

# ESTUDO IMUNOLÓGICO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI INTESTINAL ANTES E APÓS TRATAMENTO COM AMINONITROTIAZOL \*

Lucyr Jones Antunes \*\*, Dirceu Wagner Carvalho de Souza \*\*\*, Maria Suzana de Lemos Souza \*\*\*\*, Regina Maria de Marco Turchetti \*\*\*\*\* , João Paulo Mendes de Oliveira \*\*\*, Roberto Pedercini Marinho \*\*\*\*\* e Ana Zélia Almendra Correia Lima \*\*\*\*\*

*Foram dosadas as imunoglobulinas e realizados testes cutâneos para se avaliar o sistema imunológico de pacientes portadores da forma intestinal da esquistossomose mansoni. Estes testes foram realizados antes do tratamento com aminonitrotiazol e após trinta, sessenta e noventa dias do tratamento.*

*Antes do tratamento o nível de IgG ( $1893 \pm 472$  mg%) apresentava-se elevado, mas os níveis de IgA ( $186 \pm 74$  mg%) e de IgM ( $91 \pm 26$  mg%) achavam-se normais. Decorridos trinta, sessenta e noventa dias do tratamento, o nível de IgG diminuiu, observando-se ligeira elevação de IgA bem como de IgM.*

*Os pacientes, antes do tratamento, quando testados com schistosomina e anti IgE apresentaram áreas de  $1,22 \pm 0,36$  cm<sup>2</sup> e  $1,04 \pm 0,25$  cm<sup>2</sup>, respectivamente. Noventa dias após o tratamento, as reações à schistosomina e ao soro anti IgE produziram reações com áreas ainda maiores.*

*Os testes de hipersensibilidade retardada mostraram que 35% dos pacientes reagiram à schistosomina e 71% ao 2-4 dinitrofluorobenzeno.*

## INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni apresenta aspectos clínicos e laboratoriais diferentes de acordo com as fases e formas evolutivas da doença (4).

Em trabalhos anteriores, Antunes & col. (1) e Hillyer (5) estudaram a concentração das imunoglobulinas no soro de pacientes portadores de diversas formas clínicas da

esquistossomose mansoni, mostrando existir um aumento, estatisticamente significativo, das imunoglobulinas IgG e IgM, quando os resultados das fases aguda e crônica foram comparados.

No presente trabalho estudou-se o estado imunitário de pacientes com a forma intestinal da esquistossomose mansoni e as alterações sobre o mecanismo imunológico destes pacientes, após o tratamento com o

\* Trabalho realizado nas Disciplinas de Doenças Infecciosas e Parasitárias e de Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

\*\* Professor Assistente do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

\*\*\* Auxiliar de Ensino do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

\*\*\*\* Auxiliar de Ensino do Departamento de Medicina Preventiva e Social da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

\*\*\*\*\* Estagiário-Acadêmico na Disciplina de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

\*\*\*\*\* Professor Assistente do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

aminonitrotiazol, fazendo-se comparação das respostas observadas nos pacientes que se curaram e nos que se mostraram resistentes à terapêutica instituída.

#### MATERIAL E MÉTODOS

**Seleção dos doentes:** Foram selecionados 34 pacientes com a forma intestinal da esquistossomose mansoni.

**Grupo controle:** Constituído por 20 pessoas adultas não portadoras da helmintíase.

**Dosagem das imunoglobulinas:** Foi utilizado o método da difusão reversa, descrito por Antunes & col. (1, 2).

**Schistosomina:** Obtida pela homogeneização de 500mg de vermes liofilizados e pela extração dos antígenos com NaCl 0,15M. A suspensão obtida, depois de desintegrada pelo ultra-som, foi centrifugada a 10.000 r.p.m., a 4°C. Padronizou-se o sobrenadante para conter 40 µg/ml. Ao extrato final juntou-se 0,01% de mertiolato.

**Anti IgE:** Utilizou-se de soro inativado de cabra imunizada com IgE humana, diluído a 1:320, conforme padronização descrita em trabalho de Antunes e Turchetti (3).

**2-4-dinitrofluorobenzeno (DNFB, Eastman Kodack):** Foram preparadas duas soluções em acetona nas concentrações de 10% e 0,2%.

**Reações intradérmicas:** Realizadas na face anterior do antebraço direito com 0,1ml de schistosomina, e na do antebraço esquerdo com 0,1ml de anti IgE, segundo técnica descrita por Antunes & Turchetti. O contorno das áreas das pápulas foi delimitado e medido após 15 minutos, utilizando-se uma tela com retículos de 0,05cm<sup>2</sup> de área.

