



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA AGUDA HUMANA**

JOELMA RODRIGUES DE SOUZA

**RECIFE – PE
2005**

JOELMA RODRIGUES DE SOUZA

**PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA AGUDA HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Bioquímica por esta
Universidade.

Orientador: Dr. Luiz Bezerra Carvalho Júnior

Co-orientadores: Dr.^a Silvia Maria Lucena Montenegro
Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath

**RECIFE – PE
2005**

Souza, Joelma Rodrigues de
Produção de citocinas antes e após o tratamento
da esquistossomose mansônica aguda humana /
Joelma Rodrigues de Souza. – Recife : O Autor, 2005.
xxii 65 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Bioquímica, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Bioquímica – Proteínas. 2. Citocinas e
anticorpos – Dosagem – Fase aguda de
esquistossomose humana. 3. IFN- γ (interferon-gama),
IL-4(Interleucina-4) e IgE (Imunoglobulina E) –
Pacientes esquistossomóticos agudos – Dosagem
comparativa pré e pós-tratamento com Oxamniquine
- I. Título.

577.112
572.645

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-184



**PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA AGUDA HUMANA**

Projeto desenvolvido no Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ em Colaboração com o Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

**RECIFE – PE
2005
FICHA DE APROVAÇÃO**

Dissertação defendida e apresentada à Banca Examinadora:

Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior – (Orientador)
Departamento de Bioquímica – UFPE e LIKA

Dr.^a Valéria Rêgo Alves Pereira – (1º Examinador)
Departamento de Imunologia – CPqAM - FIOCRUZ

Dr.^a Maria da Paz Carvalho da Silva – (2º Examinador)
Departamento de Bioquímica - UFPE

Dr. Aníbal Eugenio Vercesi – (3º Examinador)
Departamento de Patologia Clínica – UNICAMP

Dr.^a Silvia Maria Lucena Montenegro – (Co-Orientadora)
Departamento de Imunologia – CPqAM – FIOCRUZ

Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath – (Co-Orientador)
Departamento de Imunologia – CPqAM - FIOCRUZ

Data: 24/02/2005

Hora: 14:00 h

Local: Sala de Aulas do LIKA

"Daquilo que eu sei,
Nem tudo me foi permitido
Nem tudo me deu certeza;
Daquilo que eu sei,
Nem tudo me foi proibido
Nem tudo me foi possível
Nem tudo foi concebido.
Não fechei os olhos,
Não tapei os ouvidos,
Cheirei, toquei, provei.
Ah ! eu usei todos os sentidos,
Só não lavei as mãos
E é por isso que eu me sinto,
Cada vez mais limpo !"

(Ivan Lins & Victor Martins)

DEDICATÓRIAS

Aos meus queridos pais, Joel e Conceição, por toda vida de carinho, amor, incentivo e dedicação. Muito Obrigada !

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, sabedoria, amor e discernimento.

Aos meus pais, Joel e Conceição, pelo carinho, apoio, investimento e todo amor.

Aos meus orientadores: Dr. Luiz Carvalho, Dr.^a Silvia Montenegro e Dr. Frederico Abath, pela confiança, dedicação, orientação e amizade que tanto contribuíram para meu amadurecimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos de mestrado: Bianka, Mônica, Amanda, Aurelino, Clébia, Eduardo, Márcio, Carlos, Gilvanely e Ana Helena, pelo apoio, incentivo, amizade e todos os momentos inesquecíveis que fizeram nossa turma única e peculiar: o meu muito obrigada !

A todos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, em especial aos membros e amigos do Departamento de Imunologia: Clarice, Wladimir, Eduardo, Valéria, Fábio, Lula, Mineo, Roberto, Neidinha, Virgínia, Daniele, Victor, Flávia, Fábiana e Neide; da Biblioteca: Virgínia e Romero; do Núcleo de Informática: Gilvan e Carlos; da esterilização: Rita, Socorro e Edson.

Ao Dr. Marcílio Aroucha e a Dr.^a Ana Lúcia Domingues pelo incentivo e colaboração na seleção de pacientes.

A Dr.^a Constança Barbosa e Ao Dr. Paulo Miranda pela colaboração nesse estudo.

Aos meus amigos: Marcelo, Sidney, Cristhian, Lilian Beck, Ricardo, Janielle, Áurea, Ayla, Rachel, Bruninho, Adenor, Dewson, Tiago, Ana Lenira, César e Aninha.

A minha família, pelo incentivo constante.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica, pelos valiosos ensinamentos.

Aos Funcionários do Departamento de Bioquímica: Miron, Neide, Djalma, Flávio, João e Ademar, por toda ajuda e disponibilidade.

Aos Pacientes e aos membros do grupo controle, sem os quais esse estudo não teria sido realizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES – pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELA.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUÇÃO.....	01
1. HISTÓRICO.....	01
2. EPIDEMIOLOGIA.....	02
3. O PARASITO.....	06
4. CICLO BIOLÓGICO.....	08
5. FORMAS CLÍNICAS.....	10
6. DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E CONTROLE.....	12
7. RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE.....	15
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
JUSTIFICATIVA.....	32
OBJETIVOS.....	34
• GERAL.....	35
• ESPECÍFICOS.....	35
ARTIGO CIENTÍFICO.....	36
METODOLOGIA DETALHADA.....	55
1. EQUIPAMENTOS.....	56
2. REAGENTES E PRODUTOS.....	56
3. CASUÍSTICA.....	57
4. PREPARAÇÃO CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA.....	58
5. ANTÍGENOS E MITÓGENOS.....	59
6. DOSAGEM DE ANTICORPOS IgE TOTAL.....	59
7. DOSAGENS DE CITOCINAS.....	62
8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CONCLUSÕES.....	64
ANEXOS.....	66
• CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	67
• KIT IgE TOTAL.....	71
• PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS.....	74
• GUIDE FOR AUTHORS.....	77

FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO:	
Figura 1. Distribuição Mundial da Esquistossomose.....	03
Figura 2. Fluxo Migratório Humano e Distribuição dos Hospedeiros Intermediários do <i>S. mansoni</i>	04
Figura 3. Distribuição Geográfica da Esquistossomose no Brasil.....	05
Figura 4. Ciclo Evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	09
Figura 5. Pacientes com a Forma Hepatoesplênica Descompensada.....	11
Figura 6. Praziquantel.....	13
Figura 7. Oxamniquine.....	14
 ARTIGO CIENTÍFICO	
Figure 1. IFN- γ levels measured by ELISA in whole blood cultures from acute patients pre and post-treatment	48
Figure 2. IL-4 levels measured by ELISA in whole blood cultures from acute patients pre and post-treatment	49
 METODOLOGIA DETALHADA	
Figura 8. Placa de cultura celular durante estimulação com SEA, SWAP, PMA/IONO e sem estimulação.....	59
Figura 9. Desenho esquemático mostrando a dosagem de anticorpos IgE total.....	61

TABELAS

LISTA DE TABELA

Página

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1. Measurements of Total Leukocytes, Eosinophil, IgE and Parasite

Burden in Schistosomiasis Acute Patients Pre and Post-Treatment.....47

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino- di [sulfato (6) de 3-etil benztiazolina]
ADCC	Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAA	Antígeno Anódico Circulante
CCA	Antígeno Catiônico Circulante
CD	“Cluster of Differentiation”
CO ₂	Dióxido de Carbono
DTH	Hipersensibilidade do Tipo Tardio
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
Fc	Fragmento cristalizável - Imunoglobulina
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IONO	Ionicina
JAK	“Janus Kinases”
KLH	“Keyhole Limpet Haemocyanin”
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
NaOH	Hidróxido de Sódio
PBS	Salina tamponada com fosfato
NK	Células Matadoras Naturais
PECE	Programa Especial para o Controle da Esquistossomose
pH	Potencial hidrogeniônico
PMA	Acetato de forbol miristato
RNAm	Ácido Ribonucleíco mensageiro
RPMI	Meio “Roswell Park Memorial Institute”
SDS	Dodecil Sulfato de sódio
SEA	Antígeno Solúvel de Ovo
STAT	“Signal Transducer and Activator of Transcription”

SWAP	Antígeno Solúvel de Verme Adulto
TCR	Receptor de Célula T
Th0	Linfócitos T auxiliares do tipo 0
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
WHO	“World Health Organization”

RESUMO

RESUMO

Em Pernambuco, onde a esquistossomose é historicamente considerada endêmica na região rural, novos focos de infecção aguda têm sido evidenciados em áreas litorâneas. Um episódio epidêmico incomum de esquistossomose aguda em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, permitiu-nos estudar alguns aspectos imunológicos, hematológicos e parasitológicos em 36 pacientes antes e após o tratamento com oxamniquine. O sangue foi coletado e diluído em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100µg/ml), e as culturas de sangue total foram realizadas em 14 pacientes sob estimulação antigênica com antígeno solúvel de ovo (SEA) e antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) e mitogênica com acetato de forbol miristato/Ionomicina (PMA/Iono) por 96 horas em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Os sobrenadantes foram coletados para determinação das citocinas Th1 (IFN-γ) e Th2 (IL-4) através de ELISA. Análises estatísticas foram realizadas através do teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras emparelhadas e $p < 0,05$ foi considerado significativo. A infecção com *Schistosoma mansoni* foi predominante na faixa etária de 5-15 anos (69,44%) e nos indivíduos do sexo masculino (63,89%). A carga parasitária, avaliada pelo método semi-quantitativo Kato-Katz, variou entre 24 a 1.656 ovos/g de fezes antes do tratamento e apenas 3 pacientes permaneceram positivos após o tratamento. Leucocitose e eosinofilia foram evidenciadas antes e após o tratamento. Os níveis de IgE mostraram-se elevados antes do tratamento, ocorrendo uma redução significativa após o tratamento ($p=0,0119$). Os níveis de IFN-γ dos pacientes agudos elevaram-se significativamente após o tratamento, sob estimulação com SEA ($p=0,019$), SWAP ($p=0,019$), PMA/Iono ($p=0,0029$) e sem estimulação ($p=0,0088$). Níveis da citocina IL-4, após tratamento, apresentaram-se significativamente elevados apenas sob estimulação com SEA ($p=0,0277$) e sem estimulação ($p=0,043$). Ambas as respostas Th1 e Th2 foram exacerbadas após o tratamento. Os resultados encontrados sugerem que a resposta imune na esquistossomose é modificada pelo tratamento, provavelmente devido à destruição dos parasitas e liberação de antígenos.

ABSTRACT

ABSTRACT

In the Pernambuco State, Brazil, schistosomiasis is historically considered a rural chronic endemic disease. However, new sites of acute transmission are gradually expanding into the coastal regions. An unusual outbreak of acute schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, allowed us to study some immunological, hematological and parasitological features of 36 schistosomiasis patients before and after treatment with oxamniquine. The peripheral blood was collected and diluted in RPMI 1640 medium plus penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 µg/ml) and whole blood cultures were performed from 14 patients, stimulating with soluble egg antigen (SEA), soluble adult worm preparation (SWAP) and mitogens, phorbol myristate acetate (PMA/IONO) for 96 h in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The supernatants were collected for subsequent IFN-γ and IL-4 quantitation by ELISA. Statistical analyses were performed using the Wilcoxon Signed Rank Test and $p < 0.05$ was considered significant. *Schistosoma mansoni* infection predominated in males (63.89 %), aging from 05-15 years (69.44%). The parasite burden was evaluated by the Kato/Katz semi-quantitative method, and ranged from 24-1656 eggs/g of stool before treatment. Only three patients remained positive after treatment. Leukocytosis and eosinophilia were evidenced before and after treatment. IgE levels, that was increased before treatment, significantly decreased after treatment ($p=0.0119$). IFN-γ levels increased significantly after treatment under SEA ($p=0,019$), SWAP ($p=0,019$) and PMA/IONO ($p=0,0029$) stimulations and even in basal conditions ($p=0,0088$). IL-4 levels after treatment, increased significantly under SEA ($p=0,0277$) stimulation and basal conditions ($p=0,043$). After treatment both Th1(IFN-γ) and Th2 (IL4) responses were exacerbated. These results suggest that the immune response in *Schistosoma mansoni* infection is strongly influenced by the treatment, probably due to the destruction of parasites and release of antigens.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. HISTÓRICO

Em 1851, o médico alemão Theodore Bilharz relatou pela primeira vez, durante uma autópsia, a presença de um verme, hoje denominado *Schistosoma haematobium*, nas veias mesentéricas de um camponês egípcio. Ele também contribuiu para as técnicas de diagnóstico ao desenhar ovos com espículos como característicos desse parasito. Entretanto, ele considerou que, os ovos com espículo lateral e terminal pertenciam a uma mesma espécie. Este conceito passou a ser questionado em 1902 por Patrick Manson que definiu a existência de diferentes espécies, sendo acompanhado nessa teoria por Loss que também explicou a formação de ovos com espículo lateral como consequência para o excesso de células vitelinas do ootipo. A dúvida persistiu até que em 1907, Sambon estabeleceu a nova espécie: *Schistosoma mansoni*. Um ano depois, Pirajá da Silva, na Bahia, descreveu pela primeira vez a esquistossomose mansônica no Brasil, confirmando a existência de uma espécie de agressão intestinal cujo ovo apresentava espículo lateral (RABELO, 1997). Entretanto, coube a Ruffer em 1910, a observação mais antiga da existência da infecção que relacionou a presença de ovos calcificados nos rins de duas múmias egípcias da dinastia 20 (1250-1000 a.C.); e com a descoberta de antígenos circulantes do parasita nos tecidos das múmias, sabemos hoje que a humanidade convive com essa patologia desde 3000 anos a.C. (MILLER *et al*, 1992; COURA & AMARAL, 2004).

Em 1847, no Japão, Fuji descreveu a Síndrome de Katayama, que posteriormente fora caracterizada como sendo a fase aguda da infecção causada pelo *Schistosoma japonicum* (COURA & AMARAL, 2004). Contudo, apenas em 1914 moluscos do gênero *Oncomelania* foram apontados como sendo os hospedeiros intermediários dessa espécie (MIYAIRI & SUZUKI, 1914). Um ano depois, Leiper identificou os gêneros *Bulinus* e *Biomphalaria*, nas Américas, como sendo os hospedeiros intermediários do *S. haematobium* e *S. mansoni*, respectivamente (COURA & MOURA, 2004).

Em 1919, Adolf Lutz descreveu a primeira alteração no método de diagnóstico para esquistossomose utilizando a homogeneização e sedimentação das fezes (RABELO, 1997). Esse método foi modificado por Hoffman, Pons e Janer (1934) e ainda hoje é largamente utilizado para diagnosticar ovos de helmintos e cistos de protozoários (REY, 2001). Lutz, também descreveu, no Brasil, o ciclo evolutivo do parasito (NEVES, 2000).

Seis espécies de *Schistosoma* podem infectar o homem: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* e *S. malayensis*; mas apenas o *S. mansoni* tem sido encontrado no Brasil. Dentre os hospedeiros intermediários, três espécies do gênero *Biomphalaria* têm sido descritas como hospedeiros naturais: *B. glabrata*, *B. straminea*, *B. tenagophila*; e duas como hospedeiros em potencial: *B. amazonica* e *B. peregrina*, uma vez que elas só foram infectadas experimentalmente (PARAENSE, 1966; PARAENSE, 1981).

2. EPIDEMIOLOGIA

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica que acomete mais de 200 milhões de pessoas no mundo, sendo endêmica em mais de 74 países (Figura 1). Cerca de 120 milhões de indivíduos apresentam manifestações clínicas da doença, e 20 milhões são acometidos com a forma grave hepatoesplênica (WHO, 1997).

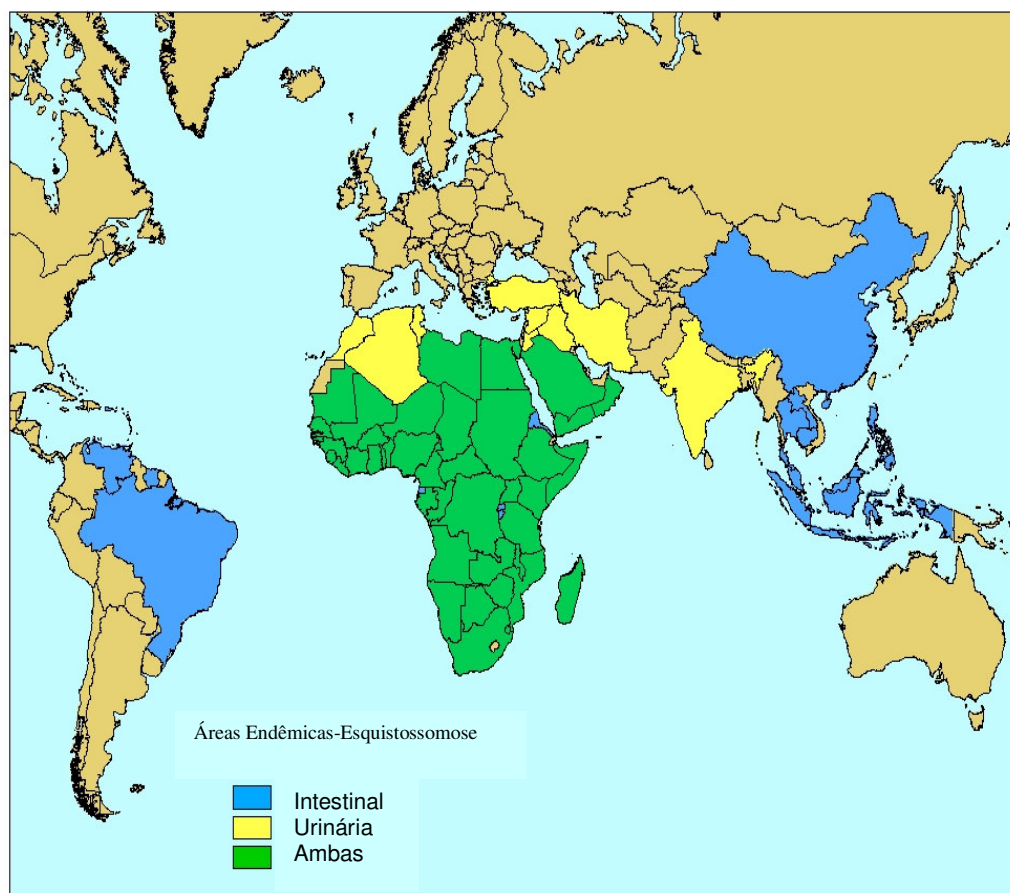
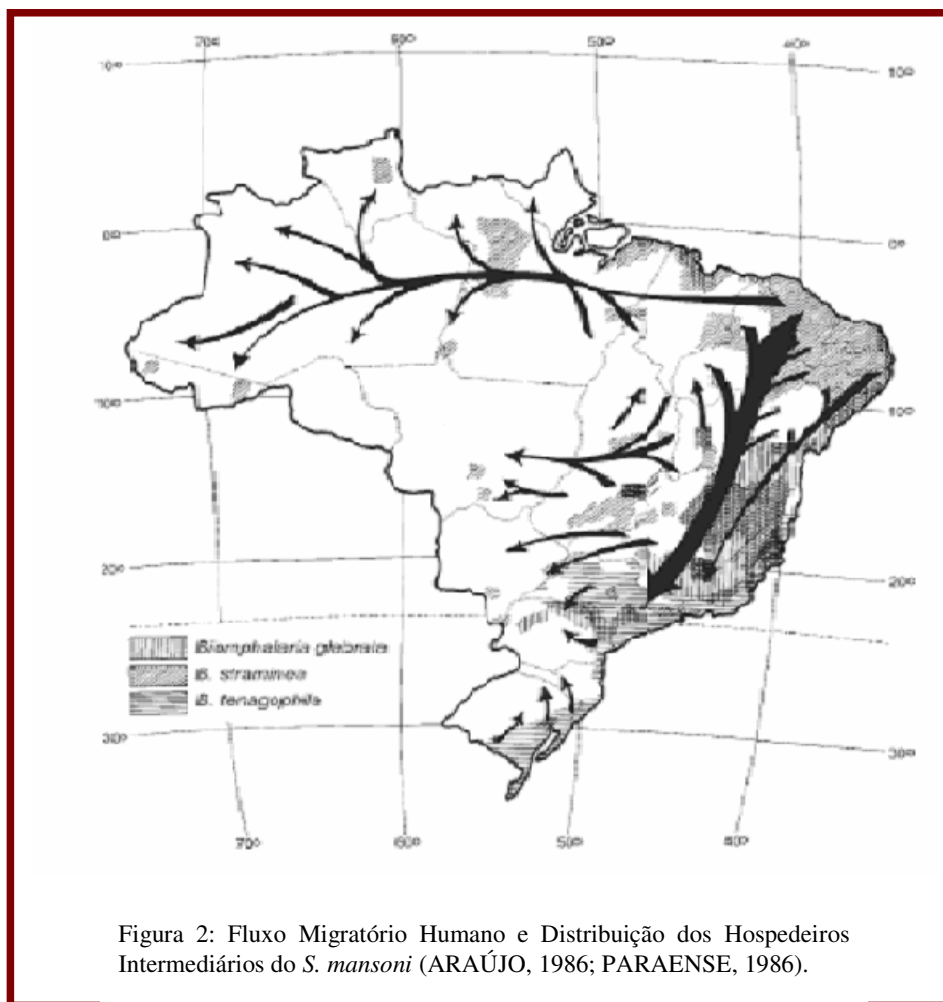


Figura 1: Distribuição Mundial da Esquistossomose (WHO,1997).

