



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM IMUNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE IN VITRO
INDUZIDA POR ANTÍGENOS DE SCHISTOSOMA
MANSONI EM INDIVÍDUOS ASMÁTICOS**

LUCIANA SANTOS CARDOSO

Salvador – BA

2005

Luciana Santos Cardoso

**Avaliação da Resposta Imune *in vitro* Induzida por
Antígenos de *Schistosoma mansoni* em
Indivíduos Asmáticos**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós graduação
em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde,
Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Imunologia.**

Professora Orientadora: Maria Ilma Andrade Santos Araujo

Salvador – Bahia

2005

Ficha catalográfica
Universidade Federal da Bahia - Faculdade de Medicina - Biblioteca

C268 Cardoso, Luciana Santos.
Avaliação da resposta imune in vitro induzida por antígeno de Schistosoma mansoni em indivíduos asmáticos. / Luciana Santos Cardoso. – Salvador, 2006.
118 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Maria Ilma Andrade Santos Araújo.
Dissertação (Mestre em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

1. Schistosoma mansoni . 2. Asma. 3. IL-10. 4. Antígenos.
Universidade Federal da Bahia II. Título.

CDU: 616.995.122:616.248(043.3)

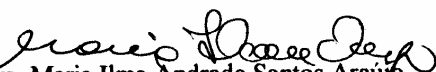


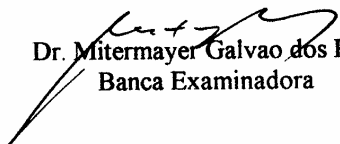
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

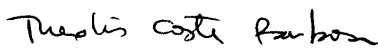


ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA
ALUNA LUCIANA SANTOS CARDOSO

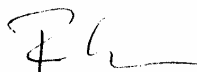
Aos seis dias do mês de dezembro do ano de dois mil e cinco, às 10:00 horas, no auditório III no segundo andar do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reúne-se a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. **Maria Ilma Andrade Santos Araújo** Orientadora, Dra. **Theolis Costa Barbosa**, Dr. **Mitermayer Galvao dos Reis**, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Dissertação intitulado: **Avaliação da Resposta Imune in vitro induzida por antígenos de *schistosoma mansoni* em indivíduos asmáticos.** da pós-graduanda **LUCIANA SANTOS CARDOSO**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelas examinadoras. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a pós-graduanda teve a sua defesa de Dissertação de Mestrado APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelas componentes da Banca examinadora, pela Mestranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, 06 de dezembro de 2005.


Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo
Orientadora


Dr. Mitermayer Galvao dos Reis
Banca Examinadora


Dra. Theolis Costa Barbosa
Banca Examinadora


Luciana Santos Cardoso
Mestranda


Dr. Roberto Meyer Nascimento
Coordenador do PPGIIm

*Dedico este trabalho a minha família pelo apoio e
compreensão ilimitados
E em particular a Professora Maria Ilma Araujo,
exemplo maior de simplicidade, serenidade
e sabedoria*

AGRADECIMENTOS

A Deus,

A Profa. Maria Ilma Araujo, orientadora do meu trabalho, pela dedicação, paciência e pelos ensinamentos a mim transmitidos,

Ao Dr. Edgar Carvalho pela sabedoria e exemplo com que conduz o grupo,

Ao Dr. Sérgio Costa Oliveira e Dr. Alfredo Miranda Góes pelo apoio tão importantes no desenvolvimento deste trabalho,

A todos os participantes do nosso Grupo de Helminthíases e Alergia, principalmente Ricardo, Profa. Leda, Cecília, Régis, Carol, Eduardo e a Charlton Cley Barros Castro, pelo auxílio direto na realização deste trabalho,

Ao Grupo do Serviço de Imunologia, especialmente Olívia, Márcia, Andréa, Silvane, Albert, Glória, Elbe, Lúcia e Dilma, pela disponibilidade e carinho com que sempre me receberam,

Ao Grupo do Dr. Sérgio Oliveira da UFMG, Cristina, Fernanda, Lucimara, Michele e especialmente Lucila, por terem me recebido tão bem e me ajudado bastante,

Aos professores e colegas Curso de Pós-Graduação em Imunologia pelo crescimento ao longo desta caminhada,

A Dilcéia, pela paciência e disponibilidade, sempre tão presentes,

A Bibliotecária Delba Barros Rosa, pela elaboração da Ficha Catalográfica,

Aos Indivíduos participantes das pesquisas,

A minha família, pela energia e confiança a mim transmitidas.

“Só o conhecimento traz o poder.”

Freud

ÍNDICE

| | |
|--|------|
| Lista de figuras | ix |
| Lista de tabelas | xii |
| Lista de tabelas | xii |
| Lista de siglas, abreviaturas e símbolos | xiii |
| Resumo | xiv |
| Abstract | xvi |
| 1. Introdução | 1 |
| 2. Revisão de literatura..... | 5 |
| 2.1 Resposta imune na atopia e na asma | 5 |
| 2.2 Resposta imune na infecção pelo <i>Schistosoma mansoni</i> | 10 |
| 2.3 Antígenos candidatos à vacina para esquistossomose | 13 |
| 2.4 A infecção por helmintos e alergia | 17 |
| 2.5 Participação da IL-10 na resposta imune nas infecções por helmintos e na alergia | 19 |
| 3. Objetivos | 23 |
| 3.1 Objetivo geral | 23 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 23 |
| 4. Metodologia | 24 |
| 4.1 Seleção dos indivíduos | 24 |
| 4.2 Desenho do estudo e cálculo amostral..... | 25 |
| 4.3 Critérios de inclusão | 26 |

| | |
|---|----|
| 4.4 Critérios de exclusão | 27 |
| 4.5 Antígenos de <i>S. mansoni</i> usados no estudo..... | 28 |
| 4.5.1 Produção do antígeno purificado PIII a partir do SWAP | 28 |
| 4.5.2 Expressão e purificação da proteína recombinante Sm22.6..... | 28 |
| 4.5.3 Expressão e purificação da proteína recombinante Sm14 | 30 |
| 4.5.4 Expressão e purificação da proteína recombinante P24 | 31 |
| 4.5.5 Expressão e purificação da proteína recombinante Sm29 | 32 |
| 4.5.6 Obtenção do Antígeno Solúvel do Verme Adulto (SWAP) e do Antígeno Solúvel do Ovo (SEA) | 34 |
| 4.6 Avaliação laboratorial e clínica dos indivíduos recrutados nos grupos | 35 |
| 4.6.1 Exame parasitológico de fezes..... | 35 |
| 4.6.2 Avaliação da resposta imune celular | 35 |
| 4.7 Análise dos dados..... | 37 |
| 5. Considerações éticas | 38 |
| 6. Resultados..... | 39 |
| 6.1 Concentrações de LPS encontradas nos antígenos de <i>Schistosoma mansoni</i> avliados no estudo..... | 40 |
| 6.2 Produção de IL-10 por CMSP de indivíduos asmáticos infectados e não infectados pelo <i>S. mansoni</i> e infectados não asmáticos estimuladas pelo LPS | 41 |
| 6.3 Neutralização dos efeitos do LPS nas culturas estimuladas com os antígenos recombinantes pelo uso da Polimixina B..... | 42 |
| 6.2 Produção de Interleucina-10 por CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo <i>S. mansoni</i> | 47 |

| | | |
|-----|--|----|
| 6.3 | Produção de interleucina-10 por CMSP de indivíduos asmáticos cronicamente infectados pelo <i>S. mansoni</i> | 50 |
| 6.4 | Produção de interleucina 10 por CMSP de asmáticos não infectados pelo <i>S. mansoni</i> | 53 |
| 6.5 | Cinética da produção de IL-10 por CMSP nos grupos estudados..... | 56 |
| 6.6 | Produção de Interferon- γ , Interleucina-5 e Interleucina-13 por CMSP estimuladas com os antígenos de <i>S. mansoni</i> | 58 |
| 6.7 | Efeito da adição de antígenos de <i>S. mansoni</i> sobre a produção de IL-10 induzida pelo Der p1 | 61 |
| 7. | Discussão | 63 |
| 8. | Sumário dos resultados..... | 71 |
| 9. | Conclusões..... | 71 |
| 10. | Perspectivas de estudo | 72 |
| 11. | Referências bibliográficas | 73 |
| 12. | Anexos | 90 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Concentrações de IL-10 produzidas por CMSP de indivíduos asmáticos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* e infectados não asmáticos, estimuladas pelo LPS em culturas de 48 horas. Teste de Kruskal-Wallis).41
- Figura 2A.** Efeito da adição de Sulfato de Polimixina B (PMB) (30µg/mL) em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* na produção de TNF induzida pela estimulação com o LPS (0,15 ng/mL).....43
- Figura 2B.** Efeito da adição de PMB (30µg/mL) em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* na produção de IL-10 induzida pela estimulação com o LPS (0,15 ng/mL).43
- Figura 3A.** Produção de TNF e IL-10 em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimulados *in vitro* com o antígeno recombinante de *S. mansoni* Sm22.6 (10 µg/mL). Os dados referem-se a produção desta citocina na ausência ou presença de Sulfato de Polimixina B (30 µg/mL) em culturas de 6, 12, 24 e 48 horas.45
- Figura 3B.** Produção de TNF e IL-10 em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimulados *in vitro* com o antígeno recombinante de *S. mansoni* Sm14 (10 µg/mL). Os dados referem-se a produção desta citocina na ausência ou presença de Sulfato de Polimixina B (30 µg/mL) em culturas de 6, 12, 24 e 48 horas.45
- Figura 3C.** Produção de TNF e IL-10 em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimulados *in vitro* com o antígeno recombinante de *S. mansoni* P24 (10 µg/mL). Os dados referem-se a produção desta

| | |
|---|----|
| citocina na ausência ou presença de Sulfato de Polimixina B (30 µg/mL) em culturas de 6, 12, 24 e 48 horas. | 46 |
| Figuras 4A, B e C. Níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos cronicamente infectados pelo <i>S. mansoni</i> estimuladas <i>in vitro</i> com os antígenos de <i>S. mansoni</i> em culturas de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (A IL-10 foi dosada em sobrenadante de culturas utilizando-se a técnica de ELISA sanduíche). As concentrações são expressas em pg/mL e os resultados em médias ± desvio padrão. | 49 |
| Figuras 5A, B e C. Níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos cronicamente infectados pelo <i>S. mansoni</i> estimuladas <i>in vitro</i> com os antígenos de <i>S. mansoni</i> em culturas de 24, 48 e 72 horas, repectivamente. | 52 |
| Figuras 6A, B e C. Níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos não infectados pelo <i>S. mansoni</i> estimuladas <i>in vitro</i> com os antígenos de <i>S. mansoni</i> em culturas de 24 horas | 55 |
| Figura 7A. Cinética de produção de IL-10 por células de indivíduos cronicamente infectados pelo <i>S. mansoni</i> estimulados <i>in vitro</i> com os antígenos de <i>S. mansoni</i> avaliados neste estudo..... | 56 |
| Figura 7B. Cinética de produção de IL-10 por células de indivíduos asmáticos cronicamente infectados pelo <i>S. mansoni</i> estimulados <i>in vitro</i> com os antígenos de <i>S. mansoni</i> avaliados neste estudo..... | 57 |
| Figura 7C. Cinética de produção de IL-10 por células de indivíduos asmáticos não infectados pelo <i>S. mansoni</i> estimulados <i>in vitro</i> com os antígenos de <i>S. mansoni</i> avaliados neste estudo..... | 57 |

- Figura 8A, B e C.** Níveis de IFN- γ (pg/mL) produzidos por CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, asmáticos ou não e asmáticos não infectados, respectivamente, estimuladas *in vitro* com os antígenos de *S. mansoni* em culturas de 72 horas (n=9).59
- Figura 9.** Níveis de IL-13 (pg/mL) produzidos por CMSP de indivíduos asmáticos não infectados pelo *S. mansoni* estimuladas *in vitro* com os antígenos PIII, Sm22.6 e P24 de *S. mansoni* em culturas de 72 horas (n=7; Teste de Kruskal-Wallis).....60
- Figura 10A, B e C.** Níveis de IL-10 em culturas de CMSP de asmáticos não infectados estimuladas com Der p1 na presença ou ausência dos antígenos PIII, Sm22.6 e P24, respectivamente. Culturas de 48 horas, n=7; p<0,05; Teste pareado de Wilcoxon.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas e intensidade de infecção dos indivíduos infectados com *S. mansoni* e asmáticos não infectados.39

Tabela 2. Concentrações de LPS nos antígenos recombinantes P24, Sm14, Sm22.6, Sm29 e na proteína PIII do *S. mansoni*. A tabela mostra as concentrações de LPS, em Unidades de Endotoxina/mL (EU/mL) e os valores correspondentes em nanogramas/mL (ng/mL).....40

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------|--|
| BSA | Fração V de albumina bovina |
| CD | Molécula de superfície celular (“clusters of differentiation”) |
| CD14 | Marcador de superfície de monócitos/macrófagos |
| CMSP | Células mononucleares do sangue periférico |
| Der p 1 | Alérgeno 1 de <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> |
| ELISA | Do inglês “Enzyme Like Immunosorbent Assay” |
| FPLC | Do inglês “Fast Protein Liquid Chromatography” |
| IFN- γ | Interferon-gama |
| Ig | Imunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| IPTG | Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| LB | Lúria-Bertani |
| LBP | Proteína Ligadora de LPS |
| MyD | Marcador de Diferenciação Mielóide |
| PAMPs | Padrão Molecular Associado aos Patógenos |
| PBS | Tampão fosfato-salina |
| PMB | Polimixina B |
| SEA | Antígeno Solúvel do Ovo do <i>S. mansoni</i> |
| SWAP | Antígeno Solúvel do Verme Adulto do <i>S. mansoni</i> |
| Th | T auxiliador (“helper”) |
| TLR | Do inglês “Toll-like receptor” |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| VLA | Do inglês “very late antigen” |

RESUMO

Estudos vêm demonstrando diminuição da reatividade aos testes cutâneos para alérgenos e menor gravidade da asma em indivíduos infectados por helmintos, principalmente *Schistosoma mansoni*. A inibição da resposta inflamatória na asma em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* parece ser mediada pela IL-10, desde que tem sido observada maior produção desta citocina por células de asmáticos infectados pelo *S. mansoni* estimuladas com o antígeno 1 do *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1) quando comparado a asmáticos não infectados. A IL-10 é capaz de inibir a produção de citocinas do tipo Th2 e a degranulação de mastócitos e liberação de mediadores inflamatórios, fatores envolvidos na patogênese das doenças alérgicas. O principal objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade dos antígenos de *S. mansoni* Sm22.6, Sm14, PIII, P24 e Sm29 de estimular a produção de IL-10 *in vitro*, por células mononucleares de sangue periférico de asmáticos infectados e não infectados pelo *S. mansoni*. Foram também avaliadas as produções de IL-5, IL-13 e IFN- γ . Foi adicionado Sulfato de Polimixina B às culturas estimuladas com os antígenos recombinantes para bloquear a ação da endotoxina em induzir a síntese de citocinas, desde que as proteínas recombinantes foram clonadas em *Escherichia coli*. As concentrações das citocinas foram medidas nos sobrenadantes das culturas de células utilizando-se a técnica ELISA sanduiche. Foi demonstrado que todos os antígenos de *S. mansoni* avaliados neste estudo induziram a produção de IL-10 por células de indivíduos infectados e de asmáticos não infectados. Nas culturas de 24 horas de células de asmáticos não infectados, os antígenos P24 e Sm 29 induziram as mais altas concentrações de IL-10 (828 ± 415 pg/mL e 891 ± 213 pg/mL,

respectivamente). Em todos os grupos avaliados e para todos os antígenos usados, foi baixa a produção de IFN- γ (valores em torno de 100 pg/mL) e os níveis de IL-5 foram abaixo do limite de detecção (15,6 pg/mL). A produção de IL-13 induzida pelos antígenos Sm22.6, P24 e PIII foi avaliada no grupo de asmáticos não infectados, e foram observadas concentrações de 68 ± 60 pg/mL, 55 ± 49 pg/mL e 81 ± 67 pg/mL, para os respectivos antígenos. A adição dos antígenos de *S. mansoni* Sm22.6, P24 e PIII às culturas de asmáticos não infectados estimuladas com o Der p1 resultou em aumento na produção de IL-10. O fato dos antígenos de *S. mansoni* avaliados neste estudo terem induzido a produção de IL-10 e baixas concentrações de IL-5, IL-13 e IFN- γ por células de asmáticos não infectados sugere que os mesmos pode ser futuramente utilizados como vacina para prevenir doenças alérgicas.

Palavras-chave: Asma, IL-10, PIII, P24, *S. mansoni*, Sm14, Sm22.6, Sm29.

ABSTRACT

Studies have shown an inhibition of skin prick test reaction to allergens and less severe asthma in asthmatics infected with helminths, mainly *Schistosoma mansoni*. The inhibition of the inflammatory response in asthma in individuals infected with *S. mansoni* seems to be mediated by IL-10, since it has been observed higher production of *Dermatophagoides pteronyssinus* antigen 1 (Der p1) driven IL-10 by cells from asthmatics infected with *S. mansoni* when compared to uninfected asthmatics. IL-10 is capable of inhibiting the production of Th2 cytokines and the release of inflammatory mediators by mast cells, factors involved in the pathogenesis of allergic diseases. The main objective of this study was to evaluate the capacity of the *S. mansoni* antigens rSm22.6, PIII, rP24, rSm14 and rSm29 to stimulate IL-10 production *in vitro* by peripheral bloods mononuclear cells of asthmatics infected or not with *S. mansoni*. The production of IL-5, IL-13 and IFN- γ was also evaluated. The antigens used in this study are recombinant cloned in *E. coli*, therefore Polimixin B was used in the cell cultures to block the endotoxin-stimulated cytokine production. Cytokines were measured in the supernatants of cultures using ELISA sandwich method. It was demonstrated that all of the *S. mansoni* antigens used in this study induced IL-10 production in cells of infected individuals and in uninfected asthmatics. In 24 hours cell cultures of uninfected asthmatics the antigens P24 and Sm29 induced the highest levels of IL-10 (828 ± 415 pg/mL and 891 ± 213 pg/mL, respectively). In all groups evaluated and for all antigens the production of IFN- γ (values around 100 pg/mL) and the levels of IL-5 were below the detection limit (15,6 pg/mL). The production of IL-13 induced by Sm22.6, P24 and PIII were respectively, 68 ± 60 pg/mL, 55 ± 49 pg/mL and $81 \pm$

67 pg/mL. The addition of *S. mansoni* antigens Sm 22.6, P24 and PIII to the cell culture of uninfected asthmatics stimulated with Der p1 resulted in an increase in the levels of IL-10. The fact that *S. mansoni* antigens evaluated in this study induced the production of IL-10 and low levels of IL-5, IL-13 and IFN- γ by cells of uninfected asthmatic individuals suggests that these antigens can be used in the future as a vaccine to prevent allergic diseases.