**Sensibilidade cutânea:** Procedendo-se à aplicação de 0,2ml da solução de DNFB, a 10%, na região do punho direito e reaplicação, 30 dias após, de igual volume de DNFB, a 0,2%, na região do punho esquerdo. Foram considerados como reatôgenos ao DNFB todos os pacientes que apresentaram, 24 a 48 horas após a segunda aplicação, reação eritematosa ou vesiculosa no local da aplicação.

**Exame parasitológico das fezes:** Foi utilizado o método de Hoffman, Pons & Janer.

**Tratamento específico:** O aminonitrotiazol foi administrado por via oral, na dose diária de 20mg/kg de peso corporal,

em duas tomadas (após o jejum e após o jantar), durante 10 dias consecutivos, prescrevendo-se, como coadjuvante, repouso absoluto e diazepam.

**Crêterios para avaliação da eficácia terapêutica:** Foram procedidas consultas mensais durante um período de seis meses, seguintes ao tratamento, nos quais se procurava obviar a cura clínica e, ainda, constatar a cura parasitológica. A cada consulta foi investigada a possibilidade de novas infecções cercarianas. Mensalmente, foram executados exames parasitológicos das fezes e hemograma de cada paciente. Nos 3 meses seguintes ao tratamento, foram feitos sorologia e testes cutâneos. Cinco meses após o tratamento, os pacientes foram submetidos à biópsia retal, realizando-se oogramas quantitativos.

#### RESULTADOS

Verificou-se cura em 14 pacientes, enquanto que em 5 constatou-se insucesso terapêutico; quinze pacientes foram eliminados, ou por terem se exposto a novos contatos com águas naturais suspeitas, ou por terem faltado a alguma etapa programada para o controle após o tratamento.

Os níveis de imunoglobulinas encontrados nos 14 pacientes curados estão registrados na Tabela I. Para os cinco pacientes que não se curaram, foram anotados os valores constantes na Tabela II.

Os testes intradérmicos de reação imediata, feitos nos pacientes curados, mostraram os resultados observados na Tabela III. Nos não curados, os referidos testes resultaram nos valores constantes da Tabela IV.

O grupo considerado normal quando testado por via intradérmica com schistosomina e anti IgE, mostrou reações com áreas de  $0,5 \pm 0,2$  cm<sup>2</sup> e  $0,81 \pm 0,32$  cm<sup>2</sup>, respectivamente.

As reações de hipersensibilidade retardada à schistosomina e ao DNFB, nos pacientes curados, foram positivadas em 35% e 71%, respectivamente, sendo que, nos indivíduos normais, a hipersensibilidade ao DNFB mostrou-se positiva em 85%, não havendo reação positiva de hipersensibilidade à schistosomina.

Nos pacientes que não se curaram a positividade das reações de hipersensibilidade retardada à schistosomina e ao DNFB, foi de 20% e 60%, respectivamente.

## DISCUSSÃO

Na Tabela I estão registrados os níveis de imunoglobinas, observados nos 19 pacientes tratados com aminonitrotiazol e que se apresentaram para os controles periódicos, programados dentro do período de 180 dias subsequentes ao tratamento. Consideraram-se dois grupos: PC = 14 pacientes curados e IT = 5 pacientes em que ocorreu insucesso terapêutico.

Antes do tratamento, os grupos PC e IT apresentavam níveis elevados de IgE estatisticamente significativos, quando comparados com os valores dos indivíduos normais (Tabela II).

Após o tratamento houve diminuição do teor de IgG em ambos os grupos, mas seu valor, após 60 dias, já se encontrava dentro dos limites normais.

O nível de IgA nos grupos PC e IT encontrava-se abaixo dos valores normais, mas sem significado estatístico. Após o tratamento, o nível de IgA acusou um aumento gradual até o 60º dia, elevação que bem poderia ser devida à destruição dos vermes no sistema porta e nos vasos mesentéricos, com libertação de novos estímulos antigênicos em áreas ricas de células produtoras de IgA. O nível de IgM, tanto nos indivíduos que se curaram quanto nos que não se curaram, apresentava-se elevado após o tratamento, fato que poderia, também, ser devido à formação de novos antígenos, a partir dos vermes lesados, com resposta imunológica do tipo reforço (*booster*).