O tráfico de escravos africanos, provavelmente introduziu a esquistossomose no Brasil logo após a descoberta do país, e os fluxos migratórios foram responsáveis por propagar a doença da costa litorânea para o interior (Figura 2) (ARAÚJO, 1986; PARAENSE, 1986).



Atualmente, a transmissão esquistossomótica compreende uma vasta área endêmica do Maranhão ao Espírito Santo e em Minas Gerais. Os estados de Pernambuco, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Alagoas são descritos como áreas de elevada prevalência. Há ainda a presença de focos isolados no Distrito Federal e nos estados do Paraná, Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio

Grande do Sul (Figura 3) (AMARAL & PORTO, 1994). De acordo com a FUNASA, estima-se que cerca de 25 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção, existindo 2,5 milhões de pessoas infectadas no Brasil (CHITSULO *et al*, 2000).

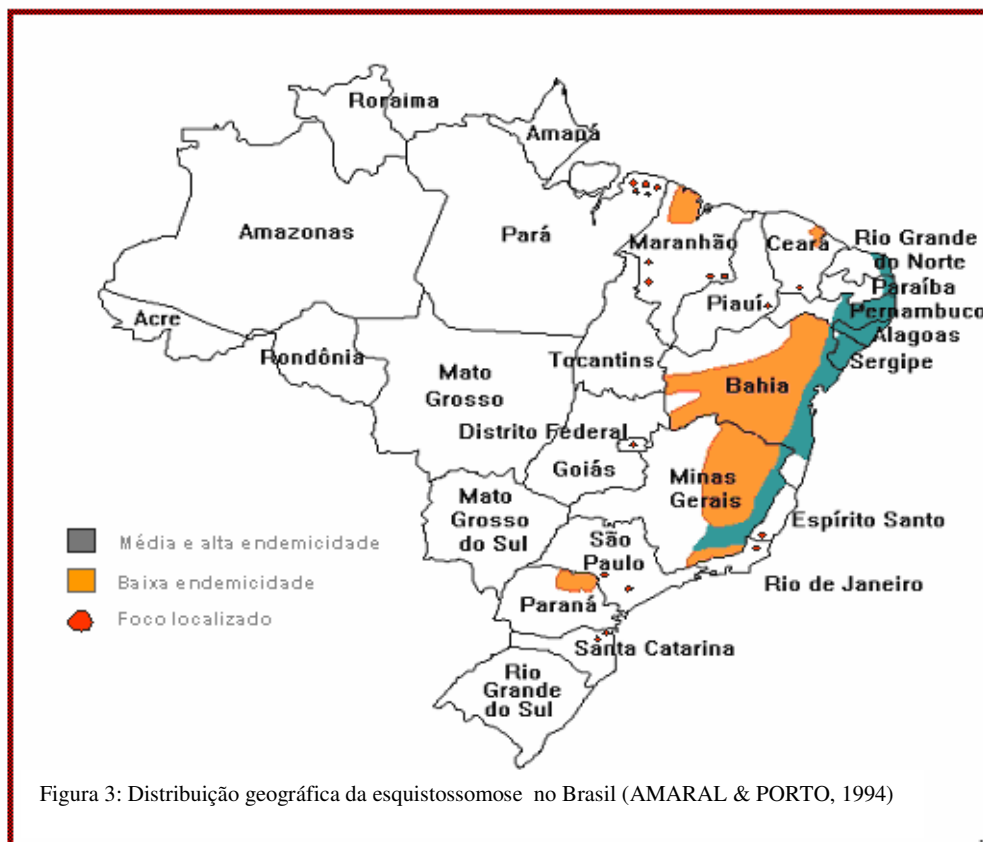


Figura 3: Distribuição geográfica da esquistossomose no Brasil (AMARAL & PORTO, 1994)

Em Pernambuco, a esquistossomose é uma doença historicamente endêmica na região rural (COUTINHO *et al*, 1997), apresentando-se predominantemente sob a forma crônica, incidindo na classe social de baixa renda e tendo como vetor o caramujo *Biomphalaria straminea*. Entretanto, devido à migração de trabalhadores rurais juntamente à gradual ocupação e modificação dos espaços urbanos, tem sido determinada uma expansão contínua desta doença para o litoral do estado, sendo que neste caso há uma maior frequência da forma aguda e em pessoas de classes média e alta, sendo o vetor *Biomphalaria glabrata* (BARBOSA *et al*, 2001). Calcula-se que a área endêmica ocupa 17.215 km² o que corresponde a 17,5 % da área total do estado,

abrangendo 79 (47%) dos 167 municípios, dos quais 55 (73,3%) estão na zona litoralmata e 24 (30,4%), no agreste (FAVRE *et al*, 2001).

A distribuição geográfica do *S. mansoni* está condicionada à presença de seus hospedeiros intermediários: os moluscos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, a *B. glabrata* é encontrada no sudeste da Bahia, norte do Espírito Santo e centro-oeste de Minas Gerais além de Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Maranhão, Pará, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná; a espécie *B. straminea* é encontrada no Acre, Amazonas, Paraná, Maranhão, Goiás, toda Região Nordeste, alguns pontos de Minas Gerais, Pará, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso; já a *B. tenagophila* encontra-se distribuída no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Brasília. A *B. glabrata* apresenta alta suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, aparecendo como o mais importante vetor da doença no Brasil e outros países latino-americanos, devido principalmente, ao seu maior tamanho, melhor adaptação ao parasito, maior sobrevivência quando infectada e maior número de cercárias eliminadas (MALAGUEÑO & SANTANA, 1994). Durante as últimas décadas, o padrão epidemiológico tradicional vem apresentando uma tendência de mudança. O acelerado movimento migratório do interior para as cidades tem determinado um aumento da urbanização da esquistossomose (SUASSUNA & COURA 1969; STURROCK 2001; BARBOSA *et al*, 2001). Surtos epidêmicos de esquistossomose aguda vem sendo relatados especialmente em zonas urbanas (FERREIRA *et al*, 1960; FERREIRA *et al*, 1966; COURA *et al*, 1970; NEVES, 1992; RABELO, 1995; BARBOSA *et al*, 2001).

3. O PARASITO

O *S. mansoni* é um trematódeo da subclasse *Digenea* que compreende espécies endoparasitas, com o corpo não-segmentado e revestido por uma citomembrana que recobre o tegumento de natureza sincicial. Possuem órgãos de fixação constituídos fundamentalmente por ventosas, desprovidas de acúleos, uma das quais dispõe-se em torno da abertura oral, estando a outra situada ventralmente e também denominada acetábulo. Seu aparelho digestivo é incompleto, terminando em fundo cego (não há ânus), e o aparelho excretor abre-se em um só poro posterior. Por pertencer a família *Schistosomidae*, subfamília *Schistosomatinae*, apresenta os sexos separados com acentuado dimorfismo sexual (REY, 2001).

O verme adulto macho é mais curto e apresenta o corpo esbranquiçado e achatado dorso-ventralmente na extremidade posterior, embora ao se encurvar sobre a fêmea latero-ventralmente forme uma calha ou tubo longitudinal denominado canal ginecóforo assumindo um formato quase cilíndrico. Seu tegumento é grosseiro, apresentando tubérculos intercalados com espinhos e papilas, formado por uma citomembrana heptalaminar em constante processo de renovação (REY, 2001).

A fêmea é mais fina e longa apresentando-se mais escura e acinzentada devido a um pigmento derivado da metabolização da hemoglobina, a hemozoína. O tegumento é quase liso, exceto na extremidade posterior, onde apresenta espinhos (MALAGUEÑO & SANTANA, 1994). Seu formato é quase cilíndrico, adaptado à migração por pequenos vasos onde ovipõe. As fêmeas põem um ovo por vez, embora o total diário pode chegar a 300 ovos (REY, 2001).

O ovo do parasito mede cerca de 150 μm de comprimento por 60 μm de largura, apresenta-se ovóide com pólo posterior contendo um espículo lateral saliente. Após a postura, os ovos contendo no seu interior o miracídio, levam cerca de uma semana para amadurecerem (NEVES, 2000).

O miracídio, apresenta sua superfície externa medindo 160 μm x 60 μm e está revestida por pequenas células epiteliais pavimentosas e ciliadas. A parede do corpo completa-se com um folheto mesodérmico contendo fibras musculares. Na extremidade anterior, o tegumento forma inúmeras pregas, que funcionam como ventosas de aderência, em forma de cone. No ápice do cone, encontra-se um par de glândulas adesivas e uma glândula de penetração, que auxiliam na infecção de seu hospedeiro. Os miracídios exibem fototropismo marcante, distinguindo graus de intensidade luminosa e buscando áreas mais claras (REY, 2001).

O esporocisto é a forma evolutiva do parasito que se caracteriza por atrofia da musculatura e desaparecimento dos órgãos de penetração do miracídio, transformando-se em uma estrutura sacular alongada, enovelada, imóvel, cheio de células germinativas em multiplicação (REY, 2001).

As cercárias apresentam pouco mais de 1 centímetro de comprimento, distinguindo-se o corpo com 0,2 mm por 0,07 mm, e a cauda com cerca de 0,32 mm, bifurcada no extremo distal. O tegumento é eriçado de microespinhos e a extremidade anterior é mais estreita constituindo o órgão de fixação cefálico, onde se abrem os canais das glândulas de penetração (REY, 2001).

O esquistossômulo apresenta-se com um aspecto veriforme sem a cauda e o glicocálix da cercária. Seu tegumento é trilaminar modificando-se durante sua maturação até o arranjo heptalaminar existente no verme adulto (REY, 2001).

4. CICLO BIOLÓGICO

A infecção com o helminto *S. mansoni* ocorre pela penetração ativa de cercárias através da pele e/ou mucosas do hospedeiro vertebrado susceptível, que em seguida perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos. Esse parasito desenvolve sua fase adulta na luz dos vasos sanguíneos do homem e de outros mamíferos, habitando preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário superior e as ramificações mais finas das veias mesentéricas, em particular a mesentérica inferior, onde faz sua oviposição. Após atravessarem a mucosa intestinal, esses ovos são eliminados com as fezes e, em presença de luz intensa, oxigenação adequada da água e temperatura em torno de 28°C, libertam seus miracídios, os quais se tornam alongados e nadam ativamente durante algumas horas, até encontrarem os hospedeiros intermediários (NEVES, 2000).

Os prováveis fatores que promovem a passagem do ovo para luz intestinal são: reação inflamatória, adelgaçamento da parede dos vasos provocados pela distensão dos mesmos devido à presença dos vermes adultos em sua luz, ações mecânicas devido ao peristaltismo intestinal, ações líticas desenvolvidas por enzimas do próprio miracídio ou dos eosinófilos que aderem em grande número a superfície ovular lesando os tecidos. Os ovos que não conseguirem chegar até a luz intestinal, terão os miracídios mortos, e estes poderão ficar presos na mucosa intestinal ou ser arrastados para o fígado. Os ovos que vão ao exterior com as fezes têm uma expectativa de vida de 24 horas em fezes líquidas a cinco dias em fezes sólidas (NEVES, 2000; REY, 2001).

Ao penetrar nos tecidos do molusco, os miracídios transformam-se em esporocistos, que por poliembrionia, geram esporocistos-filhos e depois cercárias (Figura 4) (REY, 2001).

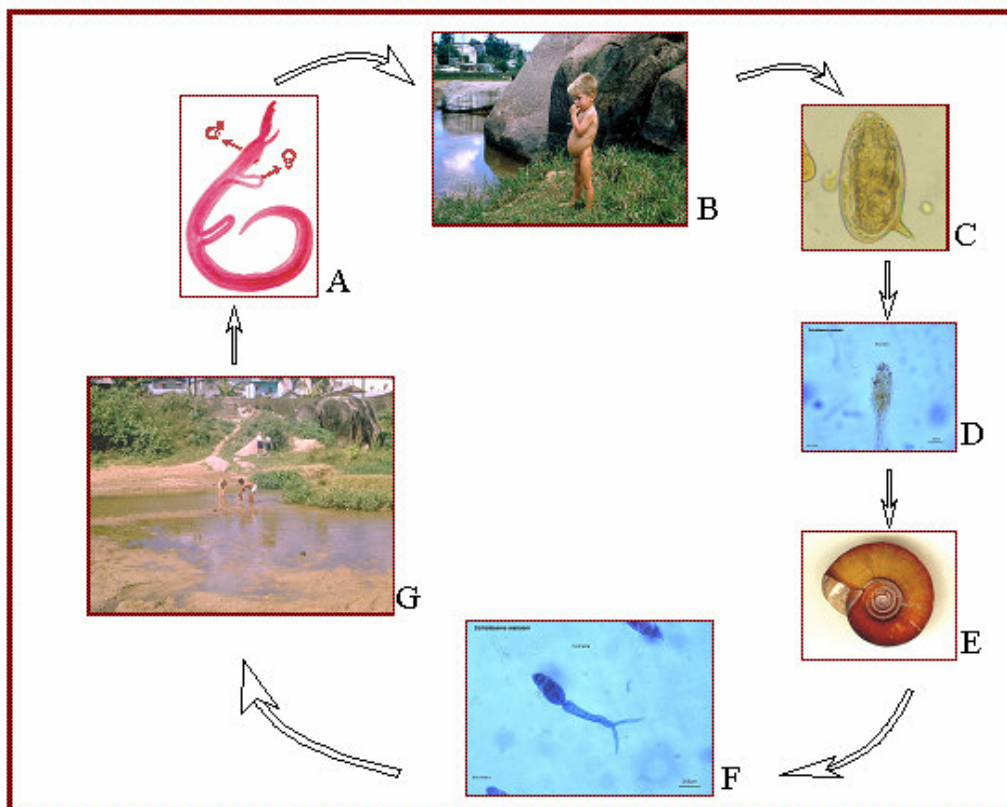


Figura 4: Ciclo Evolutivo do *Schistosoma mansoni*

A – Vermes Adultos Acasalados. B – Hospedeiro Vertebrado Infectado. C – Ovo.

D – Miracídio. E – Hospedeiro Invertebrado - Molusco do Gênero *Biomphalaria*.

F – Cercária. G – Hospedeiro Vertebrado em Contato com Cercárias Adquirindo Esquistossomose.

Figuras extraídas da “Library Tropical Diseases Research” – WHO online.

5. FORMAS CLÍNICAS

Após o contato do homem com águas infectadas com cercárias do *S. mansoni*, surge no local da penetração uma sensação pruriginosa de intensidade e duração variáveis, que pode durar até dez dias. Associado ao prurido, verifica-se erupção caracterizada por micropápulas eritematosas e discretamente edemaciadas consistindo em um quadro clínico classificado como dermatite cercariana. Com o desaparecimento dos sintomas cutâneos, ocorre um período de incubação, de quatro a oito semanas, no qual há o desenvolvimento dos esquistossômulos e sua posterior liberação para corrente sanguínea (DOMINGUES & DOMINGUES, 1994). Essa fase inicial denominada de forma aguda pode ter início abrupto, súbito ou explosivo, e caracteriza-se por febre elevada, mal estar geral, astenia, urticária, tosse seca, anorexia, náuseas, vômitos, mialgias, cefaléia e diarreia. Ao exame físico, pode-se observar emagrecimento, desidratação, hepatoesplenomegalia, microadenomegalia, taquicardia e hipotensão arterial (HUGGINS & SANTOS, 1994). O quadro hematológico é leucocitose moderada, com intensa eosinofilia que chega, por vezes, a níveis de 25 e 50% dessas células. Esta fase inicial não é evidenciada em moradores de regiões endêmicas, sendo denominada de forma inaparente (NEVES, 1992; RABELO, 1995; LAMBERTUCCI *et al*, 2000).

A doença esquistossomótica evolui de acordo com a idade da exposição inicial, a frequência de exposições, a intensidade da infecção, dentre outros fatores mórbidos ligados ao parasito, ao hospedeiro e ao meio ambiente, permitindo classificar, de forma didática, os pacientes nas formas crônicas intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. As manifestações clínicas da forma intestinal e hepatointestinal são praticamente as mesmas, havendo na forma hepatointestinal maior acometimento hepático. Dentre os sintomas podemos observar indisposição, emagrecimento, tonturas, anorexia, empachamento pós-prandial, surtos diarréicos acompanhados ou não por cólicas, que são alternados por constipação intestinal. Com o aumento da intensidade da infecção, podem ocorrer processos inflamatórios no fígado, como infiltrado celular periportal e discreta fibrose portal, destacando-se os granulomas (DOMINGUES & DOMINGUES, 1994).

Com o comprometimento e crescimento do fígado e do baço, a esquistossomose adquire sua forma hepatoesplênica, onde são observadas manifestações anatômicas e

clínicas resultantes das lesões teciduais, provocadas pelo ovo do parasito (NEVES, 2000). O aumento desses órgãos ocorre insidiosamente, de modo concomitante ou, o aumento e endurecimento do fígado precede o do baço (DOMINGUES & DOMINGUES, 1994). Há pacientes que permanecem com sua forma clínica estacionária ou compensada e outros evoluem para formas mais graves ou descompensadas (REY, 2001).

Na forma compensada, os pacientes conservam um bom estado geral com sintomatologia de pequena intensidade representada por fraqueza, inapetência, sensação de plenitude gástrica pós-prandial, intolerância a gorduras e farináceos, surtos de constipação, dores abdominais esparsas, cólicas com diarreia esporádicas. Não se observam manifestações de insuficiência hepática, mas o hepatoesplenismo é evidente (DOMINGUES & DOMINGUES, 1994).

A forma hepatoesplênica descompensada surge após complicações da esquistossomose ou associações com outras doenças. Os pacientes apresentam, dentre outros sintomas, hipertensão portal, hemorragia digestiva, fibrose periportal e varizes esofagianas (Figura 5). Quando associada com outras patologias, como síndrome nefrótica, infecção com enterobactérias, trombose portal, hepatite viral e alcoolismo crônico, episódios frequentes de hemorragia digestiva com perda protéica, sofrimento hepático transitório com polipose múltipla ou congestão crônica levando à linfangectasia intestinal que contribuem para ascite e edemas periféricos, podem ocorrer (DOMINGUES & DOMINGUES, 1994).



Figura 5: Pacientes com a Forma Hepatoesplênica Descompensada (WHO,1993).

6. DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E CONTROLE

Até pouco tempo atrás, o diagnóstico da infecção esquistossomótica se dava exclusivamente pelo encontro de uma das formas evolutivas do parasito em material biológico oriundo do hospedeiro. Como resultado dos avanços tecnológicos, ocorridos nas últimas décadas, a descoberta de componentes antigênicos do parasita no sangue do hospedeiro se tornou uma alternativa de diagnóstico de uma infecção ativa (RABELO, 1997).

Métodos parasitológicos, anatomopatológicos ou imunológicos são utilizados para diagnosticar a esquistossomose. Contudo, o diagnóstico de certeza permanece sendo a demonstração dos ovos do parasita nas fezes ou em material de biópsia de indivíduos infectados. Entretanto, resultados negativos em exames parasitológicos, não excluem a possibilidade de infecção, principalmente, quando se trata de paciente com infecção leve ou em fase crônica, onde a carga parasitária é muito pequena (FERREIRA & ÁVILA, 1996). Os métodos imunológicos são justificados nesses casos por apresentarem maior sensibilidade e são usados principalmente como métodos auxiliares em levantamentos epidemiológicos e controle de cura da doença através da pesquisa de antígenos parasitários circulantes (COELHO & TAVARES, 1991).