Key words: Asthma, IL-10, PIII, P24, *S. mansoni*, Sm14, Sm22.6, Sm29.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente mais de 130 milhões de pessoas no mundo sofrem de asma e este número vem aumentando, principalmente nos países desenvolvidos (Sears 1997; Sears 1998). A asma é uma inflamação crônica das vias aéreas, cuja etiologia decorre da interação de fatores genéticos e ambientais. A patogênese da asma está relacionada com a produção de citocinas do tipo T auxiliador (“helper”) 2 (Th2) a exemplo da Interleucina (IL) -4, IL-5 e IL-13 que, dentre outras funções, são responsáveis pelo aumento na produção de IgE, eosinófilos, mastócitos e basófilos. A seqüência fisiopatológica da asma é iniciada pela ativação dos mastócitos em resposta a ligação do antígeno alergênico a IgE específica presente na superfície destas células. As citocinas produzidas pelos mastócitos induzem o recrutamento de basófilos, eosinófilos e células Th2, resultando em liberação de mediadores pró-inflamatórios, a exemplo das prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação das plaquetas (PAF) e histamina por estas células e consequente broncoconstricção com limitação do fluxo aéreo, edema e produção de muco, podendo ainda levar a um infiltrado de células inflamatórias e posteriormente ao dano tecidual, seguido de remodelamento das vias aéreas (Davies e cols. 2003).

Em recém nascidos a população de linfócitos T do cordão umbilical tem fenótipo Th2, semelhante ao observado em adultos atópicos. Nos primeiros meses de vida há uma mudança para o fenótipo Th1, semelhante ao de adultos não atópicos (Prescott e cols. 1998; Holt e cols. 1999). Supõe-se que haveria uma predisposição natural para o desenvolvimento de doenças alérgicas no homem. Estudos mostram que infecções pelo vírus A da hepatite, *Toxoplasma gondii* e

Helicobacter pylori reduzem em 60% o risco de atopia (Matricardi e cols. 2000), sugerindo que estímulos ambientais como infecções virais e bacterianas seriam responsáveis pelo equilíbrio imunológico, desviando o tipo de resposta para o pólo Th1 e prevenindo as doenças atópicas. Esta é a chamada “Hipótese da Higiene”, que sugere que o aumento da incidência de asma em países em desenvolvimento teria como causa a melhora das condições de saneamento, a redução das parasitoses, a diminuição da exposição a alérgenos e campanhas de vacinação em massa (Strachan 1989; Strachan 2000; Yazdanbakhsh e cols. 2002).

Uma vez que respostas polarizadas do tipo Th1 e Th2 relacionam-se com a patogênese de doenças de base imunológica, a prevenção destas doenças poderia advir de mecanismos regulatórios da resposta imune que promovessem o equilíbrio entre estas respostas.

Baseando-se no princípio de que a ausência de estímulo antigênico para o padrão de resposta Th1 resultaria na polarização da resposta para o tipo Th2 e conseqüente aumento na prevalência das doenças alérgicas, seria esperado que em países desenvolvidos onde é elevada a prevalência de alergia, houvesse uma baixa prevalência de doenças auto-imunes mediadas pela resposta do tipo Th1. Entretanto, estudos mostram que tem havido nestes países aumento na prevalência não apenas de doenças alérgicas, mas de doenças auto-imunes a exemplo da esclerose múltipla (Rosati e cols. 1988; Poser e cols. 1989), *Diabetes melitus* tipo I (EURODIAB ACE 2000) e a doença de Crohn (Elliott e cols. 2000). Estes dados de que doenças do “tipo Th1” podem ocorrer concomitantemente com as do “tipo Th2” vão de encontro à hipótese de que uma contra-regulação da

resposta imune, dirigindo-a para um dos pólos Th1 ou Th2, seja responsável pelo aumento da freqüência destas doenças.

Estudos recentes sugerem que o equilíbrio da resposta imune e prevenção das doenças de base imunológica decorre da indução de mecanismos regulatórios, a exemplo da geração de células T regulatórias, cuja modulação se processa diretamente, ou via produção de citocinas regulatórias como a IL-10 (Asano e cols. 1996; Francis e cols. 2003).

A exposição crônica a antígenos parasitários, particularmente do *Schistosoma*, pode levar ao desenvolvimento de mecanismos regulatórios e prevenção de doenças alérgicas (van den Biggelaar e cols. 2000; Araujo e cols. 2004; Yazdanbakhsh e cols. 2001) e auto-imunes (Fiorentino e cols. 1989; Del Prete e cols. 1993; Cooke e cols. 1999; La Flamme e cols. 2003).

Desta forma, a nossa hipótese é de que mecanismos reguladores, desenvolvidos durante a infecção crônica pelo *S. mansoni*, a exemplo da produção da IL-10, sejam capazes de modular a resposta a aeroalérgenos, prevenindo a reação de hipersensibilidade imediata e melhorando o curso clínico da asma.

O papel modulador da IL-10 é predominantemente enfatizado na resposta Th1, mas hoje sabe-se que esta citocina possui também a capacidade de modular a resposta do tipo Th2 (Fiorentino e cols. 1989; Del Prete e cols. 1993; Oh e cols. 2002; Araujo e cols. 2004) podendo, portanto, representar um dos mecanismos de modulação da resposta nas doenças alérgicas.

A hipótese de que indivíduos infectados por *S. mansoni* desenvolvem mecanismos regulatórios de resposta, no sentido de minimizar o dano tecidual provocado pelo parasita, merece ser avaliada pela possibilidade da identificação

de antígenos do parasita capazes de exercer esta modulação (Yazdanbaksh e cols. 2002).

Neste trabalho avaliamos as proteínas recombinantes do *S. mansoni*, Sm22.6, Sm14, P24, Sm29 e o antígeno PIII do verme adulto, quanto à capacidade de indução da síntese de IL-10 em asmáticos não infectados por helmintos.

A identificação de antígenos de *S. mansoni* com capacidade para modular a resposta imune inflamatória observada nas alergias poderá resultar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas destas doenças.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resposta imune na atopia e na asma

A atopia é o termo utilizado para descrever uma condição hereditária que predispõe o indivíduo a doenças alérgicas, a exemplo da asma, rinite e dermatite atópica (Sears e cols. 1997; Strachan e cols. 2000). O diagnóstico é feito pela positividade a pelo menos um alérgeno no teste cutâneo de hipersensibilidade imediata e pela presença, no soro ou plasma, de IgE específica (Kay 2000).

Dentre as doenças atópicas a asma é a que causa maior morbi-mortalidade (Pearce e cols. 2000). Ela é definida como uma doença inflamatória crônica caracterizada por hiperresponsividade (HR) brônquica e por limitação variável do fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento, manifestando-se clinicamente por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse (III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma 2002).

A prevalência mundial desta doença varia de 2,1% na Indonésia a 32,2%, na Inglaterra (ISAAC, 1998). No Brasil a prevalência de asma é de 23,3% e na cidade de Salvador é de 27%, onde é considerada a terceira causa de hospitalização pelo Sistema único de Saúde (III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma 2002).

A asma resulta da interação entre predisposição genética e fatores ambientais como a exposição a antígenos da poeira domiciliar, a exemplo de ácaros, fungos e baratas, além da exposição a poluentes, mudanças climáticas (frio), fumos, exercício físico e estresse emocional (Busse e cols. 2001; Kumar 2001).

A imunopatologia das doenças atópicas, incluindo a asma, está ligada a uma exacerbação da resposta do tipo Th2, com produção principalmente de IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 promove a diferenciação de células T para o subtipo Th2 (Mosmann & Coffman 1989). A IL-4 e a IL-13 induzem e mantêm a troca de classe de imunoglobulina no linfócito B para o isotipo IgE. A IL-4 promove a expressão do receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI), na superfície dos mastócitos e basófilos, e de baixa afinidade (FcεRIIb) na superfície das células B ativadas, monócitos e macrófagos (Yssel e cols. 1993). A IL-4 induz a expressão de moléculas de adesão vascular nos eosinófilos e basófilos, além da produção de quimiocinas. Isto facilita a migração de células inflamatórias da circulação para a lâmina própria, o epitélio e lúmen das vias aéreas (Zhu e cols. 1999). A IL-5, junto a IL-3 e ao GM-CSF, promovem a diferenciação de eosinófilos, a partir de precursores mielóides, além de atuar na ativação desta célula. O eosinófilo ativado expressa moléculas na superfície, como a E-selectina e o VLA-4, que estimulam a quimiotaxia destas células pela ligação a receptores no endotélio vascular. (Foster e cols. 1996; Holt e cols. 1999). A IL-4, que é também produzida por mastócitos ativados, é um fator de diferenciação para células Th2, perpetuando o processo inflamatório (Yssel e cols. 1993).

Ao primeiro contato com o alérgeno a resposta imune é desviada para o tipo Th2, com produção de IgE específica. Esta imunoglobulina liga-se a receptores de alta afinidade nos mastócitos. Contatos posteriores com o alérgeno resultam em interação do mesmo com as moléculas de IgE ligadas aos mastócitos, ocorrendo degranulação destas células e liberação dos mediadores inflamatórios como a histamina, prostaglandinas e leucotrienos (Platts-Mills e cols. 1996). Esta fase se caracteriza pela ativação de terminações nervosas vagais com produção de

neurotransmissores (acetilcolina, substância P, neurocinina A) que vão resultar em broncoconstrição, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, com exsudação de plasma, hipersecreção de muco e inflamação. Há uma produção de citocinas do tipo 2 também por mastócitos, eosinófilos e basófilos, e de quimiocinas como a eotaxina, que irão recrutar mais células, perpetuando o processo inflamatório. Estes eventos iniciais da fase aguda da asma iniciam-se aproximadamente 10 minutos após o contato com o alérgeno e duram cerca de 2 horas.

A fase tardia inicia-se 2 a 4 horas após o contato com o alérgeno e tem uma duração média de 24 horas. Esta fase se caracteriza pela quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e linfócitos, aumentando da liberação de mediadores inflamatórios, como o TNF (Ferreira 2004). Segue-se a degeneração celular, com ruptura do epitélio ciliado, descamação para o lúmen, juntamente com o muco, seguido de remodelamento brônquico e fibrose subepitelial, com depósito intersticial de colágeno na lâmina reticular por células endoteliais e miofibroblastos. Com o tempo este processo pode levar a um aumento do trabalho respiratório e limitação do fluxo aéreo, causando a fadiga e a falência respiratória progressiva podendo levar ao óbito por asma (III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma 2002).

Mesmo a patogênese da asma sendo relacionada ao aumento da resposta do tipo Th2, citocinas do tipo Th1 também podem estar envolvidas, resultando em agravamento do quadro (Smart e cols. 2002; Cho e cols. 2005). Em modelo murino de asma alérgica, a administração de células Th1 produtoras de IFN- γ causa uma intensa inflamação neutrofílica das vias aéreas, reforçando a idéia de que a regulação do sistema imune nas doenças inflamatórias não resulta de um

simples desequilíbrio entre as subpopulações de células Th1 e Th2 (Hansen e cols. 1999; Randolph e cols. 1999).

Como a patogenia da asma está principalmente associada a uma falta de regulação da resposta imune, a indução de mecanismos modulatórios da resposta exacerbada poderão conter ou minimizar a patogenicidade associada a esta doença (Kay 2000).

As medidas de controle da asma baseiam-se no uso de medicamentos com propriedades broncodilatadoras, a exemplo dos β_2 adrenérgicos e antiinflamatórias, como os corticosteróides. É também necessário o acompanhamento periódico do paciente para adequação da posologia e dosagens, uma vez que os episódios de asma são na sua maioria intercorrentes e o uso constante, nos casos menos graves, não é recomendável, além dos encargos financeiros e dificuldades de acesso da maioria da população aos serviços de saúde.

Outra opção seria a realização da imunoterapia específica para o alérgeno, pela técnica da dessensibilização, onde são administrados por via subcutânea extratos de alérgenos purificados e padronizados, com o objetivo de modificar a resposta imune ao futuro contato com o alérgeno, reduzindo os sintomas. Este procedimento proporciona melhora ao longo prazo dos sintomas. É indicado na asma atópica, demonstrada por IgE específica aumentada ou testes cutâneos de hipersensibilidade imediata positivos. Este procedimento parece não beneficiar pacientes com sensibilização múltipla e não está indicado em pacientes com asma leve e que respondem bem a terapia farmacológica. A qualidade e confiabilidade dos extratos disponíveis são críticas para a eficácia desta terapêutica.

Medidas profiláticas, como forrar colchões e travesseiros com plásticos impermeáveis aos ácaros, retirar tapetes, carpetes e cortinas de pano dos quartos, não criar animais e evitar o fumo, embora sejam importantes, por si só não controlam a exacerbação da doença.

A necessidade de desenvolver vacinas com potencial imunomodulatório capazes de conter a exacerbação do processo inflamatório envolvido na patogênese da asma e que não interferissem na co-morbidade de outras patologias, justificaria pesquisas que visassem à identificação e caracterização de antígenos com propriedades regulatórias da resposta imune.

2.2 Resposta imune na infecção pelo *Schistosoma mansoni*

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* ocorre pela penetração das cercárias na pele. As cercárias então perdem a cauda neste processo, transformam-se em esquistossômulos e estes ganham a circulação, realizando o ciclo pulmonar. Em seguida, migram para o sistema porta, transformando-se neste trajeto em vermes adultos, machos e fêmeas. Os vermes adultos vivem no sistema porto-mesentérico, põem os ovos nos capilares intestinais e estes aparecem nas fezes após passar pelos tecidos da mucosa intestinal, principalmente na região colônica. Estes ovos podem ainda ganhar a circulação porto-hepática e alcançarem os espaços porta, levando à formação de um granuloma, que é caracterizado pela reação inflamatória a antígenos do ovo, seguida da produção de colágeno, podendo evoluir para um quadro de fibrose hepática. A depender do grau da fibrose pode haver hipertensão portal, varizes esofagianas e sangramento intestinal, quadro observado na forma hepato-esplênica da doença (Wynn e cols. 1995).

Seis a oito semanas após a primeira exposição inicia-se a fase aguda da doença, conhecida como síndrome toxêmica (Lambertucci 1993; Rabello e cols. 1997; De Jesus e cols. 2002). Esta fase é caracterizada principalmente por febre, astenia, acentuada perda de peso, associadas a elevação dos níveis de citocinas pró inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6). Dispneia e dor torácicas em decorrência da pneumonite e pericardite, relacionadas com níveis elevados de complexos imunes circulantes e reação de hipersensibilidade tipo III (Galvao-Castro e cols. 1981), têm sido descritas. Adicionalmente, dor abdominal e diarreia são freqüentes nesta fase e coincidem com o início da postura dos ovos, causando destruições focais

na mucosa e sub-mucosa intestinais. Apesar da elevação dos níveis de IgE nesta fase, não há evidência de broncoespasmo e não há associação dos níveis de IgE com manifestações respiratórias. Esta fase aguda é raramente encontrada em pessoas residentes em áreas endêmicas, sendo mais comum em indivíduos expostos pela primeira vez à infecção. Este achado sugere que a modulação da resposta imune que ocorre após a fase aguda previne o aparecimento destas manifestações nos indivíduos previamente infectados (Lambertucci 1993; Rabello 1995; Wynn e cols. 1998).

A resposta imune na fase aguda da esquistossomose é do tipo Th1, com produção de IFN- γ e também de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do TNF, IL-6 e IL-1 (Wynn e cols. 1998; Montenegro e cols. 1999; De Jesus e cols. 2002). Na fase crônica ocorre uma modulação da resposta inflamatória e um desvio da resposta para o tipo Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10, com baixos níveis de IFN- γ (Gazzinelli e cols. 1992; Williams e cols. 1994; Araujo e cols. 1996; Finkelman e cols. 1997; Mwatha e cols. 1998). Esta mudança no padrão de resposta tem sido relacionada à produção de IL-10 induzida por antígenos do ovo, desde que coincide com a oviposição (Montenegro e cols. 1999; Silveira e cols. 2004).

A modulação da resposta imune que ocorre na fase crônica parece ser responsável pela limitação das manifestações clínicas da forma aguda, desde que a melhora ocorre mesmo na ausência de tratamento da parasitose (Pearce 2005). Na fase crônica da esquistossomose são descritas três formas clínicas bem caracterizadas: as formas mais brandas da doença, chamadas intestinal e hepato-intestinal, e a forma mais grave ou hepato-esplênica, observada em 9,8% dos casos (Bina e cols. 2003).

Alguns fatores parecem estar envolvidos na patogênese da esquistossomose e evolução para as formas graves da doença, a exemplo do tipo de HLA (Secor e cols. 1996), pertencer a raça branca (Prata 1988; Tavares-Neto e cols. 1990) , a alta carga parasitária (Sleigh e cols. 1985) e a resposta imune do hospedeiro (Wynn e cols. 1995).

Estudos têm sido realizados para elucidar a resposta imune envolvida na formação do granuloma e da fibrose hepática, tanto em modelo experimental, como em modelo de modulação do granuloma *in vitro* e com biópsias de tecido (Wynn e cols. 1995; Falcao e cols. 1998; Gustavson e cols. 2002). Estes estudos vêm demonstrando o envolvimento da IL-4, IL-5 e IL-13 na formação do granuloma e evolução para fibrose hepática (Chiaramonte e cols. 1999; de Jesus e cols. 2000; Chiaramonte e cols. 2001; De Jesus e cols. 2004). As quimiocinas também parecem participar da patogênese da esquistossomose. A MIP-1 α , RANTES e a eotaxina estão diretamente relacionadas com o recrutamento de eosinófilos para o infiltrado inflamatório. Em modelo de modulação do granuloma *in vitro*, Falcão e colaboradores observaram uma correlação positiva entre gravidade da doença com níveis elevados de MIP-1 α (Falcao e cols. 2002).

A resposta do tipo Th2, que, como descrito acima, pode estar envolvida com a patogenia da esquistossomose, tem sido também relacionada com proteção. Tem sido demonstrado que níveis elevados de IgE correlacionam-se com proteção contra a re-infecção (Jarrett e cols. 1982; Rihet e cols. 1991; Dunne e cols. 1992; Hussain e cols. 1992). Em modelo experimental, a resposta do tipo Th1 com produção de IFN- γ também tem sido associada a proteção contra a infecção, sendo uma resposta equilibrada do tipo Th1 e Th2 sugerida como protetora (Brito e cols. 2000).

2.3 Antígenos candidatos à vacina para esquistossomose

A infecção pelo *S. mansoni* atinge 200 milhões de pessoas na África, América do Sul e Ásia (Iarotski e cols. 1981; Chitsulo e cols. 2004). A gravidade da doença em muitos casos está ligada à intensidade de infecção. O tratamento da esquistossomose controla em parte a morbidade da doença, entretanto a transmissão permanece inalterada (Dunne e cols. 1992; Butterworth e cols. 1994; Dunne e cols. 1995; Bina 1997). A interrupção da transmissão da esquistossomose a longo prazo poderá advir com o desenvolvimento de uma vacina protetora que seja capaz de controlar a reinfecção e reduzir a prevalência da doença (Bergquist e cols. 1998; Capron e cols. 1987).

Em modelo experimental, a imunidade parcial pode ser induzida por vacinação com cercária irradiada ou antígenos específicos (James 1987; Bergquist 1990; Capron e cols. 1995; De Jesus e cols. 2000). Têm sido documentados casos de resistência natural a reinfecção em indivíduos vivendo em áreas endêmicas (Capron e cols. 1987; Hagan e cols. 1991; Dessein e cols. 1992). A produção de IgE, IgG1 e IFN- γ têm sido associados com a resistência a reinfecção (Hagan e cols. 1991; Rihet e cols. 1991), sugerindo a participação de mecanismos humorais e celulares no processo (De Jesus e cols. 2000).

Dentre os antígenos que vem sendo utilizados na tentativa de controlar a infecção pelo *Schistosoma* encontram-se a Glutathione-S Transferase (P28/GST), Paramiosina (Sm97), Triose Fosfato Isomerase (TPI), Sm23 e IrV-5, que induzem proteção parcial contra a reinfecção (Bergquist 1998; Al-Sherbiny e cols. 2003).

