < 0.01$) e no tempo TX02 para CERC ($P < 0.01$)

15.0 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS IgG4 E IgE
ANTI-TEGUMENTO DE ESQUISTOSSÔMULO

Com o objetivo de avaliar com maior precisão a relação IgG4 e IgE na susceptibilidade e/ou resistência à reinfeção, avaliou-se o nível destes anticorpos contra o tegumento de esquistossômulo provável alvo da resposta imune. Além disso várias observações sugerem a participação de IgE anti-tegumento na imunidade protetora em pacientes. (Rihet et al.,1991).

A Figura 22a mostra que houve um aumento do nível de IgE após o tratamento no grupo RES, enquanto no grupo SUS nenhuma mudança foi observada. Comparando estes dois grupos a análise estatística mostra que a diferença foi significativa a partir do tempo TX02, ou seja, antes da reinfeção dos indivíduos do grupo SUS. Por outro lado a Figura 22b mostra que houve um decréscimo no nível de IgG4 dos pacientes RES, com diferença significativa somente no tempo TX03. Nos pacientes SUS esta resposta permaneceu inalterada durante o estudo.

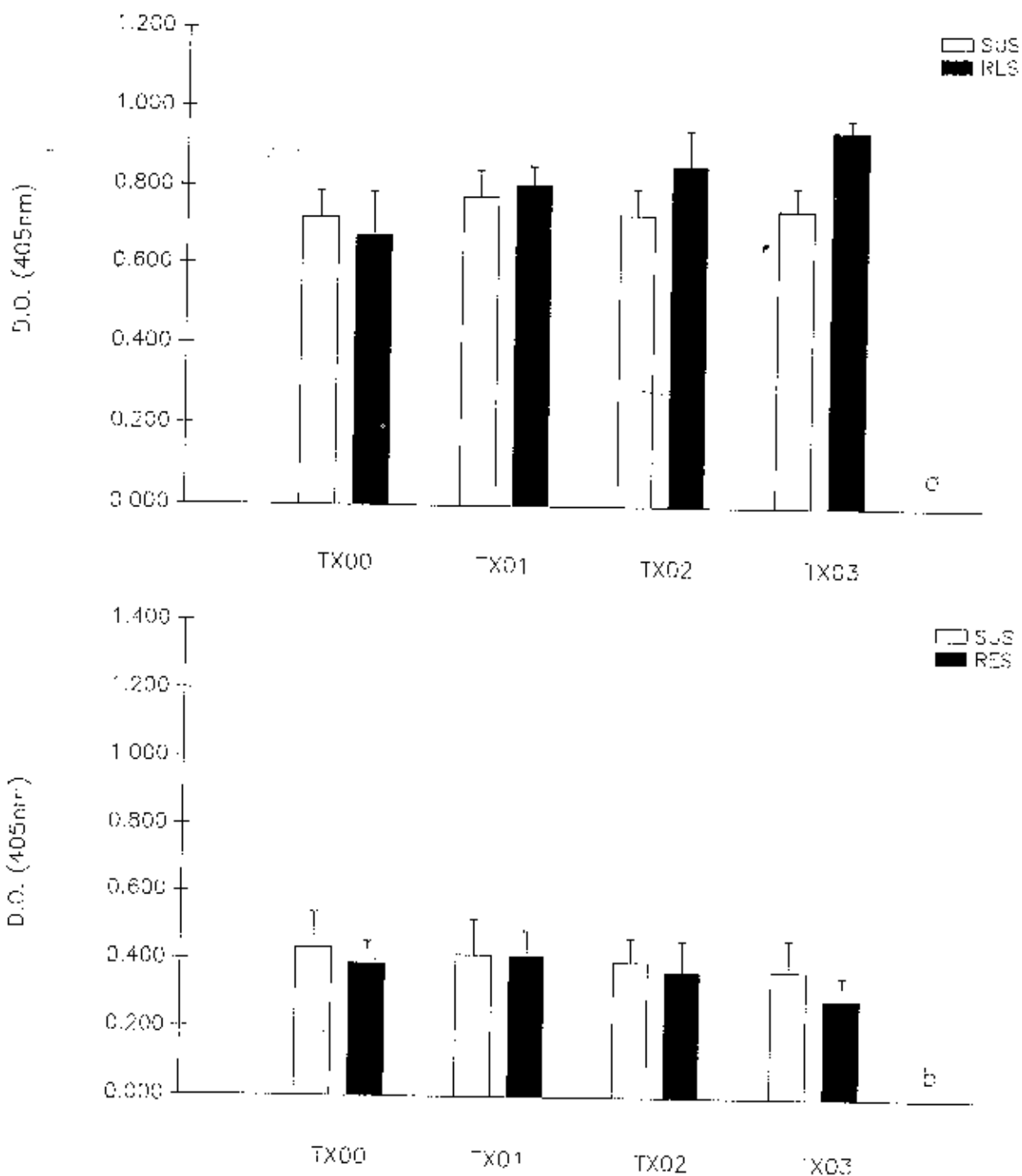


Figura 22. Média dos níveis de IgE (a) e IgG4 (b) específicos para o antígeno STEG no soro dos grupos SUS e RES nos tempos TX00, TX01, TX02 e TX03 (antes do tratamento e 2, 9 e 21 meses após o tratamento). Os grupos diferem nos tempo TX02 e TX03 para os anticorpos IgE ($P < 0.001$) e no tempo TX03 para os anticorpos IgG4 ($P < 0.05$)

16.0 CORRELAÇÃO ENTRE ANTICORPOS ANTI-SEA E ANTI-TEGUMENTO DO SORO DE PACIENTES SUS E RES

Os anticorpos produzidos contra antígenos do ovo, especialmente os anti-carboidratos, apresentam reação cruzada com glicoproteínas ou polissacarídeos da superfície do esquistossômulo. Alguns deste anticorpos são considerados efetores, enquanto outros são considerados bloqueadores (Butterworth et al., 1989) Baseado nestas observações, investigamos a possível correlação destes anticorpos no grupo de SUS e RES.

A Tabela XVII mostra a correlação dos anticorpos IgM, IgG4, IgG1 e IgG2 anti-SEA versus IgE anti-tegumento, e IgG4 anti-tegumento versus IgE anti-tegumento. Em pacientes RES, antes do tratamento, IgG1 e IgG2 anti-SEA apresentaram uma correlações inversa com IgE de tegumento. Após o tratamento, estas correlações não foram significativas. Os resultados mostram, também, que houve uma correlação positiva entre os anticorpos IgE e IgG4 anti-tegumento em paciente SUS, antes do tratamento. Observou-se ainda, que antes da reinfeção (TX02), houve uma correlação inversa entre IgE e IgG4 anti-tegumento de paciente RES, embora não significativa.

TABELA XVII

Correlação entre isotipos anti-SEA e IgE anti-STEG

	TX00		TX02		TX03	
	SUS	RES	SUS	RES	SUS	RES
SEA						
IgM	.056	.112	.121	.316	.037	.277
IgG1	.099	-.524*	.183	.112	.007	.341
IgG2	.060	-.530*	.341	.374	.081	.410
IgG4	.052	.181	.499	.419	.251	.205
STEG						
IgG4	.563*	.295	.208	-.518	.169	.165

* P<0.01

17.0 CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA PARASITÁRIA E O NÍVEL DE ANTICORPOS
IgG4, IgM E IgG2 ANTI-SEA

A Tabela XVIII mostra correlação entre os anticorpos IgG4, IgM e IgG2 anti-SEA e a intensidade de infecção, antes do tratamento, nos grupos SUS E RES. Houve uma correlação positiva entre IgG4 anti-SEA e a intensidade de infecção, e uma correlação inversa, embora não significativa, entre IgG2 e a intensidade de infecção em pacientes SUS. Com relação aos pacientes RES não se observa qualquer correlação.

TABELA XVIII

Correlação entre carga parasitária e os isotipos IgM, IgG2, IgG4 anti-SEA e IgE anti-STEG

INTENSIDADE DE INFECÇÃO	SUS	RES
IgM SEA	.157	.096
IgG2 SEA	-.505	.026
IgG4 SEA	.614 *	.001
IgE STEG	.093	.088
IgG4 STEG	.023	.026

* $P < 0.01$

DISCUSSÃO

O *Schistosoma* produz uma infecção crônica no hospedeiro, onde os vermes adultos vivem durante anos nas veias mesentéricas e aparentemente não sofrem ataque do sistema imune do hospedeiro (Warren et al., 1974; Smithers & Terry 1967). Os ovos do parasita, depositados nos tecidos, secretam substâncias solúveis altamente antigênicas que induzem no hospedeiro vertebrado resposta imune de hipersensibilidade tardia, produzindo inflamação crônica em volta dos ovos.