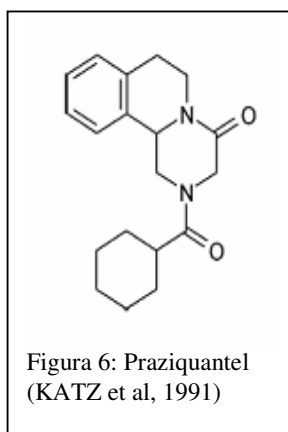
Vários métodos de imunodiagnóstico vêm sendo desenvolvidos nas últimas décadas. Coelho e Tavares (1991) classificaram esses testes em indiretos e diretos. Os métodos indiretos são a maioria dos testes sorológicos tais como: reação intradérmica, teste de aglutinação cercariana, reação circumovular, reação pericercariana, reação de imobilização do miracídio, reação de fixação do complemento, reação de hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta, radioimunoensaio e ELISA. Porém, a positividade dessas reações não indica doença, pois somente correspondem a uma resposta do sistema imune do hospedeiro frente a alguns antígenos parasitários.

O método direto da ELISA por captura é o mais utilizado como critério de cura, pois consegue detectar antígenos circulantes, caracterizando a doença ativa (RABELO, 1997). Esses antígenos circulantes são originados do tubo digestivo do parasito e regurgitados na corrente sanguínea do hospedeiro, que após quimioterapia e consequentemente morte dos parasitos, não são mais secretados, uma vez que são produtos dos vermes adultos vivos. Eles são caracterizados como: antígeno anódico circulante (CAA) e o antígeno catiônico circulante (CCA), ambos de natureza glicoprotéica (COELHO & TAVARES, 1991; RABELO, 1997).

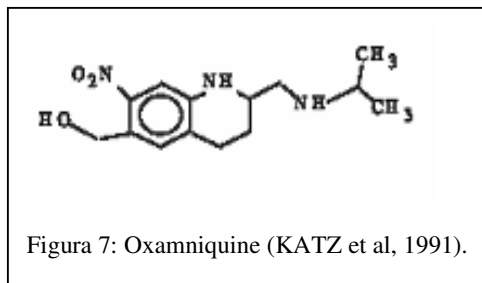
No entanto, os antígenos do *S. mansoni* mais utilizados nos ensaios imunológicos para diagnóstico através de ELISA são o antígeno solúvel de verme adulto (SWAP) e o antígeno solúvel de ovo (SEA) (RABELO, 1997).

Além disso existe uma substância altamente imunogênica encontrada em moluscos da espécie *Megathura crenulata* (YUESHENG *et al*, 1994; FERREIRA & ÁVILA, 1996) e que compartilha um epítipo carboidrato bem definido na superfície do esquistossômulo, denominado de KLH e que têm sido descrita em estudos de ensaios sorológicos por sua reatividade com anticorpos IgG, IgM e IgA na fase aguda da esquistossomose (VALLI *et al*, 1997; VALLI *et al*, 1999).

No tratamento da esquistossomose humana, dois quimioterápicos esquistossomicidas vêm sendo empregados: o praziquantel e o oxamniquine. O praziquantel é um derivado isoquinolínico-pirazínico (Figura 6), absorvido pelo intestino de forma rápida, metabolizado pelo fígado e excretado pelos rins. Ele causa perda do cálcio intracelular no parasito, resultando em paralisia e expulsão dos vermes dos locais onde estão alojados. A formação de vesículas no tegumento do parasita é seguida por ruptura e extensiva vacuolização que permite fagocitose e lise do parasita (KATZ *et al*, 1991). Prescreve-se uma dose única, via oral, 40mg/Kg de massa corpórea do paciente e os efeitos colaterais são raros e passageiros, consistindo em náuseas, dor epigástrica, diarreia, cefaléia, urticária, tonturas e sonolência (REY, 2001). Esse quimioterápico é considerado uma droga bem tolerada (WHO, 1993).



O oxamniquine é um derivado da tetraidroquinolina (Figura 7), bem absorvido após administração e excretado pela urina. O mecanismo de ação parece ser através de paralisia muscular que prejudica a sucção dos vermes adultos; as fêmeas que por acaso sobrevivam cessam a postura de ovos, perdendo seu significado patológico. Geralmente, é bem tolerado, principalmente se administrado após as refeições. Foram relatados casos de tontura, sonolência, delírio e alucinações, e em menor grau, cefaléia, anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal e urticária. É indicado nas seguintes doses: crianças com até 30 kg - 20 mg/kg/dia, dividida em duas doses, com intervalo de 4 a 6 horas e na dose máxima de 1g; adolescentes - 12,5 a 15 mg/ kg, em dose única, à noite, após o jantar (KATZ *et al*, 1991).



No período de 1976-1979, o governo brasileiro conduziu um programa vertical em âmbito nacional para o controle da esquistossomose denominado Programa Especial para o Controle da Esquistossomose (PECE) onde as atividades educacionais visando à prevenção da doença, medidas sanitárias e quimioterapia em massa com oxamniquine foram as principais atividades desenvolvidas pelo PECE (MACHADO, 1982).

Esse programa de tratamento em massa foi utilizado como o principal meio de controle, sendo intensificado em algumas áreas consideradas endêmicas, sobretudo na Região Nordeste, onde a prevalência excedia 50% (LAMBERTUCCI *et al*, 2000).

A diminuição da prevalência e da morbidade, sobretudo da forma hepatoesplênica, a redução de pacientes admitidos nos serviços de saúde, a diminuição em 47% da taxa de mortalidade devido a esquistossomose de 1977 a 1994, a redução do número de cirurgias hepáticas e esplênicas foram algumas conseqüências significativas do PECE (CORREIA *et al*, 1997). De 1976 a 1997, 11.254.847 indivíduos foram tratados com oxamniquine durante o PECE (LAMBERTUCCI *et al*, 2000).

7. RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE

A infecção pelo *S. mansoni* implica em múltiplas respostas imunes celular e humoral contra antígenos do parasito. A lesão imunopatológica mais importante é uma reação granulomatosa em torno dos ovos do parasito no fígado, podendo causar fibrose hepática severa (STADECKER *et al*, 2004). Essa inflamação é um processo complexo que envolve múltiplos tipos celulares com a participação de macrófagos, monócitos, fibroblastos, granulócitos e linfócitos; e proteínas denominadas citocinas, as quais são secretadas em resposta aos microorganismos e a outros antígenos pelas células do sistema imune (WYNN & CHEEVER, 1995).

Os eventos envolvidos na formação e modulação do granuloma são primariamente resultantes da resposta imune dependente de células T auxiliares (CD4+) contra os ovos do parasito. As células T CD4+ são fenotipicamente distintas pelo padrão de citocinas secretado (ABBAS *et al*, 1996). Podemos definir as células Th1 que produzem principalmente IL-2, TNF- α e IFN- γ ; e as células Th2 secretoras principalmente de IL-4, IL-5, IL-6, IL-13; há ainda as células Th0 que exibem ambos os perfis de citocinas (BOROS & WHITFIELD, 1999; PEARCE & MACDONALD, 2002; HOFFMAN *et al*, 2002).

As células Th1 e Th2, através de suas citocinas, se regulam de maneira recíproca e antagonica (PEARCE *et al*, 1991). Dependendo da estimulação antigênica, a resposta imunológica se polariza para um perfil Th1 ou Th2. O perfil Th1 estimula mais os mecanismos dependentes de fagócitos e de citotoxicidade celular, que são chamados pro-inflamatórios, enquanto o perfil Th2 induz sobretudo a resposta imune humoral (JANEWAY JR & TRAVERS, 2000).

A citocina IL-12, produzida por macrófagos sensibilizados, age sobre a população Th0 induzindo a transcrição gênica para produção de IFN- γ e uma resposta Th1. Entretanto, a citocina IL-4, liberada por mastócitos e basófilos sensibilizados, age sobre a população Th0 induzindo uma resposta Th2 (PEARCE *et al*, 1991; ABBAS *et al*, 2002).

Os linfócitos T exibem em sua membrana um receptor (TCR) que reconhece um complexo formado por um peptídeo antigênico e uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) exibido por uma célula conhecida como célula apresentadora de antígeno (APC), a qual pode ser uma célula dendrítica, um linfócito B

ou um macrófago ativado; ou por uma célula-alvo, que pode ser uma célula tumoral ou uma célula infectada (JANEWAY JR & TRAVERS, 2000).

Duas classes de MHC estão envolvidas nos mecanismos imunes: MHC classe I, expresso por todas as células nucleadas; e o MHC classe II, expresso apenas pelas APCs (KLEIN & SATO, 2000). As APCs também expressam em sua superfície, outras moléculas co-estimulatórias para ativação linfocitária. Essas moléculas são conhecidas como B7-1 e B7-2, as quais se ligam especificamente a molécula do CD28 dos linfócitos T (JANEWAY JR & TRAVERS, 2000).

Além das populações de células T CD4+, existem outras referidas como células T CD8+ ou citolíticas. Essas células promovem a lise de células infectadas por vírus, de células tumorais e de aloenxertos (ABBAS *et al*, 2002).

Uma outra população de linfócitos, denominados células B é caracteristicamente conhecida como produtora de anticorpos específicos, sendo envolvida com a resposta imune humoral (DELVES & ROITT, 2000).

As células matadoras naturais (NK) constituem uma terceira população de linfócitos. Elas estão envolvidas na lise de células infectadas, de células tumorais; citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), mas seus receptores são diferentes daqueles das células T e B e sua principal função é exercida na imunidade inata (ABBAS *et al*, 2002).

O IFN- γ é uma proteína homodimérica produzida pelas células NK, CD4+ Th1 e pelos linfócitos T CD8+. As células NK secretam IFN- γ em resposta ao reconhecimento de componentes desconhecidos de microorganismos ou em resposta à IL-12; nesse aspecto, o IFN- γ age como mediador da resposta inata. Na imunidade adquirida, as células T produzem IFN- γ em resposta ao reconhecimento de antígenos.

O receptor do IFN- γ é composto por dois polipeptídeos estruturalmente homólogos pertencentes à família de receptores de citocina tipo II; um desses liga a citocina e o outro participa da sinalização. A ligação da citocina ativa o STAT 1, que então estimula a transcrição dos genes responsivos ao IFN- γ , incluindo genes que codificam moléculas do MHC, enzimas que codificam substâncias microbidas, como óxido nítrico, e citocinas, tais como a subunidade p40 da IL-12. Assim, o IFN- γ aumenta a atividade microbida dos fagócitos por aumentar a expressão de moléculas MHC classe I e classe II, a apresentação de antígenos, a produção de moléculas co-

estimuladoras, a síntese de mediadores inflamatórios e a geração de radicais livres. Também atua em células B induzindo a produção de isotipos de IgG, principalmente IgG2a em camundongos, e inibindo a troca de isotipos dependente de IL-4, como IgE e IgG1 em camundongos. Inibe a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em Th2, ativa neutrófilos e estimula a atividade citolítica das células natural killer, promove reações inflamatórias ricas em macrófagos e inibe àquelas ricas em eosinófilos dependentes de IgE (DELVES & ROITT, 2000; ABBAS *et al*, 2002).

A citocina IL-4 é membro de uma família de citocinas de 4 α -hélices. Suas principais fontes celulares são os linfócitos CD4⁺ Th2, bem como os mastócitos e basófilos ativados. O receptor da IL-4 das células linfóides consiste de uma cadeia α que se liga à citocina, que é membro da família de receptores de citocinas do tipo I, associada à cadeia constante da IgG, compartilhada pelos receptores da IL-2. Este receptor de IL-4 sinaliza pela via JAK/STAT e por uma via que inclui o substrato de resposta à insulina (IRS) chamado IRS-2. A IL-4 é a única citocina que ativa a proteína STAT6, responsável por muitas das ações da IL-4, tais como a diferenciação das células Th0 em Th2 e a troca para IgE na célula B (ABBAS *et al*, 2002). Além disso, a IL-4 inibe a produção de citocinas inflamatórias (MINTY *et al*, 1993), estimula a expressão de componentes MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe II e a expressão de CD23 em monócitos/macrófagos, e células B (DE WAAL MALEFY *et al*, 1993). Também pode induzir a proliferação de células B e anticorpos do isotipo IgG e IgM, além de IgE (BRIERE *et al*, 1993; COCKS *et al*, 1993; MCKENZIE & ZURAWSKI, 1995).

IL-10 é talvez, a principal citocina anti-inflamatória conhecida produzida principalmente por macrófagos ativados e está envolvida no controle da homeostase das respostas imunes inatas e imunidade mediada por células para inibir as funções dos macrófagos ativados e finalizar essas respostas, retornando o sistema imune ao estado normal quando a infecção microbiana é erradicada (ABBAS *et al*, 2002).

As respostas das citocinas do tipo 1 ou 2 existem em humanos e camundongos. Em humanos essa divisão em resposta do tipo 1 ou 2 não é tão nítida como em camundongos (WYNN *et al*, 2004).

No estudo da patogênese esquistossomótica, vários experimentos utilizando modelos murinos, têm associado o início da inflamação granulomatosa com uma resposta do tipo 1 de curta duração, e a uma dominante e mantida resposta do tipo 2 que

se inicia com o oviposição (GRZYCH *et al*, 1991; PEARCE *et al*, 1992; VELLA & PEARCE, 1992; WYNN *et al*, 1993).

A importância das células Th2, na infecção pelo *S. mansoni*, foi confirmada em experimentos que utilizaram camundongos vacinados com antígenos do ovo juntamente com IL-12 e posteriormente infectados. Esses animais induziram uma resposta Th1 específica dirigida contra o ovo, desenvolvendo pequenas lesões e menos fibrose do que aqueles animais não vacinados que exibiam uma resposta Th2 polarizada (JAMES & SHER, 1990; WYNN *et al*, 1994; WYNN & CHEEVER, 1995; HOFFMANN *et al*, 1998; BOROS & WHITFIELD, 1999). A diminuição da fibrose foi associada com a diminuição da resposta tipo Th2 e um aumento da resposta Th1 (WYNN *et al*, 2004).

Embora os granulomas sejam deletérios, está claro que as lesões induzidas pelo ovo também servem como uma importante função protetora do hospedeiro. Os antígenos do ovo são um contínuo e potente estímulo para o sistema imune. Se esses antígenos não são eliminados nem neutralizados efetivamente, poderiam resultar em uma inflamação descontrolada que podem causar danos permanentes contra os tecidos afetados (WYNN *et al*, 2004).

Outros trabalhos experimentais, envolvendo camundongos destituídos dos genes das citocinas IL-4 e IL-10, revelaram que esses animais morreram precocemente por serem incapazes de montar uma resposta Th2 satisfatória. A formação deficiente de granulomas resulta na liberação de substâncias hepatotóxicas do ovo, e uma doença aguda severa com cachexia e morte devido ao desenvolvimento de lesões hemorrágicas na mucosa intestinal exposta a bactérias residentes no sistema digestivo (PEARCE *et al*. 2002; HOFFMAN *et al* 2002). A diminuição da resposta Th2 e o aumento da resposta Th1 induziu à inflamação que contribuiu para morte dos camundongos deficientes de IL-4 e de IL-10 (WYNN *et al* 2004).

Embora a imunomodulação da resposta do hospedeiro tenha sido intensamente avaliada em camundongos, os estudos em seres humanos têm sido relativamente escassos (CONTIGLI *et al*, 1999).

Particularmente na esquistossomose humana, estudos têm demonstrado a associação dos diferentes tipos de resposta imune com diversos fatores: formas clínicas da doença (BAHIA-OLIVEIRA *et al*, 1992; CÔRREA-OLIVEIRA *et al*, 1998;

CÔRREA-OLIVEIRA *et al*, 2000; MONTENEGRO *et al*, 1999); idade e grau de infecção, proveniência ou não de área endêmica, estimulação com diferentes tipos de

antígenos (SEA, SWAP) (COLLEY *et al*, 1977; ELLNER *et al*, 1981; BAHIA-OLIVEIRA *et al*, 1992). Nota-se também influência do tratamento quimioterápico no desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro (GROGAN *et al*, 1996; CONTIGLI *et al*, 1999; LAMBERTUCCI *et al*, 2000; BRITO *et al*, 2000).

Pacientes na fase crônica da esquistossomose têm sido caracterizados por exibirem forte resposta proliferativa contra antígenos do verme adulto, mas com baixa reatividade aos antígenos do ovo, e ainda baixa produção de IFN- γ (VIANNA *et al*, 1994; BAHIA-OLIVEIRA *et al*, 1996). Um perfil Th1 tem sido associado com a fase aguda e com a doença hepatoesplênica severa, enquanto um perfil Th2 está associado com formas intestinal e hepatointestinal (WILLIAMS *et al*, 1994; MWATHA *et al*, 1998; MONTENEGRO *et al*, 1999).

No entanto, na fase aguda da infecção, estudos apresentam forte resposta proliferativa tanto para os antígenos do verme adulto quanto para os do ovo, e alta produção de IFN- γ (CORREA-OLIVEIRA *et al*, 1998; MONTENEGRO *et al*, 1999). Já ensaios de análise proliferativa de células de sangue periférico, que utilizaram anticorpos para IL-4, revelaram uma redução significativa da resposta proliferativa para o SEA, mas não para o SWAP. Resultados similares foram encontrados em ensaios *in vitro* de avaliação do granuloma, revelando o papel da citocina IL-4 na formação do granuloma (CHEEVER 1993; CORREA-OLIVEIRA *et al*, 1998).

A influência do tratamento quimioterápico na resposta imune também tem sido investigada. Roberts *et al*, 1993 apresentaram que células do sangue periférico de indivíduos de uma área endêmica do Kenia produziram baixos níveis de IFN- γ antes do tratamento específico. Três meses após o tratamento, estes níveis foram aumentados, mas um ano depois voltaram a diminuir significativamente. Esse resultado difere daquele encontrado por Araújo *et al*, 1996 que revelaram níveis indetectáveis de IFN- γ logo após o tratamento.

Os componentes celulares envolvidos nas respostas imunológicas estão correlacionados com a resistência ou a susceptibilidade à infecção, e ainda medeiam uma patologia por hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) (BRITO *et al*, 2000; WYNN *et al*, 2004). Respostas do tipo Th2 parecem ter características de imunidade protetora

contra reinfecção (BUTTERWORTH, 1998). A maioria dos estudos em humanos revelam a importância dos anticorpos IgE na resposta humoral, e destacam o papel dos eosinófilos como células efectoras (HAGAN *et al*, 1991).

A resistência a infecção que ocorre em áreas endêmicas tem sido correlacionada com o número de respostas imunes específicas contra o parasita. Após quimioterapia, a redução da taxa de reinfecção está associada com altos níveis de IgE (HAGAN *et al*, 1991; RIHET *et al*, 1991; DUNNE *et al*, 1992; ZHANG *et al*, 1997), eosinofilia (HAGAN *et al*, 1987; ARAÚJO *et al*, 1996) e produção de IL-4 e IL-5 (ROBERTS *et al*, 1993; MEDHAT *et al*, 1998) e IFN- γ (EL RIDI *et al*, 2001) pelas células do sangue periférico.

A intensidade da reinfecção após quimioterapia também tem sido muito maior em crianças e adolescentes do que em adultos, sugerindo que a resistência pode ser adquirida gradualmente com a idade (DOENHOFF *et al*, 1987; DESSEIN, 1993; KABATEREINE *et al*, 1999).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. .H.; POBER, J. S. 2002. **Cellular and Molecular Immunology**. 4.ed. Philadelphia: W.B.Saunders.
2. ABBAS, A A; MURPHY, K..M; SHER, A. 1996. Funcional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, London, 383: 787-93
3. AMARAL, R. S.; PORTO, M.A.S. 1994. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, v. 27, S III, p. 73.
4. ARAÚJO, M. I.; JESUS, A. R. de; BACELLAR, O.; SABIN, E.; PEARCE, E; CARVALHO, E. M. 1996. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **European Journal of Immunology**, 26: 1399-403.
5. ARAÚJO, J. D. 1986. A pesquisa em esquistossomose no Brasil. In **Modernos Conhecimentos sobre esquistossomose Mansonica no Brasil. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina** 14: 9-18.
6. BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SIMPSON, A. J. G.; ALVES-OLIVEIRA, L. F. et al. 1996. Evidence that cellular immune responses to soluble and membrane associated antigens are independently regulated during human schistosomiasis mansonii. **Parasite Immunol** 18:53-63.
7. BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; GAZZINELLI, G.; ELOI-SANTOS, S. M.; CUNHA-MELO, J. R.; ALVES-OLIVEIRA, L. F.; SILVEIRA, A.M. S.; VIANA, I.R.C.; CARMO, J.; SOUZA, A.; CORREA-OLIVEIRA, R. 1992. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 86:57.
8. BARBOSA, C. S.; DOMINGUES, A. L. C.; ABATH, F.; MONTENEGRO, S.; GUIDA, U.; CARNEIRO, J.; TABOSA, B.; MORAIS, C.; SPINELLI, V. 2001. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 17: 725-728.
9. BILHARZ, T. M. 1852. Fernere Beobachtungen uber das die Pfortader des Menschen bewohnende *Distonum haematobium* und sein zu gewissen. **Wschift Zol Leipzig** 4:72-76.