Outros antígenos vacinais descritos na literatura, a exemplo do Sm22.6, Sm14, P24 e PIII, possuem a propriedade de induzirem a produção de IL-10,

citocina com propriedade antiinflamatória na asma (Akdis e cols., 1998; Akdis e cols. 2001).

O antígeno PIII é obtido a partir do antígeno solúvel do verme adulto (SWAP) por cromatografia de troca iônica em coluna de Q-sepharose - Sistema de FPLC (Hirsch e cols. 1996). Estudos demonstraram modulação do granuloma em camundongos imunizados com PIII e em modelo de indução da formação do granuloma *in vitro* (Hirsch e cols. 1996; Hirsch e cols. 1997; Gustavson e cols. 1998; Gustavson e cols. 2002; Zouain e cols. 2004). Avaliando-se a produção de citocinas e outras moléculas por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos com esquistossomose crônica, observou-se a produção de IL-10 e NO em culturas estimuladas pelo PIII (Oliveira e cols. 1999). Os mecanismos provavelmente envolvidos na modulação do granuloma esquistossomótico por este antígeno são: diminuição da proliferação celular *in vitro*, estimulação da produção de IL-10, bem como a diminuição da percentagem de células CD4⁺ expressando CD28 e aumento de células com o fenótipo CD8⁺ expressando CTLA-4. Também foi observado um aumento da percentagem de células CD33⁺ expressando CD86 (B7.2) (Zouain e cols. 2004).

O antígeno P24 nativo é uma fração do PIII. A forma aqui descrita é a recombinante. Os estudos acerca destes antígenos, P24 e PIII demonstraram redução do tamanho do granuloma em camundongos e habilidade para induzir a produção de IL-10 (Zouain e cols. 2000; Zouain e cols. 2002), enquanto não induzem a produção de IL-5 (Zouain e cols. 2002; Gustavson e cols. 2002).

A proteína Sm22.6 é uma proteína solúvel do tegumento, presente em todos os estágios do ciclo do *S. mansoni*, exceto o ovo (Jefferis e cols. 1991). Estudos com esta proteína mostram uma considerável homologia entre os antígenos de

22.6 kDa do *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum* (Fitzsimmons e cols., 2004). É considerada a principal alvo da resposta de IgE em modelos experimental e humano de infecção pelo *S. mansoni* (Santiago e cols., 1998; Li e cols. 2000; Fitzsimmons e cols. 2004). Esta produção de IgE específica para o Sm22.6 estaria relacionada a proteção contra a re-infecção pelo *Schistosoma* (Dunne e cols. 1992; Webster e cols. 1997). Estudos recentes em modelo experimental de imunização com a rSm22.6 mostram um perfil de resposta celular mista Th1/Th2, com indução de IFN- γ e IL-4, como também a produção de IL-10 (Pacífico 2005).

A proteína Sm14 está presente no esquistossômulo, no verme adulto e no ovo. É uma proteína com homologia com membros das proteínas ligadoras de lipídeos (Brito e cols. 2002). Ela tem papel central na captação, transporte e compartimentalização de lipídeos (Moser e cols. 1991). Tendler e colaboradores mostraram que existe 91% de homologia entre a Sm14 do *S. japonicum* e *S. mansoni* (Tendler e cols. 1996).

Estudos em modelo experimental mostraram que a vacinação de camundongos com Sm14 protege parcialmente contra a infecção pelo *S. mansoni* e *Fasciola hepatica*. A antigenicidade está relacionada a epítomos descontínuos na região c-terminal. Devido a grande homologia entre a Sm14 e Fh15 de *Fasciola hepatica*, esta proteína vem sendo estudada para o possível uso como vacina, tanto na proteção contra a infecção pelo *S. mansoni* com pela *F. hepatica* (Tendler e cols. 1996).

A Sm14 induz a produção de IFN- γ e TNF *in vitro* em indivíduos resistentes naturais, residentes em áreas endêmicas, e estimula a síntese de IL-10 em

indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (Brito e cols. 2000; Al-Sherbiny e cols. 2003).

A proteína Sm29 do *S. mansoni* foi uma proteína recentemente identificada por pesquisadores do Projeto Rede Genoma de Minas Gerais. Sabe-se que a forma nativa é uma glicoproteína de membrana do *S. mansoni*, presente no esquistossômulo e no verme adulto (dado não publicado). Os estudos sobre a resposta imune desenvolvida por esta proteína, tanto em modelos experimentais quanto em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, estão em andamento.

O estudo dos mecanismos envolvidos na estimulação do sistema imune do hospedeiro pelas proteínas Sm22.6, Sm 14, PIII, P24 e Sm29, além de propiciar o desenvolvimento de vacinas contra a infecção pelo *S. mansoni*, pode permitir o uso destas proteínas como vacinas contra doenças alérgicas, a exemplo da asma, uma vez que são potencialmente indutores de IL-10.

2.4 A infecção por helmintos e alergia

A prevalência de doenças alérgicas tem aumentado nas últimas duas décadas. O “International Study for Asthma and Allergy in Childhood” (ISAAC) e o “European Community Health Respiratory Survey” (ECHRS) mostraram um aumento na prevalência de asma e rinite em países ocidentais industrializados, quando comparados com países em desenvolvimento (ISAAC 1998; Pearce e cols. 2000).

Fatores ambientais, a exemplo de precárias condições sanitárias e de higiene, resultam em alta prevalência de infecções na infância e isso tem sido implicado na proteção contra o desenvolvimento de doenças alérgicas. Esta é a chamada “Hipótese da Higiene”, onde agentes infecciosos são capazes de modular a resposta imune, prevenindo o desenvolvimento de alergias (Strachan 1989; Yazdanbakhsh e cols. 2002).

Muitos trabalhos têm documentado uma associação inversa entre alergia/atopia e infecção por helmintos. Lynch e colaboradores (1993), estudando crianças de uma área endêmica em ascaridíase, observaram que estas apresentavam uma menor resposta aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata para aeroalérgenos e que o tratamento com anti-helmínticos resultou em aumento da positividade aos testes de alergia, com elevação dos níveis de IgE específica para antígenos da poeira domiciliar (Lynch e cols. 1993).

Em Caatinga do Moura, no Estado da Bahia, área endêmica em esquistossomose, foi observada a existência de uma associação inversa entre a resposta aos testes cutâneos de leitura imediata com aeroalérgenos e carga parasitária de *S. mansoni* (Araujo e cols. 2000). Medeiros e colaboradores (2003), estudando asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, residentes em área endêmica

em esquistossomose, comparando com asmáticos não infectados, observaram menor gravidade da asma no grupo de indivíduos infectados (Medeiros e cols. 2003).

Vários fatores podem explicar a menor frequência de positividade aos testes cutâneos de hipersensibilidade imediata com aeroalérgenos em indivíduos infectados por helmintos, tais como: a grande produção de IgE policlonal, altas concentrações de IgG4 antígeno-específica, redução de IgE específica para o alérgeno e aumento na produção de células e moléculas regulatórias da resposta imune (Hussain e cols. 1992; Araujo e cols. 1996; Malaquias e cols. 1997; Lynch e cols. 1998; Weiss 2000). A avaliação prospectiva de indivíduos asmáticos residentes em três diferentes áreas no Estado da Bahia, uma delas endêmica em *S. mansoni* (Caatinga do Moura), não mostrou diferenças estatisticamente significantes nos níveis de IgE total e específica para aeroalérgenos (Medeiros e cols. 2003). A possibilidade de que uma grande produção de IgE devido à ativação policlonal bloqueasse os receptores de IgE presentes em mastócitos não encontrou suporte em estudos que mostraram que basófilos de pacientes asmáticos infectados pelo *S. mansoni* degranulam quando estimulados com o antígeno 1 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1) *in vitro* (Medeiros e cols. 2003).

Diante desses dados, a hipótese mais aceita recentemente é a indução de mecanismos modulatórios da resposta imune envolvendo células regulatórias, a exemplo das células Tr1 e células CD4⁺CD25⁺, e citocinas produzidas por estas células, como a IL-10 (Yazdanbakhsh e cols. 2001; van den Biggelaar e cols. 2001).

2.5 Participação da IL-10 na resposta imune nas infecções por helmintos e na alergia

Inicialmente classificada como uma citocina do tipo Th2, a Interleucina-10 foi descrita por Fiorentino e colaboradores (Fiorentino e cols. 1989), sendo posteriormente considerada a principal citocina regulatória da resposta inflamatória (Akdis e cols. 2001). A IL-10 é produzida por uma variedade de células da resposta imune como macrófagos, linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, TCD4⁺CD25⁺, linfócitos B, células dendríticas e células NK. As principais funções promovidas por esta citocina estão relacionadas a sua atividade inibitória sobre a ativação da célula T, a produção de IgE, o recrutamento de eosinófilos e a ativação de macrófagos. Agindo nos macrófagos, modula sua atividade antimicrobiana, inibe a atividade co-estimulatória e a produção de citocinas pró-inflamatórias. A IL-10 também inibe a diferenciação de células dendríticas e suprime a produção de quimiocinas inflamatórias e citocinas do tipo Th1 e Th2 em alguns modelos (Sher e cols. 1991; Del Prete e cols. 1993; Araujo e cols, 2003). Dados recentes mostram o papel desta citocina na inibição da liberação de histamina pelos mastócitos (Royer e cols. 2001).

Em virtude de antígenos de *S. mansoni* serem capazes de induzir a produção de IL-10 (Araujo e cols. 1996) *in vitro*, grande interesse têm surgido em avaliar a capacidade da infecção pelo *S. mansoni* em atenuar as doenças auto-imunes, doenças inflamatórias crônicas e doenças alérgicas em modelos experimentais. A prevenção do diabetes tipo I em camundongos não obesos foi observada na infecção pelo *S. mansoni* ou pela injeção dos ovos do helminto. A

prevenção da doença pode ser resultado da interação de moléculas derivadas do parasita com mecanismos do sistema imune inato do hospedeiro (Zaccone e cols. 2003).

Estudos mostraram ainda que a infecção pelo *S. mansoni* pode interferir na resposta imune para outros antígenos não relacionados, como visto no trabalho de SABIN e colaboradores (1996), onde indivíduos infectados pelo *S. mansoni* produzem níveis elevados de IL-4 e baixos de IFN- γ em resposta a vacinação pelo toxóide tetânico, ao passo que nos indivíduos não infectados, há produção principalmente de IFN- γ em resposta à vacinação (Sabin e cols. 1996).

Os mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda não estão bem elucidados, contudo sabe-se que este efeito modulador não depende do parasita vivo, haja visto que antígenos oriundos desses patógenos possuem essa mesma propriedade moduladora. Porém, até o momento, apenas extratos antigênicos foram descritos com essa característica, tornando-se imperativo a identificação dessas moléculas (Deehan e cols. 1997; Faquim-Mauro e cols. 1998; Macedo e cols. 1998). O efeito imunossupresor das infecções por helmintos pode ser transferido ao feto, *in utero*, sendo demonstrado que crianças nascidas de mães infectadas com filariose ou esquistossomose respondem pobremente à vacinação com BCG (Malhotra e cols. 1999). Existe na literatura a documentação de que antígenos de *S. mansoni* são capazes de induzir a produção de IL-10 (Velupillai e cols. 2000).

A resposta imune nas alergias assemelha-se a àquela envolvida na patogênese das helmintíases, sendo também do tipo Th2. A diferença básica entre estas respostas é que nas infecções por helmintos, particularmente *S. mansoni*, a IL-10 é produzida em altos níveis (Araujo e cols. 1996) enquanto que

na asma esta citocina não é produzida, ou está presente em pequenas concentrações (Borish e cols. 1996; Lim e cols. 2004).

Células mononucleares de sangue periférico de asmáticos produzem menos IL-10 em resposta a endotoxina quando comparadas a controles normais (Borish e cols. 1996). Têm sido encontrados polimorfismos na região do promotor de IL-10 em indivíduos asmáticos, sendo que o haplótipo GCC, associado com baixa produção de IL-10, é encontrado em pacientes com asma grave (Lim e cols. 1998).

A IL-10 inibe a ativação da célula T (Akdis e cols. 2001; Akdis e cols. 2001), a produção de IgE (Royer e cols. 2001), o recrutamento de eosinófilos (Zuany-Amorim e cols. 1996) e outros aspectos da inflamação alérgica, a exemplo da inibição da liberação de histamina pelos mastócitos (Royer e cols. 2001). A IL-10 também inibe a produção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos alveolares (Lim e cols. 2004).

Altos níveis de IL-10 foram encontrados em indivíduos que respondem ao tratamento com imunoterapia específica utilizando alérgenos, reforçando o papel protetor desta citocina nas alergias respiratórias (Akdis e cols. 1998).

Em asmáticos infectados pelo *S. mansoni* foi demonstrado uma menor produção de IL-4 e IL-5, e mais alta produção de IL-10 quando comparado a asmáticos não infectados, o que sugere a infecção pelo *S. mansoni* modula a resposta inflamatória do tipo Th2 na asma. Esta modulação parece ser, pelo menos em parte, mediada pela IL-10, desde que a adição desta citocina às culturas de células de asmáticos não infectados resultou em diminuição da produção de IL-5 (Araujo e cols. 2004).

Deste modo, a hipótese a ser testada neste estudo é a de que os antígenos de *S. mansoni* Sm22.6, Sm14, PIII, P24 e Sm29 são capazes de induzir a produção de IL-10 por células de asmáticos, constituindo portanto possíveis imunomoduladores a serem utilizados na imunoterapia das doenças alérgicas, particularmente da asma.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de antígenos do *Schistosoma mansoni* em induzirem a produção de IL-10 *in vitro* por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos.

3.2 Objetivos específicos

1) Avaliar a capacidade dos antígenos de *S. mansoni* Sm22.6, Sm14, PIII, P24 e Sm29 de induzirem a produção de IL-10 *in vitro* por células de indivíduos asmáticos não infectados e comparar com indivíduos infectados, asmáticos e não asmáticos;

2) Avaliar as concentrações de citocinas do tipo Th2 (IL-5 e IL13) e Th1 (IFN- γ) em culturas estimuladas com os referidos antígenos de *S. mansoni* em asmáticos e em indivíduos infectados pelo *S. mansoni*;

3) Avaliar a capacidade dos referidos antígenos de *S. mansoni* em induzirem a produção de IL-10 por células de asmáticos não infectados estimuladas com o antígeno 1 do *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1).

4. METODOLOGIA

4.1 Seleção dos indivíduos

Neste estudo foram avaliados indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e por outros helmintos, residentes no município do Conde, Bahia, localizado ao norte, a 300 km de Salvador. Esta localidade compreende cinco comunidades, totalizando cerca de 1.500 habitantes. As condições sanitárias da região são precárias, estando os moradores sob alto risco de infecções parasitárias. A principal fonte de renda da população é a pesca e a água dos rios é também utilizada para banho, lavagem de roupas e utensílios, além do lazer. O acesso da população a Serviços de Saúde, até o início deste estudo, era difícil e não havia relatos de tratamentos prévios com anti-helmínticos.

Em 2001 foram avaliados 1064 indivíduos residentes nesta região quanto à presença de asma, rinite e parasitose intestinal. A prevalência de infecção por *Schistosoma mansoni* foi de 90,2%. As prevalências de outros helmintos a exemplo de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* e *Ancilostoma duodenale* foram de 79,7%, 77,2% e 35%, respectivamente. Protozoários intestinais como *Giardia lamblia*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba histolytica* foram encontrados em torno de 50% da população.

Atualmente, em 2005, após a população ser tratada por duas vezes com Praziquantel, a prevalência da infecção pelo *S. mansoni* encontrada no Conde é de 51%. A prevalência de asma e rinite foi avaliada através do questionário utilizado internacionalmente em estudos de prevalência de doenças alérgicas

“International Study for Asthma and Allergy in Childhood” (ISAAC, 1998), tendo sido 14% e 20%, respectivamente (Araujo e cols. 2004) (ANEXO I).

Os asmáticos identificados na região foram considerados portadores de asma leve, baseados nos critérios estabelecidos no III Consenso Brasileiro no Manejo da Asma, onde os sintomas como falta de ar, aperto no peito, chiado e tosse aparecem menos de uma vez por semana, as crises são ocasionais e leves, controladas com broncodilatadores, sem a necessidade de atendimento emergencial e uso de broncodilatador é requerido menos de uma vez por semana. Este diagnóstico é realizado após avaliação clínica e realização de exames físicos por dois médicos alergistas.

Foram selecionados indivíduos de ambos os gêneros, infectados pelo *S. mansoni*, asmáticos (n=20) e não asmáticos (n=21), com idade entre 6 e 40 anos, residentes no Conde. A seleção ocorreu de acordo com a ordem de comparecimento da população à convocação para participar deste estudo.

Indivíduos com diagnóstico de asma leve (n=13) entre 6 e 40 anos de idade, de ambos os gêneros, provenientes do Ambulatório de Alergia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, não infectados com helmintos e com baixas condições sócio-econômicas, formaram o grupo dos asmáticos não infectados.

4.2 Desenho do estudo e cálculo amostral

Trata-se de um estudo seccional, onde por ocasião da inclusão todos os indivíduos foram submetidos a avaliações laboratoriais (exame parasitológico de fezes) e avaliação da resposta imune para os antígenos de *S. mansoni*.

O tamanho amostral foi escolhido por conveniência do número de pacientes consecutivos que compareceram para participarem do estudo no período de 12 meses. Adicionalmente contribuíram para tal escolha a limitação de recursos e os critérios de seleção dos grupos, especialmente o da área endêmica.

4.3 Critérios de inclusão

1. Idade entre 6 e 40 anos;
2. Ambos os gêneros;
3. Infecção pelo *S. mansoni* (forma intestinal ou hepato-intestinal, caracterizado pelo exame físico) para compor o Grupo I (infectados não asmáticos);
4. Infecção pelo *S. mansoni* e responderem positivamente ao quesito relativo à história pessoal atual de asma brônquica com sibilância nos últimos 12 meses do questionário ISAAC, para compor o grupo II (asmáticos infectados);
5. Diagnóstico de asma leve para compor o grupo III (asmáticos não infectados).

Crianças menores de seis anos não foram incluídas no estudo pela dificuldade no diagnóstico de asma brônquica e da realização da espirometria, e adultos acima de 40 anos não participaram devido ao risco aumentado de apresentarem doença pulmonar obstrutiva crônica de outras etiologias que não fosse alérgica.

4.4 Critérios de exclusão

Não foram admitidos no estudo indivíduos:

1. Com idade inferior a 6 anos e superior a 40 anos;
2. Com asma grave;
3. Com a forma hepato-esplênica da esquistossomose;
4. Em uso de drogas imunossupressoras;
5. Mulheres gestantes;
6. Indivíduos que apresentem alguma condição que não permitisse a participação no estudo, ou por incapacidade física e/ou mental, impossibilitando a realização dos exames, ou por doenças que modifiquem a resposta imune do indivíduo, a exemplo das imunodeficiências, outras doenças crônicas, infecções virais e bacterianas.

Existe uma alteração da resposta imune em indivíduos com a forma hepato-esplênica da esquistossomose com baixa produção de IL-10 (Correa-Oliveira e cols. 1998).