Vários estudos indicam que o homem adquire gradualmente com a idade e/ou a duração da infecção resistência contra o parasita (Klotezel & Da Silva et al., 1967; Wilkins et al., 1984; Katz et al., 1978; Hagan et al., 1985; Butterworth et al., 1984). Embora vários mecanismos imunes tenham sido demonstrados experimentalmente pouco se conhece sobre os efetores envolvidos na imunidade adquirida em pacientes.

Baseado no exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar o perfil imunológico de indivíduos residentes em área endêmica, na expectativa de se identificar elementos e eventos imunológicos compatíveis com a resistência e/ou susceptibilidade a infecção pelo *S. mansoni*. O procedimento adotado neste estudo foi identificar retrospectivamente em uma área endêmica dois grupos distintos de indivíduos - um grupo susceptível, que se reinfectou após o tratamento, e um grupo resistente, que não se reinfectou até 22 meses após o tratamento, tempo de duração do estudo. Em seguida, comparamos a resposta imune destes dois grupos através de ensaios de proliferação celular e de determinação de

anticorpos específicos.

Apesar de não ter havido um controle objetivo do contato dos indivíduos com focos de infecção após o tratamento, acreditamos que a ausência de reinfecção dos indivíduos resistentes, não foi devido diminuição da exposição, uma vez que antes do tratamento estes indivíduos apresentavam grau de contato semelhante aos susceptíveis (Figura 11). Após o tratamento, não observamos nenhuma diferença nos hábitos da população que justificasse a diminuição do grau de exposição nos indivíduos resistentes. Outros aspectos, também, reforçam esta nossa suposição : o primeiro é a marcante diferença de idade encontrada entre os grupos (38,2 no grupo RES versus 16,5 no grupo SUS, Tabela II). Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores demonstrando que indivíduos mais velhos residentes em áreas endêmicas desenvolvem resistência parcial adquirida à reinfecção (Wilkins et al.,1884a; Katz et al.,1978; Hagan et al.,1985; Butterworth et al.,1984). O segundo aspecto é diferença na carga parasitária consideravelmente menor no grupo de indivíduos classificados como resistentes (Tabela IV).

A reatividade celular de PBMC de pacientes infectados na presença de antígenos do parasita, têm sido amplamente estudada por vários pesquisadores(Ottesen et al.,1985; Gazzinelli et al.,1985; Colley et al., 1977; Ellner et al., 1981; Doughty et al., 1989 ; Colley et al., 1987). Durante o curso da doença vários mecanismos imunoreguladores podem estar atuando na resposta imune do hospedeiro. Na fase aguda da doença, PBMC dos

pacientes esquistossomóticos expressam alta reatividade a antígenos do S. mansoni (Ottesen et al.,1978;Gazzinelli et al.,1985). Esta reatividade tende a diminuir progressivamente na fase crônica, especialmente com relação ao SEA. Esta diminuição tem sido interpretada como uma expressão da modulação da resposta imune, que leva a diminuição do tamanho do granuloma, descrita pela primeira vez em modelos experimentais (Andrade & Warren 1964).

A regulação da resposta celular aos antígenos do S. mansoni está correlacionada com o desenvolvimento de vários mecanismos supressores desenvolvidos durante a fase crônica, os quais limitam ou modulam a resposta celular à estes antígenos específicos. Dentre estes mecanismos estão a soro supressão (Colley et al.,1977a; Santoro et al.,1978; Nash et al.,1974;Boutet al.,1975;Ottesen & Poindexter,1980); Supressão por células mononucleares aderentes (Todd et al.,1979; Ottesen,1979);Supressão por células T específicas (Colley et al.,1978;Rocklin et al.,1981) ; Supressão por interações idiotípicas (Colley et al 1989;Doughty et al.,1989; Montesano et al.,1989) e supressão por linfocinas(Perrin et al.,1989; Mathew et al.,1990;Cheever et al.,1992).

Apesar do conhecimento do envolvimento destes fatores durante a resposta imune à infecção pouco se conhece sobre a sua importância na susceptibilidade ou resistência dos indivíduos residentes em áreas endêmicas.

A reatividade de células mononucleares a diferentes

preparações antigênicas tem sido associada com a presença ou ausência de reinfeção em indivíduos de área endêmica após o tratamento. Colley et al. (1986b) estudando longitudinalmente a resposta de PBMC de 18 pacientes, antes e após o tratamento, observaram que pacientes susceptíveis apresentavam uma reatividade menor ao antígeno de SEA e CERC antes da reinfeção. Outros pesquisadores observaram que após o tratamento, a maioria dos pacientes apresentavam respostas elevadas ao SWAP e CERC e esta reatividade se mantém alta por até 9 meses, já a resposta celular ao SEA pode não se alterar ou elevar-se (Ottesen et al., 1980; Abel-Salam et al., 1981 Barsoun et al., 1982 Colley et al., 1986b).

Neste estudo avaliamos longitudinalmente a resposta celular de PBMC dos grupos SUS e RES, estimulada com os antígenos SEA, SWAP e CERC. Com relação a resposta anti-SEA, observa-se uma baixa reatividade antes do tratamento provavelmente devido a fenômenos ligados a modulação, já descritos anteriormente por diversos autores (Ellner et al., 1980; Rocklin et al., 1981; Ottesen & Pointexter, 1981). Após o tratamento ocorreu um aumento da resposta ao SEA para os dois grupos. Esta elevação pode ter sido provocada por alterações dos mecanismos imunoreguladores que parecem não estar relacionados com a resistência ou susceptibilidade do indivíduo, mas com a presença ou ausência de infecção e/ou outros fatores ainda não identificados (Figura 12).

Com relação a resposta de proliferação celular ao SWAP e

CERC, observou-se que, antes do tratamento, o grupo SUS apresentou reatividade significativamente maior. Após o tratamento não se constatou diferenças significativas entre os grupos. Este fato pode ser explicado pelo aumento da resposta celular de PBMC à estes antígenos no grupo RES (Figura 12). Porém esta elevação parece não estar associada a resistência, já que o grupo SUS apresentou uma alta reatividade a estes antígenos. Nossos resultados diferem daqueles observados por Colley et al. (1986b) descritos anteriormente. Estas diferenças podem ser atribuídas às condições epidemiológicas e ecológicas as quais as populações estavam submetidas. Assim, por exemplo, os pacientes estudados pelos autores citados eram provenientes de área no Egito endêmica para o S. mansoni e S. haematobium enquanto os nossos eram de área endêmica apenas para S. mansoni, uma vez que o S. haematobium não ocorre no Brasil. Provavelmente a infecção com S. haematobium como ocorre em outras helmintoses pode interferir com a resposta anti-S. mansoni (Correa-Oliveira et al., 1988).

Até o momento, analisando os dados da literatura ainda não se pode relacionar a reatividade celular medida pela proliferação de células com a susceptibilidade e/ou resistência à infecção. Esta dificuldade é reforçada pela dispersão do ensaio inerente ao método utilizado, e também pelo grau de reatividade das células dependente das características intrínsecas de cada indivíduo, que se reflete em uma variação da resposta celular em cada grupo. Outro fator que também devemos levar em consideração

é a complexidade dos antígenos utilizados para avaliação destes parâmetros, que podem de certa forma mascarar a resposta a epitopos específicos.

Muitos trabalhos têm demonstrado *in vitro* e *in vivo* a participação dos anticorpos nos mecanismos imunes efetores contra a infecção pelo S. mansoni. Entretanto os mecanismos que regulam as alterações isotípicas observadas na esquistossomose, bem como o papel destes anticorpos na resistência ao parasita, ainda não estão bem estabelecidas.

Neste estudo procuramos primeiro avaliar no soro de pacientes dos grupos SUS e RES, o nível dos diversos isotipos dos anticorpos contra antígenos de três fases do parasita (Ovo, Verme e Cercária), e segundo estabelecer correlação entre eles. Inicialmente, comparamos a reatividade dos anticorpos específicos dos grupos SUS e RES com a dos indivíduos normais, não residentes em área endêmica (Tabelas VII, VIII e IX). Dependendo da preparação antigênica, utilizada na ELISA, observamos uma alteração relativa na composição isotípica no soro dos pacientes infectados quando comparada com a reatividade do soros de indivíduos normais. Uma hipergamaglobulemia ocorre no soros dos pacientes SUS e RES, com proeminente aumento dos isotipos IgG4, IgM e IgG1. Aliás esta é uma característica comumente encontrada em infecção crônica por helmintos (Dessaint et al., 1975; Iskander et al 1981; Mendes & Mendes, 1982; Jassin et al., 1987; Evengard et al., 1988).