Os testes intradérmicos com schistosomina, antes do tratamento, apresentavam áreas médias com  $1,22 \pm 0,36 \text{ cm}^2$  e  $0,94 \pm 0,07 \text{ cm}^2$ , respectivamente nos indivíduos curados e não curados. Estas reações acusaram ligeiro aumento nos dois grupos, mostrando, 90 dias após o início do tratamento, valores médios de  $1,42 \pm 0,64 \text{ cm}^2$  e  $1,32 \pm 0,32 \text{ cm}^2$ , respectivamente nos indivíduos curados e não curados (Tabelas III e IV).

Este aumento de reatividade à schistosomina seria uma evidência a favor da formação de novos antígenos, oriundos da lesão dos vermes pelo agente quimioterápico.

A reação de hipersensibilidade reversa, descrita por Ishizaka & Ishizaka (6) e utilizada como um teste semiquantitativo pa-

ra a medida da quantidade de IgE na pele, mostrou resultados com área de  $1,04 \pm 0,25 \text{ cm}^2$  e  $1,08 \pm 0,67 \text{ cm}^2$ , antes do tratamento, nos pacientes que se curaram e naqueles que não se curaram. Estes valores são um pouco superiores aos encontrados por Antunes & col. (3),  $0,81 \pm 0,28 \text{ cm}^2$  na população normal de Belo Horizonte, MG. O valor de IgE elevou-se, em ambos os grupos de pacientes, a partir do 30º dia após o tratamento, mantendo-se elevado até 90 dias após (Tabelas III e IV). Referidos dados mostram um aumento de IgE fixado à pele, confirmando os resultados da reação com a schistosomina, de ser a IgE o anticorpo responsável pela reação imediata nos testes cutâneos.

Considerando-se o tempo de 48-72 horas para leitura da reação de hipersensibilidade retardada à schistosomina, verificou-se positividade em 35% dos pacientes que se curaram (Tabela III). Tais resultados estão próximos aos encontrados por Pellegrino e Memória (8) e por Wolfson e col. (9), que registraram 25% de reações positivas.

Procurou-se comparar, também, a capacidade sensibilizadora do DNFB em pacientes com esquistosomose mansoni e em pessoas normais. Conseguiu-se induzir sensibilização ao DNFB em 71% dos pacientes que se curaram e em 60% dos que não obtiveram cura. Kligman e Epstein (7) conseguiram provocar essa sensibilização em 85% a 95% da população normal, o que corresponde aos dados que se observam em nossa população.

O presente estudo demonstrou que a resposta imunológica do tipo retardado encontra-se de certo modo deprimida, sendo esta depressão maior nos pacientes que não se curaram. Estes dados reforçam a idéia de que os estados de hipersensibilidade humoral e celular, dos pacientes com esquistosomose crônica, sejam fatores importantes na cura da parasitose. Dentro desse raciocínio, os vermes, lesados pelos agentes quimioterápicos, seriam completamente destruídos pela intervenção do mecanismo imunológico, responsável pela defesa do hospedeiro. Ter-se-ia, assim, uma possível explicação porque os agentes quimioterápicos não curam 100% dos pacientes.

Os Autores estão concluindo investigação em torno dos mesmos processos imunitários, face ao comportamento decorrente

TABELA I — Níveis das imunoglobulinas observados em pacientes com esquistossomose mansoni intestinal, antes e após a cura obtida com tratamento pelo aminotriazol

IMUNOGLOBULINAS (em mg%)	TRATAMENTO			
	Antes	Depois		
		30 dias	60 dias	90 dias
IgG	1893 ± 472	1639 ± 429	1255 ± 577	1266 ± 389
IgA	186 ± 74	146 ± 55	258 ± 130	270 ± 98
IgM	91 ± 26	92 ± 26	108 ± 33	111 ± 31

TABELA II — Níveis das imunoglobulinas observados em pacientes com esquistossomose mansoni intestinal, antes e após o inucesso terapêutico verificado com o uso de aminotriazol

IMUNOGLOBULINAS (em mg%)	TRATAMENTO			
	Antes	Depois		
		30 dias	60 dias	90 dias
IgG	2070 ± 551	1300 ± 243	1018 ± 69	1249 ± 434
IgA	168 ± 67	178 ± 130	211 ± 115	318 ± 65
IgM	105 ± 19	76 ± 23	142 ± 72	102 ± 44

TABELA III — Resultados dos testes intradérmicos, de reação imediata, observados em pacientes com esquistossomose mansoni intestinal, antes e após a cura obtida com tratamento pelo aminotriazol