4.5 Antígenos de *S. mansoni* usados no estudo

Os antígenos recombinantes de *S. mansoni* (Sm22.6, Sm14, P24, Sm29), além do PIII, SWAP e do SEA foram usados neste estudo. Estes antígenos foram gentilmente doados pelo Dr. Sérgio Costa e Dr. Alfredo Góes do Laboratório de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas/ICB - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Para produzir essas biomoléculas as seguintes metodologias foram empregadas:

4.5.1 Produção do antígeno purificado PIII a partir do SWAP

O antígeno PIII é uma fração solúvel do antígeno do verme adulto denominado SWAP obtido por FPLC (“Fast Protein Liquid Chromatography”) (Pharmacia, Uppsala, Suécia) através de cromatografia de troca aniônica utilizando uma resina de Q-Sefarose (5 mm x 90 mm; Pharmacia, Suécia) como descrito anteriormente por Hirsch e Goes (Hirsch e cols. 1996). O antígeno PIII foi eluído do sistema na concentração de 28% ou 0.28M do tampão de eluição. Em seguida o antígeno PIII foi esterilizado por filtração, liofilizado e estocado a -70 °C para posterior uso.

4.5.2 Expressão e purificação da proteína recombinante Sm22.6

O gene que codifica a proteína rSm22.6, foi encontrado na biblioteca de cDNA de esquistossômulo de fase pulmonar de *S. mansoni*. Esse gene foi subclonado no vetor de expressão em bactérias, pMAL-c2, que expressa proteínas em fusão com a proteína de ligação à manose (MBP). A expressão

utilizando o pMAL-c2 é realizada segundo as instruções do fabricante (New England Biolabs, Beverly, Mass.). Com o objetivo de se determinar a cinética da expressão da proteína de fusão, foi realizado primeiramente um experimento piloto com apenas 10 mL de cultura para discriminar o melhor tempo de indução, que foi de 3 horas. O pré-inóculo saturado de clones contendo o gene Sm22.6 foram preparados em meio LB suplementado com ampicilina, os quais foram incubados durante 16 horas a 37°C ou por uma noite sob agitação constante (200 rpm). Após o crescimento da cultura, um litro de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e glicose a 0,1% foram inoculados com 10 mL do pré-inóculo saturado de células, contendo o plasmídeo recombinante. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm até atingirem uma densidade ótica (DO) em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) de aproximadamente 0,6. Em seguida foi adicionado IPTG, para uma concentração final de 0,6 mM. Após 3 horas de indução as células foram centrifugadas a 7.000 rpm por 40 min. O sedimento contendo as células foi então ressuspense em 100 mL de PBS 0,15 M pH 8,4 contendo 25 mg de lisozima. As bactérias foram lisadas através de três ciclos de congelamento (-70°C) e descongelamento (banho-maria à 42°C) e depois sonicadas três vezes com pulsos de 30 segundos, potência de 30 % em sonicador (Fisher Scientific), intercalados por 30 segundos no gelo, para liberação total das proteínas. As frações de proteínas solúveis e insolúveis do lisado foram separadas após centrifugação a 7.000 rpm por 40min a 4°C, no sobrenadante e no sedimento, respectivamente e ambos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 % para confirmar a presença da proteína recombinante Sm22.6-MBP no sobrenadante, com o tamanho molecular de 22.6 kDa. A

proteína foi purificada por cromatografia de afinidade com resina de amilose, que se liga à maltose do MBP e é eluída por competição com maltose livre.

4.5.3 Expressão e purificação da proteína recombinante Sm14

O gene que codifica a proteína Sm14 do *S. mansoni* já se encontra clonado no vetor de expressão pMAL-c2 em cepas de *E. coli* DH5 α . A expressão utilizando o pMAL-c2 foi realizada segundo as instruções do fabricante (New England Biolabs, Beverly, Mass.), com algumas modificações descritas por Brito e colaboradores (Brito e cols. 2002). Com o objetivo de determinar a cinética da expressão da proteína de fusão, foi realizado primeiramente um experimento piloto com apenas 100 mL de cultura. O pré-inóculo saturado de clones contendo os genes Sm14 foi preparado em meio LB suplementado com ampicilina, o qual foi incubado durante 16 horas a 37°C ou por uma noite, sob agitação constante (200 rpm). Após o crescimento da cultura, 100 mL de meio LB contendo 0,1 % de glicose e 100 μ g/mL de ampicilina foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo saturado de células, contendo o plasmídeo recombinante. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm até atingirem, aproximadamente 2×10^8 células/mL (DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5). Neste momento, uma alíquota de 10 mL de cultura foi coletada e em seguida adicionado IPTG, para uma concentração final de 0,4 mM e coletadas alíquotas de 10 mL de cultura 1, 2, 3 e 4 horas após a indução da expressão com IPTG. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação a 10.000 rpm por 20 min. O sedimento contendo as células foi então ressuspensionado em 1 mL de PBS 0,15 M pH 8,4 contendo 25 mg de lisozima. As bactérias foram lisadas através de três ciclos de congelamento (gelo seco-metanol) e descongelamento (banho-maria à

37°C) e depois sonicadas três vezes com pulsos de 30 segundos, potência de 70 % em sonicador (Fisher Scientific), intercalados por 30 segundos no gelo, para liberação total das proteínas. As frações de proteínas solúveis e insolúveis do lisado foram separadas após centrifugação a 9.000 rpm por 30 min a 4°C, no sobrenadante e no sedimento, respectivamente e ambos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % para confirmar a presença da proteína recombinante Sm14-MBP. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade com resina de amilose, que se liga à maltose do MBP e é eluída por competição com maltose livre.

4.5.4 Expressão e purificação da proteína recombinante P24

O gene que codifica a proteína P24 do *S. mansoni* já se encontra clonado no vetor de expressão pET21 em cepas de *E. coli* BL21 (DE3). A expressão utilizando o pET21a foi realizada segundo as instruções do fabricante (New England Biolabs, Beverly, Mass.). O pré-inóculo saturado de clones contendo os genes P24 foram preparados em meio LB suplementado com ampicilina, os quais foram incubados durante 16 horas a 37°C ou por uma noite, sob agitação constante (200 rpm). Após o crescimento da cultura, 100 mL de meio LB contendo 0,2 % de glicose e 100 µg/mL de ampicilina foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo saturado de células, contendo o plasmídeo recombinante. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm até atingirem, aproximadamente 2×10^8 células/mL (DO_{600} de aproximadamente 0,5). Neste momento, uma alíquota de 5 mL de cultura foi coletada e em seguida adicionado IPTG para uma concentração final de 0,6 mM. Posteriormente, as células

voltaram a ser incubadas a 37°C sob agitação e foram coletadas alíquotas de 5 mL de cultura 1, 2, 3 e 4 horas após a indução da expressão com IPTG. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação a 10.000 rpm por 20 min. O sedimento contendo as células foi então ressuspensionado em 1 mL de PBS 0,15 M pH 8,4 contendo 25 mg de lisozima. As bactérias foram lisadas através de três ciclos de congelamento (gelo seco-metanol) e descongelamento (banho-maria à 37°C) e depois sonicadas três vezes com pulsos de 30 segundos, potência de 70 % em sonicador (Fisher Scientific), intercalados por 30 segundos no gelo, para liberação total das proteínas. As frações de proteínas solúveis e insolúveis do lisado foram separadas após centrifugação a 9.000 rpm por 30 min a 4°C, no sobrenadante e no sedimento, respectivamente e ambos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % para confirmar a presença da proteína recombinante P24-6xHis. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade com resina de níquel, que se liga aos resíduos de histidina e foi eluída por competição com o ácido imidoacético.

4.5.5 Expressão e purificação da proteína recombinante Sm29

O gene que codifica a proteína Sm29 do *S. mansoni* já se encontra subclonado no vetor de expressão pET21 em cepas de *E. coli* BL21 (DE3). A expressão utilizando o pET21a foi realizada segundo o manual do fabricante (Novagen, Madison, WI). Foi realizado um experimento piloto com apenas 100 mL de cultura, para determinar a cinética da proteína de fusão, que foi de 5 horas. O pré-inóculo saturado de clones contendo os genes Sm29 foram preparados em meio LB suplementado com ampicilina, os quais foram incubados durante 16

horas a 37°C ou por uma noite, sob agitação constante (200 rpm). Após o crescimento da cultura, 100 mL de meio LB contendo 0,2 % de glicose e 100 µg/mL de ampicilina foram inoculados com 1 mL do pré-inóculo saturado de células, contendo o plasmídeo recombinante. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm até atingirem, aproximadamente 2×10^8 células/mL (DO_{600} de aproximadamente 0,5). Neste momento, uma alíquota de 5 mL de cultura foi coletada e em seguida adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM. Após incubação adicional de 5 horas, as células foram recuperadas por centrifugação a 10.000 rpm por 20 min. O sedimento contendo as células foi então ressuspensionado em 1 mL de PBS 0,15 M pH 8,4 contendo 25 mg de lisozima. As bactérias foram lisadas através de três ciclos de congelamento (gelo seco-metanol) e descongelamento (banho-maria à 37°C) e depois sonicadas três vezes com pulsos de 30 segundos, potência de 30 % em sonicador (Fisher Scientific), intercalados por 30 segundos no gelo, para liberação total das proteínas. As frações de proteínas solúveis e insolúveis do lisado foram separadas após centrifugação a 7.000 rpm por 20 min a 4°C, no sobrenadante e no sedimento, respectivamente e ambos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % para confirmar a presença da proteína recombinante Sm29-6xHis. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade com resina de níquel (Amersham, Biosciences, São Paulo), que se liga aos resíduos de histidina e foi eluída por competição com o ácido imidoacético.

4.5.6 Obtenção do Antígeno Solúvel do Verme Adulto (SWAP) e do Antígeno Solúvel do Ovo (SEA)

Preparações antigênicas foram obtidas do ovo (SEA), do verme adulto (SWAP) preparadas como sobrenadante solúvel em tampão salina, de acordo com metodologia descrita por Hirsch e colaboradores em 1996 (Hirsch e cols. 1996; Hirsch e cols. 1997).

Os antígenos SEA e SWAP foram utilizados como controles da resposta imune nos grupos estudados.

4.6 Avaliação laboratorial e clínica dos indivíduos recrutados nos grupos

4.6.1 Exame parasitológico de fezes

Os indivíduos selecionados para inclusão no estudo tiveram examinadas amostras de fezes (3 amostras), através da técnica da sedimentação espontânea de Hoffmann-Pons-Janer para a determinação de infecção parasitária e pela técnica de Kato-Katz para avaliação da carga parasitária (Katz e cols. 1970).

4.6.2 Avaliação da resposta imune celular

a) Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

Células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas mediante separação por gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas para concentração de 3×10^6 células/ml em RPMI 1640, contendo 10% de soro AB⁺ humano normal inativado, penicilina 100U/mL, estreptomicina 100 µl/mL, L-glutamina 2mM, 30mM HEPES (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD).

As células (3×10^6 células/ml) foram estimuladas com os antígenos de *S. mansoni* PIII, rSm22.6, rSm14, rP24, rSm29, SWAP e SEA (10 µg/mL), LPS (0.14 ng/mL), antígeno 1 do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1) (IPI; ASAC) na concentração de 25µg/mL ou com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) na diluição final de 1:100. As células foram cultivadas em placas de 24 poços, por 6, 12, 24, 48 e 72h à 37°C e 5% de CO₂.

Após a incubação, os sobrenadantes das culturas foram coletados e mantidos a – 20°C para posterior dosagem de citocinas.

b) Adição de Sulfato de Polimixina B às culturas para bloqueio da produção de citocinas pelo LPS

As CMSP dos indivíduos foram pré-incubadas com 10 µg/mL de Sulfato de Polimixina B (PMB) (CALBIOCHEM, Alemanha) por 30 minutos a 37°C, 5% CO₂, distribuídas em placas de culturas na concentração de 3x10⁶ células/mL, conforme metodologia sugerida por Gao e colaboradores (Gao e cols. 2003a; Gao e cols. 2003b). Em seguida adicionaram-se as proteínas recombinantes nos poços contendo PMB e as proteínas não recombinantes nos demais poços, segundo esquema de placas pré-estabelecido. As concentrações das proteínas foram de 10 µg/mL e foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 12, 24 e 48 e 72 horas. Polimixina B (10 µg/mL) foi novamente adicionada a cada 12h de cultura.

A concentração final de 30 µg/mL de PMB é suficiente para bloquear até 50 ng/mL de LPS (Vabulas e cols., 2001).

A avaliação da viabilidade das células foi realizada em 24, 48 e 72 horas, contando-se o número de células viáveis, após diluição 1:1 com corante de Turck.

c) Avaliação da produção de citocinas

Os níveis de IL-10, IFN-γ, IL-5, IL-13 e TNF foram determinados pela técnica de ELISA sanduíche utilizando-se Kit comercialmente disponíveis (R&D Systems). Uma curva padrão foi usada para expressar os resultados em pg/mL.

4.7 Análise dos dados

Os dados foram analisados através do software Statistical Package for Social Science (SPSS®) versão 9. Os dados referentes à amostra da população estudada foram apresentados através de médias aritméticas e seus respectivos desvios padrões, ou através de porcentagens.

Testes não paramétricos foram utilizados para avaliar as diferenças nos níveis de citocinas. Tal escolha deveu-se ao pequeno tamanho da amostra. Foram usados o teste de Mann Whitney na comparação de níveis de citocinas entre os grupos e o teste pareado de Wilcoxon para comparar os níveis de IL-10 em cultura de CMSP na presença ou ausência de Sulfato de Polimixina B.

Todos os testes estatísticos de hipóteses foram bi-caudais, sendo considerados estatisticamente significantes valores de p inferiores ao nível de significância pré-estabelecidos em 5%.

A Representação gráfica foi realizada utilizando-se o programa Prism, versão 3.03.

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Maternidade Climério de Oliveira, sob Parecer/Resolução número 71/2004 (ANEXO II), e os seus participantes foram todos voluntários que, após esclarecimentos sobre o objetivo desta pesquisa, assinaram termo de consentimento informado (ANEXO III). No caso de menores, o consentimento foi assinado por um dos responsáveis.

Os voluntários que participaram deste estudo doaram 20 mL de sangue para avaliação imunológica e colheram amostras de fezes para realização de exames parasitológicos.

A coleta de sangue foi realizada por profissionais da área de saúde habilitados para tal. Os materiais utilizados na coleta de sangue foram descartáveis. A coleta de sangue não oferece riscos, a não ser a possibilidade de sangramento e formação de hematoma, o que é raro e pode ser contornado com compressão do local. Todos os indivíduos portadores de parasitoses intestinais foram tratados gratuitamente. Aqueles que apresentaram queixas de alergia foram devidamente orientados com relação a medidas de controle ambiental intradomiciliar, bem como com referência ao tratamento com drogas.

6. RESULTADOS

A tabela 1 mostra as características demográficas e intensidade de infecção dos indivíduos incluídos no estudo. Não houve diferença significativa em relação à idade e gênero entre os grupos avaliados.

Tabela 1. Características demográficas e intensidade de infecção dos indivíduos infectados com *S. mansoni* e asmáticos não infectados.

| Variáveis Avaliadas | Grupo 1 (n=20) Sm | Grupo2 (n=21) Sm+Asma | Grupo3 (n=13) Asma | Valor de p |
|---|-------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------|
| Idade (mediana/faixa etária em anos)* | 13 (6-40) | 11 (6-40) | 12 (7-41) | >0,05 |
| Gênero (% masc)** | 58,0% | 46,1% | 55,0% | >0,05 |
| <i>S. mansoni</i> (ovos/ g de fezes)* | 330 ± 298 | 52 ± 54 | 0 | <0,05 |

* ANOVA não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis)

** Teste exato de Fisher

Grupo 1: Não Asmáticos Infectados pelo *S. mansoni*, residentes em área endêmica;

Grupo 2: Asmáticos Infectados pelo *S. mansoni*, residentes em área endêmica;

Grupo 3: Asmáticos de área não endêmica.

6.1 Concentrações de LPS encontradas nos antígenos de *Schistosoma mansoni* avliados no estudo

Os antígenos utilizados neste estudo foram, na sua maioria, recombinantes, clonados em cepas de *E. coli* e portanto, susceptíveis a contaminação pela endotoxina presente na parede celular destas bactérias.

Inicialmente, as concentrações de LPS foram dosadas (LAL Kit-Cambrex) nos antígenos recombinantes Sm22.6, Sm14, P24, Sm29 e no antígeno não recombinante PIII. As concentrações de LPS, presente como contaminante no processo de purificação destas proteínas, estão representados na Tabela 2. A média das concentrações obtidas nas dosagens de LPS nos antígenos recombinantes foi de 0,15 ng/mL.

Tabela 2. Concentrações de LPS nos antígenos recombinantes P24, Sm14, Sm22.6, Sm29 e na proteína PIII do *S. mansoni*. A tabela mostra as concentrações de LPS, em Unidades de Endotoxina/mL (EU/mL) e os valores correspondentes em nanogramas/mL (ng/mL).

| Antígenos Recombinantes | LPS | |
|-------------------------|---------|---------|
| | (EU/mL) | (ng/mL) |
| P24 | 1,35 | 0,135 |
| Sm14 | 2,10 | 0,210 |
| Sm22.6 | 1,32 | 0,132 |
| Sm29 | 1,26 | 0,126 |
| PIII* | 0,02 | 0,002 |

* O antígeno PIII não é recombinante

6.2 Produção de IL-10 por CMSP de indivíduos asmáticos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* e infectados não asmáticos estimuladas pelo LPS

A figura 1 mostra os níveis de IL-10 produzidos por CMSP de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* asmáticos e não asmáticos e por asmáticos não infectados estimulados com 0,15 ng/mL de LPS em culturas de 24 horas. As células dos asmáticos não infectados produziram baixos níveis de IL-10 (31 ± 23 pg/mL) quando comparadas aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 1).

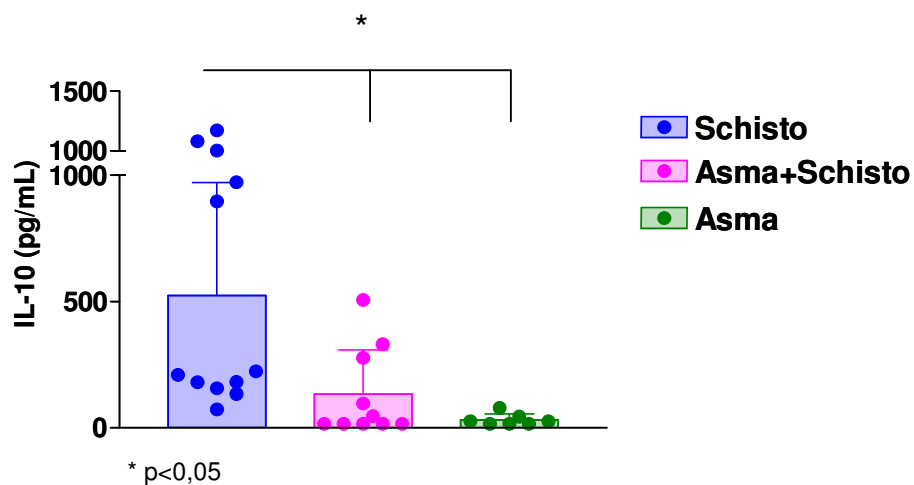


Figura 1. Concentrações de IL-10 produzidas por CMSP de indivíduos asmáticos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* e infectados não asmáticos, estimuladas pelo LPS em culturas de 48 horas. Teste de Kruskal-Wallis).