10. BOROS, D. L.; WHITFIELD, J. R. 1999. Enhanced Th1 and dampened Th2 responses synergize to inhibit acute granulomatous and fibrotic responses in murine schistosomiasis mansoni. **Infect Immun** 67:1187-1193.
11. BRIERE, F. et al. 1993. IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. **Nouv-Ver-Fr-Hematol.** 35 (3): 233.
12. BRITO, C. F. A.; CALDAS, I. R.; COURA FILHO, P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, S. C. 2000. CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in na endemic área produce interferon- γ and tumour necrosis factor- α in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. **Scandinavia Journal of Immunology**, 51: 595-601.
13. BUTTERWORTH, A. E. 1998. Immunological aspects of human schistosomiasis. **British Medical Bulletin**, 54 (2): 357-68.
14. CHEEVER, A.W. 1993. Schistosomiasis: infection versus disease and hypersensitivity versus immunity. **Amer. J. Pathol**, 142:699.
15. CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. 2000. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, 77:41-51.
16. COCKS, B.G.; DE WAAL MALEFYT, R.; GALIZZI, J.P.; VRIES, J.E. & AVERSA, G. 1993. IL-13 induces proliferation and differentiation of human B cells activated by CD40 ligand. **Int.Immunol.**,Oxford, 5(6):657-663.
17. COELHO, P. M. Z.; TAVARES, C. A. P. 1991. Diagnóstico Imunológico. In: CASTRO L. P.; ROCHA, P. R. S.; CUNHA, A. S. **Tópicos em Gastroenterologia 2: Gastroenterologia tropical**. Rio de Janeiro: MEDSI, p.27-36.
18. COLLEY, D. G., COOK, J. A., FREEMAN, G. L., BARTHOLOMEW, R. K., JORDAN, P.; 1977. *Inst Archs Allergy Appl Immun* **53:420**.
19. CONTIGLI, C.; SILVA-TEIXEIRA, D. N.; PRETE, G. D.; D'ELIOS, M. M.; DE CARLI, M.; MANGHETTI, M.; AMEDEI, A.; ALMERIGOGNA, F.; LAMBERTUCCI, J. R.; GOES, A. M. 1999. Phenotype and Cytokine Profile of *Schistosoma mansoni* Specific T cell lines and clones derived from

- Schistosomiasis patients with distinct clinical forms. **Clinical Immunology**, Orlando, 91(3): 338-344.
20. CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CALDAS, I. R.; MARTINS-FILHO, O. A.; QUEIROZ, C. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; CUNHA-MELO, J. R.; SILVEIRA, A. S.; PRATA, A.; WILSON, A.; GAZZINELLI, G. 2000. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. **Acta Tropica**, 77:141-6.
21. CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MALAQUIAS, L. C. C.; FALCÃO, P. L.; VIANA, I. R. C.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; SILVEIRA, A. M. S.; FRAGA, L. A. O.; PRATA, A.; COFFMAN, R. L.; LAMBERTUCCI, J. R.; CUNHA-MELO, J. R.; MARTINS-FILHO, O. A.; WILSON, R. A.; GAZZINELLI, G. 1998. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 31:171-7.
22. CORREIA, E. I.; MARTINELLI, R. P.; ROCHA, H. 1997. Is glomerulopathy due to schistosomiasis mansoni disappearing ? **Rev Soc Bras Med Trop** 30:341-343.
23. COURA, J. R. & AMARAL, R. S. 2004. Epidemiological and control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. **Mem Ist Osw Cruz** 99(I): 13-19.
24. COURA, J. R., COURA, L. C., KALACHE, A., ARGENDO, C. A. 1970. Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro. Estudo de 22 casos. **Rev Soc Bras Med Trop** 6: 387-396.
25. COUTINHO, E. M.; ABATH, F.; BARBOSA, C. S.; MONTENEGRO, S.; TEIXEIRA, K. M. DOMINGUES, A. L. C., 1997. Factors involved in *S. mansoni* infection in rural areas in Northeast Brazil. **Mem Inst Osw Cruz**, 92: 707-715.
26. DE WAAL MALEFYT, R. et al. 1993. Effects of Interleukin 4 on monocyte functions: comparison to interleukin 13. **Research in Immunology**, Paris, 144:629.

27. DELVES, P. J.; ROITT, I. M. 2000. The Immune System. First of two part. **New England Journal of Medicine**, London, 343(1):37-49.
28. DESSEIN, J. 1993. Resistance to *Schistosoma mansoni* in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. **J Infect Dis** 168:1000-1008.
29. DOENHOFF, M. J., A. A. SABAH, C. FLETCHER, G. WEBBE, AND J. BAIN, 1987. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 81:947-951.
30. DOMINGUES, A. L. C.; DOMINGUES, L.A.W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica .In: MALTA, J. (Ed.). **Esquistossomose mansônica**. Recife: Universitária, 1994. cap. 5, p. 91-105.
31. DUNNE, D. W., A. E. BUTTERWORTH, A. J. C. FULFORD, H. C. KARILUKI, J. G.; LANGLEY, J. H. OUMA, A. CAPRON, R. J., PIERCE, AND R.F. STURROCK. 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **Eur J Immunol** 22:1483-1494.
32. EL RIDI, R., C. B. SHOEMAKER, F. FAROUK, N. H. EL SHERIF, and A. AFIF. 2001. Human T- and B-cell responses to *Schistosoma mansoni* recombinant glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase correlate with resistance to reinfection with *S. mansoni* or *S. haematobium* after chemotherapy. **Infect Immun**. 69:237-244.
33. ELLNER, J. J.; OLDS, G. R. ; OSMAN, E. S. , EL KHOLY, A.; MAHMOUD, A. A. 1981. **J. Immunol** 126 (1):309.
34. FAVRE, T. C. ; PIERI, O.; BARBOSA, C.; BECK, L. 2001. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, DF, 34(6):569-576.
35. FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. 1996. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap 21, p. 185-193.

36. FERREIRA, H.; OLIVEIRA, C. A.; BITTENCOURT, D.; KATZ, N.; CARNEIRO, L. F. C.; GRINBAUM, E. ; VELOSO, C.; DIAS, R. P.; ALVARENGA, R. J.; DIAS, C. B. 1966. A fase aguda da esquistossomose mansoní. *nJ Bras Med* 11:54-67.
37. FERREIRA, L. F.; NAVEIRA, J. B.; SILVA, J.R. 1960. Fase toxêmica da esquistossomose mansoní. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 2:112-120.
38. FUJI, I. 1847. Katayama disease. **Katayamaki: chugai Iji Shimpō** 691: 55-56.
39. GROGAN, J. L.; KREMSNER, P. G.; DEELDER, A. M.; YAZDANBAKHSI, M. 1996. Elevated proliferation and interleukin-4 release from CD4+ cells after chemotherapy in human *Schistosoma haematobium* infection. **European Journal of Immunology**, 26:1365-70.
40. GRZYCH, J. M. et al. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine Schistosomiasis mansoní. **Journal of Immunology**, Baltimore, 146:1322-1327.
41. HAGAN, P. et al. 1991. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. **Nature**, London, 349: 243-245.
42. HAGAN, P.; BLUMENTHAL, U. J.; CHAUDRI, M.; GREENWOOD, R. J.; HAYES, J.; HODGSON, C.; KELLY, C.; KNIGHT, M.; SIMPSON, A.J. G.; SMITHERS, S. R.; WILKINS, H. 1987. Resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium* in Gambian children: analysis of their immune responses. **Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 81:938-946.
43. HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A.; DUNNE, D.W. 2002. Cytokine-mediated host responses during schistosome infection; walking the fine line between immunological control and immunopathology. **Adv Parasitol** 52:265-307.
44. HOFFMANN, K. F.; CASPAR, P.; CHEEVER, A. W.; WYHH, T.A. 1998. IFN- γ , IL-12, and TNF- α are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. **J Immunol** 161:4201-4210.

45. HOFFMAN, V.A., J.S. PONS, and J.L. JANER. 1934. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rican J. Public Health Trop Med** 9:283
46. HUGGINS, D. W.; SANTOS, A. Q. Esquistossomose mansônica: fase aguda. **Esquistossomose Mansônica**. Recife: Universitária, 1994. cap. 5, p. 81-89.
47. JAMES, S. L., SHER, A. 1990. Cell-mediated immune response to schistosomiasis. **Current Topics in Microbiology Immunology**, Berlin, p. 15521-15531.
48. JANEWAY JR, C. TRAVERS, P. 2000. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas.
49. KABATEREINE, N.B., B. J. VENNERVALD, J.H. OUMA, J. KEMIJUMBI, A. E. BUTTERWORTH, D. W. DUNNE, and A. J. FULLORD. 1999. Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. **Parasitology** 118: 101-105.
50. KATZ N, ROCHA RS, DE SOUZA CP, COURA FILHO P, BRUCE JL, COLES GC, KINOTI GK. 1991. Efficacy of alternating therapy with oxamniquine and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment. **Am J Trop Med Hyg** 44:509-12.
51. KLEIN, J.; SATO, A. 2000. The HLA system. **New England Journal of Medicine**, Boston 343:702-709.
52. LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C.; Gerspacher-Lara, R.; RAYES, A. A. M.; TEIXEIRA, R.; NOBRE, V.; ANTUNES, C. M. F. 2000. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, 77: 101-9.
53. LEIPER, R. T. 1915. Report on the results of the bilharzias mission in Egypt, 1915. Part I. Transmission. **J R Army Med Corps** 25: 1-55.
54. LUTZ, A. 1919. O *Schistosoma mansoni* e a schistossomose segundo observações feitas no Brasil. **Mem Inst Osw Cruz** 11: 121-155.

55. MACHADO, P. 1982. The Brazilian Program for Schistosomiasis Control, 1975-1979. **Am J Trop Med Hyg** 31:76-86.
56. MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V. Etiologia. In: MALTA, J.(ed.). **Esquistossomose mansônica**. Recife: Universitária, 1994. cap. 2, p. 25-38.
57. MANSON, P. 1902. Report of a case of bilharzia from West Indies. **Brit Med J** 2: 1894-1995.
58. MCKENZIE, A.N.; ZURAWSKI, G. 1995. Interleukin-13: characterization and biologic properties. **Cancer Treat. Res.** 80:367.
59. MEDHAT, A., M. SHEHATA, K. BUCCI, S. MOHAMED, ^a D. DIEF, S. BADARY, H. GALAL, M. NEFEH, and C.L. KING. 1998. Increased interleukin-4 and interleukin-5 production in response to *Schistosoma haematobium* adult worm antigens correlates with lack of reinfection after treatment. **J Infect Dis** 178:512-519.
60. MILLER, J. F. A. P.; MORAHAN, G. 1992. Peripheral T cell tolerance. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, 10: 51-69.
61. MINTY, A. et al. 1993. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune response. **Nature**. 362:248.
62. MIYARI, K. & SUZUKI, m. 1914. The intermediate host of *Schistosoma japoniam* Katsurada. **Mitt Med Fak Kaiser University Kyushu** 1: 187-198.
63. MONTENEGRO, S.M.L.; MIRANDA, P.; MAHANTY, S.; ABATH, F.; TEIXEIRA, K.; COUTINHO, E.; BRINKMAN, J.; GONÇALVES, I.; DOMINGUES, L. A.; DOMINGUES, A. L.; SHER, A.; WYNN, T. 1999. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **Journal of Infectious Disease**, Chicago, 179:1502-1514.
64. MWATHA JK, KIMANI G, KAMAU T, MBUGUA GG, OUMA JH, MUMO J, FULFORD AJ, JONES FM, BUTTERWORTH AE, ROBERTS MB, DUNNE DW. 1998. The 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. **Journal of Immunology**, Baltimore, 160:1992-1999.
65. NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Ateneu, 2000
66. NEVES, J. 1992. Acute or toxemic form of mansoni's schistosomiasis. **Mem Ins Osw Cruz** 87(4):321-324.
67. PARAENSE, W. L. 1986. Distribuição dos caramujos no Brasil. In **Modernos Conhecimentos sobre esquistossomose Mansonica no Brasil. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina**. 14: 117-128.
68. PARAENSE, W. L. 1981. *Biomphalaria occidentalis* n. sp. From South América. **Mem Inst Osw Cruz** 76: 199-211.
69. PARAENSE, W. L. 1966. *Biomphalaria amazonica* and *B. cousini*; two new species of Neotropical planorbid mollusc. **Ver Bras Biol** 26: 115-126.
70. PEARCE, E.J.; MACDONALD, A. S. 2002. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Ver Immunol** 2: 499-511.
71. PEARCE et al. 1992. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 173, p. 159-162.
72. PEARCE, E. J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J. M.; LEWIS, F. A.; SHER, A. 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*.. **Journal of Experimental Medicine**, New York, 173;159-166.
73. RABELO, A. 1997. Diagnosing Schistosomiasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n.5, p. 669-676.
74. RABELO, A. 1995. Acute human schistosomiasis mansoni. **Mem Ins Osw Cruz** 90: 277-280.
75. REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
76. RIHET, P., C.E. DEMURE, A.BOURGOIS, A. PRATA, and A. J. DESSEIN. 1991. Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. **Eur J Immunol** 21: 2679-2686.

77. ROBERTS, M.; BUTTERWORTH, A.E.; KIMANI, G.; KAMON, T.; FULFORD, A.J. C.; DUNNE, D. W.; OUMA, J. H. ; STURROCK, R.F. 1993. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between responses and resistance to reinfection. **Infect Immun.** 61: 4984-4993.
78. RUFFER, A. 1910. In: CHASEL, C. 2004. When the Egyptian mummies are speaking about the infections that have made them ill. **Hist Sci Med** 38(2):147-55.
79. SAMBON, L. W. 1907. Remarks on *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg** 10: 303-304.
80. STADECKER, M. J.; ASAH, H.; FINGER, E.; HERNANDEZ, H. J.; RUTITZKY, L. I.; SUN, J. 2004. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunological Reviews**, 201:168-79.
81. STURROCK, R. F. 2001. Schistosomiasis epidemiology and control: how did we get here and where should we go ? **Mem Inst Osw Cruz** 96(5): 17-27.
82. SUASSUNA, A. & COURA, J. R. 1969. Esquistossomose mansoni no Estado da Guanabara – Aspectos epidemiológicos relacionados às migrações internas. **Rev Soc Bras Med Trop** 2: 59-71.
83. VALLI, L.C.; KANAMURA, H. Y.; DA SILVA, R. M.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; DIETZE, R. 1999. Schistosomiasis mansoni: immunoblot analysis to diagnose and differentiate recent and chronic infection. **Am J Trop Med Hyg** 61:302-307.
84. VALLI, L.C.; KANAMURA, H. Y.; DA SILVA, R. M.; SILVA, M. I. P. G.; VELLOSA, S. A.G.; GARCIA, E. T. 1997. Efficacy of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis and serological distinction between acute and chronic *Schistosoma mansoni* infection. **Am j Trop Med Hyg** 57:358-362.
85. VELLA, A. T.; PEARCE, E. J. 1992 . CD4+ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. **J Immunol** 148: 2283-2288.
86. VIANA, I.R.C., SHER, A., CARVALHO, O. S., MASSARA, C.L., ELOI-SANTOS, S. M., PEARCE, E.J., et al. 1994. Interferon-g production

- mononuclear cells from residents of na area endemic for schistosomiasis mansoni. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 88, 466-470.
87. WHO - World Health Organization. Image Library Tropical Diseases Research. **Net**. Disponível em: [http:// www.who.int/tdr/media/image.html](http://www.who.int/tdr/media/image.html). Acessado: 04 de janeiro de 2005.
88. WHO - World Health Organization. 1997. Tropical Diseases Research. Schistosomiasis. In:___: Progress 1995-1996: **Thirteenth programme report of the UNDP/World Bank/WHO special** Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva, (5): 62.
89. WHO - World Health Organization. 1993. **The Control of Schistosomiasis, Technical Repor Series**, 83: 86
90. WILLIAMS, M. E.; MONTENEGRO, S.; DOMINGUES, A. L. ; WYNN, T. A.; TEIXEIRA, K.; MAHANTY, S.; COUTINHO, A.; SHER, A. 1994. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. **J Infect Dis** 170:946.
91. WYNN, T. A.; THOMPSON, R. W.; CHEEVER, A. W.; MENTINK-KANE, M. M. 2004. Immunopathogenesis of scistosomiasis. **Immunological Reviews**, 201: 156-67.
92. WYNN, T. A; CHEEVER, A.W. 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, 7:505.
93. WYNN, T.A. et al. 1994. Analysis of cytokine mRNA expression durin primary granuloma formation during induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, 148:900
94. WYNN, T.; ELTOUM, I.; CHEEVER, A.; LEWIS, F.; GAUSE, W.; SHER, A. 1993. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **J Immunol** 151:1430-1440.
95. YUESHENG, L.; RABELLO, A. L. T.; SIMPSON, A. J.G.; KATZ, N. 1994. The serological differentiation of acute and chronic *Schistosoma japonicum*

infection by ELISA using keyhole limpet haemocyanin as antigen. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 88:249-251.

96. ZHANG, Z. S., H. W. WU, S. C. CHEN, L.S. HU, Z. W. XIE, Y.X. QIU, C. SU, J.P. CAO, Y.P. WU, S.J. ZHANG, and G.L. WU. 1997. Association between IgE antibody against soluble egg antigen and resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum*. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 91:606-608.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A resposta imune, na esquistossomose humana, apresenta peculiaridades, não sendo idêntica a que ocorre em modelos experimentais. Isso revela a necessidade de se complementar em humanos, os conhecimentos obtidos através de experimentação. Essa complementação pode ser obtida através do conhecimento dos mecanismos imunológicos envolvidos durante as diferentes formas clínicas da esquistossomose mansônica, e em especial a caracterização da fase aguda. Isso permite uma melhor compreensão na relação hospedeiro-parasita, facilitando o desenvolvimento futuro de estudo de vacina e imunomanipulação da doença. Nesta dissertação, estamos interessados em analisar alguns aspectos imunológicos e hematológicos da forma aguda, com atenção particular às alterações que ocorrem após o tratamento. Possivelmente estas alterações estão envolvidas na susceptibilidade ou resistência à reinfecção.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Geral:

Caracterizar um perfil para a fase aguda da esquistossomose mansônica humana, por meio de achados imunológicos, correlacionando-os aos hematológicos e parasitológicos, antes e depois do tratamento específico.

Específicos:

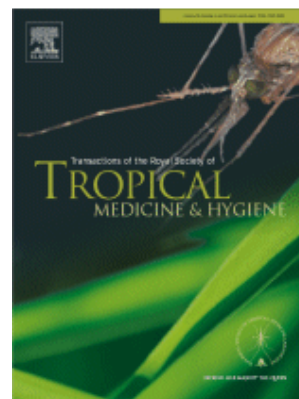
1. Verificar a produção de IFN- γ e IL-4 em resposta a antígenos de ovo e de vermes adultos do *S. mansoni* em cultura de células sanguíneas antes e após o tratamento da esquistossomose aguda.

2. Descrever os dados gerados a partir da investigação imunológica, hematologia e parasitológica, baseados na dosagem de anticorpos IgE e citocinas IFN- γ e IL-4, no perfil eosinofílico e carga parasitária, respectivamente.

ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho a ser submetido em:

The Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene



<http://www.rstmh.org/English/index.html>

The Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene

The objectives of the Society are to promote and advance the study, control and prevention of disease in man and other animals in warm climates, to facilitate discussion and the exchange of information among those who are interested in tropical diseases, and generally to promote the work of those interested in these objectives.

Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

50, Bedford Square, London, WC1B 3DP, UK

Tel: +44 (0) 20 75802127 **Fax:** +44 (0) 20 74361389 mail@rstmh.org

Editor in Chief: Professor Harold Townson

Editors: Professor Frank Cox and Professor Bo Drasar

Editorial Assistant: Caroline Scott

Editorial Office: Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 50, Bedford Square, London, WC1B 3DP, UK

**TREATMENT OF HUMAN ACUTE SCHISTOSOMIASIS WITH
OXAMNIQUINE INDUCES AN INCREASE IN IFN- γ AND IL-4 IN RESPONSE
TO *SCHISTOSOMA MANSONI* ANTIGENS**

J. R. Souza^{1,2*}; C. N. L. Morais¹; W. G. Melo¹; M. L. Aroucha²; P. Miranda²; C. S. Barbosa¹; A. L. C. Domingues²; F. G. C. Abath¹; S. M. L. Montenegro¹; L. B. Carvalho Júnior².

