

JULIANA FROESELER FITTIPALDI

**RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS – IgE E
IgG – E A FORMA CLÍNICA DA ESQUISTOSSOMOSE
MANSÔNICA EM PACIENTES DO MUNICÍPIO DE PADRE
PARAÍSO, MINAS GERAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS

2006

JULIANA FROESLER FITTIPALDI

**RELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS – IgE E
IgG – E A FORMA CLÍNICA DA ESQUISTOSSOMOSE
MANSÔNICA EM PACIENTES DO MUNICÍPIO DE PADRE
PARAÍSO, MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia e Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof^a Deborah A. Negrão-Corrêa
Universidade Federal de Minas Gerais
Co-Orientador: Prof Carlos Maurício F. Antunes
Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS

2006

Coordenadores do Projeto Queixadinha

Dr^o José Roberto Lambertucci

Dr^o José Carlos Serufo

Laboratório de Imunofarmacologia

Dr^o Mauro Martins Teixeira

Dr^o Adriano L. S. Souza

Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Dr^a Mariângela Carneiro

Meus agradecimentos ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, na pessoa do Professor Pedro Marcos Linardi, coordenador da Pós-graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo apoio e incentivo.

Ao Léo, à minha mãe Patrícia, irmãos Tatty, Fred, Gui e Sá e meus avós Lila e Bebeto. Eu posso voar, mais alto que uma águia, pois vocês são o vento sob as minhas asas.

Amo vocês de todo meu coração!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre guiou meus passos, deu-me dons preciosos e colocou pessoas iluminadas em meu caminho;

À Sumara, mãe da Turma do BICO, que tantas vezes cedeu seu ombro para meus desesperos e me acalmou com seu sorriso, você foi muito importante em nossas vidas.

À minha orientadora Deborah A. Negrão-Corrêa, por ter me acolhido quando muitos me consideraram insana, por ter acreditado em mim e contribuído imensamente na minha formação. Obrigada pela confiança. Ao abrir as portas para que eu iniciasse um estudo em população humana, iniciei uma nova vertente que espero dar bons frutos. Seus conselhos e sua paciência nos meus arrabos e ansiedades permitiram que o caminho fosse mais suave.

Ao meu co-orientador Carlos Maurício F. Antunes, por suas ótimas aulas de Epidemiologia, por toda ajuda e aprendizado enriquecedor neste trabalho.

À Mariângela Carneiro, certa vez ouvi que era um anjo, tenho que concordar, porque é a bondade e humildade em pessoa, sempre paciente e disposta a ajudar. Muito obrigada pelas valiosas contribuições a este trabalho.

À Turma do BICO, que ficou marcada na história e em meu coração, Marcelle, Sílvia, Carol, Vânia, Elisa, Andrey, Michel, Daniel, Eveline, Bárbara e Haendel. Saibam que sentirei muita falta das alegrias, das músicas, das madrugadas nos descabelando, das ansiedades compartilhadas. Obrigada pelos conselhos e empurrões. Vocês significaram muito em minha vida pessoal e acadêmica. Amigos que levarei em meu coração para sempre.

À família do GIDE, estimado Professor Allan Lane de Melo (Prof Gide), Sr. Alberto, Zeni, Zé Carlos, Jéferson, Flor, Cíntia, Raquel, Karina, Fernanda, Maria, Michele, Débora. Em especial, Ana Terezinha, Adriana, Paula e Heidi, amigas de todas as horas, que tornaram muito divertidos meus momentos.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Andréia, Rosângela e Roberta, obrigada pela disponibilidade e auxílio. Elizabeth Moreno, amiga que contribuiu tanto nas discussões sobre os delineamentos desse trabalho, Marcelle e Érica, fundamentais para a realização das análises, amigas que me ensinaram o "be-a-bá" e me pegaram no colo quando o desespero chegava. Érica, seu dom com a formatação dessa "cria" fez toda a diferença.

Ao Professor Enrico Antônio Colósimo (ICEX) e Maria Arlene Fausto, pelo apoio estatístico e construção do modelo multivariado, com valiosos ensinamentos.

Ao Dr. Mauro Martins Teixeira, que muito contribuiu nas discussões, tornando os caminhos mais retos, divertidos e tranquilos. Aos colegas do Laboratório de Imunofarmacologia, em especial Adriano e Tiça, pela disponibilidade e auxílio nos ensaios.

Ao grupo de pesquisa do Projeto Queixadinha, coordenado pelo Dr. José R. Lambertucci, por terem me cedido os plasmas e o banco de dados dos pacientes do Córrego do Choro.

Aos pacientes que participaram deste estudo, indivíduos anônimos que auxiliaram no meu crescimento. Espero que os avanços nos estudos em esquistossomose possam servi-los.

À minha família, sempre presente em minha vida. Peço desculpas pelas ausências. Perdoem-me pelo nervosismo e pela falta de tempo.

Aos meus tios queridos, Lews, Dante, Cris, Xexéu, Dads e Tonzé, obrigada pelas vibrações e torcidas.

Aos meus avós (Lila e Bebeto), exemplo de honestidade e trabalho. Obrigada pelos valores que me permitiram melhorar a cada dia.

Lu, obrigada por seu carinho e confiança em mim.

Patrícia, minha Mãe, obrigada pela vida e por tudo que fez dela. Você sempre confiou em meus ideais e me incentivou a buscá-los, não importando o quão longe estivessem. E quando meus vãos eram muito altos (mesmo até a China) e às vezes me cansava ou caía, lá estava você a me pegar nos braços, me acalantar e me convencer de que eu era capaz.

Meus lindos irmãos, Tatty, Fred, Guigui e Sabrina. Acho que nem Deus podia imaginar o bem que me faria ao colocar vocês no meu caminho. Eu nada seria sem a força, a confiança e o amor incondicional de vocês.

Ao meu querido Léo, maravilhoso companheiro de todas as horas há mais de uma década, pelos momentos de carinho, incentivo, companheirismo e amor. Obrigada por respeitar minha dedicação a este trabalho e minhas ausências. E também pelos incentivos, conselhos, serenidade e pela paciência nos momentos de estresse. Com você do meu lado eu vou longe!

À família Vilaça, em especial Sônia, Sílvio, Paty, Digo e Codo, que há uma década me adotaram e sempre me incentivaram. Lutaram e vibraram comigo em cada conquista.

À turma da Biologia, que fez parte de muitos anos da minha construção como pessoa: Ana Tetê, Kekel, Flávia Adilson, Erlisson, Gilmar, Rose, Carlas Fátima e Maria, Camila, Cláudia, Elaine, Fagner, Leandro, Lis, Chico, Natasha.

Aos colegas e professores do Departamento de Parasitologia, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento. De todos, levarei exemplos para minha vida, seja de como agir ou como nunca fazer.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em particular ao Departamento de Parasitologia/ICB, por ter me abrigado e me fornecido as ferramentas para minha transformação.

À Epidemiologia, na qual me encontrei certa vez completamente apaixonada, esperando por seus ensinamentos do dia-a-dia. Roberto Campos Amado, iniciador deste ideal. Isabela, Valdelaine, Selma, companheiras e incentivadoras. Marinaldo, Karina e Enecláudia, super equipe de frente. Grazi, companheira de jornada. A todos vocês, valeu à pena.

Gostaria de agradecer de forma sincera a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Tenho aprendido.....

Que se aprende errando;

Que crescer não significa fazer aniversário;

Que o silêncio, às vezes, é a melhor resposta;

Que trabalhar significa não só ganhar dinheiro;

Que dinheiro não compra classe;

Que amigos a gente conquista mostrando o que somos;

Que os verdadeiros amigos sempre ficam até o fim;

Que a maldade se esconde atrás de uma bela face;

Que devemos sempre ter palavras doces e gentis, pois amanhã talvez tenhamos que engoli-las;

Que não se espera a felicidade chegar, mas se procura por ela;

Que quando penso saber tudo, ainda não aprendi nada;

Que a natureza é a coisa mais bela da vida;

Que a amar significa se dar por inteiro;

Que ninguém é perfeito, até que você se apaixone por esta pessoa;

Que um só dia pode ser muito importante que muitos anos;

Que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;

Que ouvir uma palavra de carinho faz bem à saúde e, às vezes, é tudo que precisamos;

Que dar carinho também faz;

Que ser gentil é mais importante do que estar sempre certo;

Que sonhar é preciso;

Que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo que pedimos;

Que Deus não fez tudo num só dia, o que me faria pensar que eu podia?

Que se deve ser criança a vida toda;

Que não importa a seriedade que a vida exija de você, precisamos de um amigo brincalhão;

Que o julgamento alheio não é importante;

*Que se você se nivelar a alguém, só permitirá que essa pessoa continue a magoar você;
Que nem sempre posso escolher como me sinto, mas posso escolher o que fazer a respeito;
Que o que realmente importa é a paz interior;
Que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorrem
quando você está escalando-a;
Que não se precisa morrer para aprender a viver.
E, finalmente, tenho aprendido que...
Quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer.*

(adaptado de William Sheakespeare)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas – variáveis categóricas, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	70
Tabela 2: Características clínicas – variáveis contínuas, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	71
Tabela 3: Variáveis associadas ao risco de infecção por esquistossomose da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	72
Tabela 4: Distribuição das variáveis potencialmente relacionadas a presença de co-infecções e agravamento de infecção por <i>S. mansoni</i> , população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	73
Tabela 5: Média de ovos por grama de fezes por faixa etária (anos), população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	75
Tabela 6- Perfil sintomático dos pacientes com esquistossomose na avaliação clínica, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	76
Tabela 7- Perfil sintomático dos pacientes com esquistossomose na ultra-sonografia (variáveis contínuas), população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	77
Tabela 8- Perfil sintomático dos pacientes na ultra-sonografia, variáveis categóricas, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	78
Tabela 9- Localização e grau de fibrose de Symmers nos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	78
Tabela 10- Comparação entre o grau de fibrose de Symmers e o número de ovos eliminados nas fezes, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	79
Tabela 11- Distribuição em categorias étnicas da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	80
Tabela 12- Distribuição da classificação molecular étnica pelo grau de fibrose da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	81
Tabela 13- Comparação entre a classificação étnica e carga de ovos eliminados nas fezes da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	81
Tabela 14- Distribuição das Imunoglobulinas-G avaliadas na população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	83
Tabela 15- Distribuição das Imunoglobulinas-E avaliadas na população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	86
Tabela 16- Média e DP das IgEs e IgGs pela carga parasitária dos pacientes da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.....	89

Tabela 17- Variáveis clínicas de alterações do fígado e correlação com IgG anti-SWAP (valor de p), população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.	91
Tabela 18- Modelo de análise Multivariada para IgE total, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.	98
Tabela 19- Modelo de análise Multivariada para IgE anti-SEA, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.	99
Tabela 20 - Modelo de análise Multivariada para IgE anti-SWAP, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.	99
Tabela 21- Modelo de análise Multivariada para IgG anti-SEA, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.	99
Tabela 22- Modelo de análise Multivariada para IgG anti-SWAP, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de <i>Schistosoma mansoni</i> nos seus hospedeiros, molusco <i>Biomphalaria</i> e homem, adaptado de Pearce & MacDonald, 2002.	29
Figura 2- Funções efectoras das subpopulações TCD4+ (Th1 e Th2), adaptado de López-Moreno 2002, modificado de Abbas et al., 1996).	39
Figura 3- Modulação da resposta imunológica no curso da infecção por <i>S. mansoni</i> adaptado de. Pearce & MacDonald, 2002.....	41
Figura 4- Foto dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> após separação.....	59
Figura 5- Curva Padrão de IgE, modelo4-parâmetros.....	65
Figura 6- Esquema de quantificação de anticorpos específicos através da adsorção na coluna de Sepharose.....	66
Figura 7- Distribuição dos pacientes, em faixa etária, por relato de contato com águas naturais ou não.	72
Figura 8- Distribuição dos indivíduos em faixas etárias, por ovos eliminados nas fezes.	74
Figura 9- Gráfico de Regressão linear da quantidade de ovos por grama de fezes por idade..	74
Figura 10- Distribuição dos valores de absorbâncias para IgG anti-SEA e anti-SWAP. Sombreado cinza representa nível de reatividade considerado com base na média de absorbância ± 2 DP dos plasmas dos pacientes normais.	82
Figura 11- Histograma de distribuição das IgGs anti-SEA e anti-SWAP.....	83
Figura 12 Perfil de adsorção de IgG anti-SEA (A) e anti-SWAP(B), com o cutt off ± 2 DP baseado na reatividade dos plasmas dos pacientes normais.....	85
Figura 13- Histograma das distribuições de IgEs total, anti-SEA e anti-SWAP – antes e pós-normalização por log10.....	86
Figura 14- Distribuição da IgE e IgG dos pacientes pelo relato de tratamento para esquistossomose na população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1992.....	88
Figura 15- Distribuição das IgEs e IgGs dos pacientes pelo relato de contato com águas naturais.	89
Figura 16- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgG anti-SWAP, pelo contorno do fígado.	91
Figura 17- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgG anti-SWAP, pelo diâmetro da veia porta.....	92
Figura 18- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgG anti-SEA e anti-SWAP, pelo tamanho do baço ao U.Som, maior ou menor que 82 mm.....	94

Figura 19- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgE total, pela espessura da parede da vesícula biliar, maior ou menor que 3 mm.....	95
Figura 20 – Quadro de classificação de graus de gravidade.....	95
Figura 21- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgG anti-SWAP, segundo classificação de gravidade.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	→	Micrograma
μL	→	Microlitros
μm	→	Micrômetros
BBS	→	Salina tamponada com borato
BSA	→	Albumina bovina
COEP	→	Comissão de Ética em pesquisa
EDTA	→	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	→	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima
Fc ϵ RI	→	Porção Fc do receptor 1
IFN- γ	→	Interferon-gama
Ig	→	Imunoglobulina
IgG	→	Imunoglobulina G
IgE	→	Imunoglobulina E
IL	→	Interleucina
IL-4	→	Interleucina-4
IL-5	→	Interleucina-5
IL-10	→	Interleucina-10
IL-13	→	Interleucina-13
Log	→	logaritmo
mL	→	mililitro
mm	→	milímetro
mmHg	→	milímetros de mercúrio
nm	→	Nanômetros

°C	→	Grau centígrado
OPD	→	Ortofenileno-diamino
OPG	→	ovos por grama de fezes
PAD	→	pressão arterial diastólica
PAS	→	Pressão arterial sistólica
PBS	→	Salina tamponada com fosfato
PBS/BSA	→	tampão fosfato com albumina bovina
PBS/T ₂₀	→	tampão fosfato com 0,05% de Tween 20
RPM	→	Rotações por minuto
SEA	→	antígeno solúvel de ovo de <i>S.mansoni</i>
SWAP	→	antígeno solúvel de verme adulto de <i>S.mansoni</i>
TCD4+	→	Linfócitos CD4 ativados
TGF	→	Fator de transformação e crescimento
Th1	→	Resposta imune do tipo 1
Th2	→	Resposta imune do tipo 2
TNF- α	→	Fator de necrose tumoral-alfa
U.Som	→	Ultra-sonografia

RESUMO

A esquistossomose mansônica é uma doença prevalente em várias regiões do mundo e no Brasil, particularmente no estado de Minas Gerais, representa um dos principais problemas de saúde pública. A forma crônica da doença é classificada em intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica, conforme as manifestações clínicas. Os fatores que levam alguns indivíduos a desenvolver fibrose periportal são pouco entendidos. Há indícios de que deficiências nos mecanismos de imunorregulação estariam envolvidas na patogenia da esquistossomose, levando ao desenvolvimento da fibrose hepática. Neste estudo, após a padronização de uma técnica de adsorção de anticorpos específicos das amostras de plasma em colunas de *Sepharose* conjugadas ao antígeno de ovo (SEA) ou de verme adulto (SWAP) foi possível medir os níveis de IgG e IgE específicos contra o parasito (anti-SEA e anti-SWAP), através da técnica de ELISA. Foi utilizado o banco de dados de um grupo de 97 pacientes com idade entre 14 e 68 anos, de ambos os sexos, bem caracterizados clínica, parasitológica e ultra-sonograficamente, procedentes de uma área endêmica para esquistossomose, no município de Padre Paraíso, nordeste de Minas Gerais. Esta população apresentou baixa carga parasitária, com mediana de 30 ovos por grama de fezes. Utilizando programas de análise estatística, os níveis de IgG e IgE específicos foram relacionados com os fatores da infecção, como sexo, idade, etnia, carga parasitária, contato com água, tratamento, além de medidas clínicas e ultra-sonográficas de órgãos. Foi verificado que os indivíduos que tiveram aumento da vesícula biliar (um dos principais marcadores de fibrose) apresentaram diminuição de IgE. Os dados encontrados sugerem que o aumento de IgE (total e específicas para SEA e SWAP) está relacionado à proteção contra a evolução do quadro de fibrose na esquistossomose. Enquanto a IgG aumentou com os marcadores de fibrose (aumento do baço e da espessura da veia porta), sugerindo que IgG, principalmente anti-SWAP, está relacionada à evolução da patologia para fibrose. Apesar de ter sido detectado uma associação positiva entre IgE e medição do fígado pelo lado ântero-posterior esquerdo, esta consiste num viés, visto que aumenta progressivamente com a altura e o peso dos indivíduos, consistindo num fator de confusão nas medidas, e por isso não deve ser usado para avaliações ultra-sonográficas. Comparando os níveis de IgE e IgG com idade, sexo, etnia e carga parasitária, foi verificado que IgG anti-SEA diminui com a idade. O dado sugere que com o passar da idade, em populações endêmicas, os níveis de IgGs, que não são protetoras, diminuem e isto ocorre independente de outros fatores. Não foi encontrada relação entre etnia, determinada por padrões moleculares e auto-avaliação, e IgE ou IgG específicos. Os dados sugerem que não importa a origem étnica (molecular ou auto-avaliação) do indivíduo para pressupor o prognóstico da evolução do quadro da esquistossomose. Quanto ao tratamento, houve diminuição significativa de IgE (total e específicas) nos pacientes que relatam tratamento. Os demais fatores não apresentaram relação com IgE e IgG. Então, a avaliação da resposta humoral específica contra o parasito serve como marcador do desenvolvimento de formas graves da patologia de esquistossomose.

Palavras chave: esquistossomose mansônica, fibrose, IgE, IgG, ultra-sonografia.

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is a prevalent disease in several areas of the world. In Brazil, the disease is particularly relevant in the state of Minas Gerais where it represents one of the main public health problems. The chronic form of the disease is classified in intestinal, hepatointestinal and hepatosplenic, according to the clinical manifestations. The factors that lead some individuals to develop periportal fibrosis are not well understood. There are indications that deficiencies in the immunoregulatory mechanisms would be involved in the pathophysiology of the schistosomiasis, especially in the development of hepatic fibrosis. In this study, we used an ELISA technique to measure the levels of parasite-specific IgG and IgE. To this end, we standardized a technique to adsorb specific antibodies in a Sepharose column conjugated to egg antigen (SEA) or adult worm antigen (SWAP) it was possible to measure the levels of IgG and specific IgE against the parasite, through ELISA. The database is composed by 97 patients from an endemic area of schistosomiasis, in Padre Paraíso, northeast of Minas Gerais. Patients were aged between 14 and 68 years, of both sexes, with well characterized clinical, parasitological and ultrasonographic diagnosis of *S. mansoni* infection. The population had low parasite load, with a median of 30 eggs per gram. The relationship between the levels of specific IgG and IgE with factors of the infection, as sex, age, race, parasite load, water contact, treatment, besides clinical and ultrasonographic measures of organs was evaluated. It was verified that the individuals that had increase of the gall bladder (one of the main fibrosis markers) were those who had the greatest decrease of IgE. The increase of IgE (total and specific for SEA and SWAP) was related to protection against the evolution of fibrosis in schistosomiasis. While IgG increased with the fibrosis markers (increase of the spleen and of the thickness of the portal vein), suggesting that IgG, mainly anti-SWAP, was related to the evolution of the pathology to fibrosis. When the levels of IgE and IgG were compared with age, sex, race and parasite load, it was verified that IgG anti-SEA decreases with the age. The result suggests that with increase of the age, in endemic populations, the levels of IgGs, that are not protective, decrease and this occurs independently of other factors. It there was no relationship among race, in molecular patterns, and specific IgE or IgG. The data suggests that the ethnic origin (molecular or self-evaluation) of the individual does not predict the evolution of schistosomiasis. The other factors did not relate with IgE and IgG. About the treatment, it was noted a significant decrease of IgE (total and specific) in the patients that were recently treated. Then, the evaluation of the specific humoral response against the parasite serves as marker of the development in severe cases of the pathology of schistosomiasis.

Key Words: schistosomiasis mansoni, fibrosis, IgE, IgG, ultrasound.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 – ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	26
2.2. FISIOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE	30
2.3.- ASPECTOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE FORMAS GRAVES DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	35
2.4 –RESPOSTAS IMUNÓLOGICAS.....	38
2.5 – ESQUISTOSSOMOSE VERSUS RESPOSTA IMUNÓLOGICA INDUZIDA POR <i>S.</i> <i>MANSONI</i>	41
2.5.1 - RESPOSTA HUMORAL – IgE e IgG4.....	45
3. OBJETIVOS	48
3.1- OBJETIVOS GERAIS	49
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. METODOLOGIA	50
4.1 – DELINEAMENTO DO ESTUDO E POPULAÇÃO ANALISADA	51
4.1.1 –ESTUDO ORIGINAL: PROJETO QUEIXADINHA	51
4.1.2 – DADOS DO PROJETO QUEIXADINHA	51
4.1.2.1 - QUESTIONÁRIO.....	52
4.1.2.2 – COLETA E EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES.....	52
4.1.2.3 – AVALIAÇÃO CLÍNICA	52
4.1.2.4 – AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA	53
4.1.2.5 – COLETA E ESTOQUE DO PLASMA	54
4.1.2.6 – CLASSIFICAÇÃO ÉTNICA	54
4.2 – SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DO BANCO DE DADOS	55
4.3 - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	56
4.4 - OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i>	57
4.4.1 - RECUPERAÇÃO DE VERMES.....	57
4.4.2 – PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE VERME ADULTO	58
4.4.3 - OBTENÇÃO E SEPARAÇÃO DE OVOS DE <i>S. MANSONI</i>	58
4.4.4 – PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE OVO.....	59

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE IgE	60
4.5.1 – CONJUGAÇÃO DA COLUNA DE SEPHAROSE	60
4.5.2 – INCUBAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA À COLUNA	61
4.5.3 – AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A ANTÍGENOS DE S.MANSONI NO PLASMA DOS PACIENTES.....	62
4.5.4 - QUANTIFICAÇÃO DE IgE.....	64
4.6- PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	67
5. RESULTADOS.....	69
5.1 – POPULAÇÃO ANALISADA	70
5.1.1 – DESCRIÇÃO DOS PARTICIPANTES	70
5.1.2 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO RISCO DE INFECÇÃO	71
5.1.3 – CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO POR S.MANSONI NA POPULAÇÃO DE ESTUDO	73
5.1.4 – DADOS CLÍNICOS.....	75
5.1.5 – DADOS ULTRA-SONOGRÁFICOS.....	76
5.1.6 – DADOS ÉTNICOS	79
5.2 – PERFIL DAS IMUNOGLOBULINAS.....	82
5.2.1 – IMUNOGLOBULINA-G.....	82
5.2.2 – ADSORÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PELA COLUNA DE SEPHAROSE.....	83
5.2.3 – IMUNOGLOBULINA-E	86
5.3 – ANÁLISE UNIVARIADA.....	87
5.3.1 – VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS	87
5.3.2 – VARIÁVEIS ÉTNICAS.....	90
5.3.3 – PATOLOGIA CLÍNICA E ULTRA-SONOGRÁFICA.....	90
5.3.3.1 – FÍGADO	90
5.3.3.2 – VEIA PORTA.....	91
5.3.3.3 – BAÇO	92
5.3.3.4 – VESÍCULA BILIAR.....	94
5.3.3.5 – QUADROS DE GRAVIDADE	95
5.4 – ANÁLISE MULTIVARIADA	97
6. DISCUSSÃO	101
6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	102
6.2 DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS.....	103

6.3 VARIÁVEIS ASSOCIADAS À INFECÇÃO.....	105
6.3.1 – IDADE, SEXO E CARGA PARASITÁRIA.....	105
6.3.2 - CONTATO COM ÁGUA E TRATAMENTO.....	110
6.3.3 - ETNIA.....	114
6.3.4 – AVALIAÇÃO DA GRAVIDADE EM ESQUISTOSSOMOSE.....	115
7. CONCLUSÕES.....	121
8. PERSPECTIVAS.....	124
9. REFERÊNCIAS.....	126
10. ANEXOS.....	137
ANEXO A – NÍVEIS NORMAIS DE IgG E IgE.....	138
ANEXO B- QUESTIONÁRIO CLÍNICO.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
ANEXO C- PARÂMETROS ULTRA-SONOGRÁFICOS, WHO 1991.....	141
ANEXO D- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	142
11. APÊNDICE.....	143
APÊNDICE A - ANÁLISE UNIVARIADA.....	144

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo e se mantém como uma das infecções parasitárias de maior prevalência na população humana, com significativas implicações para saúde pública em muitos países em desenvolvimento, principalmente no Brasil (WHO, 2002).

O controle da esquistossomose é difícil porque diversos elos envolvidos nesta cadeia epidemiológica têm que ser atingidos, como saneamento básico, educação sanitária, atendimento e tratamento dos doentes. Apesar de inúmeros esforços empregados e grandes campanhas de tratamento terapêutico, rara seria a extinção de foco de transmissão no Brasil, devido às precárias condições sanitárias e migrações constantes. Portanto, outras medidas são necessárias para que se obtenha o controle desta parasitose e/ou diminuição da patologia.

Estudos recentes indicam que algumas alterações imunológicas induzidas durante a infecção por *S. mansoni*, como a reação granulomatosa em resposta aos antígenos liberados pelo ovo do parasito retido no tecido (principalmente no fígado), estão relacionadas à proteção do hospedeiro; outras alterações à imunomodulação da resposta inflamatória. Nesse sentido, a formação do granuloma representa uma reação importante para contenção das toxinas do ovo; porém, sua não modulação pode resultar em excesso de deposição de colágeno nos espaços porta, culminando no quadro de fibrose periportal (Pearce & MacDonald, 2002).

A evolução dos quadros graves da esquistossomose depende - dentre outros fatores - da carga parasitária, fatores genéticos e, principalmente, da capacidade do hospedeiro modular a reação granulomatosa. A resposta imunológica é um importante fator que influenciará na definição do quadro. Fatores imunológicos, como produção de citocina antiinflamatória IL-10 (Wynn et al, 1998) e IL-13 considerado pró-fibrótico (Chiaramonte et al., 2003) são importantes para a modulação da resposta granulomatosa e, portanto, poderão estar associados ao

desenvolvimento ou não do quadro grave da esquistossomose. Da mesma maneira, outros elementos da resposta imunológica, como a resposta humoral, também podem estar associados com a morbidade da esquistossomose.

Neste contexto, Imunoglobulina-E tem sido descrita em diversos trabalhos relacionando-a com proteção na esquistossomose, tanto na diminuição da intensidade da infecção, quanto na proteção à reinfeção (Viana et al., 1995; Naus et al., 1999; Nyindo et al., 1999; Bonnard et al., 2004). Entretanto, a associação de IgE com patologia em humanos ainda é pouco conhecida. A correlação da resposta adquirida de isotipos específicos pode ser uma nova linha na avaliação de diferentes estágios da esquistossomose quando o uso da ultra-sonografia não é efetivo o suficiente (como nos estágios iniciais da hipertensão portal). O estudo desses fatores humorais poderá ser de grande importância para o prognóstico da doença e o desenvolvimento de novas terapias que visem o controle desta patologia.

Devido à dificuldade de se estudar amplamente a fisiopatologia da doença em humanos, a maioria dos estudos tem sido realizada em modelos experimentais, mas apenas alguns poucos trabalhos têm verificado a relevância dos achados experimentais em populações humanas. Dessa forma, estudos visando melhor conhecimento da doença, e principalmente das interações imunológicas induzidas por *Schistosoma mansoni* no homem tornam-se essenciais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

Trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma* estão entre os mais abundantes agentes de infecções em humanos (DeJong et al., 2001). As espécies *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* e *S. mansoni* completam o ciclo no homem causando sérios problemas de saúde pública. A esquistossomose é endêmica em 74 países em desenvolvimento, sendo estimado que aproximadamente 200 milhões de pessoas encontram-se infectadas (WHO, 2002). Um outro dado alarmante para o controle da esquistossomose é que 500 a 600 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão de doença, sendo que esta helmintose ainda é responsável por 14 mil mortes anualmente (WHO, 2002). A infecção por *S. mansoni* representa um grave problema de saúde pública no Brasil, especialmente em áreas hiperendêmicas dos estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Pernambuco e Alagoas (Amaral & Porto, 1994).