6.3 Neutralização dos efeitos do LPS nas culturas estimuladas com os antígenos recombinantes pelo uso da Polimixina B

Antes de proceder ao estudo utilizando os antígenos recombinantes de *S. mansoni*, foi avaliada a produção de TNF e IL-10 em culturas de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimuladas com o LPS e o efeito da adição de PMB sobre a produção destas citocinas pelas células destes indivíduos.

A produção de TNF e IL-10 em 6, 12, 24 e 48 horas de culturas estimuladas com LPS na presença ou ausência da PMB está mostrada nas Figuras 2A e 2B, respectivamente. Comparados com culturas sem PMB, houve uma redução nos níveis de TNF pela adição deste antibiótico às culturas em todos os tempos avaliados. A média dos níveis de TNF diminuiu de 758 ± 815 pg/mL para $15,6 \pm 9,0$ pg/mL após 6 horas de cultura (97,9% de redução, $p=0,03$) e de 1481 ± 1489 pg/mL para 108 ± 175 pg/mL (92,7% de redução, $p=0,03$), 2124 ± 966 pg/mL para 35 ± 48 pg/mL (98,3% de redução, $p=0,06$) e 1253 ± 1145 pg/mL para 60 ± 104 pg/mL (95,2% de redução, $p=0,03$) em 12, 24 e 48 horas de cultura, respectivamente (Figura 2A). Adição de PMB também resultou em modulação da produção de IL-10 (Figura 2B). Os níveis médios de IL-10 em culturas sem PMB foram 301 ± 314 pg/mL, 503 ± 333 pg/mL e 308 ± 410 pg/mL em 12, 24 e 48 horas de cultura, e após a adição de PMB os níveis diminuíram para $15,6 \pm 9,5$ pg/mL ($p=0,06$), 26 ± 39 pg/mL ($p=0,03$) e $16 \pm 1,0$ pg/mL ($p=0,03$). As reduções na produção de IL-10 em culturas de 12, 24 e 48 horas representaram respectivamente 95%, 94,8 e 94,9%.

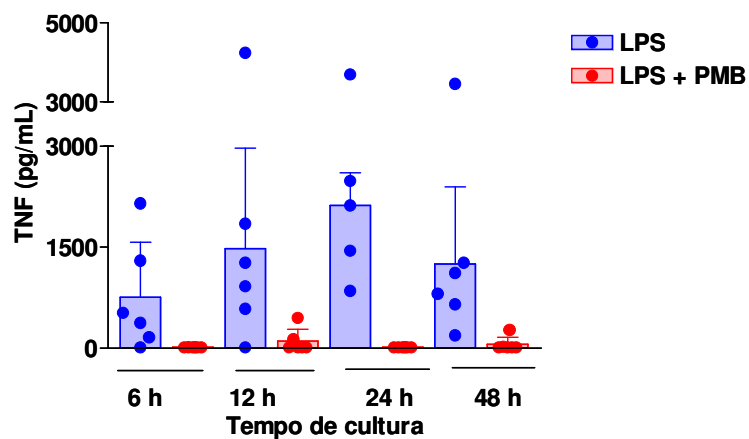


Figura 2A. Efeito da adição de Sulfato de Polimixina B (PMB) (30 μ g/mL) em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* na produção de TNF induzida pela estimulação com o LPS (0,15 ng/mL).

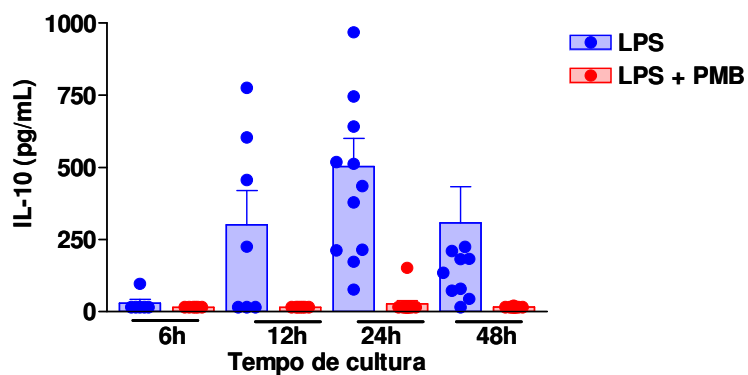


Figura 2B. Efeito da adição de PMB (30 μ g/mL) em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* na produção de IL-10 induzida pela estimulação com o LPS (0,15 ng/mL).

Diante da modulação da produção de TNF e IL-10 induzida pelo LPS pela adição de PMB às culturas, este antibiótico foi utilizado nas culturas estimuladas com os antígenos recombinantes de *S. mansoni*.

A produção de TNF e IL-10 induzidas pelos antígenos recombinantes de *S. mansoni* na presença ou ausência de PMB estão mostradas nas figuras 3A, 3B e 3C. Todas as proteínas recombinantes usadas neste estudo induziram altos níveis de TNF, como também induziram a produção de IL-10. A figura 3A mostra os níveis de produção de TNF e IL-10 em 6, 12, 24 e 48 horas de culturas estimuladas com a proteína recombinante Sm22.6, enquanto que as Figuras 3B e 3C mostram os níveis destas citocinas em culturas estimuladas com os antígenos Sm14 e P24, respectivamente. Foi observada redução variável nos níveis de TNF e IL-10 em todos os períodos avaliados, para todas as proteínas recombinantes utilizadas, entretanto não houve bloqueio completo da produção destas citocinas como observado quando o LPS foi utilizado.

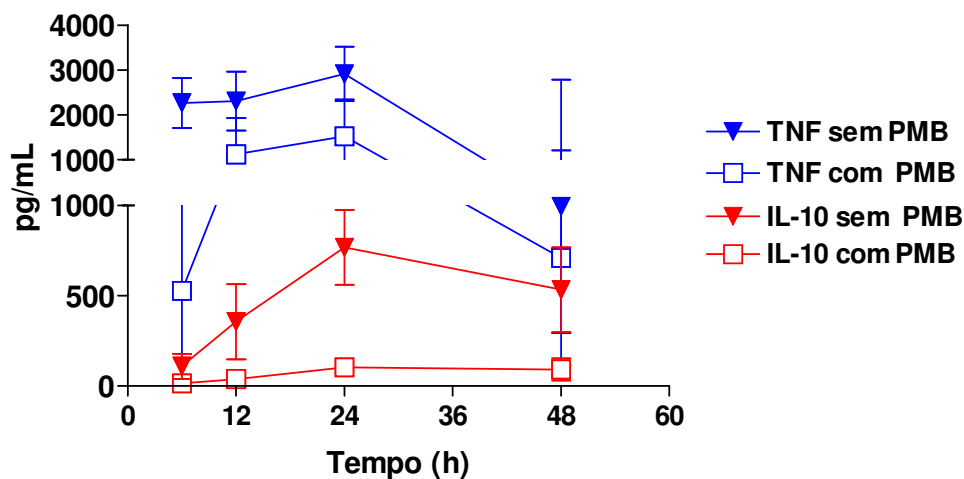


Figura 3A. Produção de TNF e IL-10 em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimulados *in vitro* com o antígeno recombinante de *S. mansoni* Sm22.6 (10 µg/mL). Os dados referem-se a produção desta citocina na ausência ou presença de Sulfato de Polimixina B (30 µg/mL) em culturas de 6, 12, 24 e 48 horas.

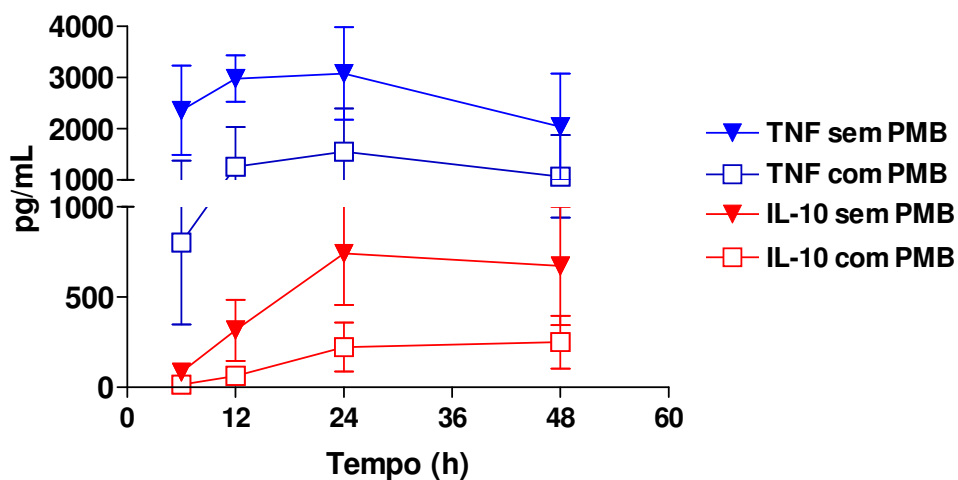


Figura 3B. Produção de TNF e IL-10 em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimulados *in vitro* com o antígeno recombinante de *S. mansoni* Sm14 (10 µg/mL). Os dados referem-se a produção desta citocina na ausência ou presença de Sulfato de Polimixina B (30 µg/mL) em culturas de 6, 12, 24 e 48 horas.

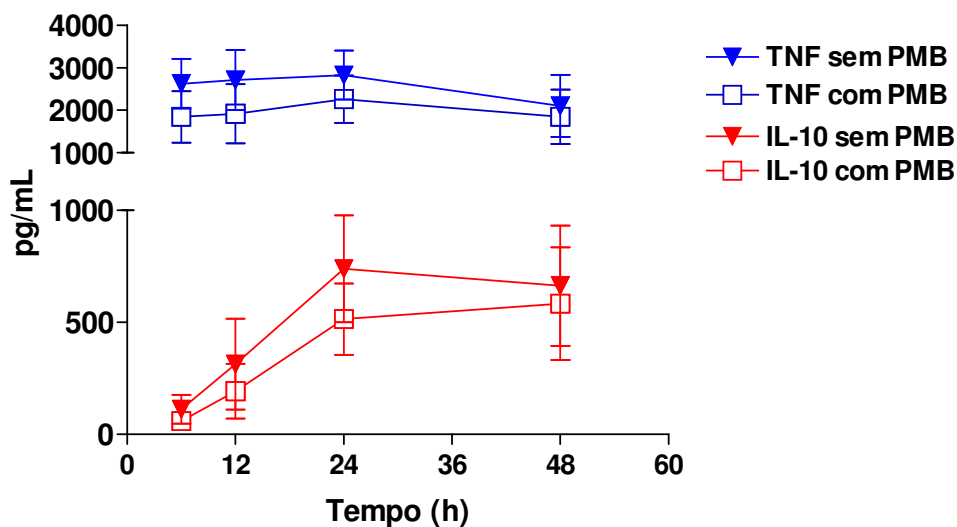


Figura 3C. Produção de TNF e IL-10 em CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimulados *in vitro* com o antígeno recombinante de *S. mansoni* P24 (10 µg/mL). Os dados referem-se a produção desta citocina na ausência ou presença de Sulfato de Polimixina B (30 µg/mL) em culturas de 6, 12, 24 e 48 horas.

Os níveis de TNF e IL-10 foram abaixo do limite de detecção, que foi de 15,6 pg/mL em culturas não estimuladas e nas estimuladas apenas com PMB ou com MBP. Quando as células foram estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) houve sempre produção de citocinas com concentrações variando de 1500 pg/mL a 4000 pg/mL para todas as citocinas avaliadas. A adição de PMB às culturas estimuladas com PHA não bloqueou a produção de citocinas por este antígeno (dados não mostrados).

A viabilidade das células não foi alterada pela adição de PMB, sendo de 98% nas culturas com e sem adição de PMB.

Foi adicionado PMB às culturas com os antígenos recombinantes a partir deste ponto do estudo em todos os experimentos.

6.2 Produção de Interleucina-10 por CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*

As figuras 4A, 4B e 4C mostram os níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, estimulados *in vitro* com os antígenos Sm22.6, Sm14, PIII, P24 e Sm29 de *S. mansoni*, além dos antígenos solúveis do verme adulto (SWAP) e do ovo (SEA), em culturas de 24 horas de incubação.

Foi observado que todos os antígenos avaliados neste trabalho induziram a produção de IL-10. Os antígenos PIII e P24 induziram os mais altos níveis desta citocina (541 ± 328 pg/mL; mediana= 590 pg/mL e 518 ± 343 pg/mL; mediana= 359 pg/mL, respectivamente) (Figura 4A).

A produção de IL-10 por células não estimuladas e estimuladas pelo SWAP e SEA na cultura de 24 horas foi baixa (48 ± 79 pg/mL, 72 ± 172 pg/mL e 63 ± 129 pg/mL, respectivamente) (Figura 4A).

A produção de IL-10 nas culturas de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* em culturas de 48 horas é mostrada na Figura 4B.

Comparando-se a produção de IL-10 nas culturas de 24 e 48 horas, observou-se que enquanto para o antígeno Sm22.6 os níveis foram aproximadamente 3 vezes maiores na cultura de 24 horas (158 ± 156 pg/mL; mediana= 122 pg/mL para 24 horas e 408 ± 514 pg/mL; mediana= 273 pg/mL

para 48 horas), não houve diferença significativa na produção de IL-10 induzida pelos antígenos Sm14, PIII, P24 e Sm29 ($p > 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis).

Os níveis de IL-10 em culturas de 48 horas não estimuladas, estimuladas com SWAP e com o SEA foram respectivamente 58 ± 118 pg/mL, 140 ± 291 pg/mL e 28 ± 34 pg/mL (Figura 4B).

A Figura 4C mostra a produção de IL-10 por CMSP estimuladas com os antígenos de *S. mansoni* avaliados neste trabalho em culturas de 72 horas. Todos os antígenos induziram a produção de IL-10, sendo os níveis desta citocina induzidos pelos antígenos Sm22.6 e PIII semelhantes aos observados nas culturas de 48 horas (304 ± 240 pg/mL; mediana= 167 pg/mL e 503 ± 304 pg/mL; mediana= 621 pg/mL, respectivamente; $p > 0,05$). Houve um aumento na produção de IL-10 nas culturas de 72 horas em relação às de 48 horas quando se utilizou os antígenos Sm14 (722 ± 353 pg/mL; mediana= 774 pg/mL para 72 horas e 401 ± 383 pg/mL; mediana= 203 pg/mL para 48 horas) e Sm29 (794 ± 206 pg/mL; mediana= 764 pg/mL e 371 ± 327 pg/mL; mediana= 284 pg/mL para 48 horas). Observou-se uma redução nos níveis de IL-10 em culturas estimuladas pelo P24, porém sem significância estatística ($p > 0,05$) (580 ± 468 pg/mL; mediana= 427 pg/mL em 48 horas para 474 ± 305 pg/mL; mediana= 590 pg/mL em 72 horas).

Em culturas estimuladas com o SWAP e SEA observou-se produção de IL-10 por CMSP de alguns indivíduos, sendo os níveis médios de 130 ± 159 pg/mL e 158 ± 206 pg/mL, respectivamente.

Figura 4A
S. mansoni – 24 horas

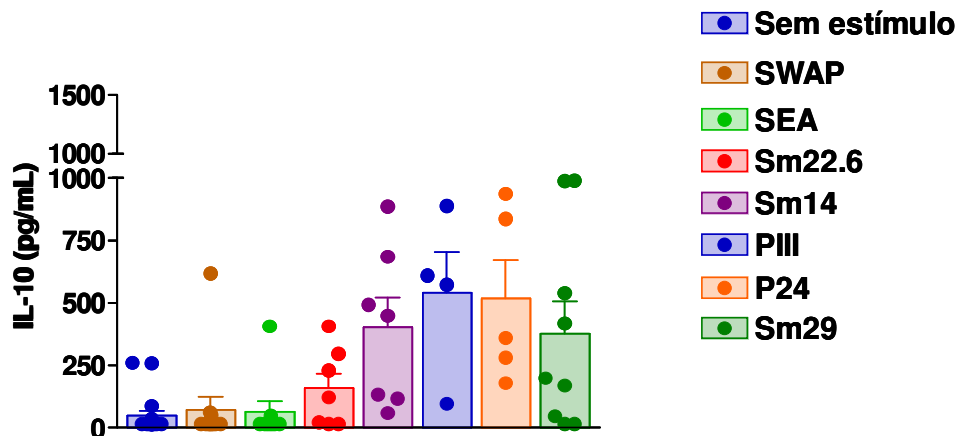


Figura 4B
S. mansoni – 48 horas

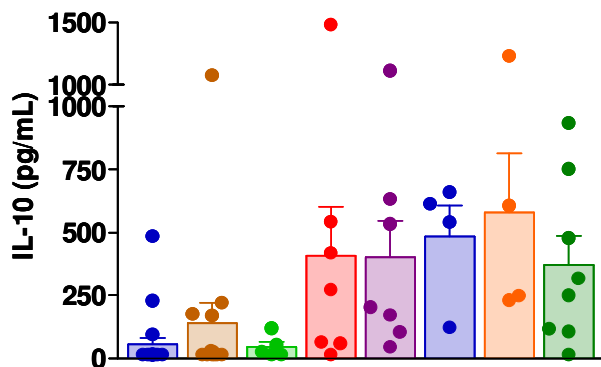
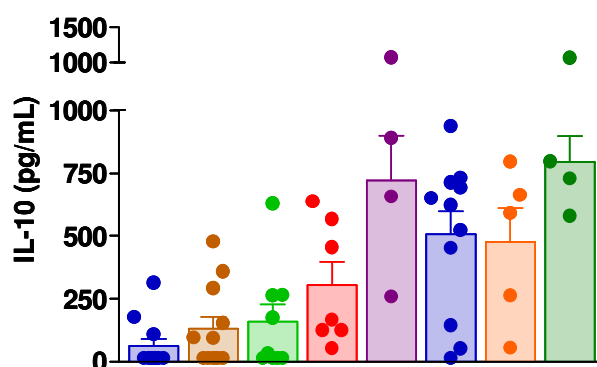


Figura 4C
S. mansoni – 72 horas



Figuras 4A, B e C. Níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimuladas *in vitro* com os antígenos de *S. mansoni* em culturas de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (A IL-10 foi dosada em sobrenadante de culturas utilizando-se a técnica de ELISA sanduíche). As concentrações são expressas em pg/mL e os resultados em médias \pm desvio padrão.

6.3 Produção de interleucina-10 por CMSP de indivíduos asmáticos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*

As Figuras 5A, 5B e 5C mostram os níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, estimulados *in vitro* pelos antígenos Sm22.6, Sm14, PIII, P24 e Sm29 de *S. mansoni*, além do SWAP e do SEA, em diferentes tempos de culturas (24, 48 e 72 horas).

Os níveis de IL-10 induzidos pelos antígenos avaliados em culturas de 24 horas foram mais elevados para os antígenos Sm14 (461 ± 449 pg/mL; mediana= 342 pg/mL), P24 (737 ± 463 pg/mL; mediana= 721 pg/mL) e o Sm29 (522 ± 416 pg/mL; mediana= 387 pg/ml).

Em culturas estimuladas com o SWAP, SEA e não estimuladas foram observados níveis médios de produção de IL-10 inferiores a 100 pg/mL (Figura 5A).

A Figura 5B mostra a produção de IL-10 por CMSP estimuladas com os antígenos de *S. mansoni* em culturas de 48 horas. Todos os antígenos avaliados (Sm22.6, Sm14, PIII, P24 e Sm29) induziram a produção de IL-10 em asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, sendo a produção mais elevada em culturas estimuladas com os antígenos P24 e Sm29 (737 ± 463 pg/mL; mediana= 727 pg/mL e 522 ± 416 pg/mL; mediana= 387 pg/mL, respectivamente).