Outra característica marcante na esquistossomose já relatada

por diversos autores é o aumento do nível de IgE quando comparados com indivíduos normais(Capron et al.,1975; Butterworth et al.,1975). Nossos dados mostram que os níveis de anticorpos IgE contra SWAP e CERC estão realmente elevados, entretanto o mesmo não ocorreu com IgE anti-SEA, cujas médias dos valores são iguais a dos normais (Comparar Tabela VII). Como a média dos valores normais para anti-SEA é aproximadamente o dobro da média dos valores para anti-SWAP e anti-CERC, é provável que estes valores estejam elevados devido a possíveis reações cruzadas, mascarando um provável aumento de IgE anti-SEA no soro dos pacientes. Vários laboratórios têm demonstrado, que soros de pacientes e de animais com outras infecções, apresentam anticorpos reativos à antígenos do *S.mansonii* (Sadunet al.,1960;Baral-Neto et al.,1983;Aronstein et al.,1985a;Aronstein et al.,1985b;Hillyer et al 1985;Hillyer et al.,1988;Ruppel et al.,1987;Andrade et al.,1988;Correa-oliveira et al.,1988).

Nossos resultados mostraram uma preponderância dos anticorpos anti-SEA e anti-CERC para a maioria dos isotipos analisados. O antígeno SWAP induz um baixo nível de reatividade dos anticorpos, principalmente para os isotipos IgA e IgG2. Observamos algumas diferenças significativas entre os níveis dos diferentes isotipos dos grupos de pacientes SUS e RES.

Os anticorpos IgA são produzidos principalmente contra antígenos do ovo e cercária (Figura 15). A produção de IgA anti-SEA pode ser devido a estimulação do sistema imune ligado a mucosa intestinal, provocada pela passagem dos ovos através do

intestino. Estes resultados confirmaram os achados de Jassin et al. (1988) que encontraram um alto nível de anticorpos IgA anti-SEA em crianças infectadas pelo S. mansoni e com alta carga parasitária. Não encontramos qualquer diferença significativa entre os níveis de IgA anti-SEA dos grupos SUS e RES embora estes não apresentassem a mesma carga parasitária antes do tratamento. De um modo geral IgA anti-CERC está mais elevada no grupo SUS, mas a diferença só foi significativa no tempo TX02. Porém, a importância imunológica desta diferença na imunidade contra a infecção não está muito clara. Estudos recentes, no Quênia, com crianças infectadas com S. mansoni demonstraram que há um aumento do nível de anticorpos IgA contra uma proteína da superfície do S. mansoni a glutathione-S-transferase (Sm28) com a idade, principalmente após o tratamento. Análise funcional destes anticorpos mostrou que eles podem induzir um decréscimo no número de vermes e também estão associados com a redução e viabilidade dos ovos do parasita. Estes estudos sugerem a participação dos anticorpos IgA anti-Sm28 na resposta imune protetora na esquistossomose. (Auriault et al., 1990; Grzych et. al., 1993). Como utilizamos antígenos complexos do S. mansoni a resposta anti-Sm28 pode estar mascarada em nossos resultados.

Alguns trabalhos têm demonstrado que, em crianças, o alto grau de susceptibilidade à reinfecção está associado a elevados níveis de anticorpos IgM contra antígenos do ovo, incluindo aqueles anticorpos que reconhecem epitopos de carboidratos, os quais são expressos também na superfície de esquistossômulo e

do miracídio. (Butterworth et al.,1985; Khalife et al.,1986; Caprom,1987; Butterworth et al.,1988). Estes estudos têm levado à hipótese de que os anticorpos IgM quando fixados na membrana do esquistossômulo, alvo da resposta imune protetora, são capazes de bloquear a resposta efetora do hospedeiro contra o parasita. A elevação do nível destes anticorpos estaria portanto relacionada com a reinfeção (Butterworth et al.,1988)

Nossos resultados mostraram um aumento generalizado dos níveis de anticorpos IgM no soro de pacientes RES, mais pronunciado com relação ao SWAP (Figura 16). Estes dados indicam, pelo menos em nossos pacientes , cuja média de idade é bem superior àquela dos trabalhos acima citados, que a elevação dos níveis IgM anti-parasita não pode ser responsabilizada como um fator complicador da resistência. Constata-se pela Figura 16 que a elevação de IgM está bem caracterizada apenas com relação à SWAP. Estes anticorpos estavam em um nível significativamente mais elevados no soro do grupo RES, durante todo o estudo. Esta observação é interessante porque já foi relatada a presença de uma glicoproteína na superfície do parasita (SmW 68) capaz de induzir níveis significativos de proteção em modelos experimentais (King e al., 1989). Estes autores observaram que a SmW68 induz um aumento do nível de IgM com a idade e ainda que os altos níveis destes anticorpos apresentam uma correlação inversa com carga parasitária. É possível então associar a resposta de IgM anti-SWAP à resistência a reinfeção.

Experiências in vitro com soros hiperimunes de ratos,

macacos e humanos indicam que IgE em combinação com eosinófilos, mastócitos ou plaquetas exerce papel importante na citotoxicidade contra o esquistossômulo (Capron et al., 1975; Grzych et al., 1982; Capron et al., 1981b). Este mecanismo atuaria na proteção contra a infecção pelo menos no rato (Capron & Dessaint, 1985 Capron et al., 1989).

Resultados recentes sobre o envolvimento dos anticorpos IgE na imunidade em humanos, têm sido obtidos observando a taxa de reinfecção em uma comunidade no Gâmbia, exposta a infecção pelo S haematobium (Hagan et al., 1991). Observou-se uma associação entre os altos níveis de IgE anti-SWAP e baixos níveis de reinfecção, sugerindo que este mecanismo poderia ser importante na imunidade do homem. Butterworth et al. (1985) analisando a resposta de IgE de indivíduos expostos a infecção pelo S mansoni, observaram uma tendência dos indivíduos resistentes à apresentar níveis mais elevados de IgE, embora estas diferenças não fossem significativas.

Outras evidências do envolvimento de IgE na imunidade, em pacientes, foram obtidas através de estudos, mostrando uma associação entre altos níveis destes anticorpos contra antígenos do tegumento de esquistossômulo e a resistência a reinfecção (Rihet et al., 1991; Dunne et al., 1992)

Neste estudo encontramos níveis elevados de anticorpos da classe IgE contra antígenos derivados de vermes adultos e esquistossômulo nos indivíduos considerados resistentes à infecção. Este aumento foi verificado com 9 e 21 meses após a

cura, respectivamente para anti-STEG e anti-SWAP (Figuras 17 e 22a) confirmando resultados anteriores e reforçando a hipótese de que os anticorpos IgE estão envolvidos na resistência à reinfeção pelo S. mansoni no homem.

Na análise das subclasses de IgG encontram-se algumas diferenças entre os grupos SUS e RES, que podem estar relacionadas com a susceptibilidade ou resistência à reinfeção. Antes do tratamento, o grupo RES apresentou níveis significativamente mais baixos de IgG1 anti-SWAP e anti-CERC, após o tratamento esta diferença permanece, principalmente, para anti-CERC (Figura 18). Com relação a subclasse IgG3, o grupo RES apresentou níveis mais elevados contra SEA antes do tratamento e contra CERC durante quase todo período de observação (Figura 20). Encontramos, também, nestes indivíduos uma correlação inversa significativa entre os níveis IgG1 anti-SEA e IgE anti-STEG, antes do tratamento, sugerindo que IgG1 provavelmente não está associado com resistência, desde que se admite a possibilidade de IgE ser anticorpo protetor como já discutido anteriormente (Tabela XVII). Todavia já se demonstrou uma associação das subclasses IgG1 e IgG3 com a morte do esquistossômulo *in vitro* (Khalife et al., 1989). Analisando nossos resultados com relação aos dados de Khalife et al., pode-se inferir que talvez os anticorpos IgG3 e não IgG1 estariam envolvidos nos mecanismos efetores contra o S. mansoni, já que eles se encontram em níveis mais elevados nos soros de pacientes RES. Porém, esta possibilidade só será resolvida por ensaios de

citotoxicidade, *in vitro*, utilizando subclasses de anticorpos purificadas dos soros destes indivíduos.