¹*Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ- Recife, PE, Brazil.*

²*Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brazil.*

**Joelma Rodrigues de Souza. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ.*

*Av. Prof. Moraes Rego s/n, Caixa Postal 7472, CEP: 50670-420, Cidade Universitária, Recife-PE-Brazil. Fone: 00-55 81 21012565 – Fax: 00-55 81 3453-1911
joelmasz@yahoo.com.br*

ABSTRACT

An unusual outbreak of acute schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, allowed us to study some immunological, hematological and parasitological features of 36 schistosomiasis patients before and after treatment with oxamniquine. The peripheral blood was collected and diluted in RPMI 1640 medium plus penicillin/streptomycin and whole blood cultures were performed from 14 patients, stimulating with SEA, SWAP and PMA/IONO for 96 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere. The supernatants were collected for cytokine IFN- γ and IL-4 quantitation by ELISA. *Schistosoma mansoni* infection predominated in males (63.89 %), aging from 05-15 years (69.44%). The parasite burden ranged from 24-1656 eggs/g of stool before treatment. Only three patients remained positive after treatment. Leukocytosis and eosinophilia were evidenced before and after treatment. IgE levels, that was increased before treatment, significantly decreased after treatment. IFN- γ levels significantly increased after treatment under SEA, SWAP, PMA/IONO stimulations and under basal conditions. IL-4 levels significantly increased after treatment under SEA stimulation and under basal conditions. These results suggest the immune response in *Schistosoma mansoni* infection is strongly influenced by the treatment, probably due to the destruction of parasites and release of antigens. After treatment both Th1(IFN- γ) and Th2 (IL-4) responses were exacerbated.

KEYWORDS:

Schistosoma mansoni – Acute Schistosomiasis – Oxamniquine – Cytokines – IgE

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease that is endemic in 74 developing countries, affecting more than 200 million people worldwide (WHO, 1993). The major pathologic lesion is the granulomatous inflammatory and fibrosing response against parasite eggs trapped mainly in the liver of the host in the course of a chronic infection (Stadecker et al, 2004). This response is a complex process involving multiple cell types and cytokines (Wynn and Cheever, 1995). Several studies have shown that different types of immune responses are associated with different clinical phases of the disease (Côrrea-Oliveira et al, 1998; Montenegro et al, 1999). However, the correlation between the evolution to different clinical forms of this disease and the establishment of a distinct Th response is still poorly defined (Contigli et al, 1999).

In the state of Pernambuco, schistosomiasis is historically considered as a rural chronic endemic disease (Coutinho et al, 1997), affecting poor people and having as vector the *Biomphalaria straminea* (Barbosa et al, 2000). The schistosomiasis endemic area of state of Pernambuco has 17.215 km², corresponding to 17.5% of this state, and including 47% of the 167 municipalities. Fifty-five (73.3%) of the municipalities are in the coastal-forest zone and 24 (30.4%), in the agreste zone (Favre et al, 2001). However, acute schistosomiasis have recently been detected in coastal areas where the disease is being introduced due to the inappropriate occupation of urban areas by rural workers, infected with *Schistosoma mansoni*. They live in the shantytowns or temporary camps without any sanitation structure producing the conditions for the infection of the snails host in there freshwater habitats (Barbosa et al, 2001; Barbosa et al, 2004). In this unusual scenarios, the disease is transmitted by the vector, *Biomphalaria glabrata*, to wealthy persons and tourists are in summer vacation in these coastal areas (Barbosa et al, 1998; Barbosa et al, 2000).

The acute phase of schistosomiasis is usually asymptomatic but clinical signs of varying intensity may occur (Lambertucci et al, 2000). The clinical findings most commonly observed include fever, cough, diarrhea, weight loss, anorexia, enlargement of the liver and spleen, and arthralgias in combination with leukocytosis and eosinophilia. These clinical manifestations are easily confused with other syndromes with hepatosplenic involvement such as infection by *Samonella sp.*, malaria and hepatitis (Neves, 1992; Lambertucci, 1993; Rabello, 1995).

The limited number of studies on the immune response of the acute phase of human schistosomiasis is due to the fact that in endemic areas the occurrence of this clinical form of the disease is very rare or negligible (Côrrea-Oliveira et al, 1998).

An unusual outbreak of acute schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, allowed us to study some immunological, hematological and parasitological features of this phase of the disease before and after specific treatment.

MATERIAL AND METHODS

STUDY POPULATION. Schistosomiasis mansoni acute patients were selected in 2000/2001 during an outbreak occurred in Porto de Galinhas beach, located in the southern coastal area of Pernambuco state. Informed consent was obtained from all patients, in line with the Brazilian ethical guidelines. The patients (n=36) underwent physical, hemathologic and fecal examinations (03 samples). They aged 15 ± 02 years (mean $\pm$ standard error). Stool examinations were performed according to Kato-Katz (1972) and Hoffman-Pons and Janer (1934) methods. Blood samples were drawn before and six months after specific treatment with oxamniquine (15 mg/Kg of body weight, single oral dose). Nevertheless, cytokines study was done in 14 patients. Brazilians individuals with negative stool examinations and no previous history of exposure to Schistosoma infection were included in that study as controls (n=11).

TOTAL LEUKOCYTE AND EOSINOPHIL LEVELS. Blood samples (05 ml) were collected into heparin (10 U/ml) for leukocyte counts and cellular culture. Total blood leukocytes were stained with Turk (1% acetic acid, gencian violet stain (1:20) and counted in a Neubauer chamber. The relative and absolute eosinophil levels were determined in giemsa stained blood smears.

WHOLE-BLOOD CULTURE. Blood cells (03 ml) were cultivated without separation of peripheral blood mononuclear cells (Montenegro et al, 1999) in RPMI 1640 medium (1:3) with penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml); and stimulated with SEA (soluble egg antigen), SWAP (soluble worm antigen preparation) and mitogens, as described below. The cultures were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, the supernatants were collected after 96h, quickly frozen and stored at – 70°C until use.

ANTIGENS AND MITOGENS. Soluble egg antigens (SEA) and soluble worm adult preparation (SWAP) were prepared as previously reported (Boros & Warren, 1970; Pearce *et al.*, 1991) and used at final concentrations of 20 and 50 µg/ml, respectively.

Phorbol myristate acetate (PMA, 50 ng/ml) and ionomycin (IONO, 1 µg/ml) were used as mitogens.

TOTAL IgE ANTIBODIES. A small amount (02 ml) of heparinized blood were centrifuged at room temperature at 500x g for 5 min, to obtain plasma. Total IgE antibodies were measured in plasma by the ACCESS (Beckman Coulter) immunoassay, described by Addison et al. (1972).

IFN- γ AND IL-4 ELISA. Cytokines were quantitated by ELISA according to Montenegro et al. (1999).

STATISTICAL ANALYSIS. Data were analyzed with the StatView 5.0 software. Difference between groups were the assessed by Wilcoxon Signed Rank Test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS

S. mansoni infection in the study populations predominated in males (63.89%) aging from 05-15 years (69.44%). Table 1 shows measurements of total leukocytes, eosinophils, IgE, parasite burden before and after treatment in 36 patients with acute schistosomiasis. Only three patients remained with positive results for Kato/Katz stool examination after treatment (28, 48 and 64 eggs/g of stool). Plasma IgE levels significantly decreased after treatment ($p=0.0119$). The eosinophils (%) and total leukocytes counts that were high before treatment, decrease after treatment, although this was not statistical significant ($p > 0.05$).

Due to operational restraints, the cytokine analysis was carried out in only 14 patients. Figures 1 and 2 show cytokine production by whole-blood cultures from acute patients and controls stimulated with mitogens and schistosome derived antigens.

The antigen stimulated of IFN- γ by whole-blood cultures from acute patients before treatment was negligible. Nonetheless, after treatment, the IFN- γ levels increased significantly when compared to those before treatment under SEA, SWAP and PMA/IONO (Figure 1). Interestingly, even with no stimulation (medium) the basal levels of IFN- γ were higher after treatment.

In pre-treatment cultures from acute patients, production of IL-4 in response to SEA or SWAP was negligible. Only mitogen stimulation induced a small production of this cytokine. After treatment, IL-4 levels increased significantly under SEA stimulation and without stimulation. (Figure 2).

DISCUSSION

The patients with acute schistosomiasis (n=36) reported in this study, 5 to 9 weeks after exposure to cercariae, demonstrated clinical manifestations that included fever, diarrhea, eosinophilia, cough and abdominal discomfort. These patients were studied before and six months after treatment to evaluate how the treatment of schistosomiasis altered the balance of the host immune response.

In studied patients, the infection was predominant in males aging from 05-15 years. Our experimental design does not allow us to conclude that these individuals are more susceptible to infection.

The severity of acute toxemic schistosomiasis is related to the intensity of infection, estimated by the number of eggs in the feces, but lightly infected patients are also sometimes very ill (Wynn et al, 2004). In the present study, *S. mansoni* eggs were found in the stool of all the acute patients. The patients also exhibited leukocytosis and eosinophilia even after treatment as has been observed in other studies (Gazzinelli et al, 1985; Hagan et al, 1987).

Schistosoma infection results in different immune responses depending on a number of factors: eventual or chronic exposure to infection, age and degree of infection (Colley et al, 1977; Ellner et al, 1981; Bahia-Oliveira et al, 1992), type of species of schistosoma and development stage of the parasite from which the antigens were derived (Joseph et al, 2004), and different clinical form of disease (Bahia-Oliveira et al, 1992; Côrrea-Oliveira et al, 1998; Montenegro et al, 1999). A Th1 profile has been associated with the acute phase and with the severe hepatosplenic disease, while a Th2 profile is associated with intestinal and hepatointestinal forms (Williams et al, 1994; Mwatha et al, 1998; Montenegro et al, 1999).

We study acute patients from non endemic area treated with oxamniquine. Our results demonstrated that IFN- γ levels increased significantly after treatment under specific antigens stimulation according to the results of Contigli et al (1999) and we also demonstrated that IFN- γ levels increased even without stimulation ($p < 0,05$) indicating pre-activation. Probably, the increase in T cell reactivity after chemotherapy can be explained by killing of the worms and exposure of released antigens to the immune system (Araújo et al, 1996; Grogan et al, 1996; Contigli et al, 1999; Brito et al, 2000). Alternatively, schistosome infection downregulates certain immune responses (Colley et al, 1986; Zwingenberger et al, 1989) that are depressed after treatment of infection

(Joseph et al, 2004). Our results are in line with these reported by Contigli et al. (1999) that showed that acute patients produced expressive amounts of IFN- γ after treatment with oxaminiquine in non endemic area under antigen stimulation. In addition, Correa-Oliveira et al (2000) reported that chronic patients in endemic area increased the levels of IFN- γ after treatment, in response to parasite antigens.

Grogan et al, (1996) studied *S. haematobium*-infected chronic individuals before and 5 weeks after treatment with praziquantel, detecting IFN- γ in only 21% of the studied subjects, with no modification of the pattern of expression after chemotherapy. Joseph et al (2004), studied chronic patients from endemic areas 7 weeks after treatment with praziquantel, reporting the levels of IFN- γ induced by SEA and SWAP were not significantly changed by treatment. In contrast, a significant increase was observed in Th2 cytokines.

Roberts et al. (1993) showed that individuals of a Kenia's endemic area produced low levels of IFN- γ before treatment. Three months after the treatment, these levels were increased, returning to pre-treatment levels one year later, suggesting that the influence of treatment on the immune response was transient.

On the other hand, Th2 based response has been implicated as a hallmark of protective immunity to reinfection (Butterworth et al, 1998). The majority of studies on human immune responses highlighted the importance of humoral immunity based on immunoglobulin E (IgE) responses, having eosinophils as effector cells (Hagan et al, 1991). Here in we have demonstrated that acute patients present leukocytosis with eosinophilia and high levels of total IgE. After treatment, there was not a significant reduction of leukocytosis and eosinophilia. In contrast, IgE levels significantly decreased after treatment. Correa-Oliveira et al (2000) demonstrated an increase in the IgE specific to adult worm antigens after three months of treatment in chronic patients. On the other hand, Fitzsimmons et al (2004) showed that SWAP-IgE levels from chronic patients 21 days after treatment were increased in one-third of the patients, one-third remained unchanged, and one-third had IgE levels decreased.

Our results showed that IL-4 levels also increased significantly after treatment under SEA stimulation or without stimulation. According to Joseph et al (2004) chronic patients treated with praziquantel produced significantly more IL-4 and IL-5 in response to SWAP, although this was not observed in response to SEA. Grogan et al (1996) also demonstrated increase IL-4 levels after treatment under SWAP and SEA

antigen stimulation in chronic patients with *S. haematobium*. In fact, cells from acute patients were the best producers of IL-4 and IL-5, and this feature may be correlated to the high levels of IgE and consistent eosinophilia normally presented in the acute phase of infection (Lambertucci and Barraviera, 1994; Contigli et al, 1999). However, we found decreased levels of IgE after treatment and an increase in IL-4 production in acute schistosomiasis.

Our explanation for this result is that IL-4 stimulates IgE and IgG4 production (Hagan et al, 1991) where anti-schistosome IgE responses were closely correlated with resistance to reinfection, whereas high levels of IgG4 were correlated with increased susceptibility to reinfection (Bonnard et al, 2004). The IL-4-dependent IgE and IgG4 synthesis is blocked by IFN- γ , although the level of IFN- γ able to inhibit IL-4-induced IgE synthesis is lower than that required to stop synthesis of IgG4 (Hagan et al, 1991). We may speculate that, after treatment, a continuous increase in IFN- γ secretion would possibly cause an inhibition in IgE synthesis, justifying the significant decrease of the IgE levels after treatment. Moreover, little is known about events soon after disruption of the parasites in the bloodstream (Joseph et al, 2004).

Taken collectively, our findings suggest and support the idea that the immune response can be influenced by the chemotherapy drug used (Araújo et al, 1996; Grogan et al, 1996; Contigli et al, 1999; Lambertucci et al, 2000; Brito et al, 2000) and the time of study after treatment (Gazzinelli et al, 1985; Contigli et al, 1999; Fitzsimmons et al, 2004).

Although immunologic responses have been extensively examined in chronic patients, few studies have been made regarding human acute schistosomiasis indicating that this is an important area for future study.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CAPES, UFPE and CPqAM-FIOCRUZ.

Table 1. Measurements of Total Leukocytes, Eosinophil, IgE and Parasite Burden in Schistosomiasis Acute Patients (n=36) Pre and Post-Treatment

Parameters	Pre-treatment*		Post-treatment*	
Total Leukocytes	11481 ± 1290	2350-42150	9924 ± 515	4650-18500
Eosinophil (%)	16 ± 02	01-45	14 ± 02	01-51
IgE (IU/ml) *	1222 ± 264	40-6100	727 ± 127**	15-2738
Parasite Burden (eggs/g of stool)	257 ± 69	24-1656	46 ± 10**	28, 48 and 64**

* - Mean ± standard error and range.

** p≤0.00119

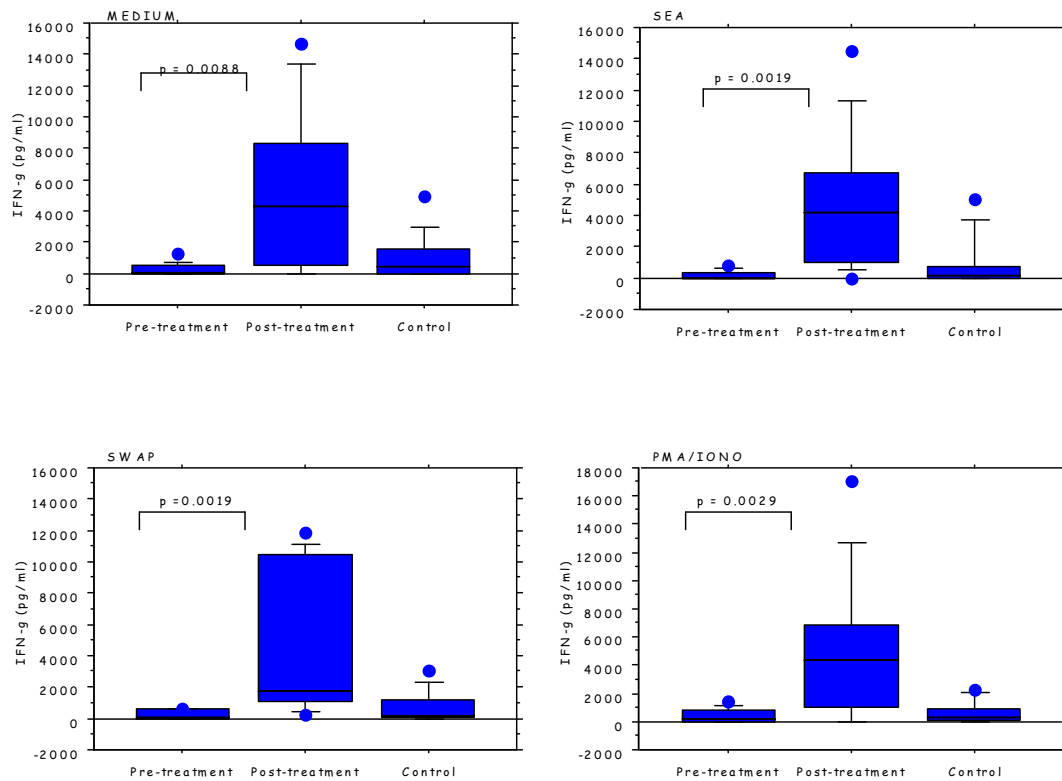


Figure 1. IFN- γ levels measured by ELISA in whole blood cultures from acute patients pre and post-treatment. The conditions of culture and stimulations are indicated in the respective figure of the panel (n=14).

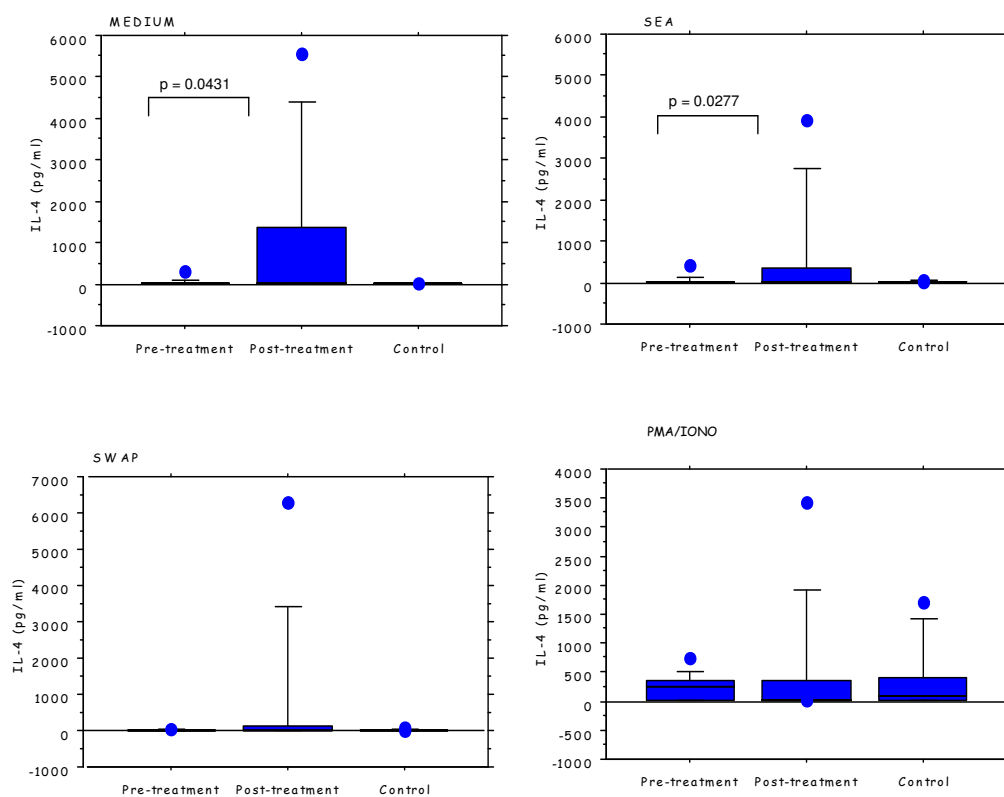


Figure 2. IL-4 levels measured by ELISA in whole blood cultures from acute patients pre and post-treatment. The conditions of culture and stimulations are indicated in the respective figure of the panel (n=14).