O *S. mansoni*, pertence ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda, subclasse Digenea, ordem Prosostomata, Família Schistosomatidae (Freitas, 1977). Este patógeno pode viver por muitos anos no sangue de seus hospedeiros mamíferos. Para o seu desenvolvimento, necessita de um hospedeiro definitivo, algumas espécies de mamíferos, principalmente o homem; e um hospedeiro intermediário, molusco do gênero *Biomphalaria*.

A espécie *S. mansoni*, descrita por Sambon em 1907, é o agente da esquistossomose mansônica ou moléstia de Pirajá da Silva, única das infecções causadas pelo gênero *Schistosoma* que é endêmica no Brasil, com aproximadamente 26 milhões de habitantes expostos ao risco da infecção (Rey, 1991). Nos últimos resultados de exames de fezes realizados pela Fundação Nacional de Saúde, o número de portadores foi estimado em 7,1

milhões em 1996 e 6,3 milhões em 1997 (Katz & Peixoto, 2000). Essa endemia está associada à falta de infra-estrutura e informação em que vivem certas populações, que utilizam coleções de água doce contaminadas com dejetos humanos que abrigam os moluscos hospedeiros intermediários deste parasito (Katz & Peixoto, 2000).

Acredita-se que a esquistossomose foi introduzida no Brasil, pelos portos de Salvador e Recife, em meados do século XVI, com o comércio de escravos africanos infectados. Estabelecidos os primeiros focos devido ao encontro de moluscos suscetíveis para o desenvolvimento das larvas deste parasito, a doença se dispersou, inicialmente por contigüidade e, posteriormente, pelas migrações internas e em decorrência da distribuição dos caramujos contaminados (Lambertucci et al., 1987; Amaral & Porto, 1994).

Os ovos maduros de *S. mansoni* eliminados no ambiente juntamente com fezes contaminadas do hospedeiro definitivo contêm larvas ciliadas, denominadas miracídios. Em contato com a água, os miracídios eclodem dos ovos e nadam ativamente à procura do hospedeiro intermediário para penetração. No Brasil, as principais espécies que atuam como hospedeiros intermediários são *Biomphalaria tenagophila*, *B. straminea* e *B. glabrata*, com grande ênfase para esta última espécie. Após a penetração no caramujo, os miracídios sofrem alterações na musculatura subepitelial e sistema nervoso, desenvolvendo-se em esporocistos primário, depois secundário em condições ideais de temperatura (entre 25 e 28°C) (Coelho, 1995). Estes migram da região cefalopodal para as glândulas digestivas ou hepatopâncreas do molusco para completar seu desenvolvimento, onde sofrem profundas modificações anatômicas e suas células germinativas podem originar as cercárias (Coelho, 1995). Segundo Jourdane et al. (1980) alguns esporocistos secundários também podem originar outra geração de esporocistos, que poderão gerar cercárias ou novos esporocistos. O desenvolvimento de *S. mansoni* em *Biomphalaria glabrata*, desde a penetração do miracídio até a produção de

cercárias e sua emergência para o meio aquático, pode ocorrer dentro de um período de 27 a 30 dias, em condições ideais de temperatura (cerca de 28°C).

A evolução do *S. mansoni* no hospedeiro definitivo inicia-se pela penetração ativa das cercárias através da pele e mucosa do hospedeiro, quando este entra em contato com águas infestadas por cercárias liberadas pelo hospedeiro intermediário. O processo de penetração das cercárias pode levar de 5 a 15 minutos (Coelho, 1995) e durante a penetração, as cercárias perdem a cauda e sofrem transformações estruturais e fisiológicas originando os esquistossômulos (Gordon & Griffiths, 1951). Nos primeiros cinco dias após infecção, pode ser verificado o quadro clínico de dermatite cercariana de aspecto urticariforme, com erupção papular, eritema, edema, prurido. Os esquistossômulos adaptam-se às condições fisiológicas do hospedeiro definitivo, migram pelo tecido subcutâneo em direção aos vasos sanguíneos e, através da circulação, são carreadas passivamente até os pulmões. Dos pulmões, os esquistossômulos chegam ao sistema porta-hepático, podendo usar duas vias para realizar esta migração: uma via sanguínea (tradicionalmente aceita) e outra transtissular. A migração pela via sanguínea é realizada a favor do fluxo sanguíneo, através da pequena circulação (pulmão-corção), sendo então disseminados pela aorta (grande circulação) para diversos pontos até chegar ao sistema porta intra-hepático. Já pela via transtissular, ocorreria a perfuração ativa do parênquima pulmonar pelos esquistossômulos, atravessando a pleura, o diafragma, e chegariam à cavidade peritoneal, alcançando o sistema porta intra-hepático. Acredita-se que ambas as vias de migração estão envolvidas, sendo a sanguínea a mais importante. Assim, os vermes completam o seu desenvolvimento no sistema porta-hepático, diferenciando-se em machos e fêmeas e atingindo a maturidade sexual, por volta do 30º dia de penetração, quando os vermes adultos vivem acasalados com a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho (Figura 1).

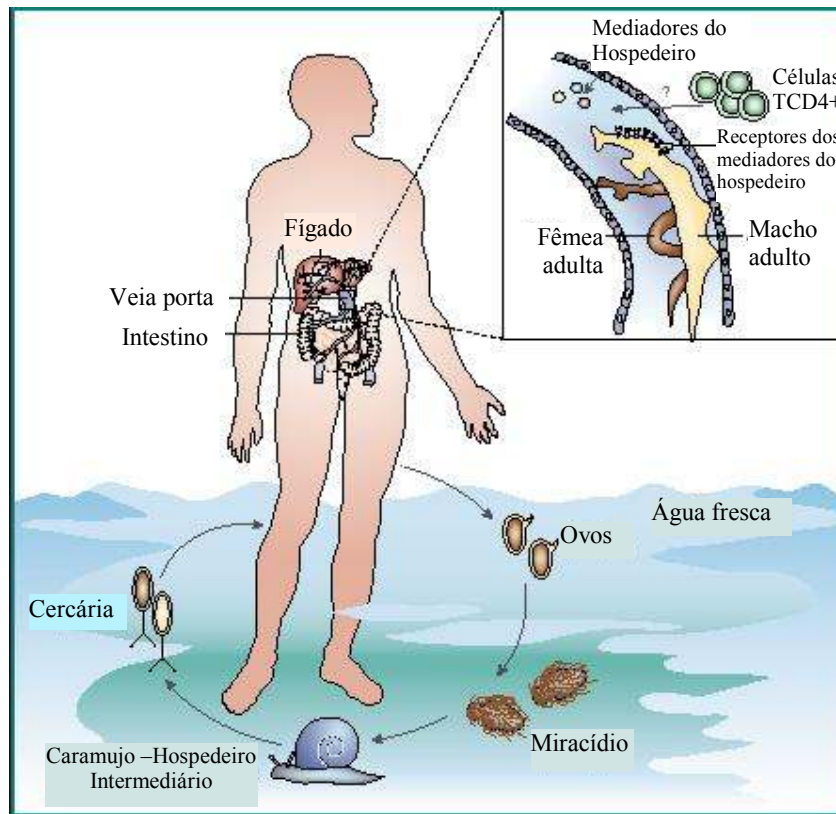


Figura 1- Ciclo de *Schistosoma mansoni* nos seus hospedeiros, molusco *Biomphalaria* e homem, adaptado de Pearce & MacDonald, 2002.

2.2. FISIOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose aguda humana é uma doença febril debilitante (febre de Katayama) que ocorre antes do aparecimento dos ovos no intestino (fase pré-postural), provavelmente até 40 dias pós-infecção. A fase aguda pode incluir os sintomas de anorexia, dor abdominal e cefaléia (Rabello, 1995). O indivíduo infectado pode apresentar um quadro clínico assintomático, comum em populações residentes em áreas endêmicas (Bina & Prata, 2003). Com menor frequência, pode relatar diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca. Ao exame físico pode ser encontrado hepatoesplenomegalia. Laboratorialmente, o achado de eosinofilia elevada é bastante sugestivo quando associado aos dados epidemiológicos.

Após migrarem para as veias mesentéricas inferiores os vermes iniciam a postura de ovos em torno de 35 dias após infecção. As fêmeas de *S. mansoni* produzem cerca de 300-400 ovos por dia, que são eliminados nos vasos sanguíneos, atravessam o endotélio e a membrana basal do vaso, a mucosa intestinal até alcançar a luz intestinal. Somente cerca de 40 % dos ovos de *S. mansoni* caem na luz intestinal e saem nas fezes. Estudos realizados com camundongos imunocomprometidos e em pacientes infectados com *S. mansoni* e HIV mostram que hospedeiros imunocomprometidos acumulam uma maior quantidade de ovos nos tecidos, portanto, a eliminação de ovos é dependente da resposta imunológica (Doenhoff, 1997; Pearce & MacDonald, 2002).

Desta maneira, uma grande parte dos ovos produzidos pelas fêmeas do *S. mansoni* fica retida no intestino do indivíduo ou, quando não deixam os vasos sanguíneos, são carreadas pelo fluxo do sangue e se acumulam principalmente no fígado, onde também se tornam alvos da resposta imune do hospedeiro, estimulando reações granulomatosas típicas (Boros & Warren, 1970).

O granuloma é uma resposta imunológica induzida por antígenos secretados pelos ovos de *S. mansoni*, através da estimulação específica dos linfócitos T-CD4, que produzem citocinas e quimiocinas, que são responsáveis pelo recrutamento das células que formarão o granuloma (Amiri et al., 1992). Os granulomas são estruturas pequenas (0,5-1,0mm de diâmetro), desprovidas de vascularização, compostas por fibras colágenas e células, especialmente macrófagos (diferenciados em células epitelióides ou células gigantes), eosinófilos e linfócitos T-CD4, que se organizam ao redor do ovo do parasito (Bogliolo, 2000).

A formação do granuloma constitui um importante mecanismo de defesa do hospedeiro que, desta maneira, é capaz de seqüestrar antígenos secretados pelo ovo do parasito retido no tecido. A importância deste mecanismo fica evidente em infecções de animais geneticamente deficientes; como exemplo, camundongos tolerizados para antígenos de ovos do parasito, não desenvolvem granuloma, mas apresentam graves lesões hepáticas (Fallon & Dunne, 1999; Dunne & Doenhoff, 1983).

Em alguns casos, macrófagos transformam-se em fibroblastos que se orientam igualmente em camadas concêntricas, em toda espessura do granuloma, e fabricam abundante quantidade de colágeno, até que, ao término de sua função, passem a fibrócitos, ocasionando a fibrose periportal. Dependendo do grau de fibrose, o hospedeiro pode apresentar alterações hemodinâmicas hepáticas e esplênicas, que afetam a fisiologia do sistema porta, levando aos sintomas graves associados à fase grave crônica da esquistossomose, como hepatoesplenomegalia e ascites (Pearce & MacDonald, 2002).

Segundo descrição de Oliveira e Andrade (2004), durante os estágios iniciais da infecção por esquistossomose, grandes granulomas ricos em eosinófilos, com os ovos em seu centro, são espalhados através dos espaços hepáticos. Estes espaços ficam aumentados devido ao edema e

infiltração celular, com predominância de eosinófilos polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos, próximos a estes granulomas periportal. Durante o estágio crônico, os espaços porta aumentam devido à fibrose e pela presença destes granulomas, representando a fibrose periportal. A vascularização de granulomas isolados é marcadamente diferente daquela vista na fibrose periportal, sendo os granulomas isolados avasculares, enquanto a fibrose, inicialmente, aparece ricamente vascularizada (Silva et al., 2006) o que demonstra a importância da angiogênese nesse processo e, posteriormente transforma-se em estrutura avascular, às vezes ainda delimitada na periferia por vasos (Baptista & Andrade, 2005).

A fase crônica da esquistossomose mansônica inicia-se após os seis meses de infecção, podendo durar vários anos, sem evidências da eliminação dos vermes adultos durante a infecção. Clinicamente, a maioria dos pacientes com esquistossomose crônica, que vive em área endêmica, apresenta as formas assintomática, intestinal ou hepatointestinal, não apresentando sinais e sintomas graves, sendo estes limitados a um ligeiro desconforto abdominal associado à diarreia. Esta fase intestinal pode persistir por anos no indivíduo, pela dificuldade no diagnóstico, devido a pouca intensidade de infecção (Lambertucci et al., 2000). Somente 5% dos pacientes infectados desenvolvem a forma grave denominada hepatoesplênica, caracterizada por uma intensa fibrose periportal (denominada fibrose de *Symmers*, descrita em 1904). A fibrose de *Symmers* é geralmente associada a sinais de hipertensão, com alterações congestivas e obstrutivas de ramos intra-hepáticos da veia porta, decorrente da deposição cumulativa de colágeno em granulomas hepáticos e ao longo da parede da veia porta que dificulta a perfusão sanguínea do órgão (Lambertucci, 1993; Silva et al., 2006). Como consequência, o baço aumenta por incremento do leito vascular e por hiperplasia do parênquima. A circulação colateral aumenta devido à formação de anastomoses que tentam diminuir a pressão sanguínea, desviando o sangue de áreas de elevada pressão.

Com frequência, as varizes podem romper-se, com perdas significativas de sangue, notadas através da hemoptise e perda de sangue pelas fezes, podendo levar ao óbito do paciente.

Este espessamento periportal necessita ser modulado, caso contrário pode levar o indivíduo ao óbito. A fibrose sem imunomodulação é a evolução mais temida das doenças crônicas que afetam o fígado; e, durante muito tempo, acreditou-se que a fibrose hepática extensa e de longa duração fosse um processo irreversível. Hoje pelo conhecimento do dinamismo do tecido conjuntivo se sabe que qualquer fibrose é reversível, desde que sua causa seja identificada e removida; visto que ele está sendo alterado e re-modelado constantemente. Quando as causas que provocaram estas alterações são eliminadas, ocorre o processo inverso (fibrólise), o excesso de tecido fibroso é removido e as lesões vasculares são remodeladas em esquistossomose, sendo que o tempo de remoção é diretamente proporcional à idade da fibrose (Andrade, 2004). Embora a fibrose em si tenha pouca significação fisiopatológica, sua gravidade está relacionada com as alterações vasculares que ela encerra. Os ductos biliares intra-hepáticos são usualmente e constantemente lesados no curso da esquistossomose, com presença de hiperplasia (Andrade et al., 1998; Oliveira & Andrade, 2004).

A identificação de pacientes com hepatoesplenomegalia baseava-se, principalmente, no diagnóstico clínico, sobretudo pelo aumento e consistência endurecida do lobo esquerdo do fígado, além do aumento do baço. Com a difusão do uso da ultra-sonografia para a avaliação de pacientes residentes em áreas endêmicas, além de outros métodos mais recentes como cardiografia com *echodoppler*, tomografia computadorizada e ressonância magnética, tornou-se claro que apenas o exame físico pode não refletir o estágio da esquistossomose. Estes exames puderam evidenciar que alguns pacientes que apresentavam diferentes graus de ecogenicidade ao exame ultrassonográfico, expressão da fibrose periportal, não eram diagnosticados no exame clínico grave da esquistossomose devido à ausência de

hepatoesplenomegalia (Lambertucci et al., 2000). Estes resultados introduziram uma nova perspectiva e expandiu os conhecimentos acerca da morbidade em esquistossomose. A ecogenicidade ultra-sonográfica correlacionou-se perfeitamente com os estudos patológicos de biópsia hepática (Homeida et al., 1988), e é de extremo auxílio no diagnóstico da fibrose de *Symmers*. O uso da ultra-sonografia é um marcador direto das formas de esquistossomose, mas este método requer experiência do operador e os resultados são operador-dependentes.

2.3.- ASPECTOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DE FORMAS GRAVES DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

A respeito da epidemiologia da doença, relata-se que em áreas endêmicas, existe um padrão de intensidade de infecção com a idade do hospedeiro, sendo observado que crianças albergam maior carga parasitária do que os adultos (Butterworth et al., 1994). A maioria das infecções é adquirida na infância e persiste por vários anos (Warren et al., 1974). Os adolescentes são portadores da maior prevalência e das maiores cargas parasitárias, o que pode estar relacionado ao sistema imunológico e aos aspectos comportamentais (Kabatereine et al., 1999; Mduluzi et al., 2001). Indivíduos infectados de área endêmica podem sofrer constantes reinfecções. Estudos epidemiológicos realizados nestas áreas indicam que a forma grave da doença pode estar associada à intensidade da infecção (Coura & Conceição, 1981; Proietti et al., 1992; Martins, 1997; Mohamed-Ali, 1999). Entretanto, a relação entre as manifestações clínicas da esquistossomose em populações humanas e intensidade da infecção não aponta sempre uma correlação positiva, visto que a doença hepatoesplênica ocorre após o pico de carga parasitária (Tanabe et al., 1997; Fallon et al., 2000).

Apesar de haver tratamento efetivo disponível, a reinfecção é altamente prevalente e pode desencadear o estabelecimento da patologia (Dutra et al., 2002), e representa um fator adicional de importância no desenvolvimento da forma hepatoesplênica da doença. Experimentos realizados em modelos murinos comprovam esta teoria, pois animais reinfectados exibiram uma maior proporção de fibrose periportal em comparação com animais com infecção única (Santos et al., 2000). Estes achados são válidos para o modelo murino, no entanto, deve-se ter cuidado para não transpô-los acriticamente para a patologia humana, visto que, na infecção humana, diversos outros fatores devem ser considerados na evolução clínica da doença.

Dessa forma, apesar da intensidade da infecção, determinada pela carga parasitária, ser um importante fator na determinação da progressão da doença, não é o único responsável pela evolução para as formas graves, especialmente a forma hepatoesplênica da doença nos seres humanos (Bina & Prata, 2003). Os fatores que levam alguns indivíduos a desenvolverem as formas graves da doença ainda não foram claramente estabelecidos e este conhecimento poderá ser primordial para o desenvolvimento de métodos eficientes para o controle das formas graves da esquistossomose mansônica. Kardoff et al. (1994) demonstraram que, em infecção humana, a deposição de colágeno no fígado pode ocorrer fora da região do granuloma podendo ocorrer fibrose hepática mesmo possuindo carga de ovos pequena.

Prata (1992) também sugere que a alta carga parasitária não é o único fator determinante das formas graves da doença, devendo-se considerar alguns fatores genéticos como importantes para a progressão da doença sendo que em algumas áreas do Brasil, a forma hepatoesplênica da esquistossomose ocorreria com frequência muito maior em brancos do que em negros. Mais recentemente, Dessein et al. (1999) mostraram em uma análise de segregação que a forma hepatoesplênica, mais frequente em algumas famílias, estava associada, principalmente, à presença de um gene – SM2, que é um gene principal codominante localizado na mesma região cromossômica que codifica o receptor-1 de IFN- γ . Foi sugerido que a maior incidência de doença grave nestes pacientes poderia estar associada à deficiência da modulação negativa da fibrinogênese no granuloma, devido a uma mutação que ocasionou a deficiência funcional de IFN- γ R1.

Uma importante característica das várias infecções parasitárias crônicas é a habilidade de invasão do patógeno e seu estabelecimento no hospedeiro, que asseguram um parasitismo bem sucedido, sem causar a morte do hospedeiro infectado. Para muitas infecções helmínticas, a modulação da resposta imunológica é crítica, porque a inflamação persistente

pode se tornar mais danosa para o hospedeiro do que para o patógeno invasor. A infecção por *S. mansoni* é um exemplo da importância desta imunomodulação, que diminui a reação granulomatosa ao redor dos ovos nos tecidos, reduzindo o nível da patologia e favorecendo a sobrevivência do parasito. Vários autores também sugeriram que a capacidade do hospedeiro de imunomodular o processo inflamatório desencadeado por antígenos liberados pelos ovos do parasito retidos nos tecidos, tem sido apontada como um importante fator determinante da forma grave da doença, que pode evoluir para a hepatoesplenomegalia (Wynn et al., 1994 e 1995; Fallon 2000; Pearce 2005). Assim, espera-se que algumas alterações imunológicas envolvidas na resposta protetora contra o verme adulto ou fatores que atuem na modulação da resposta granulomatosa possam estar associados positiva ou negativamente ao desenvolvimento de formas graves da esquistossomose.

2.4 –RESPOSTAS IMUNÓLOGICAS

As infecções produzidas por *S.mansoni* induzem uma resposta imunológica complexa, que varia no decorrer da infecção, devido à evolução do parasito e migração por diferentes órgãos ou tecidos do hospedeiro. A resposta imunológica é coordenada por linfócitos T-CD4+ virgens, que serão ativados inicialmente pelo reconhecimento de determinantes antigênicos apresentados ao complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHCII), expressos na superfície de células apresentadoras de antígeno específicas, como células dendríticas, linfócitos B e macrófagos. A especificidade da resposta imunológica induzida por linfócitos TCD4+ é iniciada através da expansão clonal seletiva, que se diferenciam em células efetoras, contribuindo para a proteção do organismo contra diversos agentes infecciosos (López-Moreno, 2002).

O entendimento do modelo de diferenciação celular em células T-CD4+, em diferentes perfis funcionais, principalmente nos tipos Th1 e Th2, tem sido crucial para o entendimento das bases que tornam uma resposta imunológica protetora ou patogênica em determinados hospedeiros e em resposta a diferentes patógenos (Mosmann et al., 1997). Esta classificação de polarização ocorre de acordo com o padrão de citocinas produzidas por estas células. Citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adquirida, em resposta a diversos antígenos, e que são mediadores moleculares da diferenciação funcional de células efetoras que participam da resposta imunológica. Os linfócitos Th1 secretam predominantemente IFN- γ , TNF- α e IL-2. Estas citocinas participam da ativação de macrófagos e na sensibilidade tardia. Por sua vez, linfócitos Th2 secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13, que são importantes na indução e proliferação de linfócitos B, com conseqüente produção de IgE e IgG4 (em humanos) e na diferenciação de eosinófilos e mastócitos (Mosmann et al., 1986 e López-Moreno, 2002) (Figura 2).

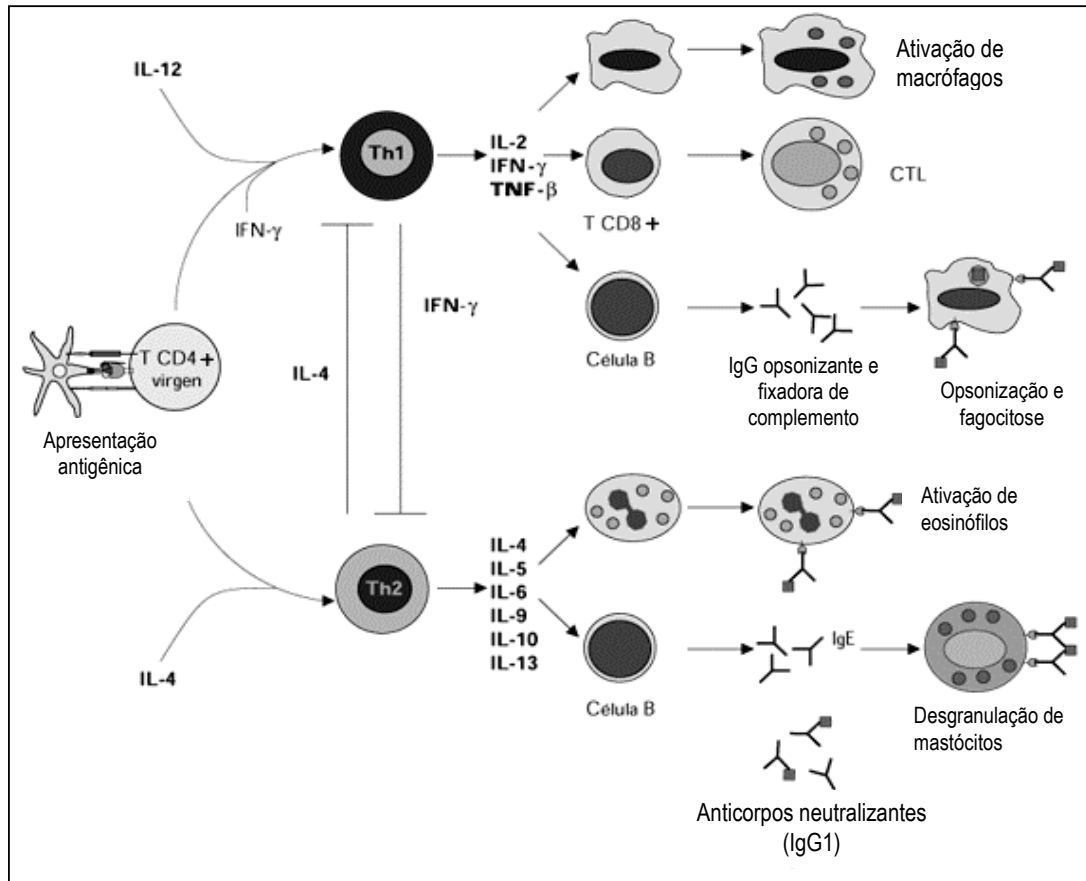


Figura 2- Funções efetoras das subpopulações TCD4+ (Th1 e Th2), adaptado de López-Moreno 2002, modificado de Abbas et al., 1996).

Um importante conceito que advém do estudo das respostas celulares de perfis Th1 e Th2, é o fato de que ambas as respostas se regulam mutuamente. Então, IFN-γ inibe o desenvolvimento de células Th2, enquanto IL-4 e IL-10 antagonizam a diferenciação celular em Th1 (Mosmann, 1996). Mais recentemente, os estudos têm focalizado na produção de quimiocinas e seus receptores, pois estas proteínas são citocinas com atividade quimiotática (Rossi & Zlotnik et al., 2000). Hoje está claro que as quimiocinas participam intimamente em muitas condições patológicas como inflamação e auto-imunidade. Também exercem um papel muito importante na homeostase, incluindo o desenvolvimento e migração linfocitária. Algumas quimiocinas têm potencial de aplicações terapêuticas, principalmente no câncer, devido à sua capacidade de atrair subpopulações de células linfocitárias e também por seus

efeitos angiostáticos (Rossi & Zlotnik, 2000). As doenças inflamatórias crônicas são caracterizadas pela presença de infiltrados celulares, neste contexto, as quimiocinas são primariamente responsáveis pela infiltração celular observada em muitas doenças. Na esquistossomose elas atuam como mediadores inflamatórios com papel importante na definição da resposta imunológica e no recrutamento dos vários tipos celulares para o granuloma esquistossômico (Wynn & Cheever, 1995).

2.5 – ESQUISTOSSOMOSE VERSUS RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA POR *S. MANSONI*

No curso da infecção da esquistossomose mansônica, a resposta imunológica progride por diferentes estágios. Nas primeiras semanas (3 a 5 semanas pós-infecção), período de migração dos esquistossômulos, diferenciação e maturação dos vermes adultos, a resposta imunológica observada nos hospedeiros é predominantemente caracterizada por um aumento de citocinas de perfil Th1 (Pearce & MacDonald, 2002) (Figura 3).

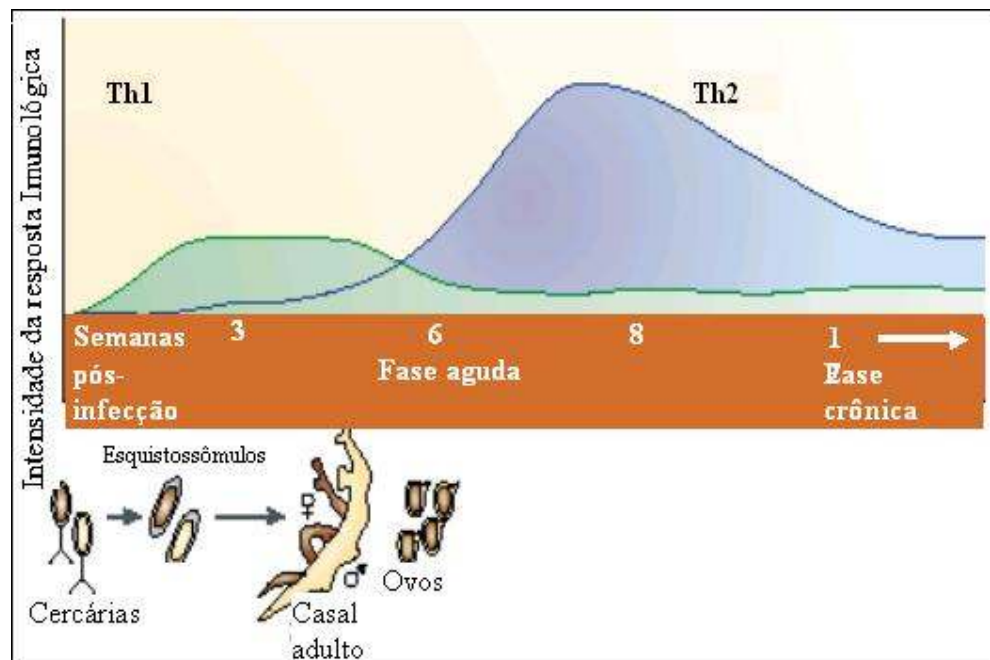


Figura 3- Modulação da resposta imunológica no curso da infecção por *S. mansoni* adaptado de Pearce & MacDonald, 2002.