Grande parte das IgG induzidas durante a infecção esquistossomótica pertencem a subclasse IgG4. Esta é também uma característica de outras infecções, cuja rota de acesso do antígeno ao sistema imune se dá através da pele e pulmão. (Aalberse et al., 1983; Shakib et al., 1977; Parish, 1981; Shakib & Stanworth, 1980; Ottesen et al., 1985; Van Nieuwkoop et al., 1982). Porém, o papel destes anticorpos na resposta imune contra a infecção pelo S. mansoni ainda permanece controverso. Os anticorpos IgG4 são ineficientes na ativação do complemento e na ligação a receptores de monócitos e macrófagos. Eles podem interferir com a ativação do complemento por IgG1, e também, bloquear a degranulação de mastócitos por competição com IgE específico para antígenos do verme (Iskander et al., 1981; Stanworth et al., 1973). Estudos recentes sugerem que anticorpos IgE e IgG4, presentes no soro de indivíduos com filariose, podem competir pelo mesmo sítio antigênico (Hussain et al., 1986). Outros trabalhos tem demonstrado a associação entre IgG4 e susceptibilidade à infecção. Auriault et al (1990), no Quênia, encontraram níveis de IgG4 anti-P28 (glutational-S-transferase), significativamente maiores nos soros de crianças infectadas com S. mansoni, do que em crianças resistentes.

Em nosso trabalho encontramos uma queda gradual no nível de anticorpos IgG4 anti-SEA e anti-STEG dos pacientes RES (Figuras 21 e 22). Esta queda coincide com um lento aumento nos níveis

de IgE anti-STEG, anti-SWAP e também anti-CERC nos soros destes mesmos indivíduos. Observamos também, que antes do tratamento há uma correlação positiva e significativa, entre IgE e IgG4 anti-STEG, nos soros dos pacientes SUS (Tabela XVII). Encontramos também no soro dos pacientes RES uma correlação inversa entre estes mesmos isotipos antes da reinfeção embora não significativa (Tabela XVII). Estes resultados enfatizam a hipótese de que IgE estaria envolvida na proteção contra a infecção pelo S. mansoni, em humanos, e que este efeito poderia ser bloqueado pelos altos níveis de IgG4 em indivíduos mais jovens, o que explicaria o desenvolvimento gradual da imunidade na esquistossomose. Por conseguinte nossos resultados sugerem, como na infecção pelo S. haematobium (Hagan et. al., 1991), que um balanço entre IgE /IgG4 seria importante para o desenvolvimento de resistência à reinfeção.

O papel dos anticorpos IgG2 da mesma forma que IgG4 como possíveis fatores bloqueadores na reação de ADCC permanece controverso. Embora, esta subclasse seja ineficiente na opsonização e na fixação do complemento, é sabido que estes anticorpos são importantes na imunidade de certas infecções bacterianas (Hammarstron & Smith 1986). Khalife et al. (1989) demonstraram que estes anticorpos apresentam dupla função, ou seja, eles podem atuar junto com os eosinófilos ativados na morte de esquistossômulos ou como bloqueadores na presença de eosinófilos normais.

Nossos estudos mostraram que os níveis de IgG2 anti-SEA e

anti-CERC dos grupos SUS e RES não diferem, enquanto anticorpos anti-SWAP desta subclasse diferem significativamente nos tempos TX00, TX01 e TX02 (Figura 19). Os valores encontrados, entretanto foram muito baixos o que nos leva a questionar o papel desta imunoglobulina na imunidade. É, também, interessante o fato de termos encontrado uma correlação inversa entre o nível de IgG2 anti-SEA e IgE anti-STEG nos pacientes RES (Tabela XVII). Estes resultados somados aqueles obtidos com IgE anti-STEG diferem da hipótese proposta por Butterworth et al.(1988), onde os anticorpos IgG2 atuavam como bloqueadores. Nossos resultados sugerem que IgG2 pode ter uma atividade não bloqueadora nestes indivíduos.

A análise epidemiológica da esquistossomose mostra que indivíduos infectados de área endêmica podem desenvolver resistência progressiva à infecção pelos S. mansoni. Os mecanismos desta resistência "natural" permanecem uma incógnita. Nossos dados são consistentes com a hipótese de que a resistência adquirida depende de um balanço adequado entre anticorpos considerados bloqueadores e efetores, isto é nas faixas etárias mais jovens este balanço seria dirigido para os anticorpos bloqueadores, embora anticorpos efetores estejam presentes. Subsequentemente com o aumento da idade o balanço mudaria favorecendo a resposta protetora.

Achamos pouco provável, no entanto, que a imunidade à infecção pelo S. mansoni esteja somente na dependência dos níveis de anticorpos específico. Um parasita de ciclo complexo como o S.

mansonii e com uma grande variabilidade antigênica, deve provavelmente estimular inúmeras populações e/ou sub populações linfocitárias capazes de se auto regularem. O resultado desta imunoregulação, a nosso ver, determinaria a resultante da resposta imune favorável à resistência ou a morbidade.

Nosso laboratório vem desenvolvendo estudos com um grupo de indivíduos que embora tenham níveis razoáveis de contato com águas infectadas, apresentam reiteradamente exames de fezes negativos. Este grupo, hipoteticamente resistente, denominamos de normais endêmicos (NE). Estudos comparando a resposta celular de pacientes da forma clínica intestinal versus normais endêmicos sugerem a participação de IFN gama na resistência à infecção apresentada por deste último grupo. A ausência de IFN gama em culturas de linfócitos de pacientes infectados já havia sido observada por Zwingenberger et al. (1989) e Bahia-Oliveira et al. (1992). É interessante observar que indivíduos normais endêmicos também apresentam níveis elevados de IgE anti-tegumento e baixos níveis de IgG4 anti-SEA. O conjunto destes resultados sugerem que mais de um mecanismo esteja envolvido na resistência destes indivíduos a infecção. A produção de IgE e IgG4 é estimulada por IL4 que por sua vez é produzida por células TH2. A síntese destes anticorpos pode ser inibida por gama IFN, produzido por células TH1. Tem-se observado, na esquistossomose experimental, que a ocorrência de TH1 e TH2 tenderia ser exclusiva. A ocorrência simultânea, como ocorre nos NE (aumento de IgE e de produção de IFN gama) tem sido explicado pela

compartimentalização em locais distintos das subpopulações , com predominância de uma ou de outra em determinados sítios (Caulada-Benedetti et al, 1991).

Estes dados avaliados em conjunto fortalecem a hipótese de que a resistência à infecção desenvolve gradualmente nos indivíduos residentes em área endêmica, mais notadamente em adultos. Estes resultados são também consistentes com a participação de IgE e IgG4 na resistência a reinfeção, entretanto não indicam quais seriam os mecanismos envolvidos. Várias razões dificultam estudos desta natureza em pacientes inclusive éticas, por isto muitas questões ainda permanecem sem resposta . Por exemplo, até que ponto a expressão da imunidade é multifatorial? Qual a expressão da resposta imune estaria correlaciona positivamente com a resitência à reinfeção em indivíduos mais velhos? Por que na esquistossomose ocorre um enorme aumento de IgG4 específica? Como IgE, um anticorpo envolvido em reações alérgicas estaria associado a resistência? Por que ocorre uma queda na expressão de IgG4 com o aumento da idade? Estas e muitas outras questões interessantes poderão no futuro ser respondidas através de uma abordagem multidisciplinar incluindo estudos imunológicos, imunopatológicos,clínicos e epidemiológicos em áreas endêmicas bem selecionadas.

ANEXO

ANEXO 1

CRITÉRIOS USADOS PARA DETERMINAR O GRAU DE CONTATO
COM ÁGUAS INFECTADAS

Variáveis	Pontos Atribuídos
1. <u>Motivos de contatos</u>	
Tomar banho ou nadar	5
Lavar roupa	4
Regar horta, lavoura ou retirar areia	4
Buscar água e/ou lavar vasilhas	3
Lavar carro	3
Pescar ou atravessar o córrego	2
2. <u>Frequência de contato</u>	
Diário	28
Semanal	4
Quinzenal	2
Mensal ou menos	1
3. <u>Nega contato</u>	1

ANEXO 2

TABELA V

Análise de variância para ensaio de Blastogêneses

Tempo	SEA		SWAP		CERC	
	F	p*	F	p*	F	p*
TX00	0.12	0.7323	9.48	0.0034	6.31	0.0185
TX01	0.30	0.5877	0.29	0.5920	0.45	0.5045
TX02	0.00	0.9606	4.08	0.0535	0.16	0.6920
TX03	0.08	0.7724	1.71	0.1985	0.07	0.7973

TABELA VI

Análise de correlação entre a medida da resposta de PHA com a medida da resposta de SEA, SWAP e CERC durante o estudo

	SEA			SWAP			CERC		
	P	B	p*	P	B	p*	P	B	p*
TX00	0.04	0.19	0.86	-0.06	-0.14	0.81	0.05	0.18	0.84
TX01	-0.03	-0.10	0.84	0.13	0.22	0.40	0.03	0.07	0.83
TX02	0.38	2.12	0.03	0.45	0.96	0.01	0.21	0.40	0.23
TX03	0.26	0.64	0.07	0.35	0.49	0.01	0.24	0.36	0.10

P é o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis.
B é o coeficiente estimado através de um modelo de regressão onde a variável resposta é o PHA.

p* é a probabilidade de significância do teste para verificar se o parâmetro estimado é significativo.