REFERENCES

1. Addison GM, Beamish MR, Hales CN, Hodgkins M, Jacobs A, Llewellyn P. 1972. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Journal of Clinical Pathology*, London, 25: 326-329.
2. Araújo, M. I.; Jesus, A. R. De; Bacellar, O.; Sabin, E.; Pearce, E; Carvalho, E. M. 1996. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European Journal of Immunology*, 26: 1399-403.
3. Bahia-Oliveira, L. M. G.; Gazzinelli, G.; Eloi-Santos, S. M.; Cunha-Melo, J. R.; Alves-Oliveira, L. F. ;Silveira, A.M. S. , Viana, I.R.C., Carmo, J.; Souza, A.; Correa-Oliveira, R. 1992. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 86:57.
4. Barbosa, C. S.; Araújo, K. C.; Antunes, L.; Favre, T.; Pieri, O. S. 2004. Spatial Distribution of Schistosomiasis Foci on itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Osw Cruz* 99 (1): 79-83.
5. Barbosa, C. S.; Domingues, A. L. C.; Abath, F.; Montenegro, S.; Guida, U.; Carneiro, J.; Tabosa, B.; Morais, C.; Spinelli, V. 2001. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 17: 725-728.
6. Barbosa, C. S.; Pieri, O. S.; Silva, C. B.; Barbosa, F. S. 2000. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na Ilha de Itamaracá, Pernambuco. *Rev Saude Pub* 34: 337-341.
7. Barbosa, C. S.; Gonçalves, J. E. ; Albuquerque, Y.; Barbosa, F. S. 1998. Urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil: Epidemiological factors involved in the recent endemic process. *Mem Inst Osw Cruz*, 93:265-266.
8. Bonnard, P.; Remoue, F.; Schacht, A-M.; Deuffic-Burban, S.; Dompnier, J-P.; Elguero, E.; Charrier, N.; Cassagnou, M.; Diop, M.; Ly, A.; Capron, A.; Riveau, G. 2004. Specific isotype immune response in the diagnosis of human schistosomiasis pathology? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71 (2): 202-5.
9. Boros, D.V.; Warren, K.S. 1970. Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exper. Med.*, 132:488
10. Brito, C. F. A.; Caldas, I. R.; Coura Filho, P.; Correa-Oliveira, R.; Oliveira, S. C. 2000. CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in na endemic área

- produce interferon- γ and tumour necrosis factor- α in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. Scandinavia Journal of Immunology, 51: 595-601.
11. Butterworth, A. E. Immunological aspects of human schistosomiasis. 1998. British Medical Bulletin, 54 (2): 357-68.
 12. Colley, D. G.; Barsoum, I.S.; Dahawi, H. S. Gamil, F.; Habib, M.; El alamy, M. A. 1986. Immune responses and immunoregulation in relation to human schistosomiasis in Egypt. III. Immunity and longitudinal studies of in vitro responsiveness after treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg 80:952-7.
 13. Colley, D. G., Cook, J. A., Freeman, G. L., Bartholomew, R. K., Jordan, P.; 1977. Inst Archs Allergy Appl Immun 53:420.
 14. Contigli, C.; Silva-Teixeira, D.N.; Prete, G. D.; D'elios, M. M.; De Carli, M.; Manghetti, M.; Amedei, A.; Almerigogna, F.; Lambertucci, J. R.; Goes, A. M. 1999. Phenotype and cytokine profile of *Schistosoma mansoni* specific T cell lines and clones derived from schistosomiasis patients with distinct clinical forms. Clinical Immunology, 91 (3): 338-44.
 15. Côrrea-Oliveira, R.; Caldas, I. R.; Martins-Filho, O. A.; Queiroz, C. C.; Lambertucci, J.R.; Cunha-Melo, J. R.; Silveira, A. S.; Prata, A.; Wilson, A.; Gazzinelli, G. 2000. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. Acta Tropica, 77:141-6.
 16. Côrrea-Oliveira, R.; Malaquias, L. C. C.; Falcão, P. L.; Viana, I. R. C.; Bahia-Oliveira, L. M. G.; Silveira, A. M. S.; Fraga, L. A. O.; Prata, A.; Coffman, R. L.; Lambertucci, J. R.; Cunha-Melo, J. R.; Martins-Filho, O. A.; Wilson, R. A.; Gazzinelli, G. 1998. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 31: 171-7.
 17. Coutinho, E. M.; Abath, F.; Barbosa, C. S.; Montenegro, S.; Teixeira, K. M. Domingues, A. L. C., 1997. Factors involved in *S. mansoni* infection in rural areas in Northeast Brazil. Mem Inst Osw Cruz, 92: 707-715.
 18. Ellner, J. J.; Olds, G. R. ;Osman, E. S. , El Kholy, A.; Mahmoud, A. A. 1981. J. Immunol 126 (1):309.
 19. Favre, T. C. ; Pieri, O.; Barbosa, C.; Beck, L. 2001. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 34 (6): 569-576.

20. Fitzsimmons, C. M.; Joseph, S.; Jones, F. M.; Reimert, C. M.; Hoffmann, K. F.; Kazibwe, F.; Kimani, G.; Mwatha, J. K.; Ouma, J. H.; Tukahebwa, E. M.; Kariuki, H. C.; Vennervald, B. J.; Kabatereine, N. B.; Dunne, D. W. 2004. Chemotherapy for schistosomiasis in ugandan fishermen: treatment can cause a rapid increase in interleukin-5 levels in plasma but decreased levels of eosinophilia and worm-specific immunoglobulin E. *Infection and Immunity*, 72 (7): 4023-30.
21. Gazzinelli, G., Lambertucci, J. R., Katz, K. Rocha, R. S. Lima, M. S. And Colley, D.G. 1985. Immune Responses During Human Schistosomiasis mansoni. XI. Immunologic Status of Patients with Acute Infections and After Treatment. *The Journal of Immunology* 135(3) 2121-2127.
22. Grogan, J. L.; Kremsner, P. G.; Deelder, A. M.; Yazdanbakhsh, M. 1996. Elevated proliferation and interleukin-4 release from CD4+ cells after chemotherapy in human *Schistosoma haematobium* infection. *European Journal of Immunology*, 26: 1365-70.
23. Hagan, P.; Blumenthal, U. J.; Dunn, D.; Simpson, A. J. G.; Wilkins, H. A. 1991. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature*, 349: 243-5.
24. Hagan, P.; Blumenthal, U. J.; Chaudri, M.; Greenwood, R. J.; Hayes, J.; Hodgson, C.; Kelly, C.; Knight, M.; Simpson, A.J. G.; Smithers, S. R.; Wilkins, H. 1987. Resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium* in Gambian children: analysis of their immune responses. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:938-946.
25. Hoffman, V.A., Pons, J.S. ; Janer, J.L. 1934. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rican J. Public Health Trop Med* 9:283
26. Joseph, S.; Jones, F. M.; Walter, K.; Fulford, A. J.; Kimani, G.; Mwatha, J. K.; Kamau, T.; Kariuki, H. C.; Kazibwe, F.; Tukahebwa, E.; Kabatereine, N. B.; Ouma, J. H.; Vennervald, B. J.; Dunne, D. W. 2004. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. *The Journal of Infectious Diseases*, 190:835-42.
27. Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J. 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Ver Int med Trop São Paulo* 14: 397-400.
28. Lambertucci, J. R.; Serufo, J. C.; Gerspacher-Lara, R.; Rayes, A. A. M.; Teixeira, R.; Nobre, V.; Antunes, C. M. F. 2000. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Tropica*, 77: 101-9.
29. Lambertucci, J. R.; Barraviera, B. 1994. Esquistossomose mansônica – Estudo Clínico. *JBM* 67: 59-100.

30. Lambertucci, J.R.; 1993. *Schistosoma mansoni*: pathological and clinical aspects. In: Jordan, P., Webbe, G., Sturrock, R. F. (Eds.), Human Schistosomiasis. Cab international, wallingford, pp. 195-225.
31. Montenegro, S.M.L.; Miranda, P.; Mahanty, S.; Abath, F.; Teixeira, K.; Coutinho, E.; Brinkman, J.; Gonçalves, I.; Domingues, L. A.; Domingues, A. L.; Sher, A.; Wynn, T. 1999. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. J. Infect. Dis., 179:1502.
32. Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, Mbugua GG, Ouma JH, Mumo J, Fulford AJ, Jones FM, Butterworth AE, Roberts MB, Dunne DW. 1998. The 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. Journal of Immunology, Baltimore, 160:1992-1999.
33. Neves, J. 1992. Acute or toxemic form of mansoni's schistosomiasis. Mem Ins Osw Cruz 87(4):321-324.
34. Pearce, E. J.; Caspar, P.; Grzych, J. M.; Lewis, F. A.; Sher, A. 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*. J. Exper. Med., 173:159.
35. Rabello, A. 1995. Acute human schistosomiasis mansoni. Mem Ins Osw Cruz 90: 277-280.
36. Roberts, M.; Butterworth, A.E.; Kimani, G.; Kamon, T.; Fulford, A.J. C.; Dunne, D. W.; Ouma, J. H. ; Sturrock, R.F.1993. Immunity after treatment of human schistosomiasis association between cellular responses and resistance to reinfection. Infect Immunity 61:(12) 4984
37. Stadecker, M. J.; Asahi, H.; Finger, E.; Hernandez, H. J.; Rutitzky, L. I.; Sun, J. 2004. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. Immunological Reviews, 201: 168-79.
38. World Health Organization (WHO) committee. The control of schistosomiasis. WHO technical report series 830. Geneva: WHO, 1993.
39. Williams, M. E.; Montenegro, S.; Domingues, A. L. ; Wynn, T. A.; Teixeira, K.; Mahanty, S.; Coutinho, A.; Sher, A. 1994. Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. J Infect Dis 170:946.

40. Wynn, T. A.; Thompson, R. W.; Cheever, A. W.; Mentink-Kane, M. M. 2004. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*, 201: 156-67
41. Wynn, T. A ; Cheever, A.W.; 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology*, 7:505
42. Zwingenberger, K.; Irschink, E. Siqueira Vergetti, J.G.; et al. 1989. Release of interleukin 2 and γ interferon by peripheral mononuclear cells in human *Schistosoma mansoni* infection normalizes after chemotherapy. *Scand J immunol* 30:463-93.

METODOLOGIA DETALHADA

METODOLOGIA DETALHADA

1. EQUIPAMENTOS

- **Capela de Fluxo Laminar Vertical:** modelo MR 115, Núcleo equipamentos, São Paulo, SP.
- **Centrífuga:** refrigerada modelo TJ-6R, Beckman Instruments, Inc, Palo Alto, CA, USA.
- **Computador e Software Microplate Manager versão 4.0, Biorad laboratories,** Richmond, CA, USA.
- **Espectrofotômetro UV/VIS:** modelo DU-65, Beckman Instruments, Inc, Glentworth, Scotland, UK.
- **Estufa para cultura de células com CO₂ :** Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA.
- **Freezer -70°C:** Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA.
- **Lavador de ELISA:** modelo 1550, Biorad Laboratories, Richmond, CA, USA.
- **Leitor de ELISA:** modelo 3550, Biorad Laboratories, Richmond, Ca, USA.
- **Microscópio Olympus, CBA.**
- **PHmetro Iris 7, Tecnow.**
- **Thermo- Mixer:** Model TM-100, Single unit, Thermonics, Tokyo- Japan.
- **Software Statview 5** for Windows, SAS. Institute, Inc., 1999.

2. REAGENTES E PRODUTOS

- **Calbiochem Burlingame, CA, USA.** Acetato de miristato forbol e ionomicina.
- **Costar, Cambridge, MA, USA.** Placas com 48 poços para cultura de células e placas com 96 poços com baixa aderência de proteínas para armazenar o sobrenadante.
- **Dynatech, Chantilly, VA, USA** Placas de fundo plano com 96 poços Immulon 4.
- **Endogen, USA.** Anticorpo monoclonal anti IFN- γ humano MA 01801, e anticorpo policlonal anti IFN- γ humano p-700.
- **Fleishmann & Royal Ltda., Rio de Janeiro:** Leite instantâneo desnatado.
- **Genzyme, Cambridge, UK** anticorpo monoclonal anti-IFN- γ e anticorpo monoclonal anti-IFN- γ receptor cadeia alpha.

- **Gibco BRL, Grand Island, NY, USA.** Penicilina/ estreptomicina, meio RPMI 1640.
- **ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA.** Soro de albumina bovina.
- **Jackson Immuno Reasearch, West Groove, PA, USA.** Anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (Fc específico-111-055-046) conjugado a fosfatase alcalina.
- **Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD, USA.** Substrato para peroxidase: ABTS, peróxido de hidrogênio, tampão glicina/ácido cítrico e estreptoavidina marcado com peroxidase.
- **Merck S. A. Indústrias Químicas.** Solução de Azur Eosina Azul de Metileno segundo Giemsa.
- **Pharmacia biotech, uppsala, Sweden.** Tween –20; SDS.
- **Pharmingen, San Diego, CA, USA.** Anticorpo monoclonal anti-IL-4 humana 18651D, anticorpo monoclonal biotinilado anti-IL-4 humana 18502D.
- **Sigma AP Chemical Company, St. Louis, USA.** Substrato para fosfatase alcalina em tabletes de fosfato de p- nitrofenil.
- **Whittaker Bioproducts, Inc. Walkersville, MD, USA.** Soro fetal bovino.

Os demais reagentes utilizados foram todos padronizados para as respectivas análises.

3. CASUÍSTICA

Os pacientes com a forma aguda de *Schistosoma mansoni* foram selecionados em 2000/2001 no município de Porto de Galinhas, Ipojuca – PE, através de exames clínico, hematológico e parasitológico de fezes (03 amostras). O exame clínico foi realizado em colaboração com uma equipe de médicos, pertencentes ao Setor de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. As manifestações clínicas predominantes foram: mal-estar, febre alta, emagrecimento, fenômenos alérgicos, tosse, diarreia, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia. Os exames laboratoriais hematológicos apresentaram leucocitose com eosinofilia e nos parasitológicos foram observados ovos de *S. mansoni* através dos métodos de Hoffman-Pons-Janer (1934) e de Kato-Katz (1972), caracterizando a forma ativa da doença.

As amostras de 36 pacientes foram coletadas antes e após 6 meses de tratamento específico com oxamniquine 15 mg/Kg. No entanto, o estudo das citocinas foi realizado

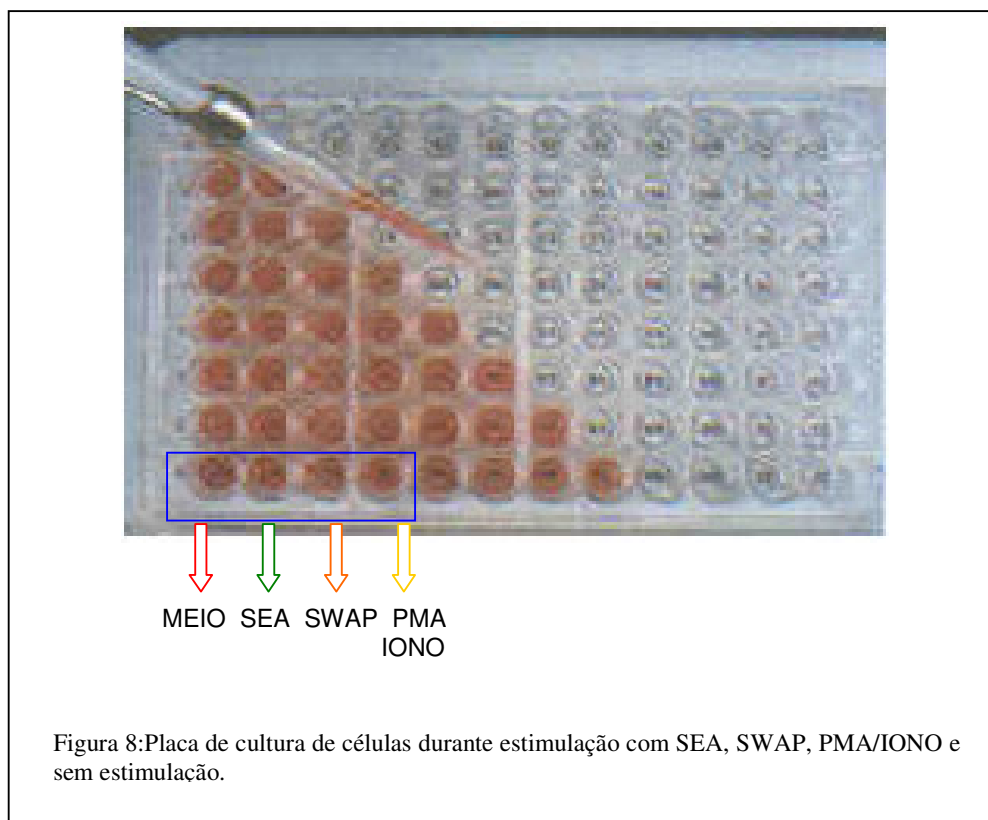
em um subconjunto deste grupo (n=14). Para análise comparativa com o grupo de pacientes acima citado, amostras de um grupo controle (n=11) formado por indivíduos brasileiros com parasitológico negativo e que não apresentaram antecedentes de banho de rio, foram coletadas.

Salientamos que este estudo foi realizado após a aprovação da Comissão de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, e que cada participante, mediante termo de consentimento, autorizou seu ingresso no mesmo (anexos).

4. PREPARAÇÃO CELULAR E CONDIÇÕES DE CULTURA

Foram coletados 05 ml de sangue venoso com heparina (10 U/ml) de pacientes e indivíduos saudáveis, para a realização do leucograma e da cultura celular. Distensões sangüíneas, para a contagem diferencial, foram feitas em duplicata em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas e posteriormente coradas pelo Giemsa, durante 15 minutos (5 gotas para 1 ml de água destilada). Para a contagem global de leucócitos, o sangue foi diluído na proporção de 1:20 com a solução de Turk (ácido acético glacial a 2%, violeta de genciana a 1% em água destilada) e os leucócitos contados em câmara de Newbauer.

O sangue (03 ml) foi cultivado sem separação da camada mononuclear (MONTENEGRO *et al.*, 1999) em meio RPMI 1640 (1:3) contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Esta cultura foi distribuída (0,7 ml) em placas com 48 poços, precedendo-se à estimulação com SEA (antígeno solúvel do ovo), SWAP (antígeno solúvel do verme adulto) e PMA/Iono (acetato de forbol miristato/ionomicina) (Figura 8). As culturas foram então, incubadas a 37⁰C em estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida e os sobrenadantes foram coletados após 96 h de cultivo e congelados a -70⁰C para determinação da produção de citocinas.



5. ANTÍGENOS E MITÓGENOS

SEA e SWAP foram preparados como descrito por BOROS & WARREN (1970) e foram usados em concentrações finais de 20 e 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, para estimulação das culturas. Os mitógenos PMA (50 ng/ml) e Iono (1 $\mu\text{g/ml}$) foram usados conjuntamente para a estimulação de culturas.

6. DOSAGEM DE ANTICORPOS IgE TOTAL

Após a coleta, 2 ml de sangue foram transferidos para um tubo falcon de 15 ml e centrifugados a 500 x g por 5 minutos, a temperatura ambiente para a obtenção do plasma que, em seguida foi coletado e armazenado a -70°C para posterior dosagem de anticorpos da classe IgE.