O IFN- γ estimula o desenvolvimento das células Th1, principalmente pela capacidade de estimular nas células T a expressão dos receptores funcionais para IL-12, que é a principal citocina indutora da resposta Th1 (Montenegro et al. 1999). Este estudo ainda relata que a fase aguda na esquistossomose está associada com uma significativa resposta de IFN- γ e que IL-10 contribui para a supressão desta resposta durante as infecções crônica e aguda. Com a

progressão natural da doença, que é marcada pelo desenvolvimento da maturidade sexual, acasalamento dos vermes e início da produção de ovos (cerca de 5 a 6 semanas pós-infecção), ocorre marcante alteração do perfil imunológico, associada com o desenvolvimento de uma forte resposta Th2, inicialmente induzida pelo antígeno do ovo (Pearce & MacDonald, 2002) (Figura 3).

A resposta de perfil Th2 CD4+, secretando IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 inibe as funções produtoras e efectoras dos mediadores pró-inflamatórios característicos de perfil Th1. IL-10 é uma citocina muito importante nesta fase da infecção, atuando como moduladora da resposta Th1. Por ser um inibidor dos macrófagos ativados, está envolvida no controle homeostático das reações da imunidade inata e adquirida, através da inibição das respostas imunes do hospedeiro, regulando a secreção das citocinas por estes macrófagos, principalmente IL-12, IFN- γ e TNF- α reduzindo a inflamação granulomatosa. A produção de IL-10 tem um papel crucial no processo de diferenciação dos linfócitos em Th2 neste período (Montenegro et al., 1999) e atuando no balanço Th1 e Th2 (Wynn et al., 1998). A continuação do ciclo do *S. mansoni* é dependente do tipo e intensidade da resposta imunológica do hospedeiro a antígenos ativamente secretados pelo ovo do parasito que facilita a passagem do ovo do sangue para a luz intestinal (Dunne & Pearce, 1999).

Há evidências de que a indução da resposta Th2 e a formação do granuloma são protetores para o indivíduo. O equilíbrio da resposta imunológica é mantido pelos eventos positivos e negativos, que se torna um dilema para o hospedeiro que necessita regular o sistema imune, não apenas para defesa contra parasitos invasores, mas também para minimizar os efeitos patológicos. A característica da resposta imunológica no hospedeiro com esquistossomose é a inflamação crônica, mas esta não é suficiente para eliminar o patógeno, resultando na persistência da infecção crônica (Cai et al., 2006).

O processo inflamatório, denominado granuloma, induzido pela presença do ovo de *S. mansoni*, é dependente de citocinas tipo Th2. Estudos realizados em camundongos relatam uma correlação entre a inabilidade de formação ou desenvolvimento dos granulomas e a persistência de uma alta resposta pró-inflamatória Th1 após a fase aguda e o desenvolvimento de doença hepatotóxica (Fallon, 2000). Em humanos, algumas evidências sugerem que hepatoesplenomegalia está correlacionada com elevados níveis séricos de citocinas de perfil Th1 (Zwingerberger et al., 1990; Mwatha et al., 1998).

Ainda que a indução da resposta Th2 tenha um papel crucial protetor na formação do granuloma, no desenvolvimento desta doença potencialmente fatal durante os estágios iniciais, uma resposta Th2 prolongada pode contribuir para o desenvolvimento da fibrose hepática e forma crônica grave, necessitando de modulação (Cheever et al., 2000). Durante a fase crônica da infecção, em que é contínua a deposição diária de ovos, a resposta Th2 é modulada e os granulomas que se formam em torno do ovo tornam-se gradativamente menores. É possível que uma deficiência nos mecanismos responsáveis pela regulação da resposta inflamatória após a destruição dos ovos possam predispor alguns indivíduos a uma resposta imune vigorosa e continuada que, eventualmente, resulte no desenvolvimento da doença hepatoesplênica (Pearce & MacDonald, 2002).

Células de perfil Th2 caracterizam a resposta do hospedeiro depois da modulação da infecção por *S. mansoni*. Um estudo comparativo de formas clínicas da esquistossomose em camundongos geneticamente deficientes para IL-13 e IL-4 sugere que IL-4 é necessária para a contenção do ovo, mas IL-13 é um agente pro-fibrótico (Fallon, 2000). Neste experimento, a maioria dos animais deficientes em IL-4 morre no início da fase crônica com graves lesões hepáticas, por não conseguirem desenvolver uma resposta Th2 e formar granulomas

adequados. IL-4 é o principal estímulo para a produção de IgE e para a diferenciação/desenvolvimento das células Th2 a partir das células TCD4+ auxiliares virgens e funciona tanto como indutora quanto efetora da resposta Th2. Já a IL-13 foi identificada em estudos recentes como a principal mediadora de fibrose hepática, responsável pela indução de produção de citocinas Th2 (Chiaramonte et al, 2003), e conseqüentemente, torna-se um alvo terapêutico para inúmeras doenças debilitantes nas quais há aumento de produção desta citocina (Mentink-Kane & Wynn, 2004).

A IL-5 é um ativador de eosinófilos maduros e estimulador do crescimento e diferenciação dos eosinófilos e atua como mediador entre a ativação da célula Th2 e a inflamação eosinofílica. Os eosinófilos expressam receptores Fc específicos para anticorpos IgE e, por isso, são capazes de ligar aos microrganismos revestidos com IgE, tais como helmintos, matando-os. Quando culturas de células de sangue de pacientes com pouca intensidade de ovos (<200 opg) são estimuladas com antígeno de verme adulto, ocorre menor a produção de IL-5 em pacientes mais velhos (Scott et al., 2004), enfatizando “idade” como um fator importante para um determinado padrão de resposta imunológica.

Assim, as células T CD4+ estão envolvidas, seja induzindo um aumento de resposta aos antígenos de ovo nos pacientes susceptíveis ao desenvolvimento de hepatoesplenomegalia, ou mesmo na produção de citocinas que regulam os níveis de isotipos associados à resistência à infecção, principalmente IgE (Hagan et al., 1991; Dunne et al., 1992).

Por problemas na definição do fenótipo da doença e no controle de possíveis fatores de confusão, como intensidade da infecção, etnia, gênero e idade do hospedeiro, a maioria dos estudos em humanos tem dificuldades em estabelecer associações significativas entre expressão de citocinas específicas e doença hepatoesplênica (Dunne & Pearce, 1999).

2.5.1 - RESPOSTA HUMORAL – IgE e IgG4

Ao contrário das infecções virais, por bactérias e protozoários, a resposta imunológica de combate a helmintos é caracterizada por elevados níveis de anticorpos, principalmente IgE antígeno-específico.

Um elemento da resposta imune do hospedeiro vertebrado que tem sido associado ao desenvolvimento de diferentes formas clínicas observadas na esquistossomose, é a produção de anticorpos, principalmente IgE e IgG4, pelos adultos de áreas endêmicas. Durante a evolução da esquistossomose no hospedeiro vertebrado alguns anticorpos são produzidos em resposta aos antígenos liberados do helminto, em todas as suas fases de vida, principalmente enquanto ovo e verme adulto, mas nem todos os anticorpos são relevantes na imunidade e alguns podem, inclusive, prevenir a ocorrência desta imunidade (Demeure et al., 1993).

A grande maioria dos trabalhos mostra que IgE anti-SWAP está associado a proteção contra o verme adulto de *S. mansoni*, e que IgG4 pode bloquear este efeito. Assim IgE poderia ter um efeito indireto na patologia por diminuir carga parasitária e por proteger contra reinfecções (Hagan et al., 1991; Grogan et al., 1997; Corrêa-Oliveira et al., 2000; Mdulusa et al., 2001). Dunne et al. (1992 e 1997), sugerem que a eliminação do *S. mansoni* e proteção à reinfecção estão associadas ao aumento, com a idade, dos níveis de anticorpos IgE e diminuição de IgG4 específicos contra antígenos de verme adulto no soro do hospedeiro. Entretanto, pouco se sabe da sua associação com patologia.

Uma possível função antagônica para IgG4 e IgE tem sido justificada pela possibilidade de IgG4 agir como um anticorpo bloqueador para a função protetora mediada por IgE, podendo

apresentar a mesma especificidade de IgE. Dessa maneira, o possível efeito protetor da IgE anti-antígenos do verme adulto de *S. mansoni* resultaria em diminuição da carga parasitária e da deposição de ovos e, conseqüentemente, afetaria a ocorrência da forma grave da doença (Rihet et al., 1991; Dunne et al., 1992; Demeure et al., 1993; Jankovic et al., 1997; King et al., 1997). Estes autores, em evidências experimentais também sugerem que a elevação dos níveis de IgE reativos contra antígenos de verme adulto de *S.mansoni* pode conferir proteção à reinfeção pós-quimioterapia, fator que também pode refletir no desenvolvimento da patologia associada à esquistossomose.

Infecções experimentais utilizando camundongos geneticamente deficientes na produção de IgE confirmam a importância desta imunoglobulina para o controle da carga parasitária, pois a infecção por *S.mansoni* nestes animais resultou em um aumento significativo da carga parasitária comparado ao grupo não deficiente. Entretanto, sua participação no controle da patologia não ficou esclarecida, já que nos animais deficientes, os granulomas apresentaram-se reduzidos (King et al., 1997). Por outro lado, Jankovic et al. (1997) mostraram que a infecção por *S.mansoni* em camundongos geneticamente deficientes para o receptor de alta afinidade de IgE (FcεRI) altera a resposta granulomatosa induzida pelos ovos do parasito. Neste estudo, foi demonstrado que os níveis de citocinas tipo Th2 e IgE eram compatíveis com o observado em animais não deficientes infectados pelo mesmo parasito, mas os granulomas apresentam-se muito aumentados com desenvolvimento de fibrose hepática.

Devido a possibilidade de níveis elevados de IgG4 interferirem na função de IgE, estudos referentes ao papel de IgE na esquistossomose humana devem, simultaneamente, considerar a participação de IgG4, outra classe de imunoglobulina humana induzida pela produção de IL-4. Bonnard et al. (2004) encontraram níveis altos de IgG4 anti-SEA nos pacientes com formas graves de patologia, em comparação com aqueles sem nenhuma patologia. Também níveis

altos de IgE foram relatados em pacientes com fibrose em comparação àqueles sem fibrose, entretanto, sem diferença estatística entre os grupos. Também Silveira et al. (2002a) demonstraram que os níveis de IgG4 anti-SEA foram significativamente maiores no soro dos pacientes com fibrose comparado aos níveis desta imunoglobulina em pacientes sem fibrose, e não detectaram nenhuma diferença para IgE entre os grupos. Nestes estudos, o nível de IgE pode não ser real devido ao bloqueio por outras imunoglobulinas que geralmente estão presentes em quantidades muitas vezes maiores (Wallach, 1999; ANEXO A).

Desta maneira, fica evidente que o papel da produção do IgE no desenvolvimento da patologia associada às formas graves de esquistossomose precisa ser melhor definido, especialmente em populações humanas.

3. OBJETIVOS

3.1- OBJETIVOS GERAIS

Verificar possíveis associações entre níveis de IgE e IgG reativos a antígenos de ovo (SEA) e de verme adulto (SWAP) de *S. mansoni*, e o desenvolvimento das formas graves em pacientes com esquistossomose mansônica, selecionados de área endêmica de Córrego do Choro, município de Padre Paraíso-MG.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os níveis plasmáticos de IgE e IgG, reativos a antígenos do ovo (SEA) e de verme adulto (SWAP) de *S.mansoni*;

Identificar inter-relação existente entre as características ultra-sonográficas, clínicas, étnicas e sociais e as formas graves da esquistossomose mansônica relacionadas aos pacientes do estudo;

Comparar os níveis de anticorpos específicos (IgE e IgG) produzidos em resposta à infecção, com a carga parasitária e a gravidade da esquistossomose revelada pelo exame clínico e ultra-sonográfico, além das variáveis étnicas e sociais na população de estudo.

4. METODOLOGIA

4.1 – DELINEAMENTO DO ESTUDO E POPULAÇÃO ANALISADA

4.1.1 – ESTUDO ORIGINAL: PROJETO QUEIXADINHA

O Projeto Queixadinha foi um estudo de campo, realizado por uma equipe multidisciplinar da Faculdade de Medicina da UFMG em uma área endêmica para esquistossomose mansônica, iniciado na década de 90. Esta área compreendia várias localidades da região do Jequitinhonha, norte de Minas Gerais, que apresentavam alta prevalência de esquistossomose (em torno de 80%) na época do estudo.

O estudo atual constitui um desdobramento do Projeto Queixadinha e trata-se da avaliação seccional de uma amostra dos pacientes originalmente examinados, sendo selecionados os indivíduos examinados do Município de Padre Paraíso (antigo distrito de Carai), situado na região do médio Jequitinhonha, a 102 Km de Teófilo Otoni, no nordeste de Minas Gerais, na região de Córrego do Choro (umas das localidades de Queixadinha), em 1999.

Nesta área, o banco de dados original do Projeto Queixadinha continha dados de 141 pacientes de 0 a 80 anos, que foram entrevistados por meio de um questionário estruturado e posteriormente avaliados clínica e ultra-sonograficamente. De cada paciente também foi realizada a coleta de fezes para exame parasitológico e coleta de sangue para estudos posteriores.

4.1.2 – DADOS DO PROJETO QUEIXADINHA

Os itens seguintes descrevem as investigações realizadas no Projeto Queixadinha e os critérios adotados para classificação dos pacientes. As informações obtidas constam de um banco de dados estruturado no programa EPI-INFO.

4.1.2.1 - QUESTIONÁRIO

O questionário (ANEXO B) continha informações tais como sexo, idade, etnia, estado civil, tratamentos anteriores, relato de contato com águas e frequência. Também constam os dados do resultado da anamnese clínica e ultra-sonográfica. As entrevistas foram realizadas individualmente por estudantes previamente treinados. As avaliações clínicas e ultra-sonográficas foram realizadas por médicos da equipe.

4.1.2.2 – COLETA E EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES

Para a investigação parasitológica utilizou-se o método coproscópico de Kato-Katz (Katz et al., 1972), recomendado para o encontro de ovos de *Schistosoma mansoni*. Foram coletadas duas amostras fecais de cada paciente, em dias alternados, sendo examinadas duas lâminas por amostra. Os exames foram realizados no Posto de Saúde local e os resultados foram incluídos no banco de dados com a conversão de ovos por grama de fezes (opg). Além disso, foi realizada a transformação em logaritmo da variável opg para normalizar a distribuição.

4.1.2.3 – AVALIAÇÃO CLÍNICA

A equipe do estudo original realizou diversas avaliações clínicas importantes para o estabelecimento de critérios de graus de gravidade da esquistossomose mansônica, que constou de medidas de pressão arterial, ausculta, presença de hematemesa (vômito com sangue) e de veias colaterais e palpação abdominal.

Na avaliação do fígado, foi apalpado o lobo direito e esquerdo, e sempre que o fígado foi palpável, a borda foi classificada como lisa ou nodular, a superfície como lisa ou rugosa e a

consistência em normal, endurecida ou dura. Sua dimensão foi referida em centímetros medida na linha direita em relação ao rebordo costal direito.

A palpação do baço (Tavares-Neto & Prata, 1990) foi realizada em decúbito dorsal e em decúbito lateral direito. Se palpável, as dimensões foram definidas em centímetros em relação ao rebordo esquerdo costal. Também foi verificada a sua consistência classificada em normal, dura ou endurecida.

4.1.2.4 – AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA

Todos os pacientes realizaram a avaliação ultra-sonográfica segundo metodologia descrita por Coutinho (1990) e por Lambertucci et al. (2000), realizada pela equipe de clínicos do Projeto Queixadinha da Faculdade de Medicina da UFMG.

A região hepática recebeu análise mais minuciosa, com vários cortes mensurados, segundo Homeida et al. (1998), como diâmetro antero-posterior e longitudinal dos lobos direito e esquerdo do fígado, ausência ou presença de fibrose hepática, bem como seus graus e distribuição (central e/ou periférica), calibres da veia porta, mesentérica superior e esplênica; presença de colaterais porto-sistêmicas, espessuras da parede portal e da vesícula biliar, diâmetro longitudinal do baço. As medidas de normalidade para cada veia (calibre) ou órgão (espessura, diâmetro) encontram-se em anexo (ANEXO C).

Foi adotada a classificação da Organização Mundial de Saúde - WHO (1991) para categorizar as formas clínicas pela infecção pelo *S.mansoni*, conforme o perfil ecogênico do espessamento periportal (dilatação das veias porta e esplênica e as colaterais porto-sistêmicas):

- Grau 1 (ausência de fibrose) com espessamento das paredes dos ramos periportais menor que 3mm;
- Grau 2 (fibrose leve) com espessamento entre 3 e 5mm;
- Grau 3 (fibrose moderada) com espessamento de 5 a 7mm, espessura da parede da vesícula biliar superior a 5 mm; e
- Grau 4 (fibrose intensa) com espessamento superior a 7mm, espessamento da parede da veia porta do hilo maior que 9mm e/ou espessura na bifurcação da veia porta maior que 6mm.

4.1.2.5 – COLETA E ESTOQUE DO PLASMA

Coletou-se uma amostra de 5mL de sangue venoso dos indivíduos em tubo *Vacutainer*® com EDTA. O plasma foi devidamente separado do sangue, rotulado, estocado a -20°C e foi utilizado para os testes imunológicos. Após a coleta, a estocagem do plasma garantiu a conservação, não tendo sido descongelada até o presente estudo.

4.1.2.6 – CLASSIFICAÇÃO ÉTNICA

O estudo do Projeto Queixadinha constou também de critérios para designação de etnia da população, considerada sob aspectos fenotípicos, auto-classificação e análise de marcadores moleculares.

Para a auto-classificação foi perguntado ao paciente, durante a anamnese se ele se classificava como branco, miscigenado ou negro.

Para designar marcadores fenotípicos, foram avaliados caracteres biológicos como cor da pele (parte inferior do braço), tipo e cor de cabelo, conformação do crânio e do rosto, do nariz e

lábios, e outros. Esta classificação fenotípica foi baseada na comparação direta com modelos descritos de Atlas de morfologia humana (Thomas-Domenech & Padilla-Boliva, 1965):

- Branco: pele branca, cabelos lisos ou ondulados, nariz afilado, lábios finos ou médios, independentemente da pigmentação dos olhos e cabelos;
- Negro: pele negra, cabelos pretos e crespos, olhos pretos e lábios grossos;
- Intermediários: todos com características intermediárias.

Conforme descrito por Parra et al. (2003), para avaliar marcadores moleculares foram escolhidos como padrões de comparação três amostragens de populações consideradas representativas. O primeiro constando de 20 indivíduos representando os brancos da Europa (Distrito de Porto, Portugal), o segundo com 20 indivíduos representando os negros da África (Ilha Santana em São Tomé, costa da África) e o terceiro grupo com 10 indivíduos ameríndios (tribos amazônicas, Brasil). A população em estudo foi analisada e pontuada comparativamente com as etnias padrões através da análise de 10 marcadores denominados PSAs (*Population-specific alleles*), definidos por Parra et al. (1998). A frequência alélica de cada indivíduo foi estimada pelo método de contagem de genes através do Index de ancestralidade africana (AAI). Na população de estudo foram encontradas as etnias:

- Branca (origem européia): definidos pelos marcadores moleculares de $-11,5$ à $-4,9$;
- Negra (origem africana): definidos pelos marcadores moleculares acima de $-4,9$ e abaixo de $+0,11$;
- Miscigenados (etnias intermediárias com a mistura dos marcadores moleculares de ambas as etnias citadas): marcadores moleculares de $+0,11$ à $+10,8$.

4.2 – SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DO BANCO DE DADOS

Conforme descrito anteriormente, os pacientes selecionados para o presente estudo foram selecionados do banco de dados original, constituído de 140 pacientes provenientes do Município de Padre Paraíso; entretanto, para as análises imunológicas foram retiradas as crianças (≤ 13 anos) e idosos acima de 70 anos, restando 97 pacientes de 14 a 68 anos. A justificativa de inclusão destes pacientes se deve a uma resposta imunológica melhor formada e mantida nesta faixa etária. O que difere da resposta imunológica montada por crianças abaixo de 14 anos e adultos acima de 68 anos (Speziali et al., 2004).

A coleção de plasma dos pacientes selecionados para este estudo, que não havia sido descongelada previamente, foi utilizada para os testes imunológicos. Após o primeiro descongelamento, as amostras foram devidamente aliquotadas sob fluxo estéril para a realização dos diferentes procedimentos proposto neste projeto. Para controle negativo das análises imunológicas foram incluídas amostras de plasma de 10 voluntários não infectados por *S. mansoni*.

No estudo original, foi criado um banco de dados com todas as informações obtidas dos indivíduos participantes do projeto (variáveis demográficas, clínicas, parasitológicas e étnicas), em programas EPI-INFO versão 6.04 e STATA versão 6.0 (STATA CORP, 1999). No presente estudo, as variáveis do banco de dados original foram acrescentadas ao banco de dados das variáveis imunológicas, criado neste estudo, utilizando o programa EPI-DATA 2.1. A análise foi realizada utilizando-se os programas STATA versão 9.0 e PRISMA 3.0.

4.3 - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O consentimento dos indivíduos foi obtido antes da realização dos exames e após esclarecimentos acerca de todo procedimento, mediante a assinatura de um termo de

consentimento. Os resultados dos exames foram encaminhados pessoalmente ou entregues ao Serviço Municipal de Saúde.

Os pacientes, independentemente da aceitação em participar do estudo, receberam tratamento específico para esquistossomose, oxaminiquine oral na dosagem única de 15 mg/Kg para adultos e 20 mg/Kg para crianças. Outras doenças diagnosticadas foram tratadas ou encaminhadas para propeidêutica especializada.

O Projeto Queixadinha foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG (COEP). Os Serviços Municipal de Saúde e Fundação Nacional de Saúde aprovaram o estudo e participaram de sua execução.

Este projeto, ainda que extensão de um projeto mais amplo, também foi individualmente submetido à avaliação do COEP, para utilização das amostras de plasma, ficando sua realização aprovada conforme número ETIC 274/05 (ANEXO D).

4.4 - OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

4.4.1 - RECUPERAÇÃO DE VERMES

Os camundongos *Swiss* com 45-50 dias de infecção pelo *Schistosoma mansoni* cepa LE, foram necropsiados e perfundidos para recuperação de vermes adultos, de acordo com a metodologia descrita por Pellegrino & Siqueira (1956). Resumidamente, após sacrifício dos animais por deslocamento cervical, as vísceras foram expostas, a veia porta seccionada e a porção terminal do intestino grosso amarrada. Então, os camundongos foram perfundidos através da artéria aorta torácica e também pelo hilo hepático, em salina 0.85% contendo 500 unidades de heparina em 8L de solução, com pipetador automático *Brewer*. Os vermes

recuperados foram lavados e armazenados a -20°C para a produção de antígeno solúvel total de verme adulto - SWAP.

4.4.2 – PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE VERME ADULTO

Para a obtenção de SWAP, conforme descrição detalhada por Dunne et al. (1997), uma grande quantidade de vermes adultos foi lavada e homogeneizada em salina tamponada com fosfato (PBS), contendo um coquetel de inibidores de proteases (Boehringer Mannheim, Indianápolis, USA), 1 tablete em 25mL de PBS por 60min a 4°C . O homogenato foi centrifugado a $9.400g$ a 4°C por 60min e dialisado contra salina por 24h com três trocas. Após diálise, o antígeno foi centrifugado a $600g$ por 15min a 4°C e as proteínas solúveis presentes no sobrenadante foram quantificadas através da técnica de dosagem de proteína de Lowry, (1951), e então aliquotadas e armazenadas.

4.4.3 - OBTENÇÃO E SEPARAÇÃO DE OVOS DE *S. MANSONI*

Os ovos de *S. mansoni* foram obtidos a partir do fígado dos camundongos após 45-50 dias da infecção por *S. mansoni*, conforme metodologia inicialmente descrita por Pellegrino e Katz, (1968). Fígados de animais infectados foram coletados, picotados e homogeneizados em salina 1,7% por 5min à temperatura ambiente. A seguir foi permitida a decantação do homogenato a 4°C por 1h, para decantação dos ovos e sedimentos maiores. O sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido até obter um sobrenadante limpo, então o precipitado contendo ovos foi retirado e, após adição de salina 1,7 % a solução foi filtrada em membrana de porosidade 0,3mm, que permitiu que os ovos (dimensões de 150 por $60\mu\text{m}$) passassem por ela e retendo parte do muco e tecido. Todos os procedimentos foram executados sob refrigeração para minimizar a eclosão dos ovos. O filtrado passou por

extensos procedimentos de centrifugação a 280g em tubos de 50mL por 5min a 4°C em salina, descarte do sobrenadante por inversão e ressuspensão até que se separassem os ovos do muco para que o muco pudesse ser retirado por pipetagem. A partir daí, realizaram-se ressuspensões com centrifugações em menor velocidade (100g) por 2min a 4°C por, no mínimo, até que se obtivesse um sobrenadante livre de resquícios de muco. A retirada do sobrenadante sob esta velocidade realizou-se por pipetagem. Aliquotas dos ovos foram retiradas e levadas ao microscópio até que se obtivesse ovos sem presença de muco (Figura 4). Após término, foram estocados a -20°C para a produção de antígeno solúvel de ovos de *S.mansoni* - SEA.



Figura 4- Foto dos ovos de *Schistosoma mansoni* após separação.

4.4.4 – PRODUÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE OVO

Conforme Dunne et al. (1992) modificado, os ovos foram ressuspensos em aproximadamente 1mL de salina 1,7% e após serem transferidos para um tubo de hemólise, iniciou-se a homogeneização em *Virtiz®* em intensidade média por 60min contendo o coquetel de inibidores de proteases supracitado, sob constante refrigeração. A prova do tempo ótimo foi realizada retirando pequenas gotas e levando-as ao microscópio óptico para verificar a

existência ou não de ovos inteiros. O homogenato foi, então, centrifugado a 9.400g por 60min a 4°C e o sobrenadante recolhido foi submetido à diálise contra salina por 24h com três trocas. Após diálise, foi centrifugado a 2.500rpm por 15min a 4°C e as proteínas solúveis presentes no sobrenadante foram quantificadas através da técnica de dosagem de proteína de Lowry, (1951), e então aliquotadas e armazenadas a -20°C.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE IgE

4.5.1 – CONJUGAÇÃO DA COLUNA DE *SEPHAROSE*

Colunas de *Sepharose* (*Cyanogen Bromide-Activated Sepharose 4B*, Sigma, Lote 79H1046, C-9142) foram conjugadas, com antígenos de SEA ou SWAP de *S. mansoni* e utilizadas para adsorver anticorpos específicos presentes no plasma.

O método de conjugação usado foi baseado em March et al. (1974). Resumidamente, a coluna de *Sepharose* 4B ativada por brometo de cianogênio foi lavada com 15 volumes de solução 1mM de ácido clorídrico (HCl), para remover pequenas partículas e aditivos estabilizantes e, então, exaustivamente lavada com Tampão de Conjugação (0,1M de bicarbonato de sódio, 0,5M de cloreto de sódio, pH 8,3) para equilibrar o meio.

As proteínas utilizadas na conjugação (antígenos de *S. mansoni* – SEA ou SWAP) foram dialisadas contra o Tampão de Conjugação por 24h com três trocas e cada antígeno foi adicionado a um recipiente contendo a *Sepharose* ativada e lavada (5 mg de proteína/mL *Sepharose*) e, então, incubado por 4 h a 20°C sob agitação, seguido por incubação por 18h a 4°C, para garantir eficiente conjugação.

Uma amostra da solução antígeno foi recolhida antes e após incubação com a coluna de *Sepharose* ativada e a concentração de proteína foi determinada utilizando o ensaio de dosagem de proteína descrito por Lowry et al., (1951). Esta técnica é possível porque a coluna permite que proteínas e outras moléculas contendo grupos amino primários sejam conjugadas diretamente a ela. As proteínas que não se ligaram à coluna, foram lavadas com Tampão de Conjugação.

Após a conjugação, grupos não reativos da *Sepharose* conjugada foram bloqueados com 1M de etanolamina pH 8,0, deixando em repouso por 2h. Então, a *Sepharose* foi submetida a 6 ciclos de lavagem utilizando, alternadamente, um tampão ácido (tampão 0,1M de acetato contendo 0,5M de cloreto de sódio, pH 3-4) e um tampão básico (tampão 0,1M Tris-HCl contendo 0,5M de cloreto de sódio, pH 8-9). Posteriormente, a coluna *Sepharose* conjugada ao antígeno foi lavada, de 3 a 6 vezes, com salina tamponada com borato (BBS – 0,1M de ácido bórico, 0,03M de borato de sódio, 0,14M de cloreto de sódio, pH 8,3). Após o uso, a coluna foi estocada a 4°C com 20% de etanol para evitar o crescimento microbiano.