Os níveis de IL-10 não diferiram significativamente com relação às culturas de 24 horas ($p > 0,05$; Teste pareado de Wilcoxon).

Os níveis de IL-10 em culturas estimuladas com SWAP (32 ± 62 pg/mL; mediana 15,6 pg/mL), SEA (17 ± 3 pg/mL; mediana 15,6 pg/mL) e sem estímulo (24 ± 40 pg/mL; mediana 15,6 pg/mL) ficaram próximos ao limite inferior de detecção (15,6 pg/mL).

A produção de IL-10 nas culturas de indivíduos asmáticos infectados pelo *S. mansoni* em culturas de 72 horas é mostrada na figura 5C. Os níveis desta citocina foram semelhantes para todos os antígenos avaliados, sendo o mais alto observado nas culturas estimuladas com o Sm14 (529 ± 134 pg/mL; mediana= 489 pg/mL) e mais baixo para o Sm22.6 (340 ± 179 pg/mL; mediana= 329 pg/mL).

Figura 5A
S. mansoni + Asma – 24 horas

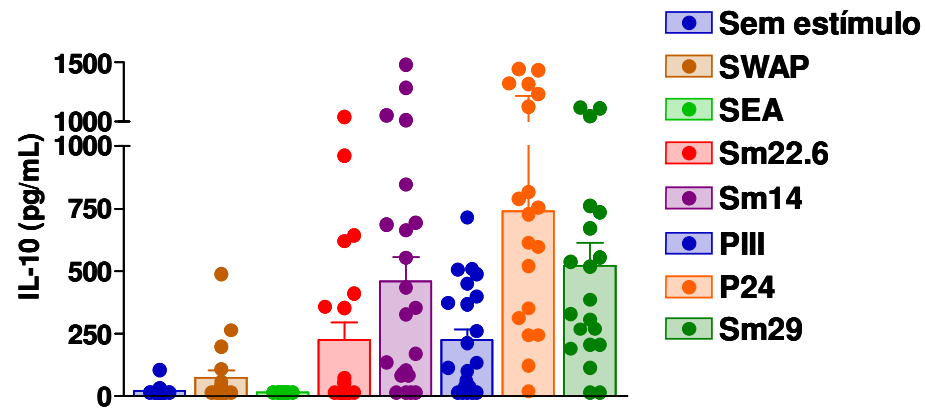


Figura 5B
S. mansoni + Asma – 48 horas

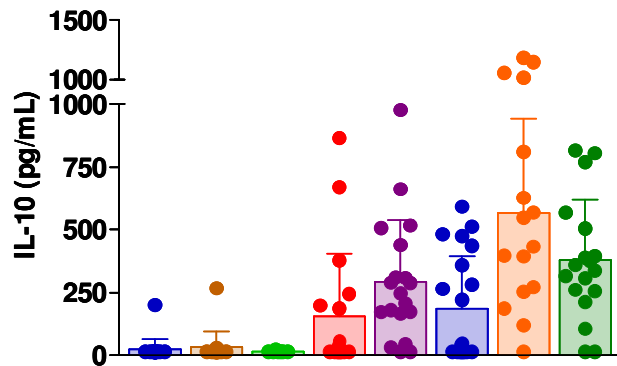
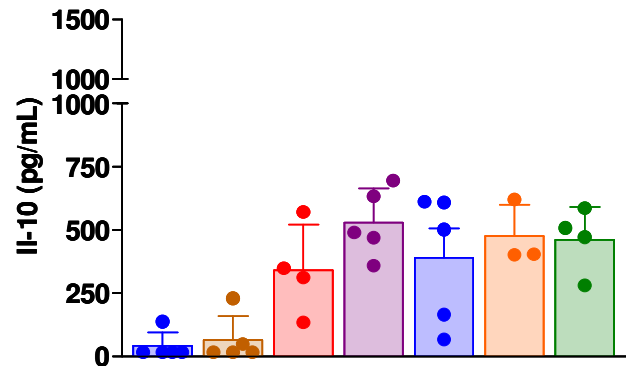


Figura 5C
S. mansoni + Asma – 72 horas



Figuras 5A, B e C. Níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimuladas *in vitro* com os antígenos de *S. mansoni* em culturas de 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

6.4 Produção de interleucina 10 por CMSP de asmáticos não infectados pelo *S. mansoni*

As figuras 6A, 6B e 6C mostram os níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos não infectados pelo *S. mansoni*, estimulados *in vitro* pelos antígenos Sm22.6, Sm14, PIII, P24 e Sm29 de *S. mansoni*, além do SWAP e do SEA. Todos os antígenos induziram altos níveis de IL-10, sendo que o P24 e o Sm29 induziram os maiores níveis desta citocina (828 ± 415 pg/mL; mediana= 730 pg/mL e 891 ± 213 pg/mL; mediana= 925 pg/mL). A produção de IL-10 induzida pelo SEA e pelo SWAP e sem estímulo foram baixas, sendo as medianas 15,6 pg/mL para todas as três condições.

A figura 6B mostra a produção de IL-10 estimulada pelos antígenos de *S. mansoni* em 48 horas. A produção de IL-10 para todos os antígenos pesquisados foi semelhante neste período. Os níveis de IL-10 para os antígenos P24 e Sm29 foram respectivamente 32% e 23% mais baixos que os observados em 24 horas.

Apenas a produção de IL-10 estimulada pelo antígeno PIII aumentou em relação a 24 horas, passando de 483 ± 263 pg/mL; mediana= 578 pg/mL para 572 ± 277 pg/mL; mediana= 633, sendo este aumento considerado não significativo estatisticamente ($p > 0,05$; Teste pareado de Wilcoxon).

Nas culturas de 72 horas foi observado que os níveis de IL-10 reduziram em relação aos tempos de 24 horas para todos os antígenos avaliados, a exceção do Sm29 que, em média, manteve-se constante (891 ± 213 pg/mL em 24 horas, 681 ± 501 pg/mL em 48 horas e 618 ± 191 pg/mL em 72 horas).

A produção de IL-10 induzida pelas culturas não estimuladas e estimuladas pelo SWAP e pelo SEA mantiveram-se baixas em todos os períodos avaliados (medianas 15,6 pg/mL para todos os períodos) (Figura 6C).

PHA foi utilizada nas culturas de todos os antígenos e nos tempos avaliados, tendo sido observado alta produção de IL-10 (concentrações médias acima de 1500 pg/mL) em todos os grupos (dados não mostrados).

Figura 6A
Asma – 24 horas

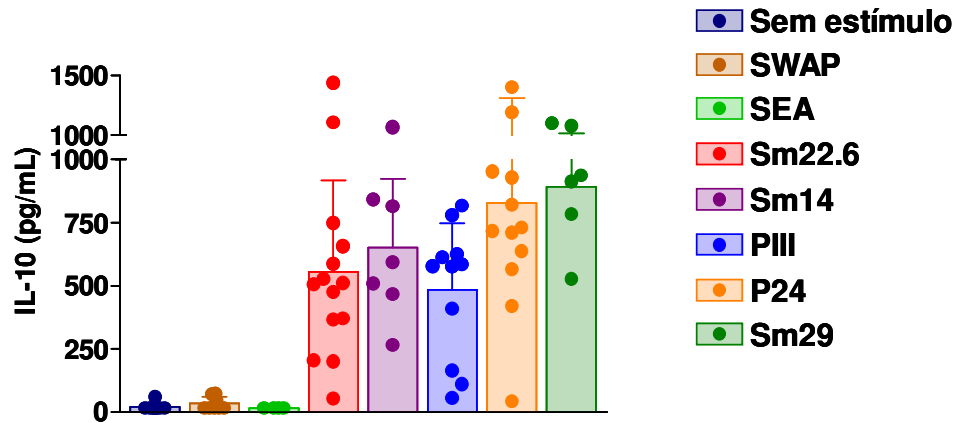


Figura 6B
Asma – 48 horas

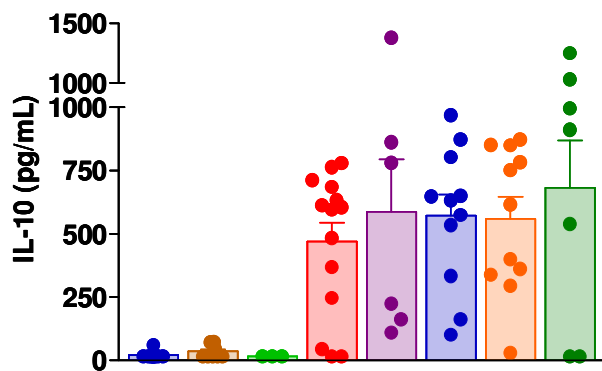
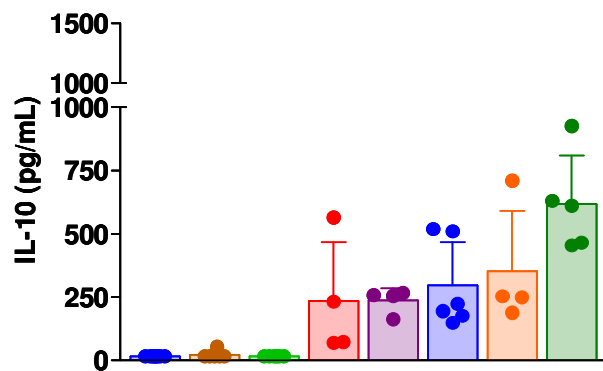


Figura 6C
Asma – 72 horas



Figuras 6A, B e C. Níveis de IL-10 produzidos por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos asmáticos não infectados pelo *S. mansoni* estimuladas *in vitro* com os antígenos de *S. mansoni* em culturas de 24 horas

6.5 Cinética da produção de IL-10 por CMSP nos grupos estudados

As Figuras 7A, 7B e 7C mostram, em resumo as cinéticas de produção de IL-10 por CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, não asmáticos e asmáticos e por indivíduos asmáticos não infectados, respectivamente. Os pontos representam as médias das concentrações de IL-10 (pg/mL). Enquanto que os níveis de IL-10 permaneceram estáveis ou aumentaram com o tempo em cultura nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (Figura 7A), nos indivíduos asmáticos não infectados houve uma diminuição da produção desta citocina nas culturas de 48 e 72 horas (figura 7C). Em asmáticos infectados os níveis de IL-10 diminuíram após 48 horas de cultura, voltando a se elevar após 72 horas (Figura 7B).

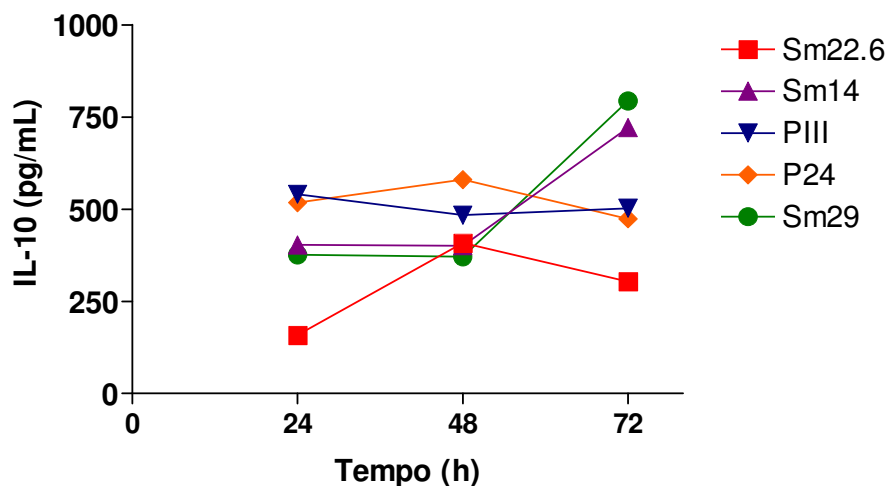


Figura 7A. Cinética de produção de IL-10 por células de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimulados *in vitro* com os antígenos de *S. mansoni* avaliados neste estudo

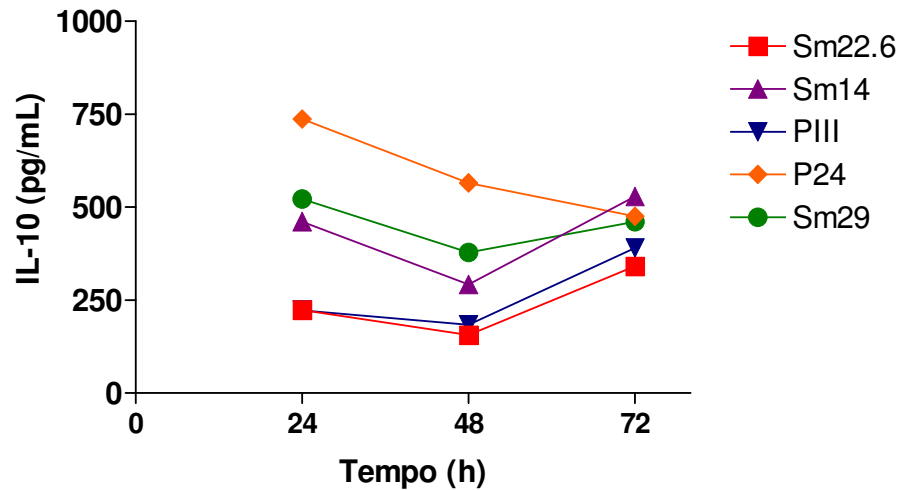


Figura 7B. Cinética de produção de IL-10 por células de indivíduos asmáticos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimulados *in vitro* com os antígenos de *S. mansoni* avaliados neste estudo

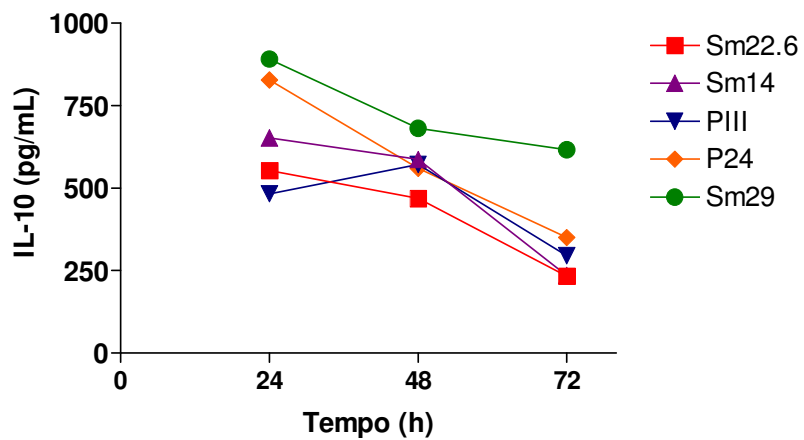


Figura 7C. Cinética de produção de IL-10 por células de indivíduos asmáticos não infectados pelo *S. mansoni* estimulados *in vitro* com os antígenos de *S. mansoni* avaliados neste estudo

6.6 Produção de Interferon- γ , Interleucina-5 e Interleucina-13 por CMSP estimuladas com os antígenos de *S. mansoni*

Foram avaliadas as produções de IFN- γ e IL-5 por CMSP de indivíduos asmáticos infectados ou não pelo *S. mansoni*.

As figuras 8A, 8B e 8C mostram a produção de IFN- γ nos três grupos avaliados. A produção desta citocina foi, de um modo geral, baixa em todos os grupos e com todos os antígenos avaliados, sendo que os antígenos P24 e Sm29 foram os que induziram níveis mais elevados de IFN- γ .

Figura 8A
S. mansoni

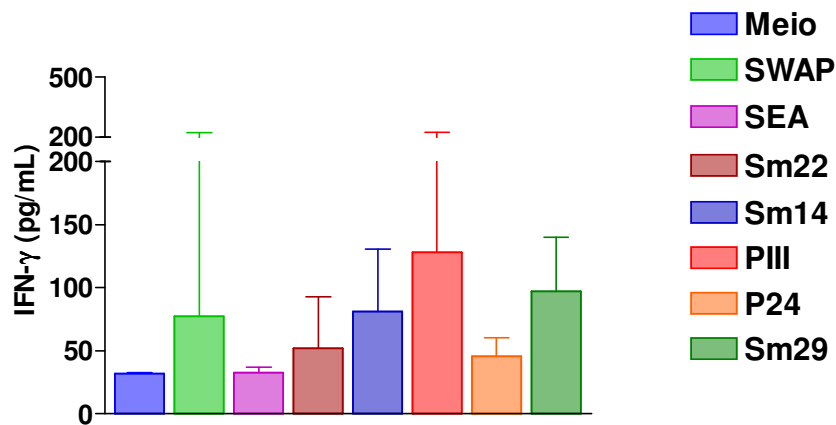


Figura 8B
S. mansoni + Asma

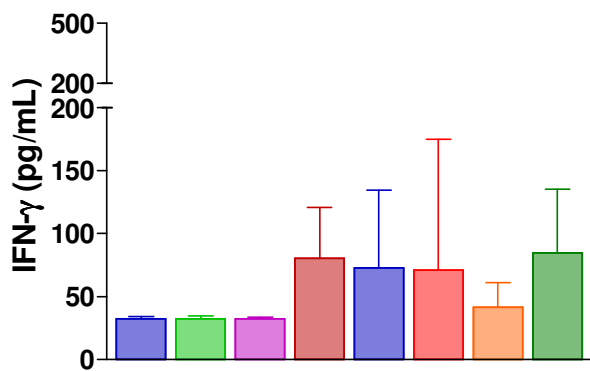


Figura 8C
Asma

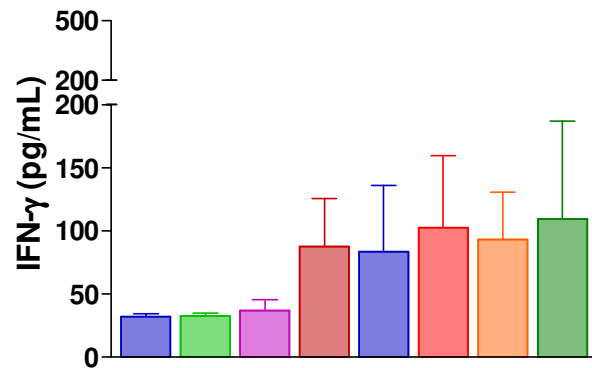
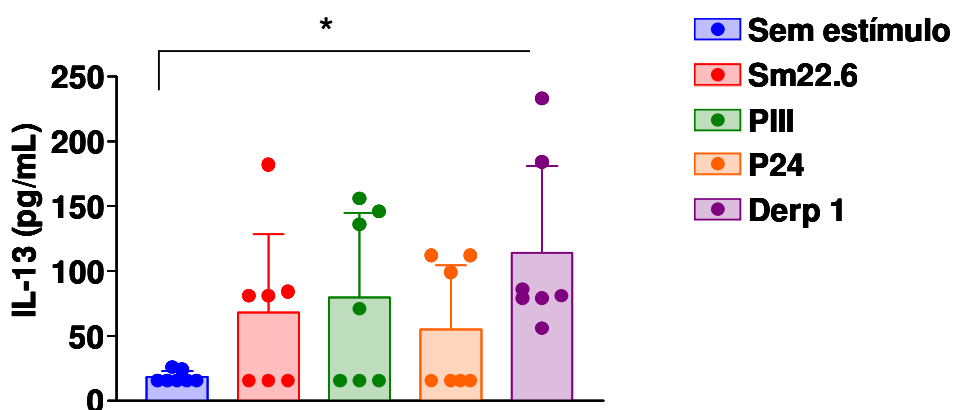


Figura 8A, B e C. Níveis de IFN- γ (pg/mL) produzidos por CMSP de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, asmáticos ou não e asmáticos não infectados, respectivamente, estimuladas *in vitro* com os antígenos de *S. mansoni* em culturas de 72 horas (n=9).