TABELA X

Análise de variância para IgA

Tempo	SEA		SWAP		CERC	
	F	p*	F	p*	F	p*
TX00	2.14	0.1514	1.15	0.2909	0.94	0.3390
TX01	0.87	0.3595	0.85	0.3646	0.00	0.9490
TX02	2.19	0.1527	1.43	0.2441	11.04	0.0031
TX03	0.63	0.4342	2.73	0.1325	1.20	0.2831

TABELA XI

Análise de variância para IgM

Tempo	SEA		SWAP		CERC	
	F	p*	F	p*	F	p*
TX00	0.07	0.7912	17.18	0.0002	0.23	0.6336
TX01	0.49	0.4913	7.45	0.0104	1.53	0.2248
TX02	6.06	0.0221	5.18	0.0329	0.88	0.3586
TX03	0.03	0.8720	10.42	0.0028	6.86	0.0131

TABELA XII

Análise de variância para IgE

Tempo	SEA		SWAP		CERC	
	F	p*	F	p*	F	p*
TX00	0.00	0.9837	1.07	0.3065	5.23	0.0276
TX01	3.52	0.0701	0.01	0.9086	1.70	0.2025
TX02	0.01	0.9130	1.17	0.2911	5.29	0.0312
TX03	4.64	0.0382	8.94	0.0051	0.40	0.5326

TABELA XIII

Análise de variância para IgG1

Tempo	SEA		SWAP		CERC	
	F	p*	F	p*	F	p*
TX00	0.56	0.4595	4.80	0.0344	10.52	0.0024
TX01	2.32	0.1382	12.22	0.0015	44.03	0.0001
TX02	0.68	0.4201	0.26	0.6142	17.47	0.0004
TX03	0.04	0.8401	1.07	0.3081	101.76	0.0001

TABELA XIV

Análise de variância para IgG2

Tempo	SEA		SWAP		CERC	
	F	p*	F	p*	F	p*
TX00	0.04	0.8837	9.15	0.0043	0.97	0.3309
TX01	0.02	0.8984	4.21	0.0486	0.43	0.5163
TX02	0.55	0.4660	6.09	0.0219	0.56	0.4618
TX03	0.01	0.9158	20.84	0.0001	0.23	0.6381

TABELA XV

Análise de variância para IgG3

Tempo	SEA		SWAP		CERC	
	F	p*	F	p*	F	p*
TX00	4.33	0.0438	0.15	0.6976	10.13	0.0028
TX01	0.04	0.8349	1.91	0.1772	9.46	0.0044
TX02	1.36	0.2562	2.59	0.1217	5.23	0.0322
TX03	0.40	0.5298	3.32	0.0771	0.30	0.5891

TABELA XVI

Análise de variância para IgG4

Tempo	SEA		SWAP		CERC	
	F	p*	F	p*	F	p*
TX00	0.00	0.9752	0.96	0.3330	0.45	0.5041
TX01	0.77	0.3873	6.76	0.0143	0.14	0.7117
TX02	0.13	0.7179	0.05	0.8323	7.04	0.0145
TX03	6.70	0.0142	2.41	0.1296	3.01	0.0915

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALBERSE, R.C., VAN DER GRAG, R., VAN LEEUWEN, J. Serological aspects of IgG4 antibodies. *J. Immunol.*, 130: 722, 1983.
- ABDEL-SALAN, E., HIGASHI, G.I., KAMAL, K.A., ISHAAC, S. Cell-mediated immune assay in children with *Schistosoma haematobium* infection and the effect of niridazole therapy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75: 207-214, 1981.
- AMIRI, P., LOCKSLEY, R.M., PARLOW, T.G., SADICK, M., RECTOR, E., RITTER, D., MCKERROW, J. Tumour necrosis factor- restores granulomas and induces egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, 356: 604-607, 1992.
- ANDRADE, C.R., ANDRADE, P.P., WRIGHT, E.P. *Leishmania donovani donovani* antigens recognized by Kala-azar patient sera and identification of cross-reacting antigens to Chagas' disease. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 21: 511-515, 1988.
- ARONSTEIN, W.S., DALTON, J.P., STRAND, M.A. *Schistosoma mansoni* surface glycoprotein cross reactive with a T1 antigen of *Fasciola hepatica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34 (5): 889-897, 1985b.
- ARONSTEIN, W.S., DALTON, J.P., WEISS, J.B., STRAND, M.A. Identification and characterization of a major *Schistosoma mansoni* glycoprotein antigen cross-reactive with *Fasciola hepatica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34 (5): 879-888, 1985a.
- AURIAULT, C., GRAS-MASSE, H., PIERCE, R.J., BUTTERWORTH, A.E., WOLOWEZUK, I., et al. Antibody response to *Schistosoma mansoni*

- infected human subjects to the recombinant ~~R~~28 glutathione-S-transferase and to synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 1918-1924, 1990.
- BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G., GAZZINELLI, G., ELOI-SANTOS, S.M., CUNHA-MELO, J.R., ALVES-OLIVEIRA, L.F., SILVEIRA, A.M.S., VIANA, I.R.C., CARMO, J., SOUZA, A., CORREA-OLIVEIRA, R. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of schistosomiasis mansoni. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**: 57-61, 1992.
- BARSOUM, J.S., GAMIL, F.M., AL-KHAFIF, M.A., RAMZY, R.M., EL ALAMY, M.A., COLLEY, D.G. Immune responses and immunoregulation during human schistosomiasis in Egypt. I. Effect of treatment on *in vitro* responsiveness. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **31**: 1181-1187, 1982.
- BICKLE, Q.D., ANDREWS, B.J., DOENHOFF, M.J., FORD, M.J., TAYLOR, M.G. Resistance against *Schistosoma mansoni* induced by highly irradiated infections: studies on species specificity of immunization and attempts to transfer resistance. *Parasitology*, **90**: 301-312, 1985.
- BUTTERWORTH, A.E., DUNNE, D.W., FULFORD, A. Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 antibodies block the expression of immunity. *Biochimie*, **70**: 1053-1063, 1988b.
- BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V., MAHMOUD, A.A.F., SHER, A. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage

- to schistosomula. *Nature*, 156: 727-729, 1975.
- BUTTERWORTH, A.E., WILSON, A., RICHARDSON, A., HARRIS, J.,
CRACHUHI, R.K., SENIOR, D., COOMBS, R.R.A. Measurement of
gamma-interferon in culture supernatants of antigen-stimulated
lymphocytes from patients with *Schistosoma mansoni* infections
by a reverse passive haemagglutination assay. *Exp. Immunol.*,
71: 241-246, 1988c.
- BUTTERWORTH, A.E., REMOLD, H.G., HOUBA, V., DAVID, J.R.,
FRANKS, D., DAVID, P.H., STURROCK, R.F. Antibody-dependent
eosinophil-mediated to ⁵¹Cr-labelled schistosomula of
Schistosoma mansoni: mediation by IgG and inhibition by
antigen-antibody complexes. *J. Immunol.*, 186: 2230-2236, 1977.
- BUTTERWORTH, A.E., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., MUGAMBI, M.,
OUMA, J.H., RICHARDSON, B.A., ARAP SIONGOK, T.K.,
STURROCK, R.F. Immunity after treatment of human
schistosomiasis mansoni. I. Study design, pretreatment
observations and the results of treatment. *Trans. R. Soc.
Trop. Med. Hyg.*, 78: 108-123, 1984.
- BUTTERWORTH, A.E., CORBETT, E.L., DUNNE, D.W., FULFORD, A.J.C.,
KIMANI, G., GACHUHI, R.K., KLUMPP, R., MBUGUA, G., OUMA, J.H.,
ARAP SIONGOK, R.K., STURROCK, R.F. Immunity and morbidity in
human schistosomiasis. In *New Strategies in Parasitology*
(McAdam, K.P.W.J., ed.), Churchill-Livingstone, London, 1989,
pp. 193-210.
- BUTTERWORTH, A.E., CAPRON, M., CORDINGLEY, J.S., DALTON, P.R.,