Foi produzida uma coluna controle, para fins de controle de adsorção inespecífica ou falha de conjugação. Esta passou pelas etapas de lavagem, incubação apenas com o tampão de conjugação, lavagem e logo após, seguiu-se o bloqueio com 1M de etanolamina e os ciclos de pH.

4.5.2 – INCUBAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PLASMA À COLUNA

Foram realizadas alíquotas de 200µL *Sepharose* conjugada com antígeno de SEA ou SWAP, ou apenas bloqueadas, em microtubos de 1,5mL. Amostra de plasma de cada paciente foi dividida em duas partes, diluídas 1:100 em PBS, 400µL foram adicionados à coluna contida

nos microtubos sendo uma alíquota submetida à adsorção de anticorpos específicos (SEA ou SWAP) e outra incubada com coluna sem antígeno para controle. Após agitação em *vórtex* por 5s foram incubadas por 24h a 4°C. No dia seguinte, processamos a centrifugação a 10.000rpm por 5min a 4°C o sobrenadante foi retirado por cuidadosa pipetagem para quantificação das imunoglobulinas.

4.5.3 –AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS REATIVOS A ANTÍGENOS DE *S.MANSONI* NO PLASMA DOS PACIENTES

Para estimar a presença de anticorpos que reagem especificamente contra antígenos do parasito, foi utilizado o método de ELISA descrito por Dunne et al. (1992) para antígenos solúveis obtidos de ovo (SEA) e de verme adulto (SWAP) de *S. mansoni*. Após padronização das concentrações de reagentes a serem utilizadas, as placas de 96 poços (*Nunc-Maxisorb*) foram sensibilizadas pela adição de 100µL/poço de tampão 0,05M carbonato-bicarbonato, pH9,6 contendo 10µg/mL de antígeno solúvel de *S.mansoni* (SEA ou SWAP) e as placas foram incubadas por 18 a 24h a 4°C.

No dia seguinte, as placas sensibilizadas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem PBS-T₂₀ (tampão fosfato com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 200µL de PBS/BSA 1% (tampão fosfato contendo 1% de albumina bovina, *Calbiochem, 126593*). Após nova etapa de lavagem PBS-T₂₀, foram adicionadas às placas 100µL/poço das amostras de plasma de cada paciente e dos indivíduos controle recolhidas das colunas diluídas 1:2 com PBS, atingindo a diluição final de 1:200 e incubadas por 1h à temperatura ambiente. Após etapa de lavagem PBS-T₂₀, as imunoglobulinas que se ligaram aos antígenos foram detectadas pela adição de anti-IgG humano (Goat anti-human IgG, *Sigma*) conjugado à peroxidase na

concentração de 1:5.000, com incubação por 1h à temperatura ambiente para ambos, seguida de lavagem PBS-T₂₀.

O substrato (4mg de OPD, 3µL de água oxigenada em 10mL de tampão citrato, pH5) foi adicionado às placas ao abrigo de luz e incubado por 10min para a reação de imunoglobulinas anti-SEA e 20min para anti-SWAP e, após interrupção com 100 µL de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₂), a absorbância das amostras controle, anti-SEA e anti-SWAP foram detectadas com filtro de 492nm no leitor de ELISA (*Molecular Devices-Emax*).

Para definição do *cutt off* (ponto de corte para reatividade) foram utilizadas amostras de plasma de 10 indivíduos, consistindo de doadores voluntários sem histórico de infecção anterior por esquistossomose. Foram considerados reativos os plasmas de pacientes que apresentaram valores de absorbâncias maior ou igual à média de absorbância obtida com os não infectados e acrescidas de dois desvios padrões.

A mesma técnica foi utilizada para avaliar a eficiência das colunas de *Sepharose* conjugada à antígenos SEA ou SWAP na adsorção de anticorpos específicos. Neste caso, foram avaliadas duas amostras de plasma de cada paciente, para cada antígeno, SEA ou SWAP, uma amostra incubada com *Sepharose* controle e outra com *Sepharose* conjugada ao antígeno a ser quantificado. Cada amostra de plasma recolhida das colunas foi diluída 1:2 em PBS, atingindo a diluição final de 1:200, que foi utilizada nos testes. Para detecção dos anticorpos que reconhecem antígenos do parasito foi usado anti-IgG humano (Goat anti-human IgG, *Sigma*) conjugado à peroxidase na concentração de 1:5.000 ou anticorpo de detecção anti-IgE também conjugado à peroxidase (*catalog n° A80-108P, Bethyl*) na concentração 1:40.000. Após a incubação e lavagem, foi adicionada a solução de substrato e a intensidade da reação foi estimada como descrito inicialmente, permitindo avaliar a redução de anticorpos

específicos nas amostras de plasmas submetidos à incubação com *Sepharose* conjugada com antígenos de *S. mansoni*.

4.5.4 - QUANTIFICAÇÃO DE IgE

Para quantificar os níveis séricos de IgE utilizou-se um kit comercial (*Bethyl*), com protocolo estabelecido pelo fabricante. Este protocolo foi testado inicialmente com amostras de pacientes positivos para esquistossomose para a otimização das diluições a serem utilizadas neste experimento.

Resumidamente, após testes de padronização das melhores diluições a serem utilizadas, placas de 96 poços (*Nunc-Maxisorb*) foram sensibilizadas pela adição de 100µL de tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, contendo 1µg/poço de anticorpo de captura para IgE (estoque 1mg/mL, *Catalog n° A80-108A, Bethyl*) e incubadas por 60min a 4°C. Foram lavadas três vezes com Tampão de Lavagem Tris/NaCl/Tween (50mM de tampão Tris-HCl contendo 0,14M de cloreto de sódio e 0,05% de Tween20) e bloqueadas por 45 min com 200µL/poço de Solução de Bloqueio (50mM de tampão Tris-HCl contendo 0,14M de cloreto de sódio e 1% de albumina bovina, *Calbiochem*). Após nova etapa de três lavagens com Tris/NaCl/Tween, as amostras recolhidas das colunas conjugadas foram adicionadas 100µL/poço às placas nas concentrações de 1:200 solução Diluente (50mM de tampão Tris-HCl contendo 0,14M de cloreto de sódio, 0,05% Tween 20 e 0,1% de albumina bovina *Calbiochem*). A curva foi construída utilizando o padrão (*Catalog n° RC80-108, Bethyl*) com concentração inicial de 1.000ng/mL e diluição seriada até 7,8ng/mL. Amostras e padrão foram incubados por 1h à temperatura ambiente.

Após etapa de cinco lavagens com Tris/NaCl/Tween, foi adicionado 100µL/poço de tampão Tris contendo anticorpo de detecção para IgE (estoque 1mg/mL, *catalog n° A80-108P, Bethyl*) na concentração 1:40.000, e incubado por 60 min. Após 5 lavagens, acrescentou-se o substrato (4mg OPD / 3µL H₂O₂ em 10mL de tampão citrato pH5) ao abrigo da luz e a reação foi interrompida com 100µL de solução 2N de ácido sulfúrico com leitura de absorbância detectadas por filtro de 492nm no leitor de ELISA (*Molecular Devices-Emax*).

Através da curva padrão (Figura 5), realizada em duplicata, com modelo de curva 4-parâmetros gerado ($R^2=1$), foi possível quantificar, por interpolação à curva, o IgE presente nas amostras que passaram pelas colunas controle, SEA e SWAP.

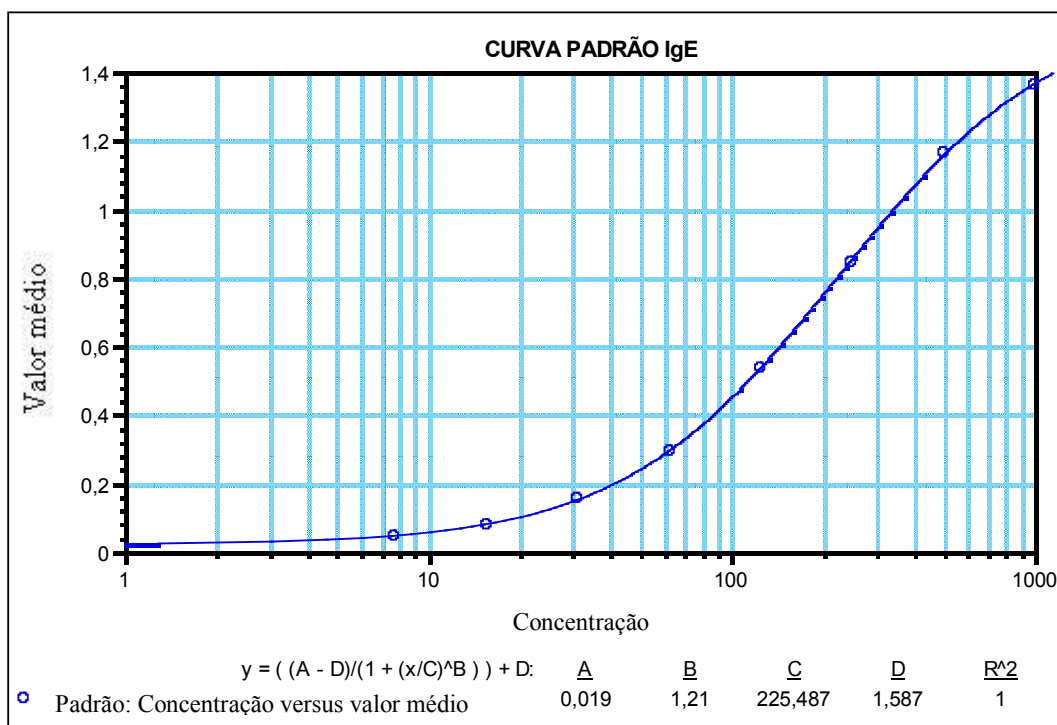


Figura 5- Curva Padrão de IgE, modelo4-parâmetros.

A quantidade de IgE presente em cada amostra foi estimada por ELISA. A diferença entre a quantidade de IgE medida na amostra não adsorvida (controle) e a quantidade na amostra adsorvida com antígeno foi considerado como imunoglobulina específica produzida contra o

determinado antígeno testado, SEA ou SWAP, como nos mostra o esquema da Figura 6 (Negrão-Corrêa et al., 1996 e 1997).

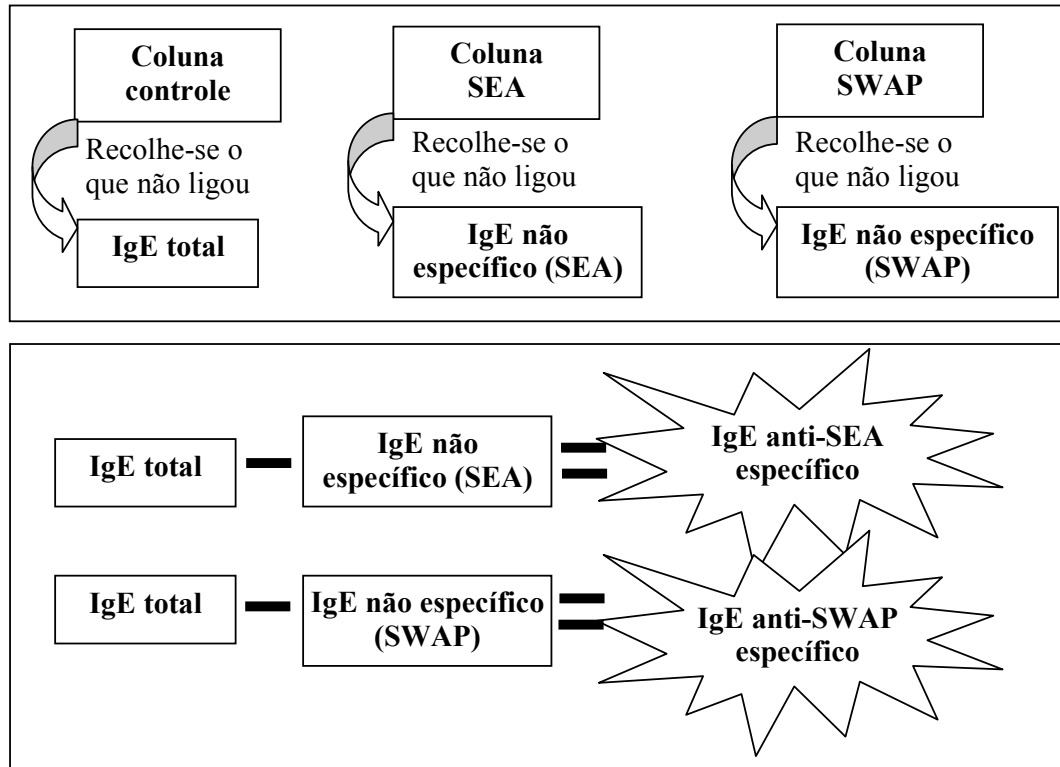


Figura 6- Esquema de quantificação de anticorpos específicos através da adsorção na coluna de Sepharose.

4.6- PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

O banco original do estudo foi criado utilizando-se o programa EPI-INFO versão 6.04. A entrada dos resultados sorológicos foi realizada utilizando o software EPI-DATA 2.1 e transferidos para o programa STATA 9.0.

As variáveis demográficas, étnicas, clínicas, ultra-sonográficas e parasitológicas de interesse para este estudo foram selecionadas no banco de dados original de Queixadinha. A análise foi realizada utilizando o programa STATA versão 9.0 (STATA CORP, 2005), de acordo com as seguintes etapas:

- análise exploratória: distribuição de frequência das variáveis categóricas e resumo das contínuas;
- testes de normalidade para cada variável contínua, permitindo a escolha do método estatístico mais adequado;
- normalização das variáveis não paramétricas;
- análise gráfica, cálculo das médias, desvio-padrão e medianas para variáveis contínuas;
- variáveis contínuas: comparação das médias utilizando-se o teste t de Student e Análise de Variância (ANOVA) ou das medianas das variáveis sem distribuição normal utilizando-se o teste de Wilcoxon (Mann-Whitney) e Kruskal-Wallis
- variáveis categóricas: utilizado o teste do Qui-quadrado;
- análise de correlação e regressão linear para variáveis imunológicas com todos os dados do banco.

A análise univariada foi realizada comparando cada imunoglobina com todas as variáveis do banco (demográficas, clínicas, ultra-sonográficas, parasitológicas e étnicas). Nestas comparações, foi considerado intervalo de confiança de 95%.

A análise multivariada foi realizada utilizando-se modelos de regressão linear com o objetivo de avaliar o efeito de covariáveis (sociais, clínicas, ultra-sonográficas, parasitológicas e étnicas) sobre a resposta imunológica das Imunoglobulinas IgE e IgG reativas a antígenos de ovo (SEA) e do verme adulto (SWAP) de *S. mansoni*.

Para construção dos modelos multivariados, foram selecionadas as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,25$ na análise univariada. Para cada imunoglobulina, partiu-se do modelo completo com todas as variáveis selecionadas para análise e descarte sucessivo das variáveis que não eram estatisticamente significativas ($p > 0,05$). Permaneceram no modelo somente as variáveis estatisticamente significativas (Intervalo de Confiança 95% e valor de $p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 – POPULAÇÃO ANALISADA

5.1.1 – DESCRIÇÃO DOS PARTICIPANTES

A partir dos 97 pacientes selecionados inicialmente realizou-se a análise descritiva do banco de dados. Seis indivíduos não possuíam alíquotas neste estoque para as análises imunológicas, portanto os testes imunológicos foram realizados com 91 indivíduos infectados por *S. mansoni*, residentes em Córrego do Choro. Durante as análises imunológicas, alguns pacientes não demonstraram quantidade de IgE detectável pela técnica de ELISA na diluição do plasma utilizada neste estudo. Então, obteve-se leitura de 80 pacientes para IgE total, 75 para IgE anti-SEA e 76 para IgE anti-SWAP. Para a leitura de absorbância de IgGs anti-SEA e anti-SWAP, todos os pacientes apresentaram leitura de absorbância sob filtro de 452 nm. A Tabela 1 caracteriza a amostra estudada quanto ao sexo, estado civil e idade.

Tabela 1: Características demográficas – variáveis categóricas, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Características da população	Tipo	Número (n=97)	Percentual
Sexo	Masculino	47	48,5
	Feminino	50	51,5
Estado civil	Solteiro	36	37,1
	Casado	55	56,7
	Viúvo	2	2,1
	Outros	1	1,0
	Ignorado	3	3,1
Faixa etária (anos)	14 a 19	27	27,8
	20 a 29	18	18,6
	30 a 39	21	21,7
	40 a 49	14	14,4
	50 a 68	17	17,5

A distribuição etária não diferiu entre homens e mulheres na amostra estudada ($p>0,05$), através do teste do qui-quadrado.

Para dados clínicos de rotina foram avaliados idade, peso, altura, pressão e pulso (Tabela 2).

Apenas as variáveis de altura e pulso apresentaram distribuição normal.

Tabela 2: Características clínicas – variáveis contínuas, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Características da população	Média ± DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
Idade (anos)	33,3 ± 15,8	30,0	18,0	44,0
Peso (Kg)	52,8 ± 10,0	51,0	48,0	59,0
Altura (cm)	156,9 ± 9,82	156,0	150,0	164,0
PAS (mm Hg)	135,4 ± 23,7	130,0	120,0	150,0
PAD (mm Hg)	84,1 ± 13,0	80,0	80,0	90,0
Pulso (bpm)	81,8 ± 13,8	80,0	68,0	92,0

5.1.2 – VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO RISCO DE INFECÇÃO

Quanto às variáveis associadas ao risco de infecção por *S.mansoni*, observa-se que a maioria da população é autóctone – nascida em Padre Paraíso – e vive em estreito contato com águas naturais, sendo relatado um contato diário em mais de 60% da população. A água que a população utiliza para banhos, lavagem de roupas e de utensílios domésticos é proveniente de riacho (39,2%) ou minas (60,8%). Na época de realização do estudo não havia serviços de água encanada ou canalização de esgoto, sendo que os destinos dos dejetos eram fossas ou as matas e beira de riachos. Além disso, a grande maioria da população (67%) relatava nunca ter sido tratada para esquistossomose o que aumentaria a confiabilidade na ausência de resistência por seleção (Tabela 3).

Tabela 3: Variáveis associadas ao risco de infecção por esquistossomose da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Variáveis de Risco para esquistossomose	Tipo	Número (n=97)	Percentual
Fonte de água	Rio ou riacho	38	39,2
	Mina	59	60,8
Destino para o esgoto	Ausente	43	44,3
	Fossa	54	55,7
Relata contato com águas naturais	Não	17	17,6
	Sim	80	82,4
Frequência de contato com águas naturais	Diária	66	68,0
	Semanal	9	9,3
	mensal	5	5,2
	Ignorado	17	17,5
Relata tratamento específico anterior para esquistossomose	Não	65	67,0
	sim	32	33,0

Quando a faixa etária foi comparada com a exposição ao contato com águas naturais (se relata exposição ou não), foi observada diferença estatística entre aqueles que relatam contato com água e faixa etária ($p=0,032$) (Figura 7).

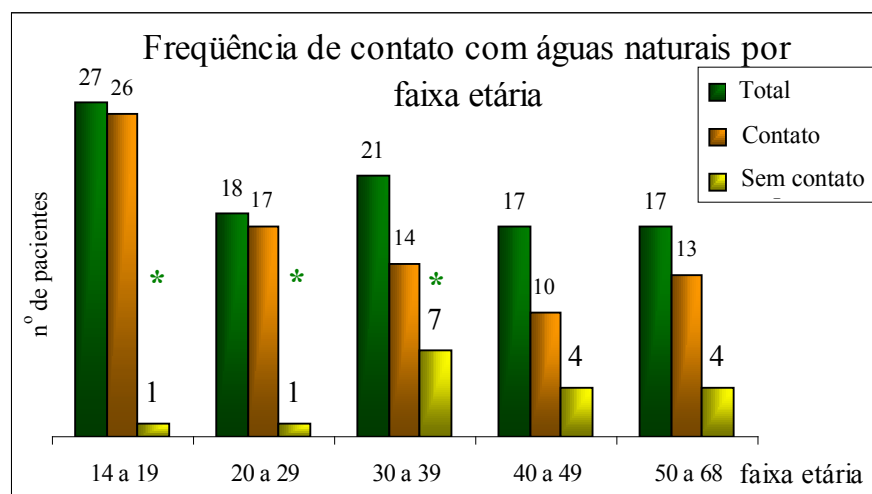


Figura 7- Distribuição dos pacientes, em faixa etária, por relato de contato com águas naturais ou não.

Teste do qui-quadrado de partição. A diferença encontra-se representada por * $p<0,05$.

A Tabela 4 apresenta a frequência de variáveis potencialmente implicadas em possíveis riscos da presença de co-infecção ou agravamento de uma infecção existente. Observa-se que o consumo de bebida alcoólica em excesso e já ter recebido transfusão sanguínea são características frequentes entre os participantes, 13,4 e 5,2%, respectivamente.

Tabela 4: Distribuição das variáveis potencialmente relacionadas a presença de co-infecções e agravamento de infecção por S. mansoni, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Variáveis de outros riscos	Tipo	Número (n=97)	Percentual
Beber em excesso	Não	82	84,5
	Sim	13	13,4
	Ignorado	2	2,1
Recebeu transfusão sanguínea	Não	92	94,8
	Sim	5	5,2

5.1.3 – CARACTERÍSTICAS DA INFECÇÃO POR *S.MANSONI* NA POPULAÇÃO DE ESTUDO

O número de ovos de *S.mansoni* eliminados pelas fezes teve média de 81,1 por grama de fezes (opg), com desvio padrão de 163,4 e mediana de 30,0. Esta variável foi normalizada através da transformação em logaritmo + 1, para análises. Esta população teve como característica uma baixa eliminação de ovos, sendo considerada infecção baixa ou moderada pela OMS 2002. Observa-se pela Figura 8 que 77 indivíduos eliminavam até 100opg, 17 eliminavam de 100 a 400opg e apenas 3 apresentaram acima de 400opg.

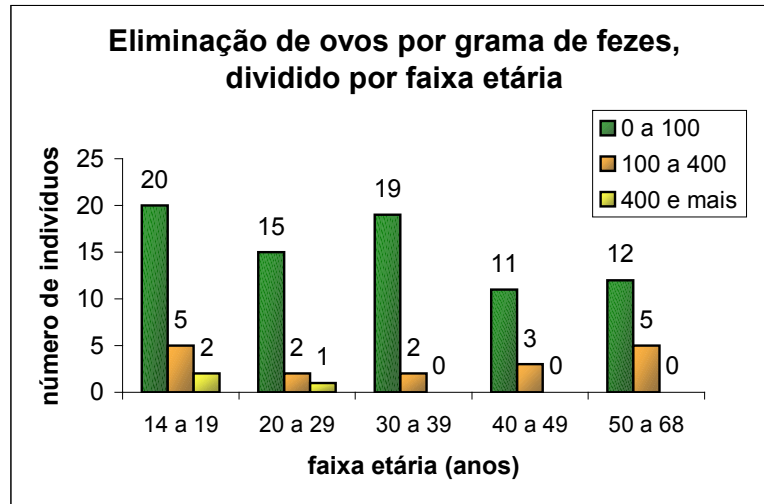


Figura 8- Distribuição dos indivíduos em faixas etárias, por ovos eliminados nas fezes.

Quando a distribuição da carga parasitária (n° de ovos por grama) foi avaliada pela variável contínua idade, observou-se que não houve relação entre estas variáveis na população em estudo (Figura 9), mesmo quando os dados de carga parasitária foram normalizados, através da transformação em logaritmo.

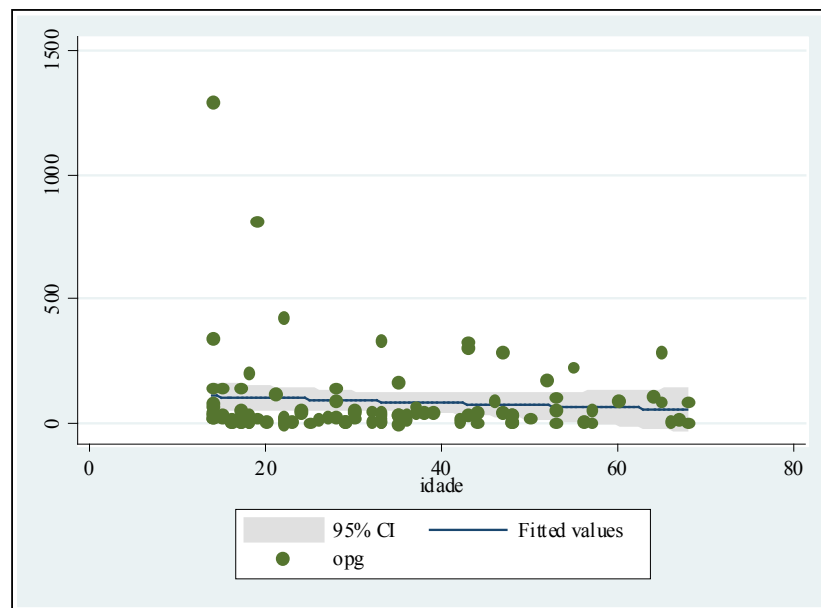


Figura 9- Gráfico de Regressão linear da quantidade de ovos por grama de fezes por idade.

Quando testados por faixa etária, esta realidade vista anteriormente se manteve, não mostrando aumento significativo do número de ovos por grama de fezes conforme a idade (Tabela 5).

Tabela 5: Média de ovos por grama de fezes por faixa etária (anos), população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Faixa etária (anos)	Média de opg
14 — 19	137,4 ± 282,7
20 — 29	61,0 ± 101,2
30 — 39	56,1 ± 72,6
40 — 49	96,6 ± 120,5
50 — 68	82,2 ± 83,2

5.1.4 – DADOS CLÍNICOS

O quadro clínico dos pacientes analisados variou desde assintomáticos, sintomáticos intestinais até hepatoesplênicos. Entre a população examinada, 7,2% relataram hematemesa. Foi observada presença de veias colaterais em 2,1% dos pacientes e alterações ao exame clínico para ausculta em 6,2%. Nove pacientes (9,3%) apresentaram baço palpável, com alterações de consistência em 4 deles. Além de alterações esplênicas, 50 (51,6%) pacientes apresentaram hepatomegalia, com alterações de contorno do órgão (fígado rugoso) em 8% dos pacientes, 4% dos pacientes apresentaram fígado nodular e 20% apresentaram alteração na consistência (fígado duro ou endurecido). Estas alterações clínicas estão associadas a um perfil de pacientes em fase crônica de infecção por esquistossomose (Tabela 6). Durante o exame clínico, também foi medido, em centímetros, o tamanho do fígado e baço, com limites determinados por palpação.

Tabela 6- Perfil sintomático dos pacientes com esquistossomose na avaliação clínica, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Perfil sintomático na avaliação clínica	Tipo	Número	Percentual
Vômito com sangue (hematemese) (n=97)	Não	90	92,8
	sim	7	7,2
Veias Colaterais (n=97)	ausentes	95	97,9
	Alterada	6	6,2
Baço (n=97)	Normal	88	90,7
	Palpável	9	9,3
Consistência do Baço (n=9)	Normal	5	55,6
	Endurecida	2	22,2
	Dura	2	22,2
Fígado (n=97)	Normal	47	48,4
	Palpável	50	51,6
Contorno do fígado (n=50)	liso	46	92,0
	rugoso	4	8,0
Superfície do fígado (n=50)	Lisa	48	96,0
	Nodular	2	4,0
Consistência do Fígado (n=50)	Normal	40	80,0
	endurecida	8	16,0
	dura	2	4,0

5.1.5 – DADOS ULTRA-SONOGRÁFICOS

Após a avaliação ultra-sonográfica de todos os pacientes, foi possível estabelecer medidas mais precisas das alterações. Foi estimado o tamanho do fígado sob diversos ângulos, a medida do baço, do diâmetro e espessura da parede da veia porta (total, no hilo e na bifurcação) e vesícula biliar (Tabela 7). Os parâmetros do esperado nas medidas ultra-sonográficas encontram-se no ANEXO C.

Tabela 7- Perfil sintomático dos pacientes com esquistossomose na ultra-sonografia (variáveis contínuas), população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Medidas anatômicas na ultra-sonografia (em mm)	Média \pm DP	Mediana	Percentil 25	Percentil 75
Tamanho do fígado				
Longitudinal direito	119,6 \pm 17,8	119,0	108,5	130,0
ântero-posterior direito	104,1 \pm 14,5	105,0	96,0	113,5
Longitudinal esquerdo	97,0 \pm 18,5	96,0	84,0	109,0
ântero-posterior esquerdo	63,2 \pm 11,6	62,0	57,0	69,0
Tamanho do baço				
	84,6 \pm 26,7	85,0	70,0	101,0
Espessura da parede da veia porta				
	9,6 \pm 2,2	10,0	8,0	11,0
Parede da veia porta no hilo				
	5,3 \pm 2,0	5,0	4,0	6,0
Espessura da parede da veia porta na bifurcação				
	4,1 \pm 1,2	4,0	3,0	4,0
Espessura da parede da vesícula biliar.				
	3,5 \pm 1,1	3,0	3,0	4,0

Com estes dados, foi possível categorizar as variáveis de medida dos órgãos dos pacientes deste estudo, partindo do que era consenso de normalidade entre a clínica médica ou conforme a média ou mediana do grupo. Além disso, foi determinado em medidas contínuas tamanho, diâmetro e espessura de estruturas anatômicas, como veia porta, vesícula biliar e baço, consideradas possíveis marcadores anatômicos de infecção por *S.mansoni*, conforme representação na Tabela 8.