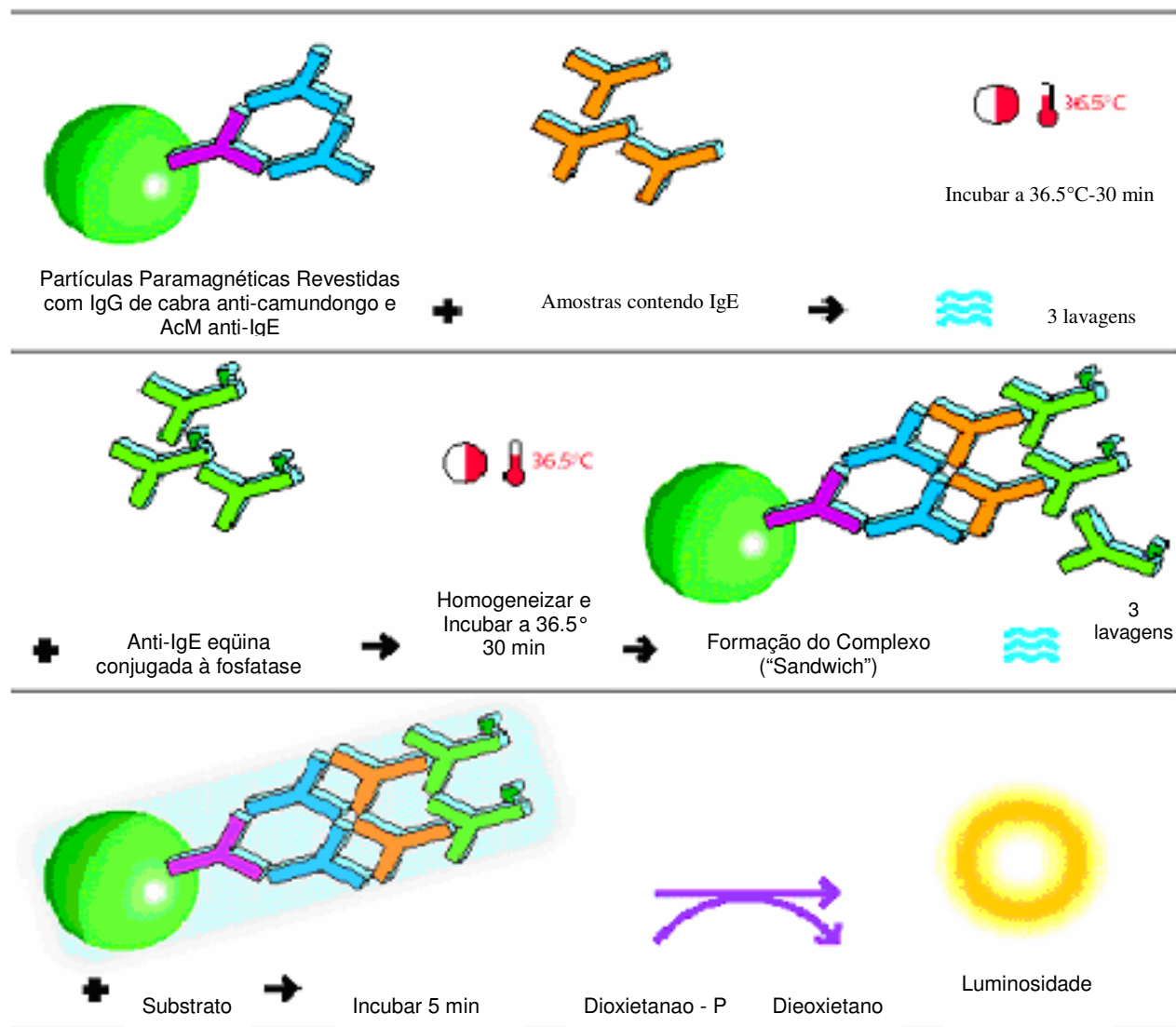
Para a determinação quantitativa dos níveis circulantes de IgE total em plasma humano foi utilizado o sistema de imunoensaio automatizado ACCESS (Beckman Coulter), que se baseia no uso de partículas paramagnéticas como fase sólida e a quimioluminescência como método de detecção da reação antígeno-anticorpo. O ensaio ACCESS IgE total é baseado no ensaio imunoradiométrico (IRMA) de dois sítios,

descritos por ADDISON *et al.* (1972), mas utiliza um anticorpo marcado com enzima no lugar do traçador radio-marcado.

No teste utilizado, a quimioluminescência se desenvolve a partir de uma reação entre a enzima fosfatase alcalina e o seu substrato dioxietano. O plasma de pacientes e indivíduos controle foi adicionado a um tubo juntamente com partículas paramagnéticas revestidas com anticorpos de cabra anti-IgG de camundongo complexados a anticorpos monoclonais (subclasse IgG) de camundongo anti-IgE humana, através de suspensão em tampão Tris-salina com surfactante, albumina sérica bovina (BSA), proteína (cabra), azida sódica a 0,1%. A IgE do plasma ligava-se a anti IgE de camundongo das partículas. Em seguida, houve separação em um campo magnético e uma lavagem removeu os materiais que não ficaram ligados à fase sólida.

Anticorpos produzidos em cavalo contra IgE humana, e conjugados à fosfatase alcalina em tampão Tris-salina com surfactante, proteína (equina), azida sódica a 0,1% eram adicionados, unindo-se às partículas de IgE previamente ligadas. Uma segunda etapa de separação e lavagem removeram o conjugado não ligado. Um substrato quimioluminescente, Lumi-Phos 530, era adicionado à reação e a luz produzida era proporcional à quantidade de IgE da amostra (Figura 09). A análise quantitativa de IgE na amostra foi determinada por meio de uma curva de calibração.

Dosagem de anticorpos IgE total



Luminosidade produzida diretamente proporcional à concentração de IgE na amostra

Figura 9: Desenho esquemático mostrando a dosagem de anticorpos IgE total

Fonte: <http://www.beckman.com/literature/ClinDiag/totalige.pdf>

7. DOSAGENS DE CITOCINAS

A detecção das citocinas IL-4 e IFN- γ foi realizada como descrito em MONTENEGRO *et al.* (1999). Placas de fundo plano com 96 poços foram sensibilizadas com 50 μ l dos anticorpos monoclonais anti-IL-4 humana e anti IFN- γ humana nas concentrações finais de 1 μ g/ml e 2 μ g/ml, respectivamente, diluídos em PBS 0,15 M, pH 7,2 e incubadas por 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com leite instantâneo desnatado a 5% em PBS 0,15 M, pH 7,2 adicionando-se 150 μ l/poço, e incubadas a 37°C por 2-3 horas, sendo posteriormente lavadas 6 vezes com PBS-Tween 20, 0,05%. Os padrões das citocinas IL-4 e IFN- γ (solução estoque a 20.000 pg/ml) e os sobrenadantes de cultura, em duplicata, foram diluídos em BSA 1% em PBS/Tween-20, 0,05% (diluyente de ELISA), sendo os padrões diluídos a partir da concentração de 10.000 pg/ml até 19,5 pg/ml com fator 2 e os sobrenadantes diluídos 1:2, acrescentados às placas e estas incubadas por 18 horas a 4°C e lavadas em seguida. Para cada placa foram incluídos 4 poços (brancos) que não continham nem os padrões das citocinas nem os sobrenadantes.

Anticorpos anti-IL-4 humana biotinilados na concentração final de 1 μ g/ml e anti-IFN- γ humana 1:1000 diluídos em diluyente de ELISA, foram acrescentados às placas no volume de 50 μ l, incubados a 37°C durante 2 horas e lavadas em seguida. O conjugado peroxidase-estreptavidina diluído 1:16.000 foi acrescentado no volume de 100 μ l nas placas, para a detecção de IL-4 e o mesmo volume de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (Fc específico) diluído 1:500 em diluyente de ELISA foi acrescentado para a detecção de IFN- γ , e incubados a 37°C por 1-2 horas.

Após 6 lavagens, os imunoensaios para IL-4 foram revelados com o substrato ABTS (2,2'-azino-di[sulfato (6) de 3-etil benzitiazolina]) e os imunoensaios para IFN- γ foram revelados com o substrato fosfato de p- nitrofenil 5 mg/ml (Sigma substrate tablets) diluído em tampão de carbonato de sódio 0,84 g/l, bicarbonato de sódio 1,25 g/l, cloreto de magnésio 0,25 g/l, pH=8,6, por aproximadamente 20-30 minutos. As reações foram interrompidas com 10 μ l/poço de SDS 10% para os ensaios para detecção de IL-4, e com o mesmo volume da solução de NaOH 0,3 N, para os ensaios para detecção de IFN- γ . Em seguida, foi realizada a leitura das reações através de um espectrofotômetro com comprimento de onda apropriado: 405 nm para a citocina IL-4 e 405/655nm para a citocina IFN- γ . As leituras e cálculo de concentrações foram feitos com o software Microplate Manager, versão 4.0 (Biorad laboratories).

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A composição do banco de dados e os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software Statview 5 for Windows, SAS. Institute, Inc., 1999.

A análise dos resultados foi realizada através do teste não-paramétrico Wilcoxon Signed Rank e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDISON GM, BEAMISH MR, HALES CN, HODGKINS M, JACOBS A, LLEWELLIN P. 1972. An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. **Journal of Clinical Pathology**, London, 25: 326-329.
- BOROS, D.V.; WARREN, K.S. 1970. Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **J. Exper. Med.**, 132:488
- HOFFMAN, V.A., PONS, J.S.; JANER, J.L. 1934. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rican. **J. Public Health Trop Med** 9:283
- KATZ, N., CHAVES, A., PELLEGRINO, J. 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Ver Int med Trop São Paulo** 14: 397-400.
- MONTENEGRO, S.M.L.; MIRANDA, P.; MAHANTY, S.; ABATH, F.; TEIXEIRA, K.; COUTINHO, E.; BRINKMAN, J.; GONÇALVES, I.; DOMINGUES, L. A.; DOMINGUES, A. L.; SHER, A.; WYNN, T. 1999. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J. Infect. Dis.**, 179:1502.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- As conseqüências dos achados descritos no que se refere a resistência contra a reinfeção ainda não estão esclarecidos.
- Houve um aumento significativo dos níveis de IFN- γ após o tratamento sob estimulação antigênica ou mitogênica e mesmo sem estimulação ($p < 0.05$).
- Os níveis da citocina IL-4 mostraram-se elevados significativamente após o tratamento, apenas sob estimulação com SEA e sem estimulação ($p < 0.05$).
- Os níveis de anticorpos IgE foram significativamente reduzidos após o tratamento, sugerindo a ocorrência de imunomodulação entre as citocinas IFN- γ e IL-4.
- A resposta imune do hospedeiro agudamente infectado pelo *Schistosoma mansoni* é fortemente influenciada pelo tratamento com oxamniquine.

ANEXOS

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi submetido à análise do Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz e obteve parecer favorável para a sua execução.

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

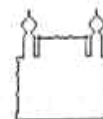
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

Campus da Universidade Federal de Pernambuco

Avenida Moraes Rego s/n° - Caixa Postal Nº 7472

Fone: (081) 271-4000 - FAX: (081) 453-1911 ; 453-3046

CEP 50670-420 - Recife - Pernambuco - Brasil



FIOCRUZ

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DO CPqAM/FIOCRUZ

Projeto:

Investigation of Citokine Responses in Brazilian Patients with Schistosomiasis Mansoni

Proponente: Silvia Maria Lucena Montenegro

Consideramos que os procedimentos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética resolução CNS 196/96.


Nilma Cintra Leal
Dra. Nilma Cintra Leal
Pesquisador Titular
Dept.º de Microbiologia
CPqAM/FIOCRUZ

Lia Giraldo

Recife, 07 de julho de 1999


Constança Simões Barbosa
Constança Simões Barbosa
Pesq. Titular - Matr. 4147-6
Chefe da Estação de Controle de Programas
de Esquistossomose-CPqAM-FIOCRUZ


Sinval Brandão
Dr. Sinval P. Brandão
Pesquisador Adjunto
Depto. de Imunologia
CPqAM/FIOCRUZ

PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE AGUDA HUMANA

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu,

_____ declaro que aceito participar do estudo científico de doentes com esquistossomose. Foi-me explicado que faz parte de minha participação neste estudo um exame médico completo e exames de sangue e parasitológico que serão feitos antes e depois de eu ser tratado para a esquistossomose. Também, o meu sangue vai ser estudado no laboratório para tentar entender melhor a doença. Os riscos de retirar sangue são dor e hematoma no local, e raramente, desmaio. A quantidade de sangue a ser estudada não deve causar problemas para a minha saúde e o material coletado no presente projeto, poderá ser arquivado em um banco de amostras, podendo ser utilizado em estudos futuros. Minha participação neste estudo não vai me beneficiar diretamente, mas poderá ajudar a entender melhor esta doença e poderia ser útil no futuro. Essa participação é voluntária e eu poderei deixar este estudo a qualquer momento se assim desejar. Caso não queira participar desse estudo, minha decisão não vai mudar meu atendimento médico ou tratamento neste hospital ou clínica agora ou no futuro. Quando os resultados deste estudo forem apresentados em revista médicas ou em reuniões científicas, eu não serei identificado pelo nome. Qualquer esclarecimento que eu necessite, eu devo entrar em contato com Dra. Silvia Montenegro, a qualquer momento pessoalmente ou pelo telefone 81-2101-2565.

_____, ____ de _____ de 200__.

_____.

KIT IgE TOTAL

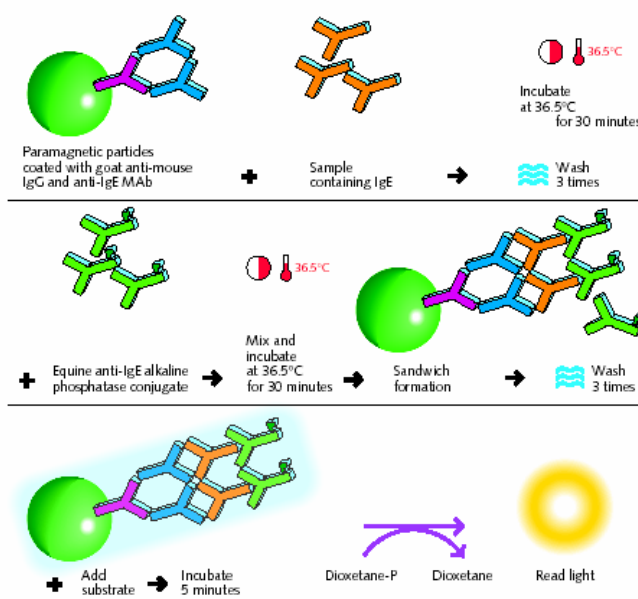


Bulletin 9080a

Total IgE

- *Broad dynamic range:* 0.25 - 3000 IU/mL
- *Analytical sensitivity:* 0.25 IU/mL
- *Sample size:* 10 μ L
- *Reproducibility:* < 10% CV
- *Calibration stability:* 28 days

2 step
sandwich
technique



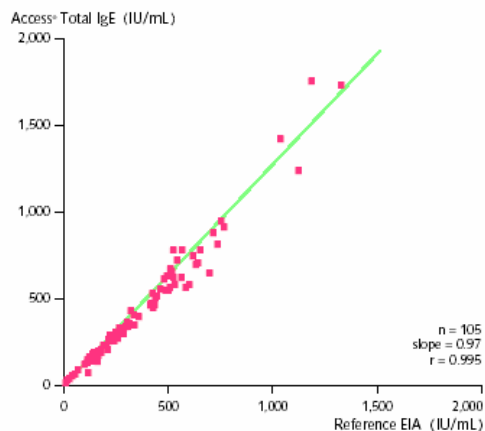
Signal produced is directly proportional to the IgE concentration in the sample.





Total IgE

Performance Correlation with a reference EIA technique



Characteristics

Sample Type/Size	Serum or plasma (heparin, EDTA) / 10 µL
Time to 1st Result	75 minutes
Analytical Sensitivity	0.25 IU/mL
Calibrator Levels	0, 3, 15, 60, 240, 1000, and 3000 IU/mL (approximate)
Normal Values	1.31 - 165.3 IU/mL
Open Pack Stability	28 days
Calibration Stability	28 days
Precision	< 10% CV

Ordering Information

Access® Total IgE - 2 packs of 50 tests/pack	35000
Access® Total IgE Calibrators - 1 vial of 6.0 mL, 6 vials of 4.0 mL/vial	35005
Access® Total IgE Zero Calibrator - 1 vial of 6.0 mL	35006



Africa/Middle East/Eastern Europe/Switzerland, Nyon (41) 22 994 0707, Australia, Gladesville (61) 2 9844 6000, Canada, Mississauga (1) 905 819 1234, China, Beijing (86) 10 6515 6028, Hong Kong (852) 2814 7431, 2814 0481, France, Villepinte (33) 1 49 90 90 00, Germany, Krefeld (49) 2151 33 35, Italy, Milan (39) 02 563921, Japan, Tokyo (81) 3 5404 8424, Latin America (1) (305) 380 4709, Mexico, Mexico City (525) 3 75 8903, Netherlands, Mijdrecht (31) 297 220633, Singapore (65) 339 9533, South Africa, Johannesburg (27) 11 806 2014, Sweden, Bromma (46) 8 98 53 20, Switzerland, Nyon 0800 810 810, Taiwan, Taipei (886) 2 2378 3456, UK, High Wycombe (44) 01494 441181, USA, Brea, CA (1) 800 352 3453, (1) 714 993 5321.

www.beckmancoulter.com

© Copyright 2000 Beckman Coulter, Inc.

PRINTED IN U.S.A.

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS



Immunological and Parasitological Studies in Patients with Acute Schistosomiasis Mansoni



Joelma R. Souza^{1*}; Clarice N.L. Morais¹; Wladimir G. Melo¹; Marcílio L. Aroucha²; Paulo Miranda²; Constança S. Barbosa¹; Ana L.C. Domingues¹; Frederico G. C. Abath¹; Silvia M. L. Montenegro¹; Luiz B. Carvalho Júnior².

¹*Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Brasil.*

²*Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Brasil.*

**Joelma Rodrigues de Souza. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz. Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE. e-mail: joelmasouza@hotmail.com*

Schistosomiasis is a chronic disease that is endemic in over 74 development countries, affecting over 200 million people worldwide. In State of Pernambuco, due to the exodus of rural workers to the urban areas, new sites of acute transmission are gradually expanding into the coastal regions. An unusual outbreak of acute schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, allowed us to study some immunological, hematological and parasitological features of 36 schistosomiasis patients before and after treatment with oxamniquine. The peripheral blood was collected and diluted in RPMI 1640 medium plus penicillin (100U/ml)/streptomycin (100µg/ml) and whole blood cultures were performed in 14 patients, stimulating with SEA (soluble egg antigen), SWAP (soluble adult worm preparation) and mitogens (PMA/IONO) for 96 h in a humidified atmosphere with 5% CO₂. The supernatants were collected for subsequent cytokine IFN-γ and IL-4 determination by ELISA. Statistical analysis were performed by paired student t test and $p < 0.05$ was considered significant. *Schistosoma mansoni* infection predominated in the age group from 10-20 years. The parasite burden was evaluated by the Kato/Katz semi-quantitative method ranging 24-1656 eggs/g of stool. IFN-γ levels from acute patients after treatment increased when compared to those before treatment after SEA ($p=0.0021$), SWAP ($p=0.0042$), PMA/IONO ($p=0.0047$) stimulations and without stimulation ($p=0.0060$). IL-4 levels from acute patients were not significantly different before and after treatment under PMA/IONO or antigen stimulation. The eosinophil (%) and serum IgE (IU/ml) levels, as mean±SE, before and after treatment were respectively, 16±02 and 14±02, 1222 ± 265 and 727 ± 128, were not significantly different, but suggested that Th2 responses play a role in the acute phase of human schistosomiasis. However, the acute patients after treatment stimulated IFN-γ cytokine, probably due to an increased of antigen from *S. mansoni* characterizing this phase as Th1 response.

Financial Support: CAPES, UFPE and CPqAM-FIOCRUZ.



IMMUNOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL STUDIES IN HUMAN ACUTE SCHISTOSOMIASIS MANSONI



Joelma R. Souza^{1*}; Clarice N.L. Moraes¹; Wladimir G. Melo¹; Marcílio L. Aroucha²; Paulo Miranda²; Constança S. Barbosa¹; Ana L.C. Domingues¹; Frederico G. C. Abath¹; Sílvia M. L. Montenegro¹; Luiz B. Carvalho Júnior².

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Brazil. ²Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Brazil.

*Joelma Rodrigues de Souza, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ.

Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil.

e-mail: joelmasouza@hotmail.com

INTRODUCTION

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease that is endemic in 74 developing countries, affecting more than 200 million people worldwide (Pearce et al., 2004). The major pathologic lesion is the granulomatous inflammatory and fibrosing response against parasite eggs trapped mainly in the liver of the host in the course of a chronic infection (Stadecker et al., 2004). This response is a complex process involving multiple cell types and cytokines (Wynn et al., 1995). Several studies have shown that different types of immune responses are associated with different clinical phases of the disease (Côrrea-Oliveira et al., 1998; Montenegro et al., 1999). In the State of Pernambuco, schistosomiasis is historically a rural chronic endemic disease (Barbosa et al., 2000). However, due to the exodus of rural workers to the urban areas, new sites of acute transmission are gradually expanding into the coastal regions (Barbosa et al., 2001). An unusual outbreak of acute schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, allowed us to study some immunological, hematological and parasitological features of this phase of the disease before and after specific treatment.