- DUNNE, D.W., KARIUKI, H.C., KIMANI, G., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., PRENTICE, M.A., RICHARDSON, B.A., ARAP SIONGOK, T.K., TAYLOR, D.W. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune response. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79: 393-408, 1985.
- BUTTERWORTH, A.E., BENSTED-SMITH, R., CAPRON, A., CAPRON, M., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., GRZYCH, J.M., KARIUKI, H.C., KHALIFE, J., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H. ARAP SIONGOK, T.K., STURROCK, R.F. Immunity in human schistosomiasis: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. *Parasitology*, 94: 269-280, 1987b.
- CAPRON, A. & DESSAINT, J.P. Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes. A heuristic view. *Ann. Rev. Immunol.*, 3: 455-476, 1985.
- CAPRON, A. & DESSAINT, J.P. Molecular basis of host-parasite relationship: towards the definition of protective antigens. *Immunol. Ewc.*, 112: 27-48, 1989.
- CAPRON, A. & DESSAINT, J.P. Immunologic aspects of schistosomiasis. *Ann. Rev. Med.*, 43: 209-218, 1992.
- CAPRON, A., DESSAINT, J.P., CAPRON, M., BAZIN, M. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature*, 253: 474-475, 1975.
- 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.*, 4: 613-623, 1974.
- CAPRON, M., TORPIER, G., CAPRON, A. **In vitro** killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. *J. Immunol.*, 123: 2220-2228, 1979.
- CAPRON, M., BAZIN, H., JOSEPH, M., CAPRON, A. Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophils. *J. Immunol.*, 126: 1764-1768, 1981b.
- CAPRON, M., CAPRON, A., KHALIFE, J., BUTTERWORTH, A.E., GRZYCH, J.M. Blocking antibodies and vaccine strategy in schistosomiasis. *Acta Trop.*, 44 (suppl. 12): 55-62, 1987.
- CARVALHO, O.S., GUIMARAES, C.T., MASSARA, C.L., BONESIO, J.E.R. Situação atual da Esquistossomose mansoni no lago da Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brasil. *Rev. Saúde Púb. São Paulo*, 19: 270-277, 1985.
- CAULADA-BENEDETTI, Z., AL-ZAMEL, F., SHER, A., JAMES, S. Comparison of Th-1 and Th-2 associated immune reactivities stimulated by single versus multiple vaccination of mice with irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *J. Immunol.*, 146 (5): 1655-1662, 1991.
- CHEEVER, A.W., FINKELMAN, F.D., CASPAR, P., HEINY, S., MACEDONIA, J.G., SHER, A. Treatment with anti-IL-2 antibodies

- reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni*-infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *J. Immunol.*, 148: 3244-3248, 1992.
- CLEGG, J.A., SMITHERS, S.R. The effect of immune rhesus monkeys serum on schistosomules of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *Int. J. Parasitol.*, 2: 79-98, 1972.
- COFFMAN, R.L. & CARTY, J. A T-cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon. *J. Immunol.*, 136: 949, 1986.
- COLLEY, D.G., LEWIS, F.A., GOODGAME, R.W. Immune responses during human schistosomiasis. IV. Induction of suppressor cell activity by schistosome antigen preparations and concanavalin A. *J. Immunol.*, 1209: 1225-1232, 1978.
- COLLEY, D.G., COOK, J.A., FREEMAN, G.L., BARTHOLOMEW, R.K., JORDAN, P. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. I. *In vitro* lymphocyte blastogenic responses to heterogeneous antigenic preparations from schistosome eggs, worms and cercariae. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 53: 420-443, 1977a.
- COLLEY, D.G., BARSOUM, I.S., DAHAWI, H.S.S., GAMIL, F., HABBIB, M., EL ALAMY, M.A. 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.*, 80: 952-957, 1986a.
- COLLEY, D.G., PARRA, J.C., MONTESANO, M.A., LIMA, M.S.,

- NASCIMENTO, E., DOUGHTY, B.L., GOES, A., GAZZINELLI, G.
Immunoregulation in schistosomiasis by idiotypic interactions
and lymphokine-mediated mechanisms. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 82**
(suppl. IV): 105-111, 1987.
- COLLEY, D.G., MONTESANO, M.A., ELOI-SANTOS, S.M., POEWELL, M.R.,
PARRA, J.F., GOES, A.M., DOUGHTY, B.L., CORREA-OLIVEIRA, R.,
ROCHA, R.S., GAZZINELLI, G. Idiotype networks in
schistosomiasis. In **Frontiers of infection Diseases. New**
strategies in Parasitology (McAdam, K.P.W.J., ed.), Proceedings
International Symposium sponsored by Glaxo Research, Broomfield
Hall, Hertfordshire, 1989.
- CORREA-OLIVEIRA, R., SHER, A., JAMES, S.L. Defective vaccine-
induced immunity to *Schistosoma mansoni* in P strain mice. I.
Analysis of antibody responses. **J. Immunol., 133: 1581-1586,**
1984.
- CORREA-OLIVEIRA, R., DUSSE, L.M.S., VIANA, I.R.C., COLLEY, D.G.,
CARVALHO, O.S., GAZZINELLI, G. Human antibody responses
against schistosomal antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg., 38 (2):**
348-355, 1988.
- DALTON, P.R. & POLE, D. Water-contact patterns in relation to
Schistosoma haematobium infection. **Bull. WHO, 56: 417-426,**
1978.
- DAMIAN, R.T., GREENE, N.D., FITZGERALD, K. Schistosomiasis
mansoni in baboons. II. Acquisition of immunity to challenge
infection after repeated small exposures to cercariae of
Schistosoma mansoni. **Am. J. Trop. Med. Hyg., 23: 78-80, 1974.**

- DEAN, D.A., WISTAR, R., MURREL, K.D. Combined *in vitro* effect of rat antibody and neutrophilic leukocytes on schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23: 420-428, 1974.
- DEAN, D.A., WISTAR, R.A., CHEN, P.A. Immune response of guinea pigs to *Schistosoma mansoni*. I. *In vitro* effects of antibody and neutrophils, eosinophils and macrophages on schistosomula. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24: 74-82, 1975.
- DESSAINT, J.P., CAPRON, M., BOUT, D., CAPRON, A. Quantitative determination of specific IgE level in patients with schistosomiasis (*S. mansoni* or *S. haematobium*). *Clin. exp. Immunol.*, 20: 427-436, 1975.
- DE WITT, W.B. & WARREN, K.S. Hepatosplenic schistosomiasis in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 8: 440-446, 1959.
- DOROZYNSKI, A. The attack on tropical disease. *Nature*, 262: 85-87, 1976.
- 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.*, 22: 1483, 1992.
- EVENGARD, B., HAMMARSTROM, L., SMITH, C.I.E., JOHANSSON, S.G.O., LINDER, E. Subclass distribution and IgE responses after treatment in human schistosomiasis. *Clin. exp. Immunol.*, 73: 383-388, 1988.
- 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.*, **130** (6): 2891-2895, 1983a.
- GAZZINELLI, G., LAMBERUCCI, J.R., KATZ, N., ROCHA, R.S., LIMA, M.S., COLLEY, D.G. Immune responses during human Schistosomiasis mansoni. XI Immunological status of patients with acute infections and after treatment. *J. Immunol.*, **135** 2121-2127, 1985.
- GRZYCH, J.M., CAPRON, M., BAZIN, H., CAPRON, A. In vitro and in vivo effector function of rat IgG2a monoclonal anti-Schistosoma mansoni antibodies. *J. Immunol.*, **129**: 2739-2743, 1982.
- GRZYCH, J.M., CAPRON, M., DISSOUS, C., CAPRON, A. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.*, **133**: 998-1004, 1984.
- GRZYCH, J.M., GREZEL, D., XU, B.C., NEYRINCK, J.L., CAPRON, M., OUMA, J.H., BUTTERWORTH, A.E., CAPRON, A. IgA antibodies to a protective antigen in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.*, **150**: 527-535, 1993.
- HAGAN, P., WILKINS, H.A., BLUMENTHAL, U.J., HAYES, R.J., GREENWOOD, B.M. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasite Immunol.*, **7**: 625-632, 1985b.
- HAGAN, P., BLUMENTHAL, U.J., DUNNE, D., SIMPSON, A.J.G., WILKINS, H.A. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, **6306**: 243-245, 1991.