Tabela 8- Perfil sintomático dos pacientes na ultra-sonografia, variáveis categóricas, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Medidas anatômicas categóricas na avaliação ultra-sonográfica	Tipo	Número (n=97)	Percentual
Diâmetro da veia porta	< 9 mm	44	45,4
	> 9 mm	53	54,6
Espessura da parede na bifurcação da veia porta	< 4 mm	63	64,9
	> 4 mm	32	33,0
	Ignorado	2	2,1
Espessura da parede da vesícula biliar	< 3 mm	57	58,8
	> 3 mm	39	40,2
	Ignorado	1	1,0
Tamanho do baço	< 82 mm	46	47,4
	> 82 mm	51	52,6

Baseado na análise ultra-sonográfica do espessamento periportal, foi possível determinar a presença de fibrose hepática em 42 pacientes, bem como foi definido o grau de comprometimento da fibrose (leve, moderada ou intensa) e localização desta (central e/ou periférica) (Tabela 9). Esta classificação de fibrose é concluída através do espessamento periportal ecogênico.

Tabela 9- Localização e grau de fibrose de *Symmers* nos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Medidas anatômicas categóricas na avaliação ultra-sonográfica	Tipo	Número	Percentual
Grau de fibrose de <i>Symmers</i> (n=97)	Ausente	55	56,7
	Leve	24	24,7
	Moderada	11	11,3
	Intensa	7	7,3
Localização da fibrose (n=42)	Central	6	14,3
	Periférica	25	59,5
	Central e periférica	11	26,2

Nesta população onde a carga parasitária é considerada baixa (Figuras 8 e 9) não houve diferença estatística entre presença de fibrose de *Symmers*, bem como seu grau de fibrose

(ausente, leve, moderada e intensa), e a intensidade de infecção por *S.mansoni*, que foi determinada pela quantidade de ovos eliminados por grama de fezes (Tabela 10).

Tabela 10- Comparação entre o grau de fibrose de Symmers e o número de ovos eliminados nas fezes, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Nº ovos	Grau de Fibrose de Symmers				Total
	Ausente	Leve	Moderada	Intensa	
0 — 100	44	20	8	5	77
100 — 200	3	4	2	0	9
200 — mais	8	0	1	2	11
Total	55	24	11	7	97

Teste do Qui-quadrado, $p < 0,05$

5.1.6 – DADOS ÉTNICOS

Quanto à classificação étnica, considerada fator de predisposição para formas graves segundo Prata (1992); 18 dos 97 pacientes se auto-classificaram como brancos; enquanto 14 pacientes foram classificados como brancos conforme características fenotípicas de cabelo, olhos, lábios, nariz, pele. Entretanto, a classificação de etnia baseada em marcadores moleculares define que 36 pacientes desta mesma população são classificados como de descendência européia ou branca (Tabela 11).

Tabela 11- Distribuição em categorias étnicas da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Designação étnica	Tipo	Número (n=97)	Percentual
Por características fenotípicas	Branco	14	14,4
	Miscigenados	73	75,2
	Negros	10	10,4
Por auto-avaliação	Branco	18	18,6
	Miscigenados	73	75,2
	Negros	6	6,2
Por designação molecular	Europeus	36	37,1
	Miscigenados	38	39,2
	Africanos	23	23,7

Quando foi relacionada a origem étnica dos pacientes com o nível de fibrose ou o número de ovos eliminados nas fezes, não houve associação entre eles (Tabela 12 e 13). Também não foi observada associação quando o grau de fibrose foi categorizado em presente ou ausente (molecular $p=0,507$; auto-avaliação $p=0,229$ e fenotípico $p=0,181$), avaliado pelo teste do Qui-quadrado.

Tabela 12- Distribuição da classificação molecular étnica pelo grau de fibrose da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Classificações Étnicas		Grau de fibrose de <i>Symmers</i>				Total
		Ausente	Leve	Moderada	Intensa	
Molecular p=0,856	Branco	18	10	5	3	36
	Miscigenado	22	8	5	3	38
	Negro	15	6	1	1	23
Auto-avaliação p=0,361	Branco	7	5	3	3	18
	Miscigenado	44	18	8	3	73
	Negro	4	1	0	1	6
Fenotípico p=0,057	Branco	5	3	3	3	14
	Miscigenado	45	19	5	4	73
	Negro	5	2	3	0	10
Total		55	24	11	7	97

Teste do Qui-quadrado, p<0,05

Tabela 13- Comparação entre a classificação étnica e carga de ovos eliminados nas fezes da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Classificações Étnicas		Número de ovos eliminados pelas fezes			Total
		0 — 100	100 —	mais	
Molecular p=0,821	Branco	29	7		36
	Miscigenado	29	9		38
	Negro	19	4		23
Auto-avaliação p=0,700	Branco	13	5		18
	Miscigenado	59	14		73
	Negro	5	1		6
Fenotípico p=0,057	Branco	10	4		14
	Miscigenado	59	14		73
	Negro	8	2		10
Total		77	20		97

Teste do Qui-quadrado, p<0,05

5.2 – PERFIL DAS IMUNOGLOBULINAS

Todas as quantificações de imunoglobulinas realizadas neste estudo foram realizadas em duplicatas para conferir maior segurança aos resultados; além disso, em todos os testes, foi realizada a repetição de 15 % para avaliar a taxa de reprodutibilidade dos mesmos, que se mostrou acima de 95% de nível de concordância.

5.2.1 – IMUNOGLOBULINA-G

A reatividade das imunoglobulinas IgG do plasma de cada paciente contra antígenos do verme adulto (SWAP) e do ovo (SEA) de *S. mansoni* foi avaliada, sendo que 49 (53%) dos pacientes foi reativo para antígenos de SEA (53%) e 68 (75%) para SWAP (Figura 10).

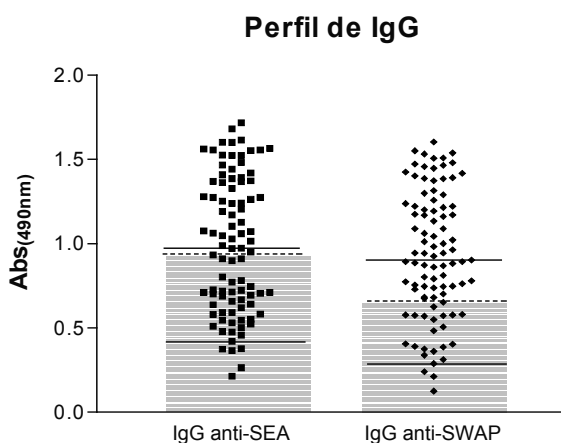


Figura 10- Distribuição dos valores de absorvâncias para IgG anti-SEA e anti-SWAP. Sombreado cinza representa nível de reatividade considerado com base na média de absorvância ± 2 DP dos plásmas dos pacientes normais.

Os valores de absorvância média e mediana para IgGs reativa contra antígenos do SEA e do SWAP estão sumarizados na Tabela 14.

Tabela 14- Distribuição das Imunoglobulinas-G avaliadas na população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Imunoglobulina-G	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
IgG anti-SEA (nm)	91	0,988 ± 0,401	0,974	0,215	1,719
IgG anti-SWAP (nm)	91	0,945 ± 0,370	0,926	0,212	1,603

Para as variáveis de imunoglobulina-G anti-SEA e anti-SWAP não houve possibilidade de normalização, optou-se pela avaliação de normalidade e homocedasticidade ao final do modelo múltiplo de regressão. Na Figura 11 encontra-se a distribuição das IgGs anti-SEA e anti-SWAP, sem nenhuma transformação.

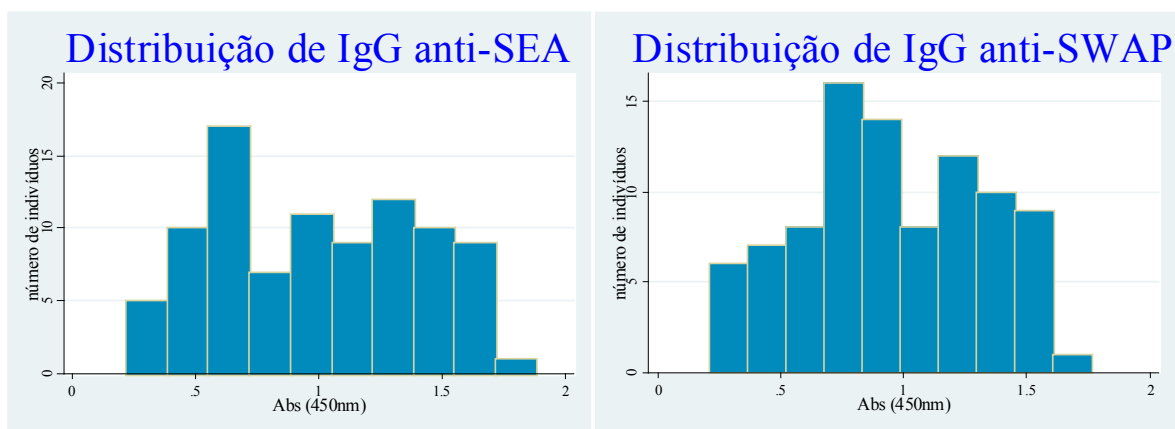


Figura 11- Histograma de distribuição das IgGs anti-SEA e anti-SWAP.

5.2.2 – ADSORÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS PELA COLUNA DE *SEPHAROSE*

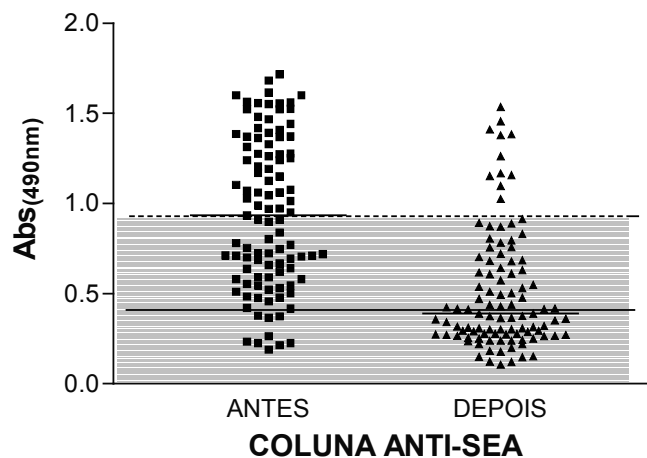
A presença de IgG reativa contra SEA e SWAP em amostras de plasma de cada paciente incubada com coluna *Sepharose* controle, conjugada à SEA ou à SWAP, foram testadas pela técnica de ELISA com o objetivo de comprovar a eficiência da coluna de adsorção de anticorpos específicos, antes de estimar a quantidade de imunoglobulina-E reativa contra antígenos de *S.mansoni*. A redução da reatividade de IgG específico contra SEA e SWAP

após incubação na coluna é ilustrada na Figura 12, os valores de média de IgG antes e após adsorção estão representados pelas linhas contínuas em cada grupo.

O ponto de corte está representado pela linha contínua longa que atravessa horizontalmente todo o gráfico. Os desvios padrões estão representados pela área cinza nos gráficos, sendo que seu ponto mais alto está representado por linhas pontilhadas. Em ambos os casos, a mediana da absorbância das amostras pós-adsorção encontram-se abaixo da linha de corte estipulada com os indivíduos não infectados. Entretanto, apesar de reduzido, 11 e 19 pacientes ainda mostram reatividade de IgG após incubação do plasma com *Sepharose* SEA e SWAP, respectivamente (Figura 12).

Antes de quantificar IgE, era necessário certificar que os anticorpos específicos haviam sido adsorvidos à coluna, ou seja, para verificar se estes pacientes também apresentaram IgE reativa no plasma, as amostras adsorvidas foram testadas em ELISA e detectadas com anticorpo anti-IgE humana. Para a grande maioria das amostras, o nível de absorbância permaneceu indetectável, assim como os pacientes utilizados para controle negativo, comprovando que houve reatividade das amostras para IgE, que ficaram adsorvidas nas colunas.

A- IgG anti-SEA antes e depois da adsorção



B- IgG anti-SWAP antes e depois da adsorção

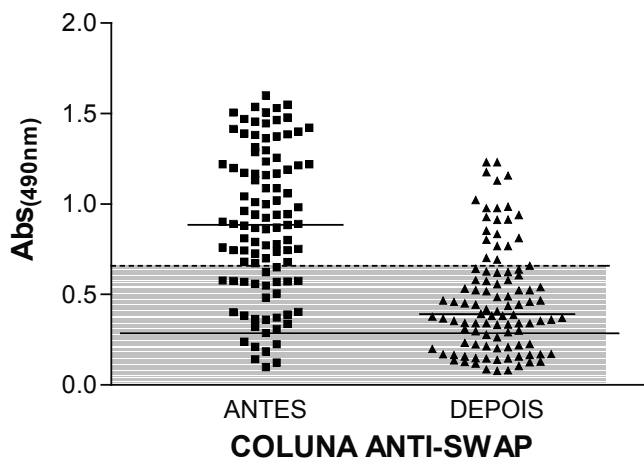


Figura 12 Perfil de adsorção de IgG anti-SEA (A) e anti-SWAP(B), com o cutt off ± 2 DP baseado na reatividade dos plasmas dos pacientes normais

5.2.3 – IMUNOGLOBULINA-E

As Imunoglobulinas-E apresentaram medianas 4.142, 1.782 e 2.060 para níveis totais, anti-SEA e anti-SWAP, respectivamente (medida em ng/mL) (Tabela 15).

Tabela 15- Distribuição das Imunoglobulinas-E avaliadas na população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Imunoglobulina-E	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo
IgE total (ng/mL)	80	6420 ± 6627	4142	145	32285
IgE anti-SEA (ng/mL)	75	2578 ± 2902	1782	115	17088
IgE anti-SWAP (ng/mL)	76	2799 ± 3111	2060	64	18398

Na população em estudo, os níveis de IgE, total e específicos, não apresentaram uma distribuição normal, portanto foi necessário normalizar as variáveis respostas para permitir a regressão múltipla. Na Figura 13, encontra-se o histograma da distribuição das concentrações das IgEs antes da normalização (Figura 13 A, B e C) e seus respectivos perfis após normalização por logaritmo em base 10 (Figura 13 D, E, F).

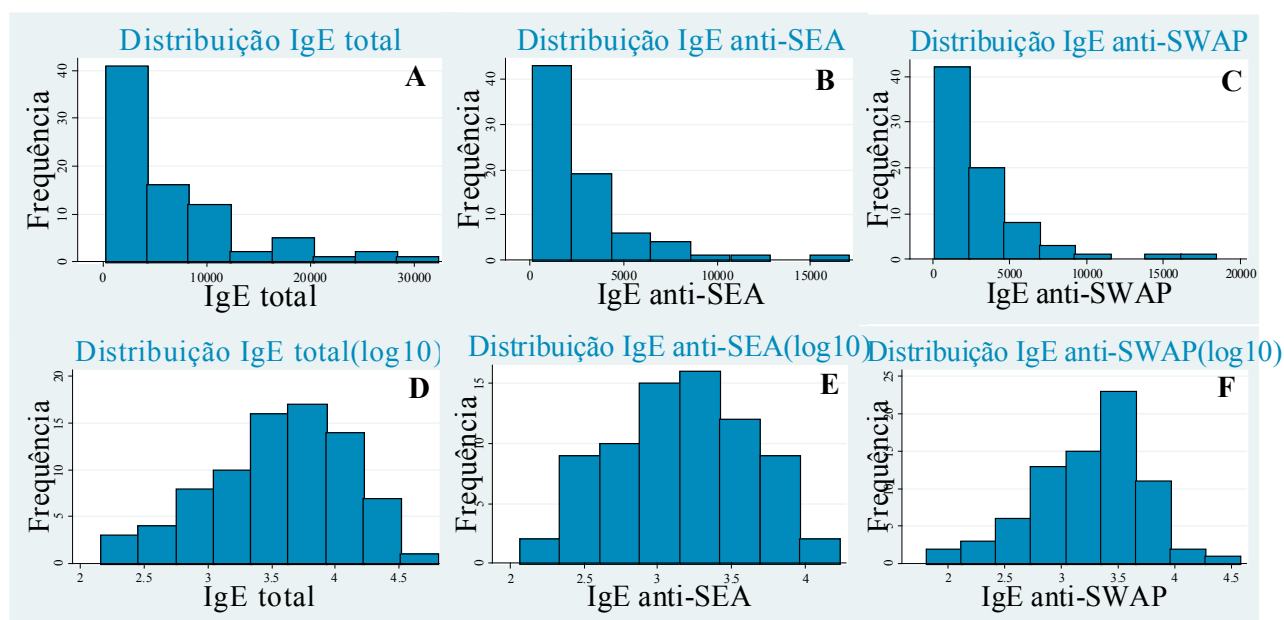


Figura 13- Histograma das distribuições de IgEs total, anti-SEA e anti-SWAP – antes e pós-normalização por log10.

5.3 – ANÁLISE UNIVARIADA

Foi realizada análise univariada para cada Imunoglobulina testada com as variáveis do banco e os resultados serão apresentados por categorias. A Tabela com os valores de p das variáveis para os diferentes testes estatísticos utilizados está no APÊNDICE A. Quando se tratou de variáveis contínuas, os coeficientes de correlação foram citados no texto. Para as IgEs, transformadas em log, foram utilizados regressão linear, teste *t de Student* e ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Para as IgGs foram utilizados regressão linear e o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns.

5.3.1 – VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS

Não foi observada diferença estatística significativa entre os sexos quando se comparou os níveis de anticorpos dos pacientes - IgE (total, anti-SEA e anti-SWAP) pelo teste t de Student e IgG (anti-SEA e anti-SWAP) pelo teste de Kruskal-Wallis, com $p > 0,05$ para ambos.

Na associação com idade, houve diferença estatística quando comparado com IgG anti-SEA pela regressão linear, demonstrando relação negativa, porém, pouco expressiva ($n=91$, $p=0,032$ com IC95 de $-0,011$ a $-0,000$), ou seja, para cada ano de idade aumentado, ocorre a diminuição da absorvância de IgG anti-SEA de $-0,01$. Não foi observada associação entre nível de imunoglobulina distribuída por faixa etária, através do teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns, com $p > 0,05$.

A associação entre níveis de anticorpos com tratamento quimioterápico demonstrou que os pacientes tratados especificamente para esquistossomose (n=30) na época da entrevista apresentaram menor quantidade de IgE (total, anti-SEA e anti-SWAP) do que os não tratados (n=61), teste t de Student, $p < 0,01$ (Figura 14). Entretanto, a absorvância de IgG anti-SEA e anti-SWAP não foi diferente para os pacientes tratados ou não com $p > 0,05$ pelo teste de Kruskal-Wallis (Figura 14).

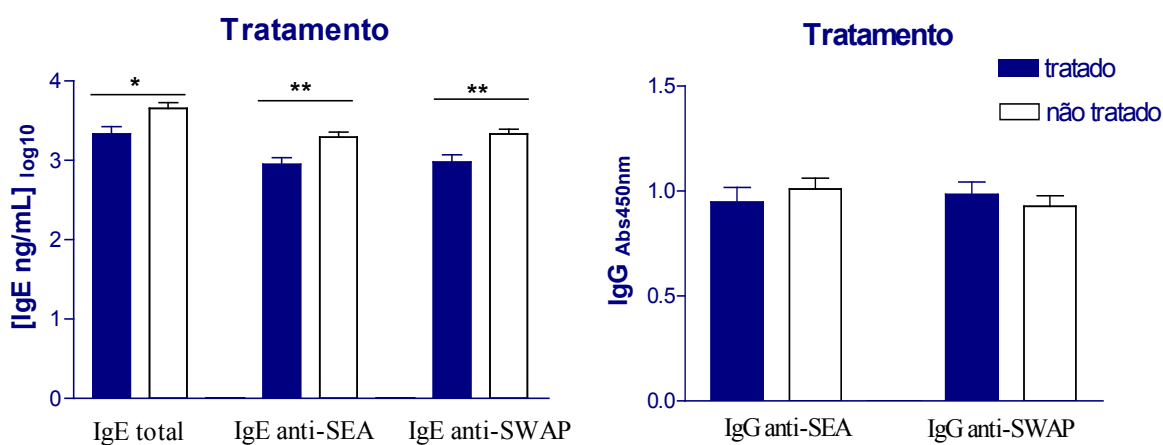


Figura 14- Distribuição da IgE e IgG dos pacientes pelo relato de tratamento para esquistossomose na população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1992.

Barras fechadas representam os pacientes tratados e barras abertas, os não tratados. Teste t de Student para IgE e Kruskal Wallis seguido do teste de Dunns para IgG *= $p < 0,05$ e **= $p < 0,01$.

Quando relacionados os níveis de IgE com o relato dos pacientes de terem tido contato com fontes de águas naturais no presente ou passado, observou-se que aqueles que relatam contato com águas naturais (n=75) apresentam níveis maiores de IgE total ($p < 0,01$) e de IgG anti-SEA do que os outros que negam contato (n=16) (Figura 15). Nestes pacientes com contato com água também foi observado absorvância de IgG anti-SEA estatisticamente mais elevada ($p < 0,05$). Já para IgE anti-SEA, IgE anti-SWAP e IgG anti-SWAP, não há diferença entre sua produção e exposição à água ($p > 0,05$) (Figura 15). Apesar da diferença no nível de anticorpos testados entre aqueles que relatam ou não contato, não existe diferença entre estes níveis e a frequência do contato com águas naturais.

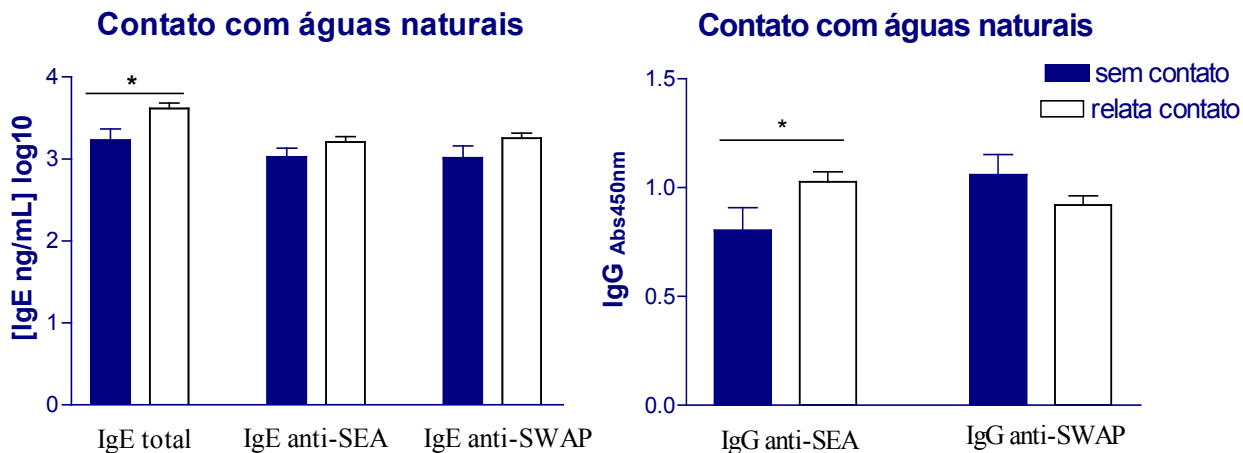


Figura 15- Distribuição das IgEs e IgGs dos pacientes pelo relato de contato com águas naturais.

Barras cheias representam pacientes sem relato de contato e barras vazias com relato de contato, Teste t de Student para IgE e Kruskal Wallis para IgG * representa $p < 0,05$.

Quando analisada a relação da quantidade de ovos eliminados nas fezes da população em estudo com os níveis de IgE(log10) e IgG, não foi observada associação. A Tabela 16 apresenta a distribuição de IgE e IgG pela quantidade de ovos por grama de fezes eliminada.

Tabela 16- Média e DP das IgEs e IgGs pela carga parasitária dos pacientes da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

OPG	n	IgE total	IgE anti-SEA	IgE anti-SWAP
0 a100	63	6490 ± 3737	2621 ± 2891	2820 ± 3063
100 e mais	17	6157 ± 6395	2430 ± 3025	2727 ± 3371
OPG	n	IgG anti-SEA	IgG anti-SWAP	
0 a100	73	0,987 ± 0,399	0,949 ± 0,363	
100 e mais	18	0,995 ± 0,423	0,931 ± 0,414	

Teste t de Student para IgE e teste de Mann Whitney para IgG. Todos os testes obtiveram $p > 0,05$

5.3.2 – VARIÁVEIS ÉTNICAS

Não foi encontrada diferença estatística significativa entre os marcadores de etnia (fenotípico, moleculares ou por auto-avaliação) e o nível de imunoglobulinas, com $p > 0,05$ utilizando os testes ANOVA para IgE (log10) e kruskal-Wallis para IgG.

5.3.3 – PATOLOGIA CLÍNICA E ULTRA-SONOGRÁFICA

Para a análise das variáveis associada à gravidade da esquistossomose mansônica, foram considerados parâmetros clínicos e ultrassonográficos disponíveis, como medidas de baço, fígado, veia porta e vesícula biliar.

5.3.3.1 – FÍGADO

Para as medidas clínicas do fígado obtidas por palpação, a absorvância de IgG anti-SEA apresentou relação com tamanho do lobo esquerdo do fígado. À medida que aumenta 1 cm no tamanho do fígado pelo lado esquerdo, a absorvância de IgG anti-SEA aumenta em 0,06 ($p = 0,047$). Esta relação não foi significativa para IgG anti-SWAP, com $p > 0,05$.

Também foi observada relação significativa entre IgG anti-SWAP e características alteradas do fígado na palpação, (superfície, contorno e consistência), que apresentaram valores estatisticamente superiores de absorvância de IgG anti-SWAP (Tabela 17 e Figura 16). Em relação aos níveis de IgE, não foi observada associação estatisticamente significativa com nenhum dos parâmetros clínicos quantificados para o fígado.

Tabela 17- Variáveis clínicas de alterações do fígado e correlação com IgG anti-SWAP (valor de p), população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Variáveis clínicas de alterações do fígado com IgG anti-SWAP	Normal	Alterada	Intermediário	Valor de p
Superfície	43	2	---	0,018
Contorno	82	4	---	0,006
Consistência	34	2	7	0,012

Teste de kruskal Wallis

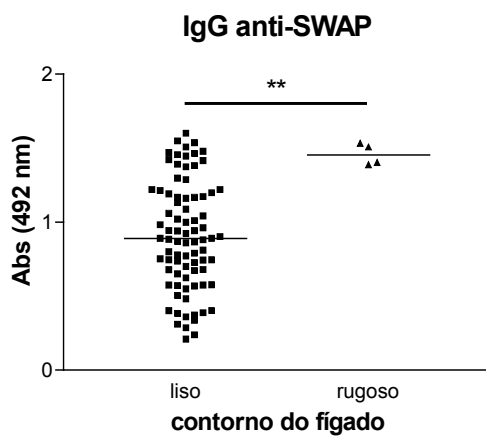


Figura 16- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgG anti-SWAP, pelo contorno do fígado.

Teste Kruskal Wallis. ** representa $p < 0,01$.

De todas as medidas ultra-sonográficas de tamanho do fígado obtidas dos pacientes examinados ($n=90$), apenas o aumento do lado ântero-posterior esquerdo foi associado com aumento de IgE, tanto total como específicas anti-SEA e anti-SWAP, através de regressão linear, com $p < 0,05$. Nenhuma das IgGs teve relação com tamanho do fígado ao ultra-som.

5.3.3.2 – VEIA PORTA

A espessura da parede da veia porta na bifurcação (varia de 2 a 8 mm, com mediana = 4) apresenta também uma relação positiva apenas com IgG anti-SWAP, através da regressão linear, que aumenta 0,09 na absorbância a cada mm de aumento da espessura ($p < 0,01$).

Além disso, também há relação entre a absorvância de IgG anti-SWAP com o diâmetro total da veia porta (varia de 5 a 15 mm, com distribuição normal e média $9,6 \pm 2,2$), sendo que a cada mm de aumento no diâmetro, aumenta também 0,04 na absorvância ($p < 0,05$ com IC_{95} de 0,006 a 0,076). Este resultado se mantém quando a variável é categorizada dividindo os pacientes em grupos pelo valor da média encontrada, sendo 41 pacientes com diâmetro >9 mm, e 50 <9 mm, $p < 0,05$ (Figura 17).