TESTES IN- TRATÉRMICOS (em cm <sup>2</sup> )	TRATAMENTO			
	Antes	Depois		
		30 dias	60 dias	90 dias
Schistosomina	1,22 ± 0,36	1,23 ± 0,44	1,77 ± 0,42	1,42 ± 0,64
Anti IgE	1,04 ± 0,25	1,16 ± 0,37	1,08 ± 0,31	1,15 ± 0,32

TABELA IV — Resultados dos testes intradérmicos, de reação imediata, observados em pacientes com esquistossomose mansoni intestinal, antes e após o inucesso terapêutico verificado com o uso de aminotriazol

TESTES IN- TRATÉRMICOS (em cm <sup>2</sup> )	TRATAMENTO			
	Antes	Depois		
		30 dias	60 dias	90 dias
Schistosomina	0,94 ± 0,07	1,28 ± 0,46	1,28 ± 0,46	1,32 ± 0,32
Anti IgE	1,08 ± 0,67	1,14 ± 0,32	1,14 ± 0,32	1,32 ± 0,32

do uso de outro quimioterápico disponível para o tratamento da helmintíase. Já iniciaram, também, outros trabalhos visando à análise do mecanismo íntimo da respos-

ta imunológica, em pacientes portadores da forma hepatoesplênica e naqueles que se encontrem na fase inicial da esquistossomose mansoni.

#### SUMMARY

The amount of immunoglobulins serum and the cutaneous sensitivity to specific antigen in 19 patients with intestinal schistosomiasis were determined, as an attempt to study the incidence of delayed and immediate type of hypersensitivity. The tests were performed before and thirty, sixty and ninety days after treatment with aminonitroiazol.

The immunoglobulin levels before treatment were found to be  $1,893 \pm 472$ ,  $186 \pm 74$  and  $91 \pm 26$  mg%, respectively for IgG, IgA and IgM; ninety days after treatment the level for IgG became normal ( $1,266 \pm 389$  mg%) and a slight increase of IgA ( $270 \pm 89$  mg%) and IgM ( $111 \pm 31$  mg%) was observed.

The patients were intradermally tested with schistosomin and with anti IgE serum. The tests before treatment gave the following results:  $1.22 \pm 0.36$  cm<sup>2</sup> for schistosomin and  $1.04 \pm 0.25$  cm<sup>2</sup> for anti IgE. Ninety days afterwards a slight increase of the reactions was observed and the results respectively were  $1.42 \pm 0.65$  cm<sup>2</sup> and  $1.15 \pm 0.32$  cm<sup>2</sup>.

The studies for delayed hypersensitivity indicated that 35% of patients showed an area of induration larger than 0.5 cm<sup>2</sup>, 48 hours after the intradermal injection with schistosomin, and 71% developed positive reaction when challenged with dinitrofluorobenzene.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANTUNES, L. J.; REIS, A. P.; PELEGRINO, J.; TAVARES, C. A. P. & KATZ, N. — Immunoglobulins in human schistosomiasis. *J. Parasit.*, 57: 539-542, 1971.
2. ANTUNES, L. J.; REIS, A. P.; TAVARES, C. A. P. & PELEGRINO, J. — Doçagem das imunoglobulinas e reação de hemaglutinação passiva em pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 14: 203-206, 1972
3. ANTUNES, L. J. & TURCHETTI, R. M. M. — Reverse hypersensitivity reagent A semiquantitation of IgE level in normal subjects and in patients with allergy to house dust. *Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol.*, São Paulo, 5: 212-213, 1973
4. CUNHA, A. S. — *Esquistossomose Mansonii*. Sarvier. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1970.
5. HILLYER, G. — Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections. *Exper. Parasit.* 25: 37-381, 1969.
6. ISHIZAKA, K. & ISHIZAKA, T. — Reversed type allergic skin reactions by anti IgE globulins antibodies in human and monkeys. *J. Immunol.* 100: 554-562, 1968.
7. KLIGMAN, A. M. & EPSTEIN, W. L. — Some factors affecting contact sensitization in man. Mechanism of hypersensitivity. In J. H. Schaffer, G. A. Lo Grippo, M. W. Chase. Boston, Little, Brown & Company, 1959.
8. PELEGRINO, J. & MEMORIA, J. M. P. — The skin test in schistosomiasis mansoni. V. Delayed type of cutaneous response. *Rev. Inst. Med. trop.*, São Paulo, 2: 265-267, 1960
9. WOLFSON, R. L.; HORNER, D. W. & KAGEN, I. G. — Delayed skin sensitivity in schistosomiasis. *J. Parasitol.* 55: 1174-1179, 1969.