- HAGAN, P., BLUMENTHAL, U.J., CHAUDRI, M., GREENWOOD, M., HAYES, R.J., HODGSON, J., KELLY, C., KNIGHT, M., SIMPSON, A.J.G., SMITHERS, R.S., WILKINS, H.A. Resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium* in Gambian children: analysis of their immune responses. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81: 938-943, 1987.
- HAMMARSTOM, L. & SMITH, C.I.E. IgG subclasses in bacterial infections. *Monographs in Allergy*, 19: 122-128, 1986.
- HIATT, R.A., SOTOMAYOR, Z.R., SANCHEZ, G., ZOMBRANA, M., KNIGHT, W.B. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *J. Inf. Dis.*, 139: 659, 1979.
- HILLYER, G.V. Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with a *Fasciola/Schistosoma* cross-reactive defined immunity antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 34 (6): 1127-1131, 1985.
- HILLYER, G.V., ROSA, M.I.G., HECTOR, A., ANABEL, H. Successful vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection with a purified 12 kD *Fasciola hepatica* cross reactive antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 38 (1): 103-110, 1988.
- HORTA, M.F.M. & RAMALHO-PINTO, F.J. Subclasses of rat IgG active in the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vitro. *J. Immunol.*, 133: 3326-3332, 1984.
- HORTA, M.F.M. & RAMALHO-PINTO, F.J. IgG2a é o isotipo efetor da morte de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* dependente de complemento no rato. *Brazilian J. Med. Biol. res.*, 19 (4-5): 652A, 1986.
- HUSSAIN, R. & OTTESEN, E.A. IgE responses in human filariasis.

- IV. Parallel antigen recognition by IgE and IgG4 subclass antibodies. *J. Immunol.*, **136**: 1859-1867, 1986.
- ISKANDER, R., DAS, P.K., AALBERSE, R.C. IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. *Int. Archs. Allergy Apply. Immunol.*, **66**: 200-207, 1981.
- JAMES, S.L. Activated macrophages as effector cells of protective immunity to schistosomiasis. *Immunol. Res.*, **5**: 129-148, 1986a.
- JAMES, S.L. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a nonliving vaccine. III. Correlation of resistance with induction of activated larvacidal macrophages. *J. Immunol.*, **136**: 3872-3877, 1986b.
- JAMES, S.L. & SHER, A. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. III. Identification of a mouse strain, P/N, that fails to respond to vaccination. *Parasite Immunol.*, **5**: 567-576, 1983.
- JASSIN R, A., HASSAN, K., CATTY, D. Antibody isotypes in schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol.*, **9**: 627-650, 1987.
- JORDAN, P. & WEBBE, J. Schistosomiasis. Heinemann. 1982.
- JORDAN, P., CHRISTIE, J.D., UNRAU, G.O. Schistosomiasis transmission with particular reference to possible ecological and biological methods of control. *Acta Trop.*, **37**: 95-135, 1980.
- KATZ, N., CHAVES, A., PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis

- mansonii. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 14: 397-400, 1972.
- KATZ, N., ZICKER, F., ROCHA, R.S., OLIVEIRA, V.B. Re-infection of patients in schistosomiasis mansonii endemic areas after specific treatment. I. Influence of age and worm burden. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 20: 273-278, 1978.
- KHALIFE, J., CAPRON, A., CAPRON, M., GRZYCH, A.E., BUTTERWORTH, A.E., DUNNE, D.W., OUMA, J.H. Immunity in human schistosomiasis mansonii: regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.*, 164: 1626-1640, 1986.
- KHALIFE, J., DUNNE, D.W., RICHARDSON, B.A., MAZZA, G., THORNE, K.J.J., CAPRON, A., BUTTERWORTH, A.E. Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansonii*. *J. Immunol.*, 142: 4422-4427, 1989.
- KING, C.H., IBIARY, S.E., NAWAWI, M.E., SAWYER, J., GRIFFIN, A., HAWEY, A.E., MAHMOUD, A.A.F. Intensity of *Schistosoma mansonii* infection in a human population is inversely correlated with antibody response to Smw68, a protective parasite antigen. *J. Inf. Dis.*, 160 (4): 686-691, 1989.
- KLOETZEL, K. aspectos epidemiológicos da Esquistossomose mansônica em uma população de Pernambuco; suas correlações clínicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1962, 119 pp. (Tese, Doutorado).
- KLOETZEL, K. Schistosomiasis mansonii in Brazil: does social development suffice? *Parasitol. Today*, 5 (12): 386-389, 1989.

- KLOETZEL, K. & SILVA, J.R. Schistosomiasis mansoni acquired in adulthood, behaviour of egg counts and the intradermal test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16: 167-169, 1967.
- LIMA E COSTA, M.F.F., MAGALHAES, M.H.A., ROCHA, R.S., ANTUNES, C.M.F., KATZ, N. Water-contact patterns and socio-economic variables in the epidemiology of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *Bul. WHO*, 65 (1): 57-66, 1987.
- LOWRY, D.A., ROSEBURG, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- LUNDE, M.N., OTTESEN, E.A., CHEEVER, A.W. Serological differences between acute and chronic schistosomiasis mansoni detected by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 28 (1): 87-91, 1979.
- MAHMOUD, A.A.F. & WAHAB, M.F.A. Schistosomiasis. In *Tropical and Geographical Medicine*, (Warren, K.S. & Mahmoud, A.A.F., eds.), 1990, McGraw Hill, pp. 458-473.
- MATHEW, R.C. & BOROS, D.C. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen induced interleukin production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immunol.*, 54: 820-826, 1986.
- MENDES, E. & MENDES, N.F. High levels of IgE in patients with schistosomiasis mansoni. Quantitation of total and specific IgE and IgG. *Trop. Geogr. Med.*, 34: 133-139, 1982.
- MINARD, P., DEAN, D.A., JACOBSON, R.H., VANNIER, W.E.,

- MURREL, K.D. Immunization of mice with cobalt-60 irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26: 76, 1978.
- MOLONEY, N.A. & WEBBE, G. The induction of species specific immunity against *Schistosoma japonicum* by exposure of rats to ultra-violet attenuated cercariae. *Parasitology*, 94: 49-54, 1987.
- MONTESANO, M.A., LIMA, M.S., CORREA-OLIVEIRA, R., GAZZINELLI, G., COLLEY, D.G. Immune response during human schistosomiasis mansoni. XVI. Idiotypic different clinical forms of infection. *J. Immunol.*, 142: 2501- , 1989.
- MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*, 7: 145-173, 1989.
- MOTT, T.E. Schistosomiasis: new gaals. *WHO*, pp. 3-4, december, 1984.
- MURREL, K.D. & CLAY, B. In vitro detection of cytotoxic antibodies to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21: 569-577, 1972.
- VAN NIEWWKOOP, J.A., BRAND, A., RODL, J., SKVARIL, F. Increased level of IgG4 subclass in 5 patients with acquired respiratory disease. *Int. Arch. Allerg. Applied Immunol.*, 67: 61, 1982.
- OTTESEN, E.A. & POINDEXTER, R.W. Modulation of the host response in human schistosomiasis. II. Humoral factors which inhibit lymphocyte proliferative responses to parasite antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29: 592-600, 1980.

- OTTESEN, E.A., SKVARIL, F., TRIPATHY, S.S., POINDEXTER, R.W.,
HUSSAIN, R. Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to
human filariasis. *J. Immunol.*, **134**: 2707-2712, 1985.
- PARISH, W.E. The clinical relevance of heat stable, short-term
sensitising maphylactic IgG antibodies (IgG-s-Ts) and of
related activities of IgG4 and IgG2. *Brit. J. Dermatol.*, **105**:
223, 1981.
- PEARCE, & McLAREN, D.J. Reappraisal of the guinea-pig as an
experimental host for studies of schistosomiasis mansoni.
Parasitology, **87**: 455-464, 1983a.
- PEREZ, H., CLEGG, J.A., SMITHERS, S.R. Acquired immunity to
Schistosoma mansoni in the rat: measurement of immunity by the
lung recovery technique. *Parasitology*, **69**: 349-359, 1974.
- PERRIN, P.J. & PHILLIPS, M.S. The molecular basis of granuloma
formation in schistosomiasis. III. In vivo effects of T cell-
derived suppressor effector factor and IL-2 on granuloma
formation. *J. Immunol.*, **143**: 649-654, 1989.
- PHILLIPS, S.M., LIN, J., GALAL, N., TUNG, A.S., LINETT, G.P.,
PERRIN, P.J. Resistance in murine schistosomiasis is
contingent on activated IL-2 receptor-bearing L3T4⁺
lymphocytes, negatively regulated by LyT2⁺ cells, and
uninfluenced by the presence of IL-2. *J. Immunol.*, **146** (4):
1335, 1991a.
- PHILLIPS, S.M., PERRIN, P.J., TUNG, A.S., LIN, J.,
DIAMANTSKEIN, T., GALAL, N. Immune response to *Schistosoma*
mansoni in invread rats. VII. Resistance is contingent on OX-8⁺