Não houve associação entre níveis de IgE e qualquer medida de espessura da veia porta examinada, através dos testes t de Student ou ANOVA (APÊNDICE A).

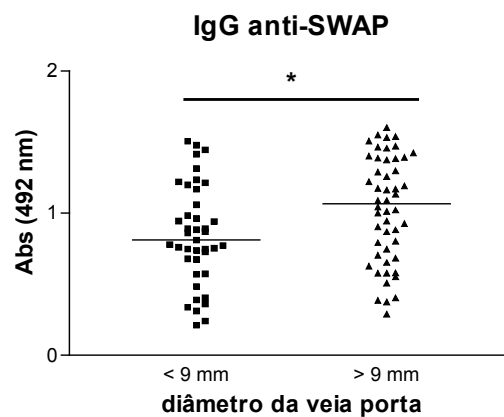


Figura 17- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgG anti-SWAP, pelo diâmetro da veia porta..

Teste de Krauskal Wallis. * representa $p < 0,05$.

5.3.3.3 – BAÇO

Foi observada uma relação estatisticamente significativa entre baço palpável e absorvância de IgG anti-SWAP ($p < 0,05$), pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo que pacientes com baço palpável ao exame clínico ($n=8$) apresentam níveis aumentados de IgG anti-SWAP. Não foi

detectado qualquer associação entre tamanho do baço e níveis de IgE ou IgG anti-SEA, através do teste t de Student, com $p > 0,05$.

Nenhuma outra medida de baço obtida durante o exame clínico dos pacientes, como tamanho no rebordo costal ou consistência do órgão, apresentou associação com o nível de anticorpos testados.

A medida do baço de cada paciente obtida na análise ultra-sonográfica foi utilizada para categorizar os pacientes em dois grupos, pacientes que possuíam baço maior ($n=44$) ou menor ($n=47$) que 82mm, média do grupo.

Não houve associação detectável entre nível de IgE com tamanho de baço ao ultra-som, tanto em relação ao tamanho absoluto pela regressão linear, quanto à categorização das medidas, pelo teste t de Student, na população examinada, com $p > 0,05$ para ambos.

Para os níveis de IgG, conforme demonstrado na Figura 18, foram encontradas relações significativas entre medidas do baço após categorização e absorbância de IgG anti-SEA ($p < 0,05$) e anti-SWAP ($p < 0,001$), utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Em relação à absorbância de IgG anti-SWAP, a associação também foi observada na correlação com a variável contínua de medida do baço por ultra-sonografia, medida que variou de 30 a 205mm, com mediana de 85, sendo que um aumento de 0,01 na absorbância de IgG anti-SWAP foi encontrado para cada mm de aumento do baço, pela regressão linear ($p < 0,001$ com IC₉₅ de 0,004 a 0,009).

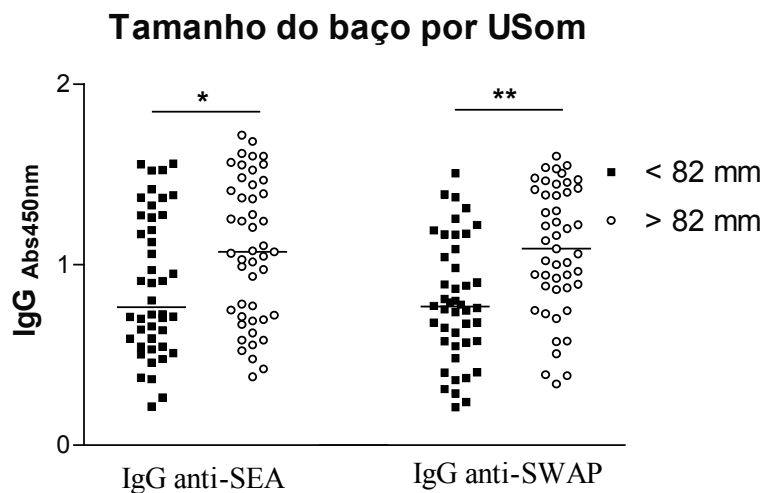


Figura 18- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgG anti-SEA e anti-SWAP, pelo tamanho do baço ao USom, maior ou menor que 82 mm.

Teste de Kruskal Wallis, * representa $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.3.3.4 – VESÍCULA BILIAR

A espessura da vesícula biliar, medida contínua determinada pela ultra-sonografia, variou de 2 a 9 mm, com mediana igual a 3 na população em estudo. O valor da mediana também foi utilizado para categorizar a população do estudo em dois grupos: pacientes com espessura de vesícula biliar maior que 3 mm ($n=54$) e pacientes com vesícula menor que 3 mm ($n=36$).

Foi encontrada relação da medida da vesícula biliar, através da regressão linear, com IgG anti-SWAP, onde cada mm de aumento na espessura da vesícula acarreta um acréscimo de 0,07 na absorbância ($p < 0,05$ com IC_{95} de 0,002 a 0,131) e também com IgE total ($p < 0,01$). Quando os pacientes foram categorizados acima ($n=54$) e abaixo ($n=36$) da mediana do grupo (mediana=3), ainda sim IgE total manteve o nível de significância ($p < 0,01$) (Figura 19).

As IgEs específicas ou IgG anti-SEA não deram correlação significativa com as medidas ultrassonográficas da vesícula biliar, com $p > 0,05$.

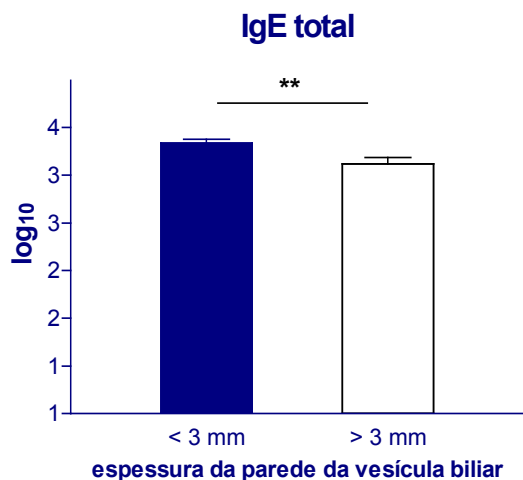


Figura 19- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgE total, pela espessura da parede da vesícula biliar, maior ou menor que 3 mm.

Teste *t* de Student. * representa $p < 0,01$.

5.3.3.5 – QUADROS DE GRAVIDADE

Além disso, foram consideradas as classificações categóricas de gravidade, que agrupam valores de patologia, como explicitado abaixo (Figura 20).

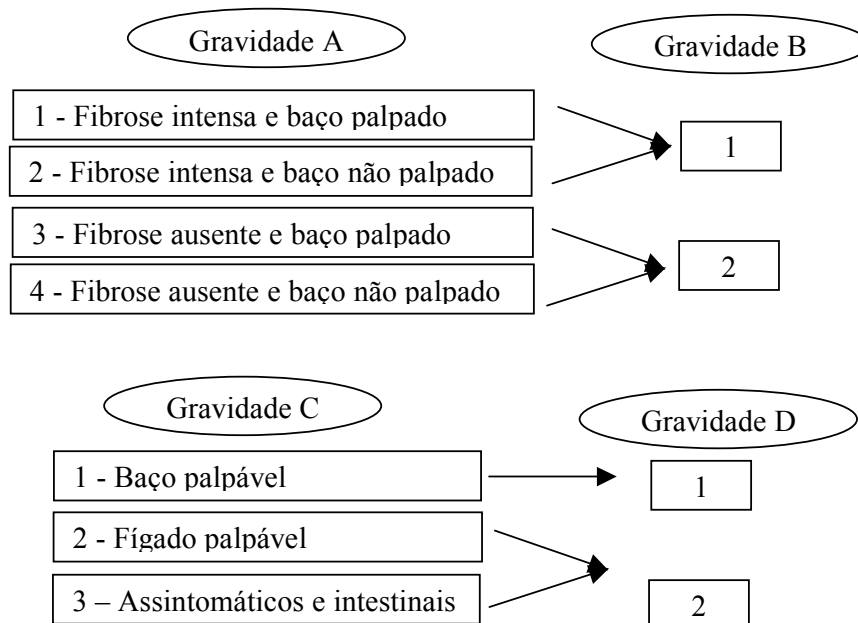


Figura 20 – Quadro de classificação de graus de gravidade

Quanto à presença de fibrose de *Symmers*, que é concluído a partir do espessamento ecogênico periportal, não foi encontrada associação para nenhuma das Imunoglobulinas testadas (IgG utilizando o teste de Kruskal-Wallis e IgE utilizando o teste t de Student). Estes resultados persistem mesmo quando foi comparado a produção destas com o grau ou a localização da fibrose (IgG utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunns e IgE utilizando o teste ANOVA), com $p > 0,05$.

Para as variáveis categóricas de gravidade também encontramos diferenças estatisticamente significativas entre as categorias para IgG anti-SWAP pela gravidade C, a diferença estatística ($p < 0,05$) está entre os grupos de fígado e baço palpáveis, sendo que o primeiro apresenta níveis menores de absorvância para a IgG anti-SWAP (Figura 21). Quando estes grupos são ainda mais reunidos, gravidade D, a diferença estatística se mantém ($p < 0,01$) (Figura 21).

Para IgEs total ou específicas (anti-SEA ou anti-SWAP) e para IgG anti-SEA não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos categorizados de gravidade.

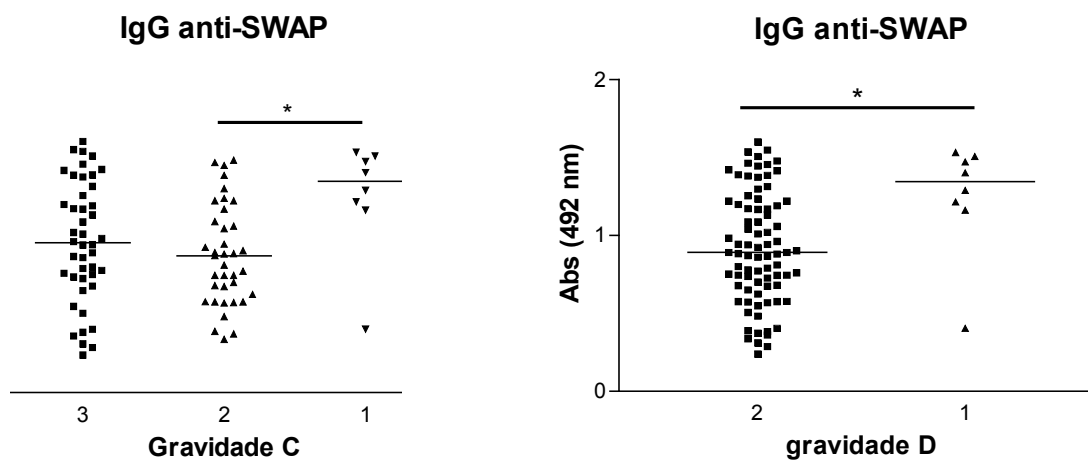


Figura 21- Distribuição dos pacientes quanto à produção de IgG anti-SWAP, segundo classificação de gravidade.

Teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunns, * representa $p < 0,05$.

5.4 – ANÁLISE MULTIVARIADA

A regressão linear múltipla foi usada para determinar o efeito independente da associação entre as co-variáveis e a resposta imunológica das diferentes imunoglobulinas frente a infecção por *S. mansoni*, estimando-se os coeficientes de regressão, os valores de significância e intervalos de confiança. Mesmo que as IgGs não tivessem distribuição normal ao entrarem nas análises univariadas, ao final da regressão múltipla, obteve-se modelos normais e homoscedásticos para todos os casos. Já para as IgEs a normalização utilizando log10 possibilitou a realização dos testes robustos normais para suas análises e os modelos finais foram também normais e homoscedásticos.

As variáveis selecionadas para a análise multivariada foram obtidas a partir da Tabela no APÊNDICE A e tiveram como critério de inclusão o valor de $p < 0,25$.

Para a análise multivariada, foi construído um modelo para cada variável resposta (IgE total, anti-SEA e anti-SWAP e IgG anti-SEA e anti-SWAP), com as características dos 91 pacientes analisados do banco. As variáveis não foram previamente ajustadas por altura e peso dos pacientes.

Para construção dos modelos, as variáveis com baixa frequência (hematemese, veias colaterais) ou que apresentaram colinearidade (categorizações de gravidade) foram excluídas.

5.4.1 – MODELOS DE ANÁLISE MULTIVARIADA

No modelo multivariado de análise verifica-se que tratamento está relacionado à diminuição de IgE total, anti-SEA e anti-SWAP, diminuindo em média 52, 58 e 57% nos tratados, respectivamente (Tabelas 18, 19 e 20). Aqueles que relatam contato com água apresentaram o dobro da quantidade de IgE total (Tabela 18).

Quanto ao tamanho do fígado pelo ângulo de medida ântero-posterior esquerdo, houve um aumento de IgE total, anti-SEA e anti-SWAP, na proporção de 3% de aumento de IgE para cada mm de aumento hepático (Tabelas 18, 19 e 20).

O crescimento vesícula biliar reflete na diminuição de IgE anti-SEA em 33% (Tabela 19), sendo que para aqueles pacientes com espessura da parede da vesícula acima de 3mm (média do grupo), observa-se, em média, 50% de diminuição de IgE total (Tabela 18).

Tabela 18- Modelo de análise Multivariada para IgE total, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Variáveis	IgE total			
	Coefficiente	IC 95%	Erro padrão	Valor de p
Tratamento	0,485	0,295 a 1,247	1,285	0,005
Contato com água	2,113	1,122 a 3,981	1,374	0,021
Fígado ântero-posterior esquerdo	1,028	1,007 a 1,050	1,009	0,009
Vesícula biliar>3 mm	0,512	0,317 a 1,211	1,271	0,007

IgE anti-SEA aumenta 3,3 vezes naqueles pacientes que apresentaram contorno do fígado rugoso (Tabela 19), comparado àqueles com contorno do fígado liso.

Tabela 19- Modelo de análise Multivariada para IgE anti-SEA, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Variáveis	IgE anti-SEA			
	Coeficiente	IC 95%	Erro padrão	Valor de p
Tratamento	0,418	0,259 a 1,489	1,268	0,000
Fígado antero-posterior esquerdo	1,033	1,014 a 1,054	1,009	0,001
Vesícula biliar	0,773	0,619 a 0,966	1,117	0,024
Contorno do fígado	3,281	1,059 a 10,162	1,758	0,040

Tabela 20 - Modelo de análise Multivariada para IgE anti-SWAP, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Variáveis	IgE anti-SWAP			
	Coeficiente	IC 95%	Erro padrão	Valor de p
Tratamento	0,431	0,260 a 0,711	1,285	0,001
Fígado antero-posterior esquerdo	1,028	1,007 a 1,050	1,009	0,010

IgG anti-SEA obteve associação negativa com idade e tamanho do fígado (medida longitudinal e ântero-posterior direitos), reduzindo sua quantidade em média 1,4% à medida que aumenta 1 ano na idade ou 1 mm no fígado (Tabela 21).

Já para o baço, IgG anti-SEA demonstrou um aumento de 2,2 vezes, para cada cm de aumento do baço (medido por palpação) (Tabela 21).

Tabela 21- Modelo de análise Multivariada para IgG anti-SEA, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Variáveis	IgG anti-SEA			
	Coeficiente	IC 95%	Erro padrão	Valor de p
Idade	0,986	0,975 a 0,998	1,005	0,012
Tamanho do fígado longit. direito	0,986	0,977 a 0,995	1,005	0,007
Tamanho do fígado antero-posterior dir.	0,986	0,973 a 0,998	1,005	0,013
Tamanho baço pela palpação	2,223	1,178 a 4,188	1,374	0,014

Quanto ao IgG anti-SWAP, verificamos seu aumento de, em média, 14,8% para cada mm de aumento da espessura da parede da veia porta na bifurcação e 1,4% para cada mm de aumento do baço (medido ao U. Som) (Tabela 22).

Tabela 22- Modelo de análise Multivariada para IgG anti-SWAP, população de Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG, 1999.

Variáveis	IgG anti-SWAP			
	Coefficiente	IC 95%	Erro padrão	Valor de p
Espessura da veia porta na bifurcação	1,148	1,002 a 1,315	1,069	0,046
Tamanho do baço ao U.Som	1,014	1,007 a 1,019	1,002	0,000

6. *DISCUSSÃO*

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste estudo foi realizada uma avaliação imunológica e uma investigação da associação entre a resposta imunológica e os dados parasitológicos, demográficos, étnicos, clínicos e ultrassonográficos de pacientes residentes em uma área endêmica para esquistossomose mansônica. Uma análise epidemiológica sobre diferentes aspectos da esquistossomose foi possível porque a população de enfoque havia sido previamente avaliada.

Considerando a esquistossomose como problema de saúde pública e sua complexidade epidemiológica, estudos relacionando fatores humorais com suas formas clínicas, como o aqui apresentado, poderão ter implicações para o diagnóstico e controle das formas graves. Alguns trabalhos relacionam níveis de anticorpos com a evolução da esquistossomose, sendo geralmente observado aumento de IgE anti-SWAP em associação com o aumento de proteção à reinfeção por *S. mansoni* (Silveira, 2002b; Pereira, 2006). Entretanto, os estudos visando quantificar IgE podem ter subestimado a participação desta imunoglobulina na resposta imunológica induzida por helmintos parasitos pois, devido à pequena quantidade de IgE presente no plasma, existe a possibilidade de bloqueio da ligação de IgE por outras imunoglobulinas que estão presentes em elevadas concentrações no plasma, nas técnicas utilizadas para sua quantificação. Além disto, na maioria dos estudos, os dados populacionais especialmente relacionados à forma grave da esquistossomose não são detalhadamente examinados, dificultando a correlação entre resposta imunológica e outros aspectos associados à forma clínica grave da doença.

A metodologia utilizada foi um estudo transversal, que tem como premissa expressar simultaneamente causa e efeito num dado momento, não esclarecendo a ordem cronológica dos acontecimentos. Uma das limitações desta investigação é o viés de temporalidade (Pereira, 1995), que afeta a interpretação dos resultados no desenho transversal, na medida em

que não é possível identificar quando ocorreu a infecção por *S. mansoni* e outros fatores que se associam ao quadro de gravidade.

A função da análise multivariada foi avaliar a contribuição independente das variáveis que foram investigadas no aumento ou diminuição da variável resposta (imunoglobulinas G e E). Por este motivo, a ênfase da discussão baseou-se na interpretação de variáveis que permaneceram nos modelos de regressão multivariada.

6.2 DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS

A técnica utilizada neste estudo para determinação de IgE no plasma dos pacientes com esquistossomose foi inovadora e permitiu estimar a quantidade de IgE específica contra antígenos de *S. mansoni* em valores absolutos (ng/mL), ao contrário da maioria dos estudos, nos quais a estimativa da quantidade de IgE específica era obtida em absorbância ou titulação (Silveira, 2002b; Lima, 2005; Pereira, 2006). No caso da IgE, a estimativa indireta (absorbância) representa um dado de difícil interpretação, devido à diferença de concentração sérica de IgE e IgG (ANEXO A). A presença de IgG, especialmente IgG4 pode competir com sítios específicos de ligação da IgE, bloqueando-os e, conseqüentemente, resultando em quantificação subestimada. Segundo Rihet et al. (1992), os valores de IgE apresentam-se sempre subestimados, sendo observado até 98% de inibição sorológica devido ao bloqueio efetuado por outras imunoglobulinas.

Neste estudo, todos os experimentos para os marcadores imunológicos foram realizados em duplicatas para conferir maior segurança nos resultados; além disso, em todos os testes, foi realizada a repetição de 15% para avaliar a taxa de reprodutibilidade dos mesmos. Os resultados foram coerentes, demonstrando a confiabilidade dos ensaios. A técnica utilizada neste estudo para avaliar a quantidade de IgE parasito-específica foi baseada na metodologia

descrita por Negrão-Corrêa (1997) para estimar IgE reativa contra *Trichinella spirallis* em ratos infectados. Esta técnica estima a quantidade de IgE parasito-específica através da quantidade de IgE total avaliada por ELISA antes e após a adsorção dos anticorpos específicos em coluna de *Sepharose* conjugada ao antígeno de interesse. Este princípio foi adaptado para utilização neste estudo, sendo produzida uma coluna conjugada à SEA e outra à SWAP com o objetivo de adsorver os anticorpos específicos do plasma dos pacientes com esquistossomose.

Através da estimativa de redução de IgG reativa contra SEA e SWAP, nas amostras de plasma incubadas em colunas controle e nas colunas conjugadas com antígenos de interesse, foi possível comprovar a eficácia da adsorção dos anticorpos específicos. Conforme demonstrado nos resultados (Figura 12), houve redução significativa da absorbância medida pela técnica de ELISA. Verificou-se que a mediana de absorbância obtida com os pacientes infectados, após adsorção na coluna conjugada com antígenos específicos, ficou abaixo do valor estimado como reativo, indicando que a adsorção pela incubação em coluna de *Sepharose* foi bastante eficiente em eliminar anticorpos específicos. Porém, alguns indivíduos permaneceram com absorbância elevada, sugerindo que não houve adsorção completa de anticorpos específicos nestes pacientes. Para verificar se além de IgG, a adsorção teria eliminado IgE específica, a reatividade de IgE do plasma adsorvido dos pacientes, foi também testada pela técnica de ELISA. Foi comprovado que, após a adsorção, a reatividade de IgE nas amostras foi semelhante àquela dos indivíduos não infectados e próxima do controle negativo adicionado em cada placa de ensaio, mesmo nos pacientes que ainda apresentavam um pouco de reatividade para IgG. Este resultado permitiu que a avaliação do presente estudo pudesse ser realizada, pois indica que foi possível retirar das amostras os anticorpos específicos, especialmente IgE.

Como IgG é a imunoglobulina predominante no plasma, não tem sido relatado ocorrência de bloqueio desta pela presença de outras classes de imunoglobulina (Rihet et al., 1992). Dessa forma, a estimativa da presença de IgG reativa a antígenos de *S. mansoni* (SEA e SWAP) foi realizada através da técnica de ELISA direta, sendo apresentado os valores de absorvância de IgG com indicativo de quantidade. O objetivo inicial também incluía a mensuração de IgG4 nas amostras de plasma antes e após adsorção específica com o antígeno, mas os reagentes testados apresentaram reatividade cruzada com outras subclasses de IgG, não permitindo a quantificação específica desta imunoglobulina e a análise da quantidade relativa IgG4/IgE. Outros reagentes ainda serão testados e amostras de plasma de cada paciente estão armazenadas para cumprir esta finalidade.

A mensuração da absorvância de IgG anti-SEA e IgG anti-SWAP em pacientes parasitologicamente positivos para *S. mansoni* em relação a pessoas não infectadas, revelou que alguns indivíduos, ainda que positivos para esquistossomose e eliminando ovos, não apresentavam níveis altos de IgG parasito-específicas. Estes pacientes não demonstraram diferença na quantidade de ovos comparados aos demais. Por ser um estudo transversal, outras inferências tornam-se limitadas acerca das investigações sobre os indivíduos.

6.3 VARIÁVEIS ASSOCIADAS À INFECÇÃO

6.3.1 – IDADE, SEXO E CARGA PARASITÁRIA

Nos pacientes de Córrego do Choro examinados neste estudo, a relação entre idade e carga parasitária não foi evidente, não sendo observada diferença estatística entre faixa etária e carga parasitária ($p=0,776$). Entretanto, é necessário considerar que neste estudo foram selecionados indivíduos de 14 a 68 anos, sendo excluídos os muito jovens e mais velhos, que supostamente poderiam apresentar variações na resposta imunológica não necessariamente

associadas à infecção pelo parasito (Speziali et al., 2004). Por isso, a faixa etária foi restringida e, conseqüentemente, a maioria das correlações relacionadas à idade também. Muitos autores têm relatado diferenças significativas entre idade do hospedeiro e intensidade da infecção por *S. mansoni*, sendo freqüentemente observado que indivíduos mais jovens apresentam maior carga parasitária quando comparados aos mais idosos (Butterwoth et al., 1994; Kabatereine et al., 1999). É importante ressaltar que, mesmo a diferença não sendo estatisticamente significativa, foi observada uma tendência de aumento da média da carga parasitária na faixa etária mais baixa (14 a 19 anos) (Tabela 5). Dos três indivíduos que eliminavam acima de 400 opg, dois tinham entre 14 e 19 anos e um entre 20 e 29 (Figura 8).

Outra característica importante da população aqui estudada foi a baixa carga parasitária revelada nos exames parasitológicos dos pacientes examinados (mediana de 30 opg) (Figura 9). Esta característica pode ser conseqüência de uma população endêmica já submetida a prévio tratamento, selecionada no campo e não em hospitais ou locais que poderiam viciar a amostragem. Muitos indivíduos da população em estudo relatam ter sido submetidos ao tratamento específico contra *S. mansoni* recentemente (67%). O tratamento específico é determinante na diminuição da carga parasitária, diminuindo a quantidade de vermes, mas sem necessariamente erradicar a infecção, visto que a população se reinfecta ao manter contato com as fontes de água e encontra-se eliminando ovos.

Outro fator importante que pode ter influência na baixa carga parasitária observada na população em estudo seria a exposição intra-uterina dos indivíduos residentes em áreas endêmicas a antígenos de *S. mansoni*, devido à infecção materna, ou mesmo após o nascimento, através do leite materno; permitindo que estes indivíduos infectados na infância respondam diferente daqueles fora da área endêmica (Novato-Silva et al., 1992; Attalah et al., 2003). Não é possível distinguir entre idade e a história de infecção em populações

endêmicas, visto que os indivíduos são expostos ao parasito desde muito cedo e, a partir daí, submetidos a constantes reinfecções (Webster et al., 1998). Os indivíduos do presente estudo, também foram expostos a constantes reinfecções desde tenra idade, e isto foi mostrado quando, de posse do banco de dados completo de Córrego do Choro, foi verificada a presença de ovos nos exames de fezes de todas as crianças (desde os 5 anos, idade mínima de inclusão no estudo original).

A população apresentou baixa carga parasitária, e esta não foi associada à patologia. Trabalhar com uma população com baixa carga parasitária como esta é uma vantagem, pois representa a realidade que é encontrada hoje na maioria das áreas de transmissão de esquistossomose no Brasil, após implantação de campanhas de tratamento em massa preconizado pela WHO em 1996. É importante salientar que a carga parasitária é um dos elementos importantes associados à evolução da forma hepatoesplênica da esquistossomose (Prata, 1992). Bina e Prata (2003) encontraram relação de aumento da carga parasitária com o aumento da patologia (forma hepatoesplênica), entretanto, esta relação acontecia apenas quando a intensidade da infecção ultrapassava 1.000 ovos por grama de fezes. Dessa forma, outros fatores, além de carga parasitária, desempenham um importante papel na evolução clínica da esquistossomose, visto que nem todas as pessoas intensamente infectadas desenvolvem doença hepatoesplênica (Andrade et al., 1998) e pacientes com baixa eliminação de ovos nas fezes podem evoluir para a forma grave da esquistossomose, como apresentado neste estudo, onde 43% dos pacientes examinados apresentavam algum grau de fibrose, apesar da eliminação de ovos ser considerada baixa (mediana de 30opg). Neste sentido, os pacientes de Córrego do Choro representam uma população apropriada para avaliar a importância de outros fatores não relacionados à intensidade da infecção, como resposta imunológica, na evolução das formas graves da esquistossomose.

Os pacientes examinados neste estudo eram homogêneos quanto ao sexo (Tabela 1) e não foi encontrada diferença também entre sexo e intensidade de infecção (opg). A literatura apresenta resultados conflitantes quanto à relação entre sexo e carga parasitária de *S. mansoni*. Alguns trabalhos demonstraram maior carga parasitária em mulheres (Bina & Prata, 2003) e outros em homens (Mohamed-Ali et al., 1999), mas a maioria dos autores não encontra relação com sexo, quando ajustados por fatores de confusão, como aqueles ocupacionais (Naus et al., 2003).

Quando estes fatores relacionados à infecção (idade, sexo e carga parasitária) foram associados aos níveis das imunoglobulinas E e G dosadas neste estudo (Apêndice A), foi observado correlação negativa entre IgG anti-SEA e idade, ou seja, a medida que a idade aumenta, observou-se diminuição da quantidade de IgG específico para SEA. Os achados de Grogan et al. (1997) e Hagan et al. (1991) corroboram com nossos resultados visto que nestes trabalhos foram detectados maiores níveis de IgG4 anti-SWAP e anti-SEA em crianças e diminuindo com o aumento da idade. Alguns autores (Corrêa-Oliveira et al., 2000; Mduluz et al., 2001) sugerem que níveis elevados de IgG, especialmente IgG4, em crianças estariam associados à elevada suscetibilidade destes pacientes à reinfeção, provavelmente devido a possibilidade de altos níveis de anticorpos IgG4 bloquearem mecanismos protetores relevantes, dos quais IgE pode participar.