MATERIALS AND METHODS

Study Population: 36 patients of middle socioeconomic class were diagnosed through clinical examination and parasitological tests, as acute schistosomiasis. Blood samples (13 ml) were collected with heparin (10 U/ml) to realize leukogram and immunological studies. Total blood leukocytes were counted using Turk's solution and a Neubauer counting chamber, and the eosinophils were scored by differential smears. A small amount (0.2 ml) of heparinized blood were centrifuged in room temperature at 500x g for 5 min, to obtain plasma to measure total IgE antibodies by chemiluminescence. The parasite burden (eggs/gram of stool) was evaluated by the Kato-Katz semi-quantitative method. All the acute patients were treated with oxamniquine (15 mg/Kg of body weight, single oral dose) and reevaluated.

Cell Preparations and Culture Conditions: the peripheral blood was diluted in RPMI 1640 medium plus penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) and whole blood cultures were performed in 14 patients, stimulating with SEA (soluble egg antigen), SWAP (soluble adult worm preparation) and mitogens (PMA/IONO) for 96 h in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

Measurement of cytokine production by ELISA: the supernatants were collected for subsequent cytokine IFN-γ and IL-4 determination by ELISA before and after treatment.

Data Analysis: statistical analysis were performed by paired student t test and p<0.05 was considered significant.

RESULTS

Schistosoma mansoni infection predominated in the age group from 10-20 years (n=21) and in the male sex individuals (n=23). The parasite burden ranging 24-1656 eggs/g of stool before treatment and only three patients remained with positive for Kato/Katz after treatment. The plasma IgE levels significantly decreased after treatment (p=0.012). The eosinophil (%) and total leukocytes counts increased before and after treatment (table 1).

Following SEA, SWAP, and PMA/IONO stimulations, the IFN-γ production was significantly increased after treatment in comparison to the acute patients before treatment (Figure 1). In fact, the levels of IFN-γ were increased even without any stimulation. The levels of IL-4 from acute patients were not significantly different before and after treatment under PMA/IONO or antigen stimulation (Figure 2).

DISCUSSION

The acute phase of schistosomiasis has been correlated with a high proliferative response to both adult worm and egg antigens, and a high IFN-γ production (Côrrea-Oliveira et al., 1998; Montenegro et al., 1999). In this study, we have demonstrated that cells from acute patients produced expressive amounts of IFN-γ after treatment under stimulation or without stimulation. The data parallels with other investigator's findings who have demonstrated that the parasite killing by chemotherapy exposes many worm antigens to the host immune system, increasing the T cell reactivity after treatment (Brito et al., 2000; Grogan et al., 1996; Araújo et al., 1995). Nevertheless, IL-4 levels did not increase significantly after treatment, even under stimulation, in agreement with Contigli et al., 1999. However, high levels of IgE and eosinophils indicated that the Th2 responses also play a role in the acute phase of human schistosomiasis.

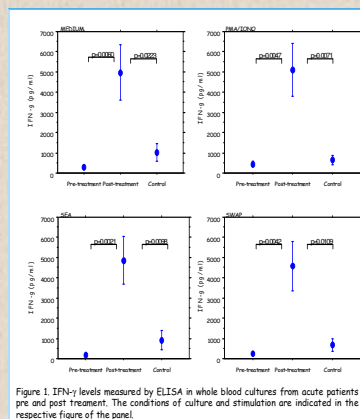


Figure 1. IFN-γ levels measured by ELISA in whole blood cultures from acute patients pre and post treatment. The conditions of culture and stimulation are indicated in the respective figure of the panel.

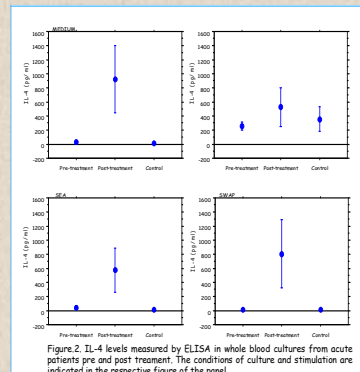


Figure 2. IL-4 levels measured by ELISA in whole blood cultures from acute patients pre and post treatment. The conditions of culture and stimulation are indicated in the respective figure of the panel.

CONCLUSION

- There is a significant increase in IFN-γ production after chemotherapeutic treatment of acute schistosomiasis
- IL-4 secretion, however, did not increase significantly after treatment and
- IgE levels decreased after treatment

Table 1. Measurements of total leukocytes, eosinophils and IgE in schistosomiasis acute patients pre and post-treatment

Parameters	Pre-treatment	Post-treatment
	(x̄) ± SE	(x̄) ± SE
Total Leukocytes (mm ³)	11481 ± 1290	9924 ± 515
Eosinophils (%)	16 ± 02	14 ± 02
IgE (IU/ml) *	1222 ± 264	727 ± 127

The results are reported as mean ± standard error (n=36). *p=0.012

FINANCIAL SUPPORT: CAPES, CqAM/FIOCRUZ, UFPE.



GUIDE FOR AUTHORS

O guia de instruções para autores para a revista científica ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE encontra-se disponível no seguinte link:

<http://www.rstms.org/English/contributorsenglish.html>



GUIDE FOR AUTHORS

[Editorial Office](#)

[Submission Checklist](#)

[General](#)

[Online Submission](#)

[Print Submission](#)

[Electronic Formats](#)

[Presentation of Text](#)

[Ethical Issues](#)

[References](#)

[Preparation of Illustrations](#)

[Proofs](#)

Editorial Office

Manuscripts may be submitted online or sent to:

The Editor
Transactions Editorial Office
Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene
50, Bedford Square
London WC1B 3DP
UK

Tel: +44 (0)20 7580 2127

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to ending it to the journal's editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

- One author designated as corresponding author:
 - e-mail address
 - Full postal address
 - Telephone and fax numbers
- All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked"
 - References are in the correct format for this journal
 - All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
 - Colour figures are clearly marked as being intended for colour reproduction or to be reproduced in black-and-white
- For any further information please contact the Author Support Department at authorsupport@elsevier.com
-

General

It is important to give a fax number and e-mail address when submitting a manuscript. Articles must be written in good English.

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright (for more information on copyright see <http://authors.elsevier.com>). This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A letter will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript. A form facilitating transfer of copyright will be provided. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact ES Global Rights Department, P.O. Box 800, Oxford, OX5 1DX, UK; phone: (+44) 1865 843830, fax: (+44) 1865 853333, e-mail: permissions@elsevier.com

Should authors be requested by the editor to revise the text, the revised version should be submitted within one month. After this period, the article will be regarded as a new submission.

Online submission to the journal prior to acceptance

Authors can upload their article as a ***LaTeX***, ***Microsoft® (MS) Word®***, ***WordPerfect®***, ***PostScript*** or ***Adobe® Acrobat® PDF*** document via the "[Author Gateway](http://authors.elsevier.com)" page of this journal(<http://authors.elsevier.com>), where you will also find a detailed description on its use. The system generates an Adobe Acrobat PDF version of the article which is used for the reviewing process. Authors, Reviewers and Editors send and receive all correspondence by e-mail and no paper correspondence is necessary.

Note: manuscripts submitted are converted into PDF for the review process but may need to be edited after acceptance to follow journal standards. For this an "editable" file format is necessary. See the section on "[Electronic format requirements for accepted articles](#)" and the further general instructions on how to prepare your article below.

Submission to this journal normally proceeds online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the "Author Gateway" page of this journal (<http://authors.elsevier.com>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. Once the uploading is done, our system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for

revisions, will be by e-mail. In general, no separate proof is sent to you: the PDF is your proof. A proof will be provided only when the final layout of the article has to differ significantly from that in the initial PDF.

The above represents a very brief outline of this form of submission. It can be advantageous to print this 'Guide for Authors' section from the site for reference in the subsequent stages of article preparation.

Print Submission to the journal prior to acceptance

Electronic submission is preferred where possible, however if it is more appropriate to submit your paper via print please send three copies of the manuscript, including one set of high-quality original illustrations, suitable for direct reproduction. (Copies of the illustrations are acceptable for the other sets of manuscripts, as long as the quality permits refereeing.)

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of two potential referees. You may also mention persons who you would prefer not to review your paper.

Electronic format requirements for accepted articles

General points

We accept most wordprocessing formats, but Word, WordPerfect or LaTeX are preferred. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Save your files using the default extension of the program used.

Wordprocessor documents

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article.

In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed 'graphically designed' equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. The electronic text should be prepared in a way similar to that of conventional manuscripts (see also the Author Gateway's Quickguide:

<http://authors.elsevier.com>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Preparation of electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spellchecker' function of your wordprocessor.

LaTeX documents

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsart', or alternatively the standard document class 'article'. The Elsevier LaTeX package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Author Gateway's Quickguide: <http://authors.elsevier.com>. It consists of the files: elsart.cls (use this file if you are using LaTeX2e, the current version of LaTeX), elsart.sty and elsart12.sty (use these two files if you are using LaTeX2.09, the previous version of LaTeX), guidelines for users of elsart, a template file for quick start, and the instruction booklet "Preparing articles with LaTeX".

Although Elsevier can process most wordprocessor file formats, should your electronic file prove to be unusable, the article will be typeset from the hardcopy printout.

Preparation of text

Presentation of manuscript

General

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above). Italics must be used for generic and specific names and for genes. Authors in Japan kindly note that, upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact our Tokyo office: Elsevier K.K., 4F Higashi-Azabu, 1-Chome Bldg, 1-9-15 Higashi-Azabu, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan, tel.: (+81) (3) 5561 5037; fax: (+81) (3) 5561 5047, email: jp.info@elsevier.com

Print the entire manuscript on one side of the paper only, using double spacing and wide (3 cm) margins. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.).

Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal (from Volume 98 onwards) to become familiar with layout and conventions.

Number all pages consecutively.

Provide the following data on the title page (in the order given).

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and**

fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract. A concise and factual abstract is required (maximum length 200 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

References should therefore be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list.

Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords. Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations. Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Arrangement of the article

Subdivision of the article. Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction. State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Experimental/Materials and methods. Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory and/or calculation. A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Discussion. This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

Conclusions. The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Acknowledgements. Place acknowledgements, including information on grants received, before the references, in a separate section, and not as a footnote on the title page.

References. See separate section, below.

Figure legends, tables, figures, schemes. Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left, but such embedding should not be done specifically for publishing purposes. Further, high-resolution graphics files must be provided separately (see Preparation of illustrations).

Specific remarks

Mathematical formulae. Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Use the solidus (/) instead of a horizontal line,

$$\begin{array}{c} \text{e.g.: } X_p/Y_m \\ \text{rather than} \\ \frac{X_p}{Y_m} \end{array}$$

Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Number consecutively any equations that have to be displayed separate from the text (if referred to explicitly in the text).

Tables. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text.

Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Tables must be prepared using the Tables function of the package used not in a tabbed text format.

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature & Related Documents <http://www.chem.qmc.ac.uk/iubmb> for further information.

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example below). This combination of letters and format will

enable Elsevier's typesetters to recognise the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.** In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Preparation of supplementary data. The Journal now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Author Gateway at <http://authors.elsevier.com>.

Files can be stored on 3½ inch diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh). This journal offers electronic submission services and supplementary data files can be uploaded via the Author Gateway page of this journal via <http://authors.elsevier.com>.

Ethical issues

Policy and ethics. The Transactions publishes the results of research involving human subjects only if the research has been conducted in full accordance with ethical principles. Any manuscript describing the results of such research must include a clear statement, specifying that the free and informed consent of the subjects or their legal guardians was obtained and that the relevant institutional or national ethical review board approved the investigation. The Editors may refer matters involving publication ethics for expert opinion. The anonymity of authors, reviewers and third parties will be preserved in this process.

Further guidance on relevant ethical principles are available from the Nuffield Council on Bioethics <http://www.nuffieldbioethics.org/publications/index.asp>

Work involving animals must have been carried out in accordance with EC Directive 86/609/ECC for animal experiments; <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>.

Conflicts of interest

A conflict of interest arises when a professional judgment concerning a primary interest (such as the conduct of a trial, a patient's welfare or the validity and interpretation of the research) tends to be unduly influenced by financial gain or other self-interested motive which may be at odds with professional obligations. Authors should disclose at the time

of submission information on financial conflicts of interest that may influence the manuscript. They are also encouraged to declare other interests that could influence the results of the study or the conclusions of the manuscript (e.g. employment, academic links, family relationships, political or social interest group membership, deep personal conviction). For further information, see the web site of the International Committee of Medical Journal Editors: <http://www.icmje.org/sponsor.htm>.

Funding

Authors should declare the sources of funding for the work undertaken.

References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors.

Citations in the text: Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications should not be in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Citing and listing of web references: As a minimum, the full URL should be given. Any further information, if known (author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.
- Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995).
Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then chronologically. Where there are several papers by the same first author they should be ordered as follows: (i) single author, (ii) two authors, alphabetically, and (iii) three or more authors, chronologically. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. The Elements of Style, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations:
<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>

Preparation of illustrations

Preparation of electronic illustrations

Submitting your artwork in an electronic format helps us to produce your work to the best possible standards, ensuring accuracy, clarity and a high level of detail.

General points

- Always supply high-quality printouts of your artwork in case conversion of the electronic artwork is problematic.
- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
 - Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Helvetica, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files, and supply a separate listing of the files and the software used.
- Provide all illustrations as separate files and as hardcopy printouts on separate sheets.
 - Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.

Files can be stored on 3½ inch diskette, ZIP-disk or CD (either MS-DOS or Macintosh). This journal offers electronic submission services and graphic files can be uploaded via the Author Gateway page of this journal via <http://authors.elsevier.com>.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<http://authors.elsevier.com/artwork>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (Note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below.):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: Colour or greyscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (colour or greyscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Non-electronic illustrations

Provide all illustrations as high-quality printouts, suitable for reproduction (which may include reduction) without retouching. Number illustrations consecutively in the order in which they are referred to in the text. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. Clearly mark all illustrations on the back (or in case of line drawings-on the lower front side) with the figure number and the author's name and, in cases of ambiguity, the correct orientation.

Mark the appropriate position of a figure in the article

Captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions on a separate sheet, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Line drawings

Supply high-quality printouts on white paper produced with black ink. The lettering and symbols, as well as other details, should have proportionate dimensions, so as not to become illegible or unclear after possible reduction; in general, the figures should be designed for a reduction factor of two to three. The degree of reduction will be determined by the Publisher. Illustrations will not be enlarged. Consider the page format of the journal when designing the illustrations.

Photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs (halftones)

Please supply original photographs for reproduction, printed on glossy paper, very sharp and with good contrast. Remove non-essential areas of a photograph. Do not mount photographs unless they form part of a composite figure. Where necessary, insert a scale bar in the illustration (not below it), as opposed to giving a magnification factor in the legend.

Note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour illustrations

Submit colour illustrations as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. 'Polaroid' colour prints are *not* suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://authors.elsevier.com/artwork>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, to be checked for typesetting/editing. No changes in, or additions to, the accepted (and subsequently edited) manuscript will be allowed at this stage. Proofreading is solely your responsibility.

A form with queries from the copyeditor may accompany your proofs. Please answer all queries and make any corrections or additions required.

Return corrections within 5 days of receipt of the proofs. Should there be no corrections, please confirm this. The Publisher reserves the right to proceed with publication if corrections are not communicated.

When your manuscript is received by the Publisher it is considered to be in its final form. Proofs are not to be regarded as 'drafts'.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. In order to do this we need your help. When you receive the (PDF) proof of your article for correction, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete. Note that this does not mean you have any less time to make your corrections, just that only one set of corrections will be accepted.

Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

50, Bedford Square, London, WC1B 3DP, UK

Tel: +44 (0) 20 75802127 Fax: +44 (0) 20 74361389 mail@rstmh.org

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

Ata da defesa de dissertação da mestranda, realizada em 24 de fevereiro de 2005, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Às 14:15 do dia 24 de fevereiro de 2005, foi realizada, na sala de aulas do LIKA, a defesa de dissertação de **Joelma Rodrigues de Souza**, aluna do Curso de Mestrado em Bioquímica. Iniciando, o Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, orientador da aluna em questão, atendendo solicitação da Coordenadora do Curso, Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, fez a apresentação da aluna, de seu orientador, Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, de seus Co-orientadores, Profa. dra. Sílvia Maria Lucena Montenegro, e Prof. Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath, e da Banca Examinadora composta pelos professores doutores: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, na qualidade de Presidente, Maria da Paz Carvalho da Silva, ambos do Depto. de Bioquímica, Valéria Rego Alves Pereira, do Depto. de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ, e Aníbal Eugenio Vercesi, do Depto. de Patologia Clínica da UNICAMP. Após as apresentações, o Sr. Presidente convidou a aluna para a apresentação de sua dissertação intitulada: **"Produção de Citocinas Antes e Após o Tratamento da Esquistossomose Mansônica Aguda Humana"**, e informou, que de acordo com o Regimento Interno do Curso, o candidato dispõe de até 50 (cinquenta) minutos para apresentação do trabalho e o tempo de arguição para cada examinador, juntamente com o tempo gasto pelo aluno para responder às perguntas será de 30 (trinta) minutos. A aluna procedeu a sua apresentação em 30 (trinta minutos). Após a defesa, o Sr. Presidente convidou os membros da Banca Examinadora para ocupar seus lugares, passando a palavra para a Profa. Valéria Pereira, em seguida para o Prof. Aníbal Vercesi, e finalmente para a Profa. Maria da Paz Carvalho da Silva. Concluídas suas arguições, agradeceram e cumprimentaram a mestranda e seus orientadores. Em seguida, a sessão foi suspensa para o julgamento pela Banca Examinadora, que se reuniu na sala de reuniões. Após alguns comentários, a Banca decidiu, por unanimidade, conceder a menção **"Aprovada com Distinção"**. Nada mais havendo a tratar, lavrei a presente ata que vai assinada por mim, Secretário, e demais membros presentes. Recife, 24 de fevereiro de 2005.

Joelma Rodrigues de Souza
Valéria Rego Alves Pereira
Aníbal Eugenio Vercesi
Maria da Paz Carvalho da Silva

A PRESENTE CÓPIA CONFERE
COM O DOCUMENTO ORIGINAL.

RECIFE, 11, 04, 2005

Djalma Gomes da Silva
Djalma Gomes da Silva
Assessor da Coordenação do Curso de
Mestrado em Bioquímica / CCB / UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**AUTORIZAÇÃO DE PUBLICAÇÃO ELETRÔNICA DE TESE / DISSERTAÇÃO PARA
FINS EXCLUSIVAMENTE ACADÊMICOS**

Eu, **JOELMA RODRIGUES DE SOUZA**

portador do RG nº, 5063846 emitido por SSP - PE em 10-09-1993

CPF nº 02871020418 residente à RUA PROFESSORA LOURDES DUTRA Nº 88 ARRUDA

**autor da tese ou dissertação "PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTES E APÓS O
TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA AGUDA HUMANA"**

defendida no programa de pós-graduação em BIOQUÍMICA

em 24 DE FEVEREIRO DE 2005

de acordo com a lei de direito autoral número 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, capítulo III,
artigo 29, que trata dos direitos patrimoniais do autor e de sua duração, autorizo a publicação
da obra em formato digital no "Líber" Banco de teses da Universidade Federal de Pernambuco
exclusivamente para fins acadêmicos na modalidade de texto ☐ *completo*, ☐ *com restrições*
☒ *só o resumo.*

Recife, 14 de ABRIL de 2005

Autor

TELEFONE, E-MAIL

(81) 3443-4016, joelmasz@yahoo.com.br



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
BIBLIOTECA CENTRAL**

RECIBO

Recebemos 02 (dois) exemplares da tese, abaixo referenciada, para o acervo Da Coleção Especial da Biblioteca Central, conforme determina a Resolução nO10/85, de 27/09/85, do Conselho Coordenador de Ensino Pesquisa e Extensão.

Autor: JOELMA RODRIGUES DE SOUZA

Título: "PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA AGUDA HUMANA"

Centro: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB

Mestrado: BIOQUÍMICA

Doutorado: -

Data da Defesa: 24 DE FEVEREIRO DE 2005

Defina os assuntos contidos na sua tese: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE NA FASE AGUDA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA AGUDA HUMANA ATRAVÉS DA DOSAGEM DAS CITOCINAS IFN- γ E IL-4 E DOS ANTICORPOS IgE ANTES E APÓS 6 MESES DE TRATAMENTO COM OXAMNIQUINE

ENDEREÇO, TELEFONE e EMAIL

RUA PROFESSORA LOURDES DUTRA Nº 88 ARRUDA, (81) 3443-4016,
joelmasz@yahoo.com.br

Assinatura do Autor

Serviço de Documentação BC/UFPE