- regulated high affinity IL-2 receptor-bearing W3/25⁺ lymphocytes but not on IL-4 dependent cells. *J. Immunol.*, **147** (1): 330, 1991b.
- POLDERMAN, A.M. Transmission dynamics of endemic schistosomiasis. *Trop. Geog. Med.*, **31**: 465-475, 1979.
- RAMALHO-PINTO, F.J., McLAREN, D.J., SMITHERS, S.R. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rats eosinophils in vitro. *J. Exp. Med.*, **147**: 147-156, 1978.
- RAMALHO-PINTO, F.J., GAZZINELLI, G., HOWELLS, R.E., MOTA-SANTOS, T.A., FIGUEIREDO, E.A., PELLEGRINO, J. *Schistosoma mansoni*: defined system for step-wise transformation of cercariae to schistosomula in vitro. *Exp. Parasitol.*, **36**: 360-362, 1974.
- RIHET, P., DEMEURE, C.E., BOURGOIS, A., PRATA, A., DESSEIN, A.J. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. *Eur. J. Immunol.*, **21**: 2679-2689, 1991.
- ROCKLIN, R.E., TRACY, J.W., EL KHOLY, A. Activation of antigen-specific suppressor cells in human schistosomiasis mansoni by fractions of soluble egg antigens nonadherent to con A sepharose. *J. Immunol.*, **127**: 2314-2318, 1981.
- RUPPEL, A., SHI, Y.E., WEI, D.X., DIESFELD, H.J. Sera of *Schistosoma japonicum* - infected patients cross-react with diagnostic 31/32 kD proteins of *S. mansoni*. *Clin. exp. Immunol.*, **69**: 291-298, 1987.

- SADUN, E.H., WILLIAMS, J.S., ANDERSON, R.J. Fluorescent antibody technic for sero-diagnosis of schistosomiasis in humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **105**: 289-291, 1960.
- SALGAME, P., ABRAMS, J.S., CLAYBERGER, C., GOLDSTEIN, H., CONVIT, J., MODLIN, R.L., BLOOM, B.R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and Cd8 T cell clones. *Science*, **254**: 279-282, 1991.
- SANTORO, F., LACHMAN, P.J., CAPRON, A., CAPRON, M. Activation of complement by *Schistosoma mansoni* schistosomula. Killing of parasites by the alternative pathway and requirement of IgG for classical pathway activation. *J. Immunol.*, **123**: 1551-1560, 1979.
- SHAKIB, F. & STANWORTH, D.R. Human IgG subclasses in health and disease, part 11. *La Ricerca Clinical Laboratory*, **10**: 561, 1980.
- SHAKIB, F., McLAUGHLAN, P., STANWORTH, D.R., SMITH, E.P. Eluated serum IgE and IgG4 in patients with atopic dermatitis. *Brit. J. Dermatol.*, **97**: 59, 1977.
- SHER, A., MACHENZIE, P., SMITHERS, S.R. Decreased recovery of invading parasites from the lungs as a parameter of acquired immunity to schistosomiasis in the mouse. *J. Inf. Dis.*, **130**: 626-633, 1974.
- SHER, A., KUSEL, J.R., PEREZ, H., CLEGG, J.A. Partial isolation of a membrane antigen with induces the formation of antibodies lethal to schistosomes cultured in vitro. *Clin. exp. Immunol.*,

18: 357-369, 1974.

- SHER, A., HIENY, S., JAMES, S.L., ASOFSKY, R. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with irradiated cercariae. II. Analysis of immunity in hosts deficient in T lymphocytes, B lymphocytes and complement. *J. Immunol.*, 128: 1880-1884, 1982.
- SHER, A., COFFMAN, R.L., HIENY, S., CHEEVER, A.W. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL5 or anti-IL4 antibodies fails to effect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *J. Immunol.*, 145: 3911-3916, 1990.
- SHER, A., COFFMAN, R.L., HIENY, S., SCOTT, P., CHEEVER, A.W. Interleukin 5 (IL5) is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87: 61-66, 1990.
- SIMPSON, A.J.G., KNIGHT, M., HAGAN, P., HADGSON, J., WILKINS, M.A., SMITHERS, S.R. The schistosomulum surface antigens of *Schistosoma haematobium*. *Parasitology*, 90: 449-508, 1985.
- SIMPSON, A.J.G., MACKETT, F., KELLY, C., KNIGHT, M., PAYARES, G., OMER-ALI, P., LILLYWHITE, J., FLECK, S.L., SMITHERS, S.R. The recognition of *Schistosoma* surface antigens by antibodies from patients infected with *S. mansoni* and *S. haematobium*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80: 261-270, 1986.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. Immunity in schistosomiasis. *Ann.*

- New York Acad. Sci., 160: 826-840, 1969.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. The immunology of schistosomiasis. *Adv. Parasitol.*, 7: 41-93, 1969.
- SMITHERS, S.R. & DOENHOFF, M.J. Schistosomiasis. In *Proceedings of the Sixth Symposium of the British Society for Parasitology - Immunity to Parasites* (Taylor, A.E.R., ed.), Blackwell Scientific, Oxford, 1982, pp. 55-66.
- SNAPPER, C.M. & PAUL, W.E. Interferon and cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, 236: 944, 1987.
- STANWORTH, D.R. & SMITH, A.K. Inhibition of reagin mediated PCA reactions in baboons by the human IgG4 subclass. *Clin. Allerg.*, 3: 37-41, 1973.
- STURROCK, R.F., KIMANI, R., COTTRELL, B.J., BUTTERWORTH, A.E., SEITZ, H.M., SIONGOK, T.K., HOUBA, V. Observations on possible immunity to reinfection among Kenyan schoolchildren after treatment for *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 363-371, 1983.
- STURROCK, R.F., BENSTED-SMITH, R., BUTTERWORTH, A.E., DALTON, P.R., KARIUKI, H.C., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., SIONGOK, T.K.A. Immunity after treatment and retreatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81: 303-314, 1987.
- TODD, C.W., GOODGAME, R.W., COLLEY, D.G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. V. Suppression of schistosome antigen-specific lymphocyte blastogenesis by adherent/phagocytic cells. *J. Immunol.*, 122: 1440-1446, 1979.

- VELLA, A.T. & PEARCE, E.J. The CD4⁺ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs rapidly develops through an early, transient Th0-like stage. *J. Immunol.*, 148: 2283-2290, 1992.
- VERWAERD, C., JOSEPH, M., CAPRON, M., PIERCE, R.J., DAMONNEVILLE, M., VELGE, F., AURIAULT, C., CAPRON, A. Functional properties of a rat monoclonal IgG antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 138: 4441-4446, 1987.
- VOGEL, H. & MINNING, W. The acquired resistance of *Macaca rhesus* to *Schistosoma japonicum*. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 4: 418-505, 1953.
- WARREN, K.S. regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man: immunology or ecology? *J. Inf. Dis.*, 127: 595-609, 1973.
- WEBBE, E. & JAMES, C. Acquired resistance to *Schistosoma mansoni haematobium* in the baboon (*Papio anubis*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67: 28-29, 1973.
- WIERENGA, E.A., SNOEK, M., JANSEN, H.M., BOS, J.D., VAN LIER, R.A.W., KAPSENBERG, M.L. Human atopen-specific types 1 and 2 T helper cell clones. *J. Immunol.*, 147: 2942-2949, 1991.
- WILKINS, H.A., GOLL, P.M., MARSHALL, T.F. DE C., MOORE, P.J. Dynamics of *Schistosoma haematobium* infection in a Gambian community. I. The pattern of infection in the study area. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 78: 216-221, 1984a.
- WILKINS, M.A., GOLL, P.M., MARSHALL, T.F. DE C., MOORE, P.J. Dynamics of *Schistosoma haematobium* infection in a Gambian community. III. Acquisition and loss of infection. *Trans. R.*

Soc. Trop. Med. Hyg., 78: 227-232, 1984b).

WILKINS, M.A., BLUMENTHAL, P., HAGAN, P., HAYES, R.J.,
TULLOCH, S. Resistance to reinfection after treatment of
urinary schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81:
29-35, 1987.

ZWINGBERGER, K., HOHMANN, A., DE BRITO, M.C., RITTER, M.
Impaired balance of interleukin-4 and interferon-gamma
production in infections with *Schistosoma mansoni* and
intestinal nematodes. *Scand. J. Immunol.*, 34: 243-253, 1991.

ZWINGBERGER, K., IRSCHIK, E., SIQUEIRA VERGETTI, J.G., CORREIA
DACAL, A.R., 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.*,
30: 463-473, 1989.