No presente estudo, não foi encontrada diferença estatística entre IgE total, nem IgE específica (anti-SEA e SWAP) e idade ou faixa etária; diferente dos achados de Webster et al. (1997), que demonstraram um aumento da IgE anti-SWAP associado com o aumento de idade dos pacientes. Naus et al. (2003), investigando uma comunidade de pescadores endêmica para esquistossomose também verificaram que IgE anti-SWAP aumenta com a idade (principalmente após a puberdade) e com a carga parasitária. Entretanto, neste mesmo estudo,

os autores relatam que IgE anti-SEA não teve associação com carga parasitária, idade ou sexo. Os dados de Webster e Naus corroboram com a hipótese da participação de IgE no mecanismo protetor induzido nos hospedeiros frequentemente expostos à infecção por *S. mansoni* com a progressão da idade. É importante salientar que o perfil da área de transmissão estudada por Naus et al. (2003) é diferente do apresentado no presente estudo, pois a comunidade de pescadores apresentava altos níveis de exposição ao parasito e elevada intensidade de infecção por *S. mansoni*, com mediana em torno de 500 opg, enquanto a intensidade de infecção detectada no presente estudo apresenta mediana de 30 opg, o que pode ter sido responsável pela ausência da associação de IgE com idade. Por outro lado, não foi determinado neste estudo a relação IgG4/IgE, sendo possível que, mesmo em termos absolutos, não ocorra aumento de IgE específico com a idade, a diminuição de IgG observada nos mais velhos resulte em aumento efetivo de IgE.

Não foi detectada diferença estatística entre sexo e os níveis de anticorpos dosados no presente estudo. Webster et al. (1997) encontraram uma relação positiva entre sexo e IgE e IgG anti-SWAP, sendo que homens têm maior quantidade destes anticorpos, e esta relação foi mantida quando ajustada nas análises multivariadas, mostrando que não se tratava de um fator de confusão, ou seja, não foi encontrada associação com ocupação. Os autores justificam essa diferença através da regulação dos hormônios das gônadas e adrenais, que são componentes intrínsecos dos mecanismos de regulação imunológica. O estrógeno aumentaria a imunidade humoral, enquanto andrógenos suprimiriam-na (Rivero et al., 2002) através da diminuição dos níveis de IFN- γ – citocina antifibrinogênica mais atuante no granuloma (Lortat-Jacob et al., 1997). Esta associação não foi observada entre os pacientes com esquistossomose analisados neste estudo.

6.3.2 - CONTATO COM ÁGUA E TRATAMENTO

Na população aqui estudada, também foi detectada uma diferença significativa quando comparado o contato com água entre as faixas etárias ($p=0,032$). Este dado demonstrou que quase todos os indivíduos da faixa etária mais jovem (14 a 29 anos) relataram contato com água, enquanto a partir de 30 anos, o relato de contato diminuiu para dois terços de indivíduos (Figura 7). Gazzinelli et al. (2001) utilizam índices para estimar o contato com água e observaram que, com o avanço da idade, existe uma tendência na redução do contato com a água. Entretanto, o relato de diminuição de contato nos pacientes deste estudo provavelmente não resultou em redução da taxa de infecção nas faixas etárias mais altas, pois não houve redução significativa na intensidade da infecção ou no número de pessoas infectadas com o aumento da idade (Tabela 5). Uma possível razão para este dado, inicialmente conflitante, talvez seja explicada pelo fato do contato com fonte de infecção ser muito maior do que a população consiga estimar, visto que, no momento do estudo em campo a localidade não tinha abastecimento de água tratada e canalizada e nem encanamentos de esgoto, que terminavam sempre por desembocar nos córregos. Padre Paraíso possui 378 nascentes, além de muitos córregos e ribeirões perenes. A água que abastecia a caixa d'água, na ocasião do estudo original e coleta do plasma, também era proveniente dessas fontes naturais, o que poderia manter a população infectada, mesmo sem banhar-se em coleções de águas naturais contaminadas. Logo, o contato relatado estaria subestimado.

Os resultados deste estudo também não demonstraram diferença significativa quanto à frequência deste contato e os níveis das imunoglobulinas avaliadas, talvez porque a maioria desta população (66 indivíduos) relata contato diário e, além disso, uma grande parcela (17 indivíduos) não sabia informar esta frequência (Tabela 3).

O banco de dados não inclui profissão, então não se sabe o nível (profundidade e tempo) de exposição dos indivíduos às fontes de contaminação, o que restringe a interpretação sobre o contato com a água.

Nenhuma medida isolada é capaz de garantir o controle ou fim da transmissão de *S. mansoni*, considerando toda a complexidade envolvida na epidemiologia e imunologia da esquistossomose. Para resolver este impasse, é necessária uma abordagem focando vários elos desta cadeia de transmissão da doença. A canalização das redes de água e esgoto, somada ao fornecimento de água tratada seriam as principais medidas de grande impacto para esta população. Sabe-se que, há apenas quatro décadas, o distrito de Padre Paraíso se emancipou de Carai, constituindo um município com administração específica. Desde então, aos poucos, a população tem sido atendida quanto às suas necessidades básicas de saneamento e suprimento de água potável. Esta mudança ainda está em fase de consolidação e espera-se colher os frutos dessas ações se somadas à educação sanitária e participação da comunidade. Além disso, outra medida preconizada pela WHO (1996) foi o tratamento em massa para esquistossomose, iniciado nesta população ao final da década de 90. A partir daí, a prevalência da doença que antes era de 80%, reduziu-se para 25% - valor que permanece ainda nos dias atuais.

No presente estudo, a avaliação do contato com a água (Figura 15) e o tratamento (Figura 14) em relação aos níveis detectados de IgG e IgE totais e específicos demonstrou que a quantidade de IgE total, foi estatisticamente mais elevada em pacientes que relatam contato com fontes de águas naturais, do que naqueles pacientes sem relato de contato e esta associação se manteve após a análise multivariada. Mas, as demais imunoglobulinas (IgE e IgG específicas) não apresentaram diferença estatística, visto que os níveis dessas apresentaram-se muito elevados naqueles pacientes que não relatavam contato com águas

naturais. Visto que, na época do estudo, não havia água ou esgoto canalizados e que a água que abastecia a caixa d'água era proveniente dos córregos; a fonte de infecção seria maior do que a população possa estimar, o que a manteria infectada mesmo sem se banhar nas coleções de água. Estes resultados indicam que a exposição freqüente às fontes de infecção favorece as reinfecções, além da exposição a outras parasitoses; o que estimularia a manutenção dos altos níveis de produção de IgE e IgG sem necessariamente alterar significativamente a carga parasitária.

Entre os pacientes examinados neste estudo, também foi verificado que aqueles que relataram tratamento recente para esquistossomose (mesmo sem ter sido definido especificamente o e específica (anti-SEA e SWAP), em comparação àqueles pacientes sem relato de tratamento (Figura 14). A associação se manteve no modelo de análise multivariada, indicando que a diminuição dos níveis de IgE nos pacientes tratados apresenta um efeito independente de outros fatores (Tabelas 18, 19 e 20). Entretanto, o nível de reatividade de IgG plasmática, tanto anti-SEA como anti-SWAP, permanecem elevadas mesmo nos pacientes tratados (Figura 14). Alguns trabalhos mencionam que a imunidade humoral induzida pela infecção por *S. mansoni* pode persistir por décadas, ainda na ausência de re-exposição ao patógeno (Mitre e Nutman, 2006), sendo este um dos principais problemas para o desenvolvimento de uma técnica de diagnóstico baseada em alterações imunológicas. Entretanto, a maioria dos estudos clássicos tem sido sobre a permanência dos anticorpos IgG antígeno-específicos (Paul et al., 1931). Por diminuir mais rapidamente no pós-tratamento, IgE parasito-específica pode ser um marcador de infecção, que consiste num achado com importante perspectiva no desenvolvimento de técnicas alternativas para o diagnóstico de esquistossomose. Entretanto, este achado não tem acontecido em todos os modelos de infecção por helmintos; Mitre e Nutman (2006) demonstraram a persistência da resposta de IgE específica anti-helminto por anos em população submetida a tratamento para infecção filarióide e não reexposta. Mesmo a

avaliação dos níveis de IgE em pacientes submetidos ao tratamento com praziquantel tem revelado resultados conflitantes, sendo que muitos autores relatam associação entre aumento de IgE e proteção contra reinfecção humana pelo *S. mansoni* após quimioterapia específica (Hagan et al., 1991; Demeure et al., 1993; Viana et al., 1995; Naus et al., 1999; Nyindo et al., 1999). Entretanto, a maioria dos estudos avalia pacientes que não foram reinfectados após tratamento específico e associam aumento de IgE, especialmente anti-SWAP, com proteção. É importante ressaltar que, na população em estudo, apesar de relatar tratamento recente, não existe definição precisa de há quanto tempo o tratamento foi realizado e os pacientes examinados apresentavam-se infectados no momento da coleta de sangue.

A maioria dos autores acredita que o tratamento seja benéfico, visto que impediria a alta intensidade de infecção, considerada uma das possíveis contribuições para evolução da forma grave da esquistossomose. O tratamento altera a resposta imune ao parasito e algumas dessas mudanças pós-quimioterapia podem ser correlacionadas ao desenvolvimento da resistência à reinfecção, que é uma consequência multifatorial e não pode ser apenas associada a um único mecanismo imune (Corrêa-Oliveira et al., 2000). Vários autores demonstram uma grande diminuição na prevalência de esquistossomose após a implantação do tratamento seqüencial (Corrêa-Oliveira et al., 2000; Conceição & Borges-Pereira, 2002). Existe um consenso entre a comunidade médica brasileira, acerca do importante declínio do número de casos de forma grave em esquistossomose, desde a implantação do programa de tratamento em massa, na década de 70 (Lambertucci et al., 2000). Estes autores reportam um declínio de 47% na taxa de mortalidade devido à esquistossomose (1977 à 1994), diminuição em 50% na admissão de pacientes nas redes hospitalares do Brasil (1984 à 1997), além da grande redução das cirurgias de hipertensão portal (Correia et al., 1997).

6.3.3 - ETNIA

Traços físicos do indivíduo, principalmente pigmentação da pele, formato de lábios e nariz, cor e textura dos cabelos são frequentemente utilizados para categorizações étnicas e raciais e exercem grande influência nas relações sociais humanas. Todavia, o fenótipo pode ter sido consequência de adaptações a fatores geográficos seletivos e sua utilização como marcador étnico é errônea. Então, a classificação fenotípica realizada pelo observador ou pela auto-classificação dos indivíduos não representa necessariamente o que está expresso em marcadores moleculares étnicos. A falta de coincidência entre a definição molecular e fenotípica de etnia fica evidente neste estudo, quando apenas 14 indivíduos foram fenotipicamente considerados brancos, mas apenas 6 destes apresentaram marcas moleculares típicas de descendentes europeus, enquanto 30 que haviam sido classificados como miscigenados e negros possuíam marcadores moleculares de europeus (dados não tabulados).

Não foi observada diferença estatística significativa entre a etnia do paciente, avaliada através da classificação fenotípica pelo observador, auto-classificação ou avaliação molecular, e gravidade da esquistossomose avaliada pelo grau de fibrose de *Symmers* (ausente, leve, moderado e intensa) (Tabela 12). Porém, é importante ressaltar que os brancos, embora a associação não tenha sido significativa ($p=0,057$), quando a classificação étnica foi realizada pelo fenótipo, apresentaram as formas clínicas de fibrose mais graves. Relação semelhante também foi observada entre a classificação étnica (fenotípica) e a quantidade de ovos eliminado nas fezes, mesmo não sendo estatisticamente significativa ($p=0,057$), os brancos eliminam maior quantidade de ovos (Tabela 13). Estes dados são semelhantes aos achados de Prata (1992) que encontrou associação entre formas graves de esquistossomose e etnia branca do paciente, usando classificação fenotípica.

Neste mesmo estudo, Prata (1992) verificou que se um dos pais apresentava a forma hepatoesplênica da esquistossomose, quintuplicava a chance do descendente apresentar esta forma clínica grave da doença caso fosse infectado. É certo que outros fatores genéticos não relacionados com etnia possam, e devam, influenciar na modulação da esquistossomose. Estes fatores podem estar presentes em uma maior proporção de pessoas de alguma região que possuam a mesma origem étnica e passem os genes de expressão aos seus descendentes, mas isto não implica que o fator genético seja étnico. Dessein et al (1999) demonstraram que a forma hepatoesplênica presente em algumas famílias avaliadas em seu estudo estava associada à presença de um gene mutado codificador do receptor de IFN- γ , que impede sua funcionalidade e, conseqüentemente, interfere na modulação da fibrinogênese do granuloma.

Nos pacientes avaliados neste estudo também não foi encontrada associação entre os níveis de IgE e IgG com nenhuma das classificações étnicas. Estes achados indicam que não há tendências de resposta imunológica humoral diferenciada para esquistossomose entre indivíduos de diferentes origens étnicas, principalmente quando a classificação étnica é realizada baseada em parâmetros moleculares.

6.3.4 – AVALIAÇÃO DA GRAVIDADE EM ESQUISTOSSOMOSE

Até meados do século passado, a avaliação clínica dos pacientes com esquistossomose era o único método de determinação da gravidade da doença, porém este método demonstrava pouca sensibilidade, especificidade, além de muita subjetividade. Com a incorporação da ultra-sonografia, a avaliação clínica para definição de gravidade em pacientes com esquistossomose passou a ser considerada como método auxiliar (Abdel-Wahab et al., 1992).

Embora alguns estudos tenham tentado utilizar marcadores externos de fibrose, com aparente sucesso nos casos das dosagens do pro-colágeno I, do hialuran, do TGF- β ou da excreção da hidroxiprolia urinária, o presente consenso é de que ainda não estão disponíveis marcadores confiáveis de fibrose hepática (Andrade, 2004). A introdução do exame por ultra-sonografia como método de avaliar gravidade da esquistossomose, em substituição ao exame clínico isolado, foi considerado um grande avanço para a definição de pacientes com formas clínicas graves da doença (Gerspacher-Lara et al., 1997). É um método direto, seguro, rápido, não invasivo e relativamente de baixo custo, que pode detectar alterações patológicas mesmo nos estágios iniciais. Mais recentemente, Lambertucci et al. (2004) demonstraram que os resultados encontrados no exame de pacientes com esquistossomose pela ultra-sonografia estão em acordo com aqueles detectados pela ressonância magnética, confirmando a importância desta ferramenta na definição de gravidade da doença. Em pacientes com esquistossomose hepatoesplênica, o padrão ultra-sonográfico é característico, apresentando um marcado espessamento periportal que não é causado por nenhum outro agente, ou seja, não constitui um fator de confusão (Gerspacher-Lara et al., 1997).

Diferentes de outros autores (Coura & Conceição, 1981; Proietti et al., 1992; Martins, 1997; Mohamed-Ali et al., 1999), a população avaliada no presente estudo não apresentou associação significativa entre a forma clínica e a intensidade da infecção, quando foram comparados indivíduos com diferentes graus de fibrose de *Symmers* e o número de ovos do parasito eliminados por grama de fezes (Tabela 10). Um dos elementos que deve ser considerado é a baixa intensidade de ovos eliminados pelos pacientes desta população, sendo relatada existência de tratamentos específicos prévios por grande parte dos pacientes examinados. Dessa forma, a elevada taxa de fibrose observada neste estudo pode ser consequência de infecções crônicas passadas e tratadas. Santos et al. (2000) relataram maior proporção de fibrose periportal em animais reinfectados e com acúmulo da carga parasitária

somente quando o tratamento era ausente e após várias exposições à infecção. Também utilizando modelos experimentais, Silva et al. (2006) não verificaram correlação entre reinfecções e aumento da produção de ovos ou desenvolvimento da fibrose periportal nos animais em fase crônica de infecção. Prata (1992) também não encontrou nenhuma relação entre carga parasitária e hepatoesplenomegalia em uma população do interior de Minas Gerais.

Neste estudo ficou demonstrado que não existe uma relação entre hepatoesplenomegalia e fibrose; este último sendo o verdadeiro marcador de gravidade para esquistossomose. A maioria dos pacientes que apresentaram fígado (n=26) e baço (n=5) palpáveis ao exame clínico (Tabela 6), não possuía nenhum grau de fibrose (dados não tabulados). Isto é corroborado por Vennervald et al. (2004), que avaliaram crianças e adolescentes com esquistossomose e verificaram que a forma hepatoesplênica pode ocorrer sem a presença de fibrose, sugerindo que inflamação e alterações granulomatosas nas veias porta podem levar ao aumento da pressão, esplenomegalia e dilatação das veias porta sem fibrose periportal.

No presente estudo, a associação de parâmetros clínicos e ultra-sonográficos dos pacientes e os níveis de IgG e IgE revelou uma correlação positiva entre os níveis de IgE (total, anti-SEA e anti-SWAP) e a medida do fígado por ultra-sonografia no ângulo ântero-posterior (Tabelas 18, 19 e 20). Porém, quando realizada a regressão linear desta medida pelos coeficientes de biótipo (altura e peso), foi observado que esta variável (medida ântero-posterior esquerdo do fígado) consistia em um perfeito viés, ou variável de confusão, visto que a regressão linear da medida antero-posterior esquerdo do fígado com altura e peso do paciente demonstrou um $p=0,000$ para ambas, ou seja, à medida do fígado pelo lado antero-posterior esquerdo aumentava conforme aumentavam a altura e/ou peso dos indivíduos. Atualmente, por esta particularidade de bias, esta variável deixou de ser utilizada como parâmetro para avaliar

gravidade da esquistossomose hepática (WHO, 1996), onde a correção pelo biótipo só é possível para as medidas longitudinais. Dessa forma, a associação positiva entre níveis de IgE e esta medida de fígado não está diretamente associada com a gravidade.

Outra associação significativa verificada neste estudo foi a correlação inversa entre o aumento da espessura da parede da vesícula biliar com a diminuição dos níveis de IgE total e anti-SEA (Tabelas 27 e 28). Mohamed-Ali et al. (1999) encontraram forte relação entre aumento dos diâmetros da veia porta e da vesícula biliar e graus avançados de fibrose. Mudanças na vesícula biliar, bem como nos seus ductos, são marcas constantes e comuns da esquistossomose hepática grave, mas ainda é desconhecida sua repercussão funcional (Oliveira e Andrade, 2004). Esses autores verificaram que esta lesão não regride facilmente após o tratamento da esquistossomose. IgE anti-SEA aumentou naqueles pacientes que apresentaram contorno do fígado rugoso à ultra-sonografia (Tabela 19). Estes dados necessitam de uma maior investigação, visto que apenas 4 pacientes apresentavam a característica de fígado rugoso. Neste sentido, este estudo demonstrou que pacientes com alterações associadas às formas mais graves da esquistossomose teriam menos produção de IgE específica. Este dado corrobora com achados de outros autores que sugerem o efeito protetor da IgE específica (Hagan et al., 1991; Demeure et al., 1993; Viana et al., 1995; Jankovic et al., 1997; King et al., 1997; Naus et al., 1999; Nyindo et al., 1999; Corrêa-Oliveira et al., 2000; Mdulusa et al., 2001; Silveira et al., 2002b). A hipótese é que contínuas exposições aos antígenos do verme resultariam em resposta imunológica protetora, associada ao aumento de IgE anti-SWAP que, conseqüentemente, resulta em prevenção do depósito de grande número de ovos e dos desenvolvimento da imunopatologia associada às formas graves da esquistossomose (Nyindo et al., 1999; Corrêa-Oliveira et al., 2000; Mdulusa et al., 2001). Entretanto, vale ressaltar que, na maioria destes estudos, a associação encontrada é entre níveis de IgE anti-SWAP e proteção contra re-infecção, avaliada pela quantidade de ovos nas

fezes, sendo seu efeito na forma grave avaliado indiretamente. No presente trabalho, foi avaliado somente pacientes com exames parasitológicos positivos, em uma área endêmica caracterizada por baixa carga parasitária. Dessa forma, a relação inversa encontrada entre IgE anti-SEA e espessura da vesícula biliar pode ser consequência da participação de IgE na modulação do granuloma e/ou destruição dos ovos do parasito. Esta hipótese deverá ser futuramente verificada em modelos experimentais (Bonnard et al., 2004).

Outro resultado encontrado na população do presente estudo concerne na relação positiva entre IgG anti-SEA e o aumento do baço (Tabela 21). IgG anti-SWAP também demonstrou o mesmo perfil, aumentando à medida que o baço ou a espessura da parede da veia porta (em diversas medidas, principalmente na bifurcação) aumentam (Tabela 22). Em resumo, o presente resultado consistentemente associa positivamente o aumento de IgG reativa contra o parasito com formas clínicas graves da esquistossomose. Sabe-se que as IgGs são relatadas como Imunoglobulinas ligadas à patogênese e fibrose, principalmente IgG4 (Rihet et al., 1991; Dunne et al., 1992; Silveira et al., 2002 a e b; Bonnard et al., 2004; Lima, 2005). Assim, o aumento de IgG reativa contra antígenos do parasito em pacientes com esquistossomose grave corrobora com a maioria dos trabalhos descritos (Rihet et al., 1992; Demeure et al., 1993; Caldas et al., 2000; Silveira et al., 2002).

A esplenomegalia resulta de uma passiva congestão e hiperplasia do sistema reticuloendotelial (Lambertucci et al., 2000). O baço, sendo local de linfoproliferação, tem importante papel no desenvolvimento da fibrose de *Symmers*, com influências multifatoriais, incluindo ajuste vascular hepático e fatores associados à matriz extracelular do fígado (Andrade et al., 1998). Mudanças no fígado – como congestão, inflamação, fibrose e necrose - podem, às vezes, repercutir na estrutura e funcionamento esplênicos (Yamamoto, 1979).

Deve-se considerar a presença de alguns fatores de confusão não relatados no banco, como fatores nutricionais, genéticos e co-infecções. Todos estes fatores influenciariam na resposta imunológica dos indivíduos, bem como nos outros prognósticos da infecção. Mwatha et al. (2003), num estudo de caso-controle em co-infecção de esquistossomose e malária verificaram que a hepatoesplenomegalia não era devido à malária, mas as crianças co-infectadas hepatoesplênicas possuíam muito mais anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* quando comparadas às não-hepatoesplênicas, demonstrando que co-infecções influenciam a resposta humoral e, conseqüentemente, o desenvolvimento da hepatoesplenomegalia.

7. CONCLUSÕES

A adsorção do plasma de pacientes com esquistossomose em colunas de *Sepharose* conjugadas a antígenos de *S. mansoni* seguida de quantificação de IgE total no plasma adsorvido e não adsorvido permite uma quantificação absoluta e mais precisa do nível de IgE parasito-específico.

Os pacientes com esquistossomose mansônica avaliados neste estudo apresentaram baixa carga parasitária (mediana de 30opg) e não houve associação entre carga parasitária e o nível de IgG ou de IgE entre os pacientes examinados. Nesta população, a carga parasitária também não estava associada ao sexo e faixa etária dos pacientes. Neste estudo, também ficou demonstrado que não existe associação entre hepatoesplenomegalia e fibrose em pacientes com esquistossomose.

Não foi encontrada relação entre etnia, determinada por padrões moleculares, e IgE ou IgG específicos ou nível de fibrose de *Symmers* ou carga parasitária. Os dados sugerem que não importa a origem étnica (molecular ou auto-avaliação) do indivíduo para pressupor o prognóstico da evolução do quadro da esquistossomose.

Pacientes recentemente tratados especificamente para esquistossomose demonstraram diminuição de IgE (total e específicas).

Os indivíduos que tiveram aumento da vesícula biliar (um dos principais marcadores de fibrose) apresentaram diminuição de IgE. Os dados encontrados sugerem que o aumento de IgE (total e específicas para SEA) está relacionado à proteção contra a evolução do quadro de esquistossomose para fibrose.

O aumento de IgG reativa contra antígenos do parasito está positivamente associada com a presença de alterações em marcadores de fibrose (aumento do baço e da espessura da veia porta). Os dados encontrados sugerem que IgG, principalmente anti-SWAP, está relacionada à evolução da patologia para fibrose.

A IgG anti-SEA diminui com a idade. O dado sugere que com o passar da idade, em populações endêmicas, os níveis de IgGs, que não são protetoras, diminuem e isto ocorre independente de outros fatores.

8. PERSPECTIVAS

Sabe-se da necessidade de estimar IgG4 para contrapor seus dados àqueles descobertos para IgE e providências têm sido tomadas na busca de kits comerciais que minimizem a reação cruzada entre IgG4 e outras imunoglobulinas IgG.

Outros fatores imunológicos são de extrema importância na regulação da progressão da esquistossomose. Neste contexto, as citocinas e quimiocinas, proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adquirida, em resposta a diversos antígenos, e que são mediadores moleculares da diferenciação funcional de células efetoras ocupam um importante papel na participação na resposta imunológica em esquistossomose. Utilizando os mesmos pacientes deste estudo, análises destes mediadores estão em fase de realização. Foram dosados níveis das quimiocinas (CCL24/eotaxina-2, CCL3/MIP-1 α (Proteína inflamatória de Macrófagos) e CCL7/MIF (Fator inibitório da migração de macrófagos)) e citocinas (IL-5, MCP -3 (proteína quimiotática de monócitos-3), TNF- α (Fator de necrose tumoral) e receptor para TNF- α). Pretende-se relacionar os dados obtidos às variáveis do banco de dados, visando ampliar os conhecimentos acerca dos fatores considerados protetores ou patogênicos na progressão da doença.

Afinal, *“já que você tem que pensar de qualquer forma, pense grande” (Donald Trump).*

9. REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB F; ESMAT G; FARRAG A; ELBORAAY WA; STRICKLAND GT.- Grading of hepatic schistosomiasis by the use of ultrasonography. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 46: 403-408, 1992.
- AMARAL RS & PORTO MAS - Evolução e situação do controle da esquistossomose no Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 27(3): 73-90, 1994.
- AMIRI P; LOCKSLEY RM; PARSLow TG; SADICK M; RECTOR E; RITTER A; MCKERROW JH - Tumour-necrosis factor- α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, v. 356: 604-607, 1992.
- ANDRADE ZA; SILVA LM; DOUZA MM; SADIGURSKY M; BARBOSA A; OLIVEIRA IR – Role of the Spleen on the pathogenesis of schistosomal periportal (pipestem) fibrosis of the liver: an experimental approach – *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59(4): 557-562, 1998.
- ANDRADE, 2004 - Regressão da fibrose hepática. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38(6): 314-320, 2004.
- ATTALLAH AM; GHANEM GE; ISMAIL H; EI WASEEF AM - Placental and oral delivery of *Schistosoma mansoni* antigen from infected mothers to their newborns and children – *Am. J. Trop. Med.*, v.68 (6): 647-651, 2003.
- BAPTISTA AP & ANDRADE ZA – Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100(2): 183-185, 2005.
- BINA JC & PRATA A – Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I -Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36(2): 211-216, 2003.
- BOGLIOLO L; BRASILEIRO FILHO G – *Patologia* – 6ª edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.
- BONNARD P; REMOUE F; SCHACHT AM; DEUFFIC-BURBAN S; DOMPNIER JP; ELGUERO E; CHARRIER N; CASSAGNOU M; DIOP M; LY A; CAPRON A; RIVEAU G – Specific isotype immune response in the diagnosis of human schistosomiasis pathology? – *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 71 (2): 202-205, 2004.
- BOROS DFL & WARREN KS - Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by soluble isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. - *J. Exp. Med.*, v. 132:448-507, 1970.
- BUTTERWORTH AE; CURRY AJ; DUNNE DW; FULFORD AFC; GACHUHI K; KARIUKI HC; KLUMPP R; KOECH D; MBUGUA G; OUMA JH; ROBERTS M; THIONG'O FW; CAPRON A; STURROCK RF; - Immunity and morbidity in human schistosomiasis mansoni. *Trop. Geograf. Med.*, v. 46(4): 197-208, 1994.
- CAI XP; ZHANG H; ZHANG YC; WANG Y; SU C; JI AJ; WU HW; ZHU X; ZHANG ZS; WU GL – Dynamics of CD4+CD25+ T cells in spleens and mesenteric lymph nodes of mice infected with *Schistosoma japonicum* – *Acta Bioch. et Biophysica Sinica*, v. 38(5): 299-304, 2006.

CALDAS IR; CORRÊA-OLIVEIRA R; COLOSIMO E; CARVALHO OS; MASSARA CL; COLLEY DG; GAZZINELLI – Susceptibility and resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection: parallel cellular and isotypic immunologic assessment. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, v. 62(1): 57-64, 2000.

CHEEVER AW - Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol. Today*, v. 21: 465-466, 2000.

CHIARAMONTE MG; MENTINK-KANE M; JACOBSON BA; CHEEVER AW; WHITTERS MJ; GOAD ME; WONG A; COLLINS M; DONALDSON DD; GRUSBY MJ; WYNN TA – Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2- dominant immune response. *J. Exp. Med.*, v. 197(6):687-701, 2003.

COELHO PMZ - Resistência e suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In: BARBOSA, F. S. *Tópicos em Malacologia Médica*, Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, p. 208-217, 1995.

CONCEIÇÃO MJ & BORGES-PEREIRA J – Influence of specific treatment on the morbidity of schistosomiasis mansoni in endemic area of Minas Gerais, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 95(5): 755-757, 2002.

CORRÊA-OLIVEIRA R; CALDAS IR; MARTINS-FILHO AO; QUEIROZ CC; LAMBERTUCCI JR; CUNHA-MELO JR; SILVEIRA AS; PRATA A; WILSON A; GAZZINELLI G – Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. *Acta Trop.*, v. 77: 141-146, 2000.

CORREIA EI; MARTINELLI RP; ROCHA H – Is glomerulopathy due schistosomiasis mansoni disappearing? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 30: 341-343, 1997.

COURA JR & CONCEIÇÃO MJ – Correlação entre carga parasitária de *S.mansoni* e gravidade das formas clínicas em uma comunidade rural de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 19(1): 93-97, 1981.

COUTINHO AD – A new dynamic approach to the diagnosis of Symmers' fibrosis on schistosomiasis by ultrasound. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 32(2): 73-77, 1990.

DEJONG RJ; MORGAN JAT; PARAENSE WL; POINTIER JP; AMRISTA M; AYEHKUMI PFK; BABIKER A; BARBOSA CS; BRÉMOND P; CANESE AP; SOUZA CP; DOMINGUEZ C; FILE S; GUTIERREZ A; INCANI RN; KAWANO T; KAZIBWE F; KPIKPI J; LWAMBO NJS; MIMPFUNDI R; NJIOKOU F; PODA JN; SENE M; VELÁSQUEZ LE; YONG M; ADEMA CM; HOFKIN BV; MKOJI GM; LOKER ES - Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biol. Evol.*, v. 18(12): 2225-2239, 2001.

DEMEURE CE; RIHET P; ABEL L; OUATTARA M; BOURGOIS A; DESSEIN AJ - Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy – *J. Infect. Dis.*, v. 168: 1000-1008, 1993.

DESSEIN AJ; HILLAIRE D; ELWALI NE; MARQUET S; MOHAMED-ALI Q; MIRGHANI A; HENRI S; ABDELHAMEED AA; SAEED OK; MAGZOUB MM; ABEL L

- Severe hepatic fibrosis in *S. mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon- γ receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 65: 709-721, 1999.

DOENHOFF MJ – A role for granulomatous inflammation in the transmission of infectious disease: schistosomiasis and tuberculosis. *Parasitol.*, v. 115: 113-125, 1997

DUNNE DW & DOENHOFF MJ - *Schistosoma mansoni* egg antigens and hepatocyte damage in infected T-cell-deprived mice. *Contrib. Microbiol. Immunol.*, v. 7: 22-29, 1983.

DUNNE DW; BUTTERWORTH AE; FULFORD AJ; KARIUKI HC; LANGLEY JG; OUMA JH; CAPRON A; PIERCE EJ; STURROCK RF - Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigen and resistance to reinfection. *Eur. J. Immunol.*, v. 22: 1483-1494, 1992.

DUNNE DW; WEBSTER M; SMITH P; LANGLEY JG; RICHARDSON BA; FULFORD AJ; BUTTERWORTH AE; STURROCK RF; KARIUKI HC; OUMA JH - The isolation of a 22 Kda band after SDS-PAGE of *Schistosoma mansoni* adult worms and its use to demonstrate that IgE responses against the antigen(s) it constants are associated with human resistance to reinfection. *Parasite Immunol.*, v. 19(2): 79-89, 1997.

DUNNE DW & PEARCE EJ – Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes and Infect.* v. 1: 553-560, 1999.

DUTRA WO; CORREA-OLIVEIRA R; DUNNE D; CECCHINI LF; FRAGA L; ROBERTS M; SILVEIRA AMS; WEBSTER M; YSSEL H; GOLLOB KJ – Polarized Th2 like cells, in the absence of Th0 cells, are responsible for lymphocyte produced IL-4 in high IgE-producer schistosomiasis patients – *BMC Immunology*, v. 3:1-8, 2002.

FALLON PG & DUNNE DW – Tolerization of mice to *Schistosoma mansoni* egg antigens causes elevated type 1 and diminished type 2 cytokine responses and increased mortality in acute infection – *The J. of Immunol.*, v. 162: 4122-4132, 1999.

FALLON PG – Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunol. Today*, v.21: 29-35, 2000.

FALLON PG RICHARDSON EJ; McKENZIE GJ; McKENZIE ANJ – Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenesis roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *The J. of Immunol.*, v.164: 2585-2591, 2000.

GAZZINELLI A, BETHONY J, LOVERDE P, CORREA-OLIVEIRA R, KLOOS H - Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil I: water contact. *Trop. Med. and Int. Health*, 6(2):126-135, 2001.

GERSPACHER-LARA R; PINTO-SILVA RA; RAYES AAM; DRUMMOND SC; LAMBERTUCCI JR – Ultrasonography of periportal fibrosis in schistosomiasis mansoni in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.91: 307-309, 1997.

GORDON RM & GRIFFITHS RB - Observation on the means by which the cercariae of *S. mansoni* penetrate mammalian skin together with an account of certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae. *Ann. Trop. Med.*, v. 45: 227-243, 1951.

- GROGAN JL; KREMSNER PG; VAN DAM GJ; DEELDER AM; YAZDANBAKHSH M - Anti-schistosome IgG4 and IgE at 2 years after chemotherapy: infected versus uninfected individuals. *J Infect Dis.*, v. 176(5): 1344-50, 1997.
- HAGAN P; BLUMENTAL UJ; DUNN D; SIMPSON AJ; WILKINS HA – Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, v. 349(6306): 243-245, 1991.
- HOMEIDA M; ABDEL-GADIR AF; CHEEVER AW; BENNETT JL; ARBAB BM; IBRAHIUM SZ; ABDEL-SALAM IM; DAFALLA AA; NASH TE – Diagnosis of pathologically confirmed *Symmers'* periportal fibrosis by ultrasonography: a prospective blinded study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 38: 86-91, 1988.
- JANKOVIC D; KULLBERG MC; DOMBROWICS D; BARBIERI S; CASPAR P; WYNN TA; PAUL WE; CHEEVER AW; KINET JP; SHER A - FcεRI-deficient mice infected with *Schistosoma mansoni* mount normal Th2-type responses while displaying enhanced liver pathology. *J. Immunol.*, v. 159: 1868-1875, 1997.
- JOURDANE J; THERON A & COMBES C - Demonstration of several sporocysts generations as a normal pattern of reproduction of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, v. 37: 177-182, 1980.
- KABATEREINE NB, VENNERVALD BJ, OUMA JH, KEMIJUMBI J, BUTTERWOTH AE, DUNNE DW, FULFORD AJ - Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. *Parasitol.*, v. 118:101-105, 1999.
- KARDOFF R; TRAORE M; DIARRA A; SACKI M; MAIGA M; FRANKE D; VESTER U; HANSEN U; TRAORE HA; FONGORO S - Lack of ultrasonographic evidence for severe hepatosplenic morbidity in Schistosomiasis mansoni in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 51: 190-197, 1994.
- KATZ N; CHAVES A & PELLEGRINO J – A simple device for quantitative stool Thick-Smear Technique in schistosomiasis mansoni – *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 14 (6): 397-400, 1972.
- KATZ N & PEIXOTO SV – Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. *Rev Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 33(3): 303-308, 2000.
- KING CL; XIANLI J; MALHOTRA I; LIU S; MAHMOUD AA; OETTGEN HC - Mice with a targeted deletion of IgE gene have increased worm burdens and reduced granulomatous inflammation following primary infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, v. 158: 294-300, 1997.
- LAMBERTUCCI JR; ROCHA RS; CARVALHO OS; KATZ NA – Esquistossomose mansoni em Minas Gerais. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 20(1):47-52, 1987.
- LAMBERTUCCI JR – *Schistosoma mansoni*: Pathological and clinical aspects. In: JORDAN P; WEBBE G; SURROCK RF (Eds.) Human Schistosomiasis. Wallingford: *Cab. International*, cap.5: 195-235, 1993.

- LAMBERTUCCI JR; SERUFO JR; GERSPACHER-LARA R et al., - *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Trop.*, v. 77: 101-109, 2000.
- LAMBERTUCCI JR; SILVA LCS; ANDRADE LM; QUEIROZ LC; PINTO-SILVA RA – Magnetic resonance imaging and ultrasound in hepatosplenic schistosomiasis mansoni – *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.*, v. 37(4): 333-337, 2004.
- LIMA HD – Influência da intensidade de infecção pelo *Schistosoma mansoni* sobre o perfil de marcadores imunológicos da resposta celular e humoral na forma clínica intestinal da esquistossomose. *Dissertação Fundação Oswaldo Cruz*, Mestrado em Ciências da Saúde, 2005.
- LÓPEZ-MORENO HS – Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2. *Salud Pública de México*, v. 44(2): 145-152, 2002.
- LORTAT-JACOB H; BALTZER F; DESMOULIERE A; PEYROL S; GRIMAUD JA – Lobular- but not periportal- inhibition of collagen deposition in the liver of *S. mansoni* infected mice using interferon-gama. *J Hepatol.*, v. 26: 894-903, 1997.
- LOWRY OH; ROSEBROUGH NJ; FARR AL; RANDALL RJ – Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193(1): 265-275, 1951.
- MACDONALD AS; ARAUJO MI; PEARCE EJ – Immunology of Parasitic Helminth Infections. *Infect. And Immunity*, v. 70(2): 427-433, 2002.
- MARCH SC; PARIKH I; CUATRECASAS P – A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Analytical Biochemistry*, 60(1): 149-152, 1974.
- MARTINS MJ – A morbidade da esquistossomose mansônica em Queixadinha, Município de Carai, Minas Gerais. Belo Horizonte: ICB/UFMG. *Dissertação em Parasitologia*, 1997.
- MDULUZA T; NDHLOVU PD; MADZIWA TM; MIDZI N; ZINYAMA R; TURNER CMR; CHANDIWINA SK; NYAZEMA N; HAGAN P – The impact of repeated treatment with Praziquantel of schistosomiasis in children under six years of age living in an endemic area for *Schistosoma haematobium* infection. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96: 157-164, 2001.
- MENTINK-KANE MM & WYNN TA – Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor alpha 2 in health and disease. *Immunol. Rev.*, v. 202: 191-202, 2004.
- MITRE E & NUTMAN TB – IgE memory: persistence of antigen-specific IgE responses years after treatment of human filarial infections – *J. Allerg. Clin. Immunol.*, v. 117: 939-945, 2006.
- MOHAMED-ALI Q; ELWALI NEMA; ABDELHAMEED AA; MERGANI A; RAHOUD S; ELAGIB KE; SAEED OK; ABEL L; MAGZOUN MMA; DESSEIN AJ – Susceptibility to Periportal (*Symmers*) Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infections: Evidence that intensity and duration of infection, gender, and inherits factors are critical in disease progression. *The J. of Infect. Dis.*, v. 180: 1298-1306, 1999.
- MONTENEGRO SML; MIRANDA P; MAHANTY S; ABATH FGC; TEIXEIRA KM; COUTINHO EM; BRINKMAN J; GONÇALVES I; DOMINGUES LACD; SHER A;

- WYNN TA- Cytokine production in acute versus chronic schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of IFN- γ and IL-10 in the responses of PBMCs and splenocytes to parasite antigens. *The J. of Infect. Dis.*, v. 179: 1502-1514, 1999.
- MOSMANN TR; CHERWINSKI H; BOND MW; GIEDLIN MA; COFFMAN RL – Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, v. 136(7): 2348-2357, 1986.
- MOSMANN TR & SAD S – The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today*, v. 17: 138-146, 1996.
- MOSMANN TR; HENGARTNER H; KAGI D; FU W; SAD S – Differentiation and functions of T cell subsets; *Ciba. Found. Symp.*, v.204:148-154, 1997.
- MWATHA JK; KIMANI G; KAMAU T; MBUGUA GG; OUMA JH; MUMO J; FULFORD AJC; JONES FM; BUTTERWORTH AE; ROBERTS MB; DUNNE DW - High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN- γ , but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.*, v. 160: 1992-1999, 1998.
- MWATHA JK; JONES FM; MOHAMED G; NAUS CW; RILEY EM; BUTTERWOTH AE; KIMANI G; KARIUKI CH; OUMA JH; KOECH D; DUNNE DW – Associations between anti-Schistosoma mansoni and anti-Plasmodium falciparum antibody responses and hepatosplenomegaly, in Kenian schoolchildren. *J. Infect. Dis.*, v. 187(8): 1337-1341, 2003.
- NAUS CWA; BOOTH M; JONES FM; KEMIJUMBI J; VENNERVALD BJ; KARIUKI CH; OUMA JH; KABATEREINE NB; DUNNE DW – The relationship between age, sex, egg-count and specific antibody responses against *Schistosoma mansoni* antigens in a Ugandan fishing community – *Trop. Med. and Int. Health*, v.8 (6): 561-568, 2003.
- NEGRÃO-CORRÊA D; ADAMS LS & BELL RG – Intestinal transport and catabolism of IgE. A major blood-independent pathway of IgE dissemination during a *Trichinella spiralis* infection of rats. *J. Immunol.*, v. 157: 4037-4044, 1996.
- NEGRÃO-CORRÊA D – The intestinal response to infection with *Trichinella spiralis* in rats. Cornell, 1997 (*Tese de Doutorado*, Universidade de Cornell).
- NOVATO-SILVA E, GAZZINELLI G, COLLEY DG - Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XVIII Immunologic status of pregnant women and their neonates. *Scan J Immunol*, v. 35(4): 429-37, 1992.
- NYINDO M; KARIUKI TM; MOLA PW; FARAH IO; ELSON L; BLANTON RE; KING CL – Role of adult worm antigen-specific Immunoglobulin E in acquired immunity to *Schistosoma mansoni* infection in baboons – *Infect. and Immun.*, v. 67(2): 636-642, 1999.
- OLIVEIRA L & ANDRADE ZA – Significance of bile-duct changes in schistosomiasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 38(6): 464-468, 2004.
- PARRA EJ; MARCINI A; AKEY J; MARTINSON J; BATZER MA; COOPER R; FORRESTER T; ALLISON DB; DEKA R; FERREL RE; SHRIVER MD - *Am. J. Hum. Genet.*, v. 63: 1839-1851, 1998.

- PARRA FC; AMADO RC; LAMBERTUCCI JR; ROCHA J; ANTUNES CM; PENA – Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS*, v. 100(1): 177-182, 2003.
- PAUL JR – Antibodies to three different antigenic types of poliomyelitis virus in sera from north Alaskan Eskimos. *Am. J. Hyg.*, v. 54: 275-285, 1951.
- PEARCE EJ & MACDONALD AS – The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews/ Immunology*, v. 2: 499-511, 2002.
- PEARCE EJ – Priming of the immune response by schistosome eggs – *Parasite Immunology*, v. 27: 265-270, 2005.
- PELLEGRINO J & SIQUEIRA AF - Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, v. 8: 585-597, 1956.
- PELLEGRINO J & KATZ N – Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. *Adv. Parasitol.*, v. 6: 233-290, 1968.
- PEREIRA MG – Epidemiologia: Teoria e Prática. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, p. 583, 1995.
- PEREIRA WR – Fatores de risco associados à infecção pelo *Schistosoma mansoni*. Dissertação Fundação Osvaldo Cruz, *Mestrado em Ciências da Saúde*, 2006.
- PRATA A – Influence of host related factors in the development of the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87(4): 39-44, 1992.
- PROIETTI F; PAULINO UHM; CHIARI CA - Epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection in a low-endemic area: clinical and nutritional characteristics. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 34(5): 409-419, 1992.
- RABELLO A - Acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst O. Cruz*, v. 90: 277-290, 1995.
- REY L - *Schistosoma* e esquistossomose: O Parasito. In *Parasitologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 389-410, 1991.
- RICHTER J; HATZ C; CAMPAGNE G; BERGQUINT NR; JENKINS JM – Ultrasound in schistosomiasis, A practical guide to the standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis-related morbidity – *Second International Workshop – WHO/TDR*, Niger 1996.
- RIHET P; DEMEURE CE; PRATA A; BOURGOIS A; DESSEIN AJ – Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels – *Eur. J. Immunol.*, v. 21(11): 2679-2686, 1991.
- RIHET P; DEMEURE CE; DESSEIN AJ; BOURGOIS A - Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. *Euro. J. Immunol.*, v. 22(8): 2063-70, 1992.

- RIVERO JC; INOUE Y; MURAKAMI N; HORII Y – Androgen- and estrogen-dependent sex differences in host resistance to *Strongyloides venezuelensis* infection in Wistar Rats. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 64(6): 457-461, 2002.
- ROSSI D & ZLOTNIK A – The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 18: 217-242, 2000.
- SANTOS ABA; SOUZA MM; ANDRADE ZA – Reinfecções e desenvolvimento da fibrose periportal esquistossomótica no modelo murino. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 33(2): 197-200, 2000.
- SCOTT JT; VEREECKEN K; DIAKHATE MM; VANAGT T; SAMBOU V; DIOP M; LY A; VERCRUYSSSE J; GRYSEELS B; KESTENS L – Are the cellular immune responses of children and adults with *Schistosoma mansoni* infection intrinsically different? Cytokines produced ex vivo in response to antigens and mitogens. *Parasite Immunol.*, v. 26(1): 29-36, 2004.
- SILVA LM; RIBEIRO-DOS-SANTOS R; SOARES MBP; ANDRADE ZA – Characterizations of the vascular changes in schistosomal portal (piperstem) fibrosis of mice – *Acta Tropica*, v. 98: 34-42, 2006.
- SILVEIRA AMS; BETHONY J; GAZZINELLI A; KLOOS H; FRAGA LAO; ÁLVARES MCB; PRATA A; GUERRA HL; LOVERDE PT; CORREA-OLIVEIRA R; GAZZINELLI G – High levels of IgG4 to *Schistosoma mansoni* egg antigens in individuals with periportal fibrosis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 66(5): 542-549, 2002a.
- SILVEIRA AMS – Esquistossomose mansoni: efeito da infecção na resposta humoral e celular de indivíduos com e sem fibrose periportal. Dissertação UFMG *Doutorado em Bioquímica e Imunologia*, 2002b.
- SPEZIALI E; BETHONY J; MARTINS-FILHO O; FRAGA LAO; LEMOS DS; SOUZA LJ; CORRÊA-OLIVEIRA R; FARIA AMC – Production of interferon- γ by natural killer cells and aging in chronic human schistosomiasis. *Mediators of Inflammation.*, v. 13(5/6): 327-333, 2004.
- STATA CORP *Stata Statistical Software: Release 6.0 College Station, TX: Stata Corporation*, 1999.
- TANABE M; GONÇALVES JF; GONÇALVES FJ et. al. – Occurrence of a community with high morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection regardless of low infection intensity in north-east Brazil. *Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 91(2): 144-149, 1997.
- TAVARES-NETO J & PRATA A – A forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica, em relação à composição racial e o nível sócio-econômico, em Catolândia/BA. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 23(1): 37-42, 1990.
- THOMAS-DOMENECH JM & PADILLA-BOLIVAR A – Atlas das Raças Humanas. *Livro Íbero-Americano*, RJ pp.B1-B4, 1965.
- VENNERVALD BJ; KENTY LC; BUTTERWOTH AE; KARIUKI CH; KADZO H; IRERI E; AMARANGA C; KIMANI G; MWATHA J; OTEDO A; BOOTH M; OUMA JH; DUNNE DW – Detailed clinical and ultrasound examination of children and adolescents in a

Schistosoma mansoni endemic area in Kenya: hepatosplenic disease in the absence of portal fibrosis – **Trop. Med. and Int. Health**, v. 9(4): 461-470, 2004.

VIANA IR; CORREA-OLIVEIRA R; CARVALHO ODOS S; MASSARA CL; COLOSIMO E; COLLEY DG; GAZZINELLI G - Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. **Parasite Immunol.**, v. 17(6): 297-304, 1995.

WALLACH J – Interpretação de exames de laboratório, **Medsj**, 6ª edição, 1999.

WARREN KS; MAHNOUD AA; CUMMINGS P; MURPHY DJ; HOUSER HB – Schistosomiasis mansoni in Yemen in California: durations of infection, presence of disease, therapeutic management. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 23(5): 902-909, 1974.

WEBSTER M; LIBRANDA-RAMIREZ BDL; ALIGUI GD; OLVEDA RM; OUMA JH; KARIUKI HC; OLDS GR; FULFORD AJC; BUTTERWOTH AE; DUNNE DW – The Influence of sex and age on antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* in human populations in Kenya and the Philippines – **Parasitology**, v. 114: 383-393, 1997.

WEBSTER M; ROBERTS M; FULFORD AJC; MARGUERITE M; GALLISOT MC; DIAGNE M; NIANG M; RIVEAU G; CAPRON A; DUNNE DW – Human IgE response s to rSm22.6 are associated with infection intensity rather than age per se, in a recently established focus of Schistosomiasis mansoni – **Trop. Med. and Int. Health**, v. 3(4): 318-326, 1998.

WHO – World Health Organization, 1991.

WHO – World Health Organization, 1999.

WHO – World Health Organization, 2002. Schistosomiasis Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/schisto/index.html>> acesso em junho 2006.

WYNN TA; ELTOUM I; OSWALD IP; CHEEVER AW; SHER A – Endogenous interleukin-12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*, and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. **J. Exp. Med.**, v. 179(5): 1551-1561, 1994.

WYNN TA; CHEEVER AW; JANKOVIC D; POINDEXTER RW; CASPAR P; LEWIS FA; SHER A - An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. **Nature**, v. 376(6541): 594-596, 1995.

WYNN TA & CHEEVER AW – Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7(4): 505-511, 1995.

WYNN TA; CHEEVER AW; WILLIAMS ME; HIENY S; CASPAR P; KUHN R; MULLER W; SHER A - IL-10 regulates liver pathology in acute murine schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **J. Immunol.**, v. 160: 4473-4480, 1998.

WYNN TA; THOMPSON RW; CHEEVER AW; MENTINK-KANE MM – Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunological Rev.**, v. 201: 156-167, 2004.

YAMAMOTO K – Morphological study of the spleen in idiopathic portal hypertension (so called Banti's syndrome without cirrhosis) using light microscopy, scanning electron microscopy and histometry. *Acta Pathol. Jpn.*, v. 29: 1-19, 1979.

ZWINGERBERGER K; IRSCHICK E; VERGETTI SIQUEIRA JG; CORREIA DACAL AR; FELDMEIER H - Tumour necrosis factor in hepatosplenic schistosomiasis. *Scan. J. Immunol.*, v. 31(2): 205-211, 1990.

ANEXO A – NÍVEIS NORMAIS DE IgG E IgE

IgG (mg/dL)		IgE (IU/mL)	
0-4 meses	141-930	< 1 ano	0,0-6,6
5-8 meses	250-1.190	1-2 anos	0,0-20,0
9-11 meses	320-1.250	2-3 anos	0,1-15,8
1-3 anos	400-1.250	3-4 anos	0,0-29,2
4-6 anos	560-1.307	4-5 anos	0,3-25,0
7-9 anos	598-1.379	5-6 anos	0,2-17,6
10-12 anos	638-1.453	6-7 anos	0,2-13,1
13-15 anos	680-1.531	7-8 anos	0,3-46,1
16-17 anos	724-1.611	8-9 anos	1,8-60,1
> 18 anos	700-1.500	9-10 anos	3,6-81,0
		10-11 anos	8,0-95,0
		11-12 anos	1,5-99,7
		12-13 anos	3,9-83,5
		13-16 anos	3,3-188,0

ANEXO C- PARÂMETROS ULTRA-SONOGRÁFICOS, WHO 1991.

- Diâmetro longitudinal do fígado: para indivíduos adultos (>12 anos)

Lobo direito: >140 mm considerado normal; ≤ 140 mm (pequeno ou retraído).

Lobo esquerdo: ≤ 70 mm (considerado normal), > 70 mm (aumentado).

- Diâmetro longitudinal do baço: > 14 anos

Homens 112mm e mulheres 100 mm.

- Calibre da veia porta: medido ao nível do hilo hepático, correspondendo ao diâmetro da luz da veia, sem se considerar suas paredes. Valor máximo 12mm.

-Calibre da veia esplênica: medido ao nível do hilo hepático, valor máximo até 9mm.

- Espessura da parede anterior da veia porta: parâmetros de referência até 9mm.

- Espessura da parede da vesícula biliar: medida ao nível do corpo, valor de referência até 5mm.

- Espessura do ramo portal periférico: corresponde à espessura da parede do primeiro ramo de segunda ordem no lobo esquerdo na sua porção proximal.

ANEXO D- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


Parecer nº. ETIC 274/05

Interesse: Profa. Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 28 de setembro de 2005, o projeto de pesquisa intitulado « **Estudo das Alterações Imunológicas de Pacientes com Esquistossomose Mansônica e sua Associação com Formas Clínica e Parasitológica** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dr. Rui Rothe - Neves
Vice-Presidente do COEP/UFMG

11. APÊNDICE

APÊNDICE A - ANÁLISE UNIVARIADA

MODELO 1 – TODOS OS PACIENTES

Variáveis	IgE total (log ₁₀)	IgE anti-SEA (log ₁₀)	IgE anti-SWAP (log ₁₀)	IgG anti-SEA	IgG anti-SWAP	
	p	p	p	p	p	
Sociais	Sexo	0,660	0,146	0,177	0,625	0,302
	Idade	0,772	0,362	0,752	0,032	0,509
	Faixa etária	0,977	0,418	0,718	0,053	0,074
	Tratamento	0,011	0,002	0,002	0,497	0,580
	Contato água	0,013	0,245	0,130	0,025	0,179
	Frequência	0,380	0,272	0,251	0,312	0,288
	Opg (log)	0,613	0,442	0,583	0,711	0,096
Etnia	Molecular contínuo	0,907	0,786	0,549	0,867	0,697
	Molecular categórico	0,338	0,735	0,322	0,426	0,590
	Auto-avaliação	0,812	0,861	0,737	0,365	0,411
Fígado clínica (cm)	Palpável ou não	0,633	0,367	0,177	0,727	0,793
	Borda direita*	0,566	0,641	0,393	0,683	0,635
	Borda esquerda*	0,936	0,881	0,876	0,047	0,127
	Superfície*	0,128	0,061	0,089	0,409	0,018
	Contorno	0,392	0,209	0,283	0,512	0,006
	Consistência*	0,229	0,754	0,299	0,427	0,012
Som	Longitudinal direito	0,746	0,711	0,606	0,565	0,872
	Longitudinal esquerdo	0,644	0,969	0,843	0,201	0,066
U.	Ântero-posterior dir.	0,683	0,688	0,873	0,068	0,717
	Ântero-posterior esq.	0,020	0,004	0,025	0,116	0,101
Fígado (mm)	Presença de fibrose de <i>Symmers</i>	0,692	0,477	0,826	0,445	0,452
	Grau da fibrose	0,752	0,731	0,901	0,071	0,001
	Localização da fibrose*	0,126	0,667	0,242	0,547	0,523
Porta	Medida contínua	0,920	0,586	0,707	0,759	0,021
	> ou < que 9	0,512	0,881	0,766	0,981	0,022
	Parede no hilo	0,786	0,794	0,920	0,895	0,162
Veia (mm)	Parede na bifurcação contínua	0,949	0,486	0,520	0,624	0,009
	Parede na bifurcação > ou < que 4	0,824	0,538	0,571	0,104	0,106

Continuação MODELO 1

Variáveis		IgE total (log ₁₀)	IgE anti-SEA (log ₁₀)	IgE anti-SWAP (log ₁₀)	IgG anti-SEA	IgG anti-SWAP
		p	p	p	P	P
Baço clínica (cm)	Palpável ou não	0,104	0,122	0,228	0,084	0,014
	Tamanho.*	0,318	0,180	0,198	0,715	0,326
	Consistência*	0,712	0,907	0,747	0,915	0,069
Baço U. som (mm)	Tamanho contínuo	0,898	0,539	0,779	0,104	0,000
	Tamanho > ou < que 82	0,149	0,742	0,394	0,022	0,000
Vesícula biliar (mm)	Contínua	0,010	0,137	0,240	0,109	0,044
	Catagórica > ou < que 3	0,002	0,062	0,158	0,751	0,078
Gravidade	A Clinalt**	0,697	0,466	0,333	0,198	0,050
	B Grngr**	0,578	0,483	0,489	0,886	0,093
	C Clintrad**	0,706	0,884	0,625	0,236	0,028
	D grngrcl**	0,110	0,134	0,242	0,089	0,016

* não foram utilizadas na análise multivariada por representarem apenas os pacientes hepatoesplêncos.

** não foram utilizadas na análise multivariada por serem variáveis que agrupam outras, gerando colinearidade.