Os níveis de IL-5 ficaram abaixo do limite de detecção (15,6 pg/mL) em culturas de células de indivíduos asmáticos estimuladas por todos os antígenos (não mostrado). Nas culturas estimuladas com Der p1 a concentração desta citocina foi 198 ± 319 pg/mL.

A produção de IL-13 também foi avaliada em células de asmáticos não infectados estimuladas pelos antígenos PIII, Sm22.6 e P24 (Figura 9). As concentrações desta citocina foram 81 ± 67 pg/mL, 68 ± 60 pg/mL e 55 ± 49 pg/mL, para os três antígenos respectivamente. Em culturas estimuladas com o Der p1 observou-se mais elevada concentração de IL-13 (114 ± 67 pg/mL), porém sem significância estatística ($p > 0,05$). Quando comparado com a cultura não estimulada, a concentração de IL-13 foi significativamente maior apenas na cultura estimulada com Der p1 ($p < 0,05$).



* $P < 0,05$

Figura 9. Níveis de IL-13 (pg/mL) produzidos por CMSP de indivíduos asmáticos não infectados pelo *S. mansoni* estimuladas *in vitro* com os antígenos PIII, Sm22.6 e P24 de *S. mansoni* em culturas de 72 horas ($n=7$; Teste de Kruskal-Wallis).

6.7 Efeito da adição de antígenos de *S. mansoni* sobre a produção de IL-10 induzida pelo Der p1

As Figuras 10A, 10B e 10C mostram o efeito da adição dos antígenos PIII, P24 e Sm22.6 do *S. mansoni* na produção de IL-10 por CMSP de asmáticos não infectados (n=7) estimulados com o antígeno 1 de *Dermatophagoides pteronissinus* (Der p1).

Foi observado que a adição dos antígenos PIII, rP24 e rSm22.6 resultou no aumento da produção de IL-10 por células de asmáticos não infectados (Figuras 10A, B e C, respectivamente).

Figura 10A
P111

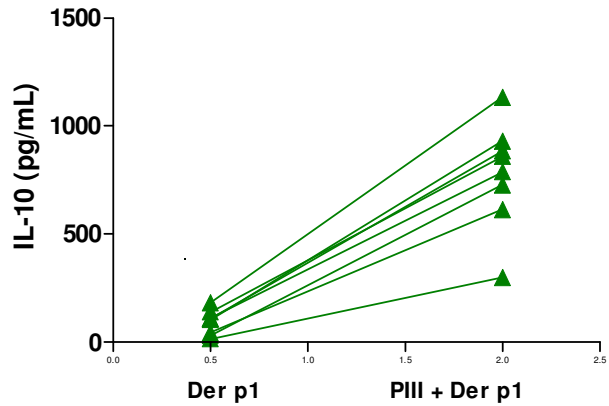


Figura 10B
Sm22.6

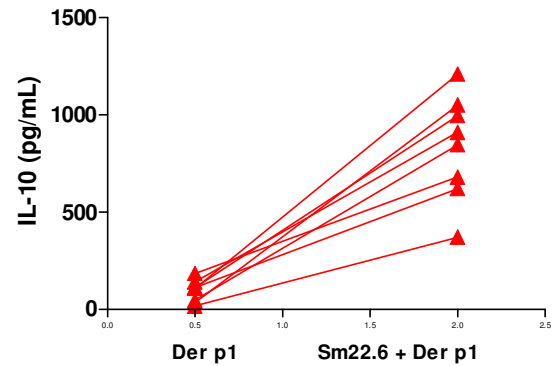


Figura 10C
P24

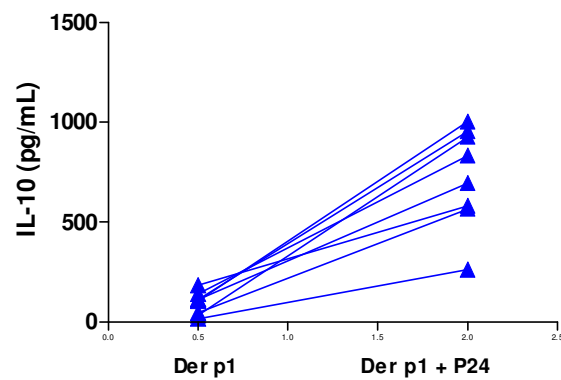


Figura 10A, B e C. Níveis de IL-10 em culturas de CMSP de asmáticos não infectados estimuladas com Der p1 na presença ou ausência dos antígenos P111, Sm22.6 e P24, respectivamente. Culturas de 48 horas, n=7; p<0,05; Teste pareado de Wilcoxon.

7. DISCUSSÃO

Estudos vêm demonstrando que a infecção pelo *Schistosoma mansoni* previne a atopia (Araujo e cols. 2000; van den Biggelaar e cols. 2001; Medeiros e cols. 2003) e o desenvolvimento de doenças auto-imunes (Cooke e cols. 1999; La Flamme e cols. 2003). Estes estudos sugerem que a IL-10 possa estar envolvida no processo de modulação da resposta imune exacerbada observada nestas doenças. No presente estudo, os antígenos de *S. mansoni* Sm14, Sm22.6, Sm29, P24 e PIII induziram a produção de IL-10 por células de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e também por células de asmáticos não infectados.

Células de indivíduos asmáticos produzem baixos níveis de IL-10 quando estimuladas com o Derp p1 (Araujo e cols. 2004), e no presente estudo foi demonstrado que células destes indivíduos também produzem baixos níveis de IL-10 quando estimuladas com o LPS, concordando com os achados de Borish e colaboradores (Borish e cols. 1996). Entretanto foi observada produção desta citocina quando células de asmáticos foram estimuladas *in vitro* com os antígenos de *S. mansoni*.

Antígenos de *S. mansoni* induzem a produção de IL-10 (Gazzinelli e cols. 1992; Williams e cols. 1994; Araujo e cols. 1996; Finkelman e cols. 1997; Mwatha e cols. 1998) e existem evidências de que a IL-10 modula a resposta imune envolvida na patogênese das doenças alérgicas (Royer e cols. 2001; Araujo e cols. 2004). Outros estudos também demonstram que a IL-10 tem papel protetor na asma, sendo produzida em pacientes que se beneficiam com o uso da imunoterapia com alérgenos (Akdis e cols. 1998) e com corticosteróides inalatórios (John e cols. 1998). Estes achados justificariam a busca da

identificação de antígenos de *S. mansoni* capazes de induzir a produção de IL-10 por células de asmáticos, na tentativa de futuro desenvolvimento de uma vacina capaz de prevenir a asma. Os medicamentos disponíveis para o controle da asma levam a efeitos colaterais muitas vezes importantes e o tratamento tardio está associado com o maior grau de irreversibilidade das vias aéreas (Seiroos e cols. 1995), embora não haja comprovação de que o tratamento farmacológico, mesmo introduzido precocemente, seja capaz de impedir o declínio da função pulmonar.

A escolha dos antígenos de *S. mansoni* Sm22.6, Sm14, PIII, P24 e Sm29 para serem utilizados neste estudo decorreu do fato de todos eles serem localizados na membrana e/ou tegumento do verme adulto. Proteínas secretadas ou localizadas na superfície de *Schistosoma sp*, que estão em íntimo contato com os tecidos do hospedeiro são mais eficazes em desencadear processos imunorregulatórios, possivelmente como mecanismo de escape do sistema imune (Simpson e cols. 1990). A maioria dos antígenos associados à membrana presentes no tegumento do *S. mansoni* não apresenta reatividade cruzada com antígenos do ovo, os quais estão envolvidos na imunopatologia associada a esta doença (Simpson e cols. 1990). Adicionalmente, contribuiu para a escolha destes antígenos a capacidade dos mesmos em induzirem a produção de IL-10 por células de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* (Brito e cols. 2000; Al-Sherbiny e cols. 2003; Pacifico e cols. 2005).

Quatro dos antígenos utilizados neste trabalho são proteínas recombinantes. Sabe-se que o uso das proteínas recombinantes em imunologia representa uma importante ferramenta na pesquisa. Essas proteínas têm sido utilizadas para compreensão dos mecanismos de resistência e susceptibilidade do hospedeiro

para doenças parasitárias e possuem o potencial para serem usadas como vacinas.

A produção da maioria das proteínas recombinantes é feita através da clonagem em vetores de *Escherichia coli* contendo o cDNA com o plasmídeo para a proteína desejada. Uma limitação comum deste processo é a contaminação da proteína recombinante com endotoxina (Salek-Ardakani e cols. 2002). A presença do LPS, mesmo em pequenas concentrações, é capaz de induzir a produção de TNF e IL-10 (Gao e cols. 2003a; Gao e cols. 2003b). A IL-10 é uma importante citocina reguladora da resposta inflamatória que deve surgir neste caso para modular os efeitos do TNF (Gerard e cols. 1993).

Muitos trabalhos publicados até o momento utilizando proteínas recombinantes clonadas em *E. coli* não chamam atenção para o fato de que a indução da resposta imune por estas proteínas pode ser, em grande parte, devido à contaminação com o LPS.

Existem alguns métodos de purificação de proteínas contaminadas com o LPS, mas com limitada eficácia (Salek-Ardakani e cols. 2002). O peptídeo natural Polimixina B é um potente antibiótico que liga e neutraliza o LPS, prevenindo desta forma o choque séptico (Corrigan e cols. 1971; Corrigan e cols. 1979). A adição de PMB às culturas de macrófagos murinos mostrou ser capaz de bloquear a produção de TNF pelos macrófagos estimulados pelo LPS presente como contaminante em proteínas recombinantes (Gao e cols. 2003a; Gao e cols. 2003b).

Inicialmente foi avaliado neste estudo o efeito da PMB em modular a produção de TNF e IL-10 em culturas de células de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni* estimuladas pelo LPS. Foi escolhida a concentração

de 0,15 ng/mL de LPS para estimular as células *in vitro* pois esta foi a média das concentrações de LPS encontradas nas proteínas recombinantes avaliadas e, a concentração de 30µg/mL de PMB para o bloqueio da ação do LPS, com base em estudo que demonstrou que esta concentração foi suficiente para bloquear a ação de até 50 ng de LPS (Vabulas e cols. 2001).

O uso de PMB em culturas estimuladas com o LPS aboliu completamente a produção tanto do TNF quanto da IL-10. Nas culturas estimuladas com os antígenos Sm22.6, Sm14 e P24 mesmo com a adição de PMB não se observou bloqueio total da produção destas citocinas, sugerindo serem estes antígenos capazes de induzir a produção de IL-10 e TNF por células de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*. A partir destes achados todos os ensaios com proteínas recombinantes foram realizados na presença de PMB.

Os antígenos de *S. mansoni*, Sm22.6, Sm14, PIII, P24 e Sm29 estimularam a produção de IL-10 não apenas por células de indivíduos cronicamente infectados pelo *S. mansoni*, mas de asmáticos não infectados. Enquanto que os antígenos SWAP e SEA só induziram a produção de IL-10 nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*.

Foram observadas baixas produções de IL-5, IL-13 e IFN- γ nas culturas de células destes indivíduos estimuladas pelos antígenos de *S. mansoni*, o que é uma vantagem, considerando que estas citocinas estão relacionadas à patogénia da asma.

Avaliando-se a cinética de produção de IL-10, observou-se que, nos grupos de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* a produção desta citocina foi maior na cultura de 72 horas, quando comparada com a de 24 horas, quando foram utilizados os antígenos Sm22.6, Sm14 e Sm29. As concentrações de IL-10 foram

semelhantes nestes dois tempos de cultura quando as células foram estimuladas com os antígenos PIII e P24. Embora em menores proporções, os antígenos Sm22.6 e Sm14, além do PIII, também induziram maior produção de IL-10 no tempo de 72 horas de cultura de células de asmáticos infectados pelo *S. mansoni*, enquanto que para o Sm29 não houve mudança no padrão de indução de IL-10 e para o P24 houve uma diminuição de produção desta citocina na cultura de 72 horas.

Diferente do observado para as culturas de células de indivíduos infectados houve uma maior produção de IL-10 em culturas de 24 horas, quando comparadas com as de 72 horas, em culturas de células de asmáticos não infectados, para todos os antígenos avaliados neste estudo. Isso sugere que a IL-10 deve ter sido produzida por células da resposta imune inata ou células regulatórias nestes indivíduos.

Sabe-se que na infecção pelo *S. mansoni* a IL-10 é produzida tanto por células da resposta imune inata, quanto por células T específicas e células regulatórias (Hesse e cols. 2004), o que poderia justificar a ausência de uniformidade nos tempos de indução desta citocina pelos diferentes antígenos do parasita no grupo de infectados.

Algumas das recém descritas células regulatórias, as células TCD4⁺CD25⁺ e T regulatória 1 (Tr1), são produtoras de altas concentrações de IL-10 (Asano e cols. 1996; Francis e cols. 2003). Em modelo experimental de asma, foi observado que tanto para o desenvolvimento quanto para a função das células T regulatórias é necessário a presença de IL-10 e da co-estimulação envolvendo ICOS, um membro da família CD28 (Akbari e cols. 2002). Além disso, células T regulatórias induzidas pela exposição das células dendríticas a alérgenos produzem IL-10 e

expressam altos níveis de ICOS ligante que, potencialmente, inibem o desenvolvimento de inflamação das vias aéreas e a hiperreatividade brônquica em modelo experimental de asma (Akbari e cols. 2002).

Enquanto que existem vários estudos avaliando as funções das células regulatórias nas alergias, pouco se conhece sobre as funções destas células nas infecções por helmintos. Na esquistossomose experimental, células T regulatórias produtoras de IL-10 reduzem a morbidade da doença e prolongam a sobrevivência do parasita (Hesse e cols. 2004; McKee e cols. 2004). Certamente estas células devem participar da modulação da resposta imune no sentido de permitir a sobrevivência do hospedeiro e perpetuação do parasita.

Em 1989 Charles Janeway demonstrou que o sistema imune inato pode reconhecer padrões moleculares (PAMPs) conservados em múltiplos patógenos (Janeway 1989). Este trabalho encontrou apoio no estudo que identificou glicolípídeos (GLS) e lisofosfatidilserina (lyso PS) como moléculas capazes de ativar células do sistema imune inato pela ligação de PAMPs aos receptores “Toll-like” 2 (TLR-2) (van der Kleij e cols. 2002). O papel de PAMPs derivados do *S. haematobium* tem sido avaliados em indivíduos não primados e em indivíduos cronicamente infectados pelo parasita. Nos indivíduos infectados observou-se uma resposta a estes antígenos com baixa produção de citocinas, ao passo que naqueles não infectados houve uma alta produção de citocinas em resposta a estimulação antigênica (Yazdanbakhsh e cols. 2001). Estes resultados indicam que a exposição crônica aos helmintos pode afetar a responsividade celular aos PAMPs derivados destes parasitas (van der Kleij e cols. 2004).

Outros estudos demonstraram que o TLR-4 é necessário para o desenvolvimento da resposta imune do tipo Th2. Células TCD4⁺ de camundongos

cujas células dendríticas são deficientes em TLR-4 produzem baixos níveis de IL-4 e IL-5 após estimulação, e diminuem a inflamação *in vitro* quando administradas no pulmão de camundongos. Isto deveu-se a inabilidade destas células em maturar e induzir a resposta Th2 (Dabbagh e cols. 2002; Dabbagh e cols. 2003).

O antígeno LNFP III, um carboidrato encontrado no SEA, promove a resposta Th2 *in vivo* e, conjugado a um adjuvante como a albumina humana (HSA), promove o recrutamento de macrófagos moduladores (Okano e cols. 2001). O antígeno LNFP III-Dex, definido como um PAMP, dirige *in vitro* a diferenciação de células dendríticas não primadas para o tipo 2 (CD2), por uma via dependente de TLR-4 e independente da sinalização pelo MyD88, mecanismo diferente do induzido pelo LPS (Thomas e cols. 2003). Mecanismos semelhantes talvez possam explicar o fato de células de asmáticos não infectados terem produzido IL-10 em resposta aos antígenos de *S. mansoni* e não em resposta ao LPS. Não se pode, entretanto afastar a hipótese de que as células destes indivíduos estariam reconhecendo antígenos do *S. mansoni* através de reações cruzadas com outros antígenos presentes no lúmen intestinal, o que levaria ao desenvolvimento de células regulatórias.

Em apoio aos achados deste trabalho que observou produção de IL-10 por células de asmáticos não infectados, foi demonstrado que o antígeno de *S. mansoni*, fosfatidilserina (PS), mas não o antígeno solúvel do ovo, SEA estimulou o TLR-2 em indivíduos não primados (van der Kleij e cols. 2002), o que reforça a suposição de que a IL-10 produzida em resposta à estimulação dos antígenos de *S. mansoni* no presente estudo pode ter decorrido via estimulação de TLR-2.

Existem poucos dados na literatura avaliando o papel dos receptores “Toll-like” no reconhecimento de proteínas. Vabulas e colaboradores, em 2001,

demonstraram que a proteína HSP60 é reconhecido pelo TLR-2 (Vabulas e cols. 2001).

Existe grande homologia entre epítomos de alguns antígenos nas diferentes espécies de *Schistosoma* e até entre outros parasitas, a exemplo do Sm14 do *S. mansoni* com o Fh15 da *F. hepatica*. Estas homologias poderiam representar uma forma de “padrões” para o reconhecimento pelo sistema imune inato do hospedeiro de proteínas destes parasitas.

Estudos como o realizado neste trabalho que avaliam o potencial de antígenos parasitários em induzir mecanismos modulatórios da resposta inflamatória alérgica, fornecerão subsídios para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de doenças que cursam com a ativação excessiva ou inapropriada da resposta imune (Goodridge e cols. 2005).

8. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- 1) Os antígenos de *S. mansoni* avaliados neste estudo (P111, rSm22.6, rP24, rSm14 e rSm29) induziram a produção da Interleucina-10 *in vitro* por células mononucleares de sangue periférico de asmáticos não infectados pelo *Schistosoma mansoni*, sendo o P24 e o Sm29 os maiores indutores da produção de IL-10 por células destes indivíduos;
- 2) A indução de IL-10 foi observada também por células de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, asmáticos ou não;
- 3) Não foi observada a produção de IL-10 quando as células de asmáticos não infectados foram estimuladas com o SWAP, SEA e com o LPS;
- 4) Os antígenos avaliados não induziram a produção de IL-5 e induziram baixos níveis de IL-13 e IFN- γ por células de asmáticos não infectados;
- 5) A adição dos antígenos P111, Sm22.6 e P24 às culturas de células de asmáticos não infectados estimuladas pelo Der p1 resultou em aumento nos níveis IL-10.

9. CONCLUSÕES

Os antígenos Sm22.6, Sm14, P111, P24 e Sm29 de *S. mansoni* avaliados induzem IL-10 e baixas produções de IL-5, IL-13 e IFN- γ por células de asmáticos, podendo ser utilizados futuramente na prevenção e tratamento de doenças alérgicas.

10. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

1. Caracterizar a resposta imunológica específica para os antígenos recombinantes de *S. mansoni* indutores de IL-10 (Sm22.6, P24 e PIII) *in vitro* por células de indivíduos asmáticos, através da avaliação da produção de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e anti-inflamatórias (TGF- β e IL-10);
2. Avaliar a capacidade dos antígenos de *S. mansoni* PIII, Sm22.6 e P24 em modularem a resposta imune *in vitro*, específica para aeroalérgeno (a produção de IL-4, IL-5 e IL-13) em indivíduos asmáticos não infectados pelo *S. mansoni*;
3. Identificar os fenótipos das células produtoras de IL-10 em culturas estimuladas com os antígenos de *S. mansoni* nos asmáticos não infectados;
4. Testar os antígenos recombinantes do *S. mansoni* Sm22.6, P24 e o PIII com relação a capacidade de modular a hiperreatividade brônquica em camundongos sensibilizados e desafiados com ovalbumina.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2002). "Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity." Nat Med **8**(9): 1024-32.
- Akdis, C. A., T. Blesken, M. Akdis, B. Wuthrich and K. Blaser (1998). "Role of interleukin 10 in specific immunotherapy." J Clin Invest **102**(1): 98-106.
- Akdis, C. A. and K. Blaser (2001). "Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression." Immunology **103**(2): 131-6.
- Akdis, C. A., A. Joss, M. Akdis and K. Blaser (2001). "Mechanism of IL-10-induced T cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens." Int Arch Allergy Immunol **124**(1-3): 180-2.
- Al-Sherbiny, M., A. Osman, R. Barakat, H. El Morshedy, R. Bergquist and R. Olds (2003). "In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens." Acta Trop **88**(2): 117-30.
- Araujo, M. I., A. R. de Jesus, O. Bacellar, E. Sabin, E. Pearce and E. M. Carvalho (1996). "Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis." Eur J Immunol **26**(6): 1399-403.
- Araujo, M. I., A. A. Lopes, M. Medeiros, A. A. Cruz, L. Sousa-Atta, D. Sole and E. M. Carvalho (2000). "Inverse association between skin response to aeroallergens and *Schistosoma mansoni* infection." Int Arch Allergy Immunol **123**(2): 145-8.
- Araujo, M. I., B. Hoppe, M. Medeiros, Jr., L. Alcantara, M. C. Almeida, A. Schriefer, R. R. Oliveira, R. Kruschewsky, J. P. Figueiredo, A. A. Cruz and E. M. Carvalho (2004). "Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma." J Infect Dis **190**(10): 1797-803.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (1996). "Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation." J Exp Med **184**(2): 387-96.
- Bergquist, R. (1990). "Prospects of vaccination against schistosomiasis." Scand J Infect Dis Suppl **76**: 60-71.

- Bergquist, N. R. (1998). "Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects." Mem Inst Oswaldo Cruz **93 Suppl 1**: 95-101.
- Bina, J. C. (1997). "Estudo de variáveis que podem influenciar na evolução da esquistossomose mansônica: efeito da terapêutica específica e da interrupção da transmissão." Rev. Patol. Trop. **26**: 69-128.
- Bina, J. C. and A. Prata (2003). "[Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I- *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms]." Rev Soc Bras Med Trop **36**(2): 211-6.
- Borish, L., A. Aarons, J. Rumbly, P. Cvietusa, J. Negri and S. Wenzel (1996). "Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma." J Allergy Clin Immunol **97**(6): 1288-96.
- Brito, C. F., I. R. Caldas, P. Coura Filho, R. Correa-Oliveira and S. C. Oliveira (2000). "CD4+ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein." Scand J Immunol **51**(6): 595-601.
- Brito, C. F., G. C. Oliveira, S. C. Oliveira, M. Street, S. Riengrojpitak, R. A. Wilson, A. J. Simpson and R. Correa-Oliveira (2002). "Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm." Braz J Med Biol Res **35**(3): 377-81.
- Busse, W. W. and R. F. Lemanske, Jr. (2001). "Asthma." N Engl J Med **344**(5): 350-62.
- Butterworth, A. E., A. J. Curry, D. W. Dunne, A. J. Fulford, G. Kimani, H. C. Kariuki, R. Klumpp, D. Koech, G. Mbugua, J. H. Ouma and et al. (1994). "Immunity and morbidity in human schistosomiasis mansoni." Trop Geogr Med **46**(4): 197-208.
- Capron, A., J. P. Dessaint, M. Capron, J. H. Ouma and A. E. Butterworth (1987). "Immunity to schistosomes: progress toward vaccine." Science **238**(4830): 1065-72.
- Capron, A., G. Riveau, J. M. Grzych, D. Boulanger, M. Capron and R. Pierce (1995). "Development of a vaccine strategy against human and bovine

- schistosomiasis. Background and update." Mem Inst Oswaldo Cruz **90**(2): 235-40.
- Chiaromonte, M. G., A. W. Cheever, J. D. Malley, D. D. Donaldson and T. A. Wynn (2001). "Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis." Hepatology **34**(2): 273-82.
- Chiaromonte, M. G., D. D. Donaldson, A. W. Cheever and T. A. Wynn (1999). "An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response." J Clin Invest **104**(6): 777-85.
- Chitsulo, L., P. Loverde and D. Engels (2004). "Schistosomiasis." Nat Rev Microbiol **2**(1): 12-3.
- Cho, S. H., L. A. Stanciu, S. T. Holgate and S. L. Johnston (2005). "Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma." Am J Respir Crit Care Med **171**(3): 224-30.
- "Consenso Brasileiro no Manejo da Asma, III" 2002. Jornal de Pneumologia **28** (Supl 1): 1-51.
- Cooke, A., P. Tonks, F. M. Jones, H. O'Shea, P. Hutchings, A. J. Fulford and D. W. Dunne (1999). "Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice." Parasite Immunol **21**(4): 169-76.
- Cooper, P. J., M. E. Chico, L. C. Rodrigues, D. P. Strachan, H. R. Anderson, E. A. Rodriguez, D. P. Gaus and G. E. Griffin (2004). "Risk factors for atopy among school children in a rural area of Latin America." Clin Exp Allergy **34**(6): 845-52.
- Cooperstock, M. S. (1974). "Inactivation of endotoxin by polymyxin B." Antimicrob Agents Chemother **6**(4): 422-5.
- Correa-Oliveira, R., L. C. Malaquias, P. L. Falcao, I. R. Viana, L. M. Bahia-Oliveira, A. M. Silveira, L. A. Fraga, A. Prata, R. L. Coffman, J. R. Lambertucci, J. R. Cunha-Melo, O. A. Martins-Filho, R. A. Wilson and G. Gazzinelli (1998). "Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection." Braz J Med Biol Res **31**(1): 171-7.

- Corrigan, J. J., Jr. and B. M. Bell (1971). "Endotoxin-induced intravascular coagulation: prevention with polymyxin B sulfate." J Lab Clin Med **77**(5): 802-10.
- Corrigan, J. J., Jr. and J. F. Kiernat (1979). "Effect of polymyxin B sulfate on endotoxin activity in a gram-negative septicemia model." Pediatr Res **13**(1): 48-51.
- Dabbagh, K., M. E. Dahl, P. Stepick-Biek and D. B. Lewis (2002). "Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells." J Immunol **168**(9): 4524-30.
- Dabbagh, K. and D. B. Lewis (2003). "Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses." Curr Opin Infect Dis **16**(3): 199-204.
- Davies, D. E., J. Wicks, R. M. Powell, S. M. Puddicombe and S. T. Holgate (2003). "Airway remodeling in asthma: new insights." J Allergy Clin Immunol **111**(2): 215-25; quiz 226.
- De Jesus, A. R., D. G. Miranda, R. G. Miranda, I. Araujo, A. Magalhaes, M. Bacellar and E. M. Carvalho (2000). "Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection determined by ultrasound in an endemic area of Brazil, Caatinga do Moura." Am J Trop Med Hyg **63**(1-2): 1-4.
- De Jesus, A. R., A. Silva, L. B. Santana, A. Magalhaes, A. A. de Jesus, R. P. de Almeida, M. A. Rego, M. N. Burattini, E. J. Pearce and E. M. Carvalho (2002). "Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni." J Infect Dis **185**(1): 98-105.
- De Jesus, A. R., A. Magalhaes, D. G. Miranda, R. G. Miranda, M. I. Araujo, A. A. de Jesus, A. Silva, L. B. Santana, E. Pearce and E. M. Carvalho (2004). "Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection." Infect Immun **72**(6): 3391-7.
- Deehan, M. R., M. M. Harnett and W. Harnett (1997). "A filarial nematode secreted product differentially modulates expression and activation of protein kinase C isoforms in B lymphocytes." J Immunol **159**(12): 6105-11.
- Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti and S. Romagnani (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." J Immunol **150**(2): 353-60.

- Dessein, A. J., P. Couissinier, C. Demeure, P. Rihet, S. Kohlstaedt, D. Carneiro-Carvalho, M. Ouattara, V. Goudot-Crozel, H. Dessein, A. Bourgois and et al. (1992). "Environmental, genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*." Immunol Invest **21**(5): 423-53.
- Dunne, D. W.,(a) A. E. Butterworth, A. J. Fulford, H. C. Kariuki, 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**(6): 1483-94.
- Dunne, D. W.,(b) A. E. Butterworth, A. J. Fulford, J. H. Ouma and R. F. Sturrock (1992). "Human IgE responses to *Schistosoma mansoni* and resistance to reinfection." Mem Inst Oswaldo Cruz **87 Suppl 4**: 99-103.
- Dunne, D. W., P. Hagan and F. G. Abath (1995). "Prospects for immunological control of schistosomiasis." Lancet **345**(8963): 1488-91.
- Elliott, D. E., J. J. Urban, C. K. Argo and J. V. Weinstock (2000). "Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease?" Faseb J **14**(12): 1848-55.
- EURODIAB ACE (2000). "Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. EURODIAB ACE Study Group." Lancet **355**(9207): 873-6.
- Falcao, P. L., R. Correa-Oliveira, L. A. Fraga, A. Talvani, A. E. Proudfoot, T. N. Wells, T. J. Williams, P. J. Jose and M. M. Teixeira (2002). "Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1alpha during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans." J Infect Dis **186**(11): 1696-700.
- Falcao, P. L., L. C. Malaquias, O. A. Martins-Filho, A. M. Silveira, V. M. Passos, A. Prata, G. Gazzinelli, R. L. Coffman and R. Correa-Oliveira (1998). "Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation." Parasite Immunol **20**(10): 447-54.
- Faquim-Mauro, E. L. and M. S. Macedo (1998). "The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components." Clin Exp Immunol **114**(2): 245-51.

- Ferrari, D., C. Pizzirani, E. Adinolfi, S. Forchap, B. Sitta, L. Turchet, S. Falzoni, M. Minelli, R. Baricordi and F. Di Virgilio (2004). "The antibiotic polymyxin B modulates P2X7 receptor function." J Immunol **173**(7): 4652-60.
- Ferreira, M. A. (2004). "Inflammation in allergic asthma: initiating events, immunological response and risk factors." Respirology **9**(1): 16-24.
- Finkelman, F. D., T. Shea-Donohue, J. Goldhill, C. A. Sullivan, S. C. Morris, K. B. Madden, W. C. Gause and J. F. Urban, Jr. (1997). "Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models." Annu Rev Immunol **15**: 505-33.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond and T. R. Mosmann (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." J Exp Med **170**(6): 2081-95.
- Fitzsimmons, C. M., T. J. Stewart, K. F. Hoffmann, J. L. Grogan, M. Yazdanbakhsh and D. W. Dunne (2004). "Human IgE response to the *Schistosoma haematobium* 22.6 kDa antigen." Parasite Immunol **26**(8-9): 371-6.
- Foster, P. S., S. P. Hogan, A. J. Ramsay, K. I. Matthaei and I. G. Young (1996). "Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model." J Exp Med **183**(1): 195-201.
- Francis, J. N., S. J. Till and S. R. Durham (2003). "Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy." J Allergy Clin Immunol **111**(6): 1255-61.
- Galvao-Castro, B., J. C. Bina, A. Prata and P. H. Lambert (1981). "Correlation of circulating immune complexes and complement breakdown products with the severity of the disease in human schistosomiasis mansoni." Am J Trop Med Hyg **30**(6): 1238-46.
- Gao, B.(a) and M. F. Tsan (2003). "Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages." J Biol Chem **278**(1): 174-9.
- Gao, B. (b) and M. F. Tsan (2003). "Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages." J Biol Chem **278**(25): 22523-9.

- Gazzinelli, G. and D. G. Colley (1992). "Human immune responses during schistosomiasis mansoni." Rev Soc Bras Med Trop **25**(2): 125-34.
- Gerard, C., C. Bruyns, A. Marchant, D. Abramowicz, P. Vandenabeele, A. Delvaux, W. Fiers, M. Goldman and T. Velu (1993). "Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia." J Exp Med **177**(2): 547-50.
- Goodridge, H. S., G. Stepek, W. Harnett and M. M. Harnett (2005). "Signalling mechanisms underlying subversion of the immune response by the filarial nematode secreted product ES-62." Immunology **115**(3): 296-304.
- Grzych, J. M., E. Pearce, A. Cheever, Z. A. Caulada, P. Caspar, S. Heiny, F. Lewis and A. Sher (1991). "Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni." J Immunol **146**(4): 1322-7.
- Gustavson, S., S. C. Oliveira, J. B. Alves and A. M. Goes (1998). "Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection by antigens purified from PIII, a fraction of adult worm, associated to the downregulation of granuloma formation." Mem Inst Oswaldo Cruz **93 Suppl 1**: 191-6.
- Gustavson, S., C. S. Zouain, J. B. Alves, M. F. Leite and A. M. Goes (2002). "Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII." Parasitol Int **51**(3): 259-69.
- Hagan, P., U. J. Blumenthal, D. Dunn, A. J. Simpson and H. A. Wilkins (1991). "Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*." Nature **349**(6306): 243-5.
- Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (1999). "Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation." J Clin Invest **103**(2): 175-83.
- Hesse, M., C. A. Piccirillo, Y. Belkaid, J. Prufer, M. Mentink-Kane, M. Leusink, A. W. Cheever, E. M. Shevach and T. A. Wynn (2004). "The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells." J Immunol **172**(5): 3157-66.
- Hirsch, C., C. A. Almeida, B. L. Doughty and A. M. Goes (1997). "Characterization of *Schistosoma mansoni* 44.7/56.8 kDa egg antigens recognized by human

- monoclonal antibodies which induce protection against experimental infection and proliferation of peripheral blood mononuclear cells from schistosomiasis patients." Vaccine **15**(9): 948-54.
- Hirsch, C. and A. M. Goes (1996). "Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation in vitro." Parasitology **112 (Pt 6)**: 529-35.
- Hirsch, C., C. S. Zouain, J. B. Alves and A. M. Goes (1997). "Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm." Parasitology **115 (Pt 1)**: 21-8.
- Holt, P. G., C. Macaubas, P. A. Stumbles and P. D. Sly (1999). "The role of allergy in the development of asthma." Nature **402**(6760 Suppl): B12-7.
- Hussain, R., R. W. Poindexter and E. A. Ottesen (1992). "Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass." J Immunol **148**(9): 2731-7.
- Iarotski, L. S. and A. Davis (1981). "The schistosomiasis problem in the world: results of a WHO questionnaire survey." Bull World Health Organ **59**(1): 115-27.
- ISAAC, 1998. "Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)." Eur Respir J **12**(2): 315-35.
- James, S. L. (1987). "*Schistosoma spp.*: progress toward a defined vaccine." Exp Parasitol **63**(3): 247-52.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.
- Jarrett, E. E. and H. R. Miller (1982). "Production and activities of IgE in helminth infection." Prog Allergy **31**: 178-233.
- Jefferis, S. A., P. Hagan, R. Allen, R. Correa-Oliveira, S. R. Smithers and A. J. Simpson (1991). "Molecular cloning and characterisation of the 22-kilodalton adult *Schistosoma mansoni* antigen recognised by antibodies from mice protectively vaccinated with isolated tegumental surface membranes." Mol Biochem Parasitol **46**(1): 159-67.

- Katz, N., P. M. Coelho and J. Pellegrino (1970). "Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces." J Parasitol **56**(5): 1032-3.
- Kay, A. B. (2000). "Immunological Mechanisms in Asthma and Allergic Diseases. Proceedings of a symposium in honor of Professor A. Barry Kay. London, United Kingdom, June 24-25, 1999." Chem Immunol **78**: XI-XII, 1-214.
- Kumar, R. K. (2001). "Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy?" Pharmacol Ther **91**(2): 93-104.
- La Flamme, A. C., K. Ruddenklau and B. T. Backstrom (2003). "Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis." Infect Immun **71**(9): 4996-5004.
- Lambertucci, J. R. (1993). "Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **35**(5): 399-404.
- Li, Y., A. Auliff, M. K. Jones, X. Yi and D. P. McManus (2000). "Immunogenicity and immunolocalization of the 22.6 kDa antigen of *Schistosoma japonicum*." Parasite Immunol **22**(8): 415-24.
- Lim, S., G. Caramori, K. Tomita, E. Jazrawi, T. Oates, K. F. Chung, P. J. Barnes and I. M. Adcock (2004). "Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages." Allergy **59**(5): 505-14.
- Lim, S., E. Crawley, P. Woo and P. J. Barnes (1998). "Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma." Lancet **352**(9122): 113.
- Lynch, N. R., I. Hagel, M. Perez, M. C. Di Prisco, R. Lopez and N. Alvarez (1993). "Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum." J Allergy Clin Immunol **92**(3): 404-11.
- Lynch, N. R., I. A. Hagel, M. E. Palenque, M. C. Di Prisco, J. E. Escudero, L. A. Corao, J. A. Sandia, L. J. Ferreira, C. Botto, M. Perez and P. N. Le Souef (1998). "Relationship between helminthic infection and IgE response in atopic and nonatopic children in a tropical environment." J Allergy Clin Immunol **101**(2 Pt 1): 217-21.
- Macedo, M. S., E. Faquim-Mauro, A. P. Ferreira and I. A. Abrahamsohn (1998). "Immunomodulation induced by *Ascaris suum* extract in mice: effect of anti-

- interleukin-4 and anti-interleukin-10 antibodies." Scand J Immunol **47**(1): 10-8.
- Makarova, E., T. S. Goes, A. L. Marcatto, M. F. Leite and A. M. Goes (2003). "Serological differentiation of acute and chronic schistosomiasis using *Schistosoma mansoni* recombinant protein RP26." Parasitol Int **52**(4): 269-79.
- Malaquias, L. C., P. L. Falcao, A. M. Silveira, G. Gazzinelli, A. Prata, R. L. Coffman, V. Pizziolo, C. P. Souza, D. G. Colley and R. Correa-Oliveira (1997). "Cytokine regulation of human immune response to *Schistosoma mansoni*: analysis of the role of IL-4, IL-5 and IL-10 on peripheral blood mononuclear cell responses." Scand J Immunol **46**(4): 393-8.
- Malhotra, I., P. Mungai, A. Wamachi, J. Kioko, J. H. Ouma, J. W. Kazura and C. L. King (1999). "Helminth- and Bacillus Calmette-Guerin-induced immunity in children sensitized in utero to filariasis and schistosomiasis." J Immunol **162**(11): 6843-8.
- Matricardi, P. M., F. Rosmini, S. Rioldino, M. Fortini, L. Ferrigno, M. Rapicetta and S. Bonini (2000). "Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study." Bmj **320**(7232): 412-7.
- McInnes, I. B., B. P. Leung, M. Harnett, J. A. Gracie, F. Y. Liew and W. Harnett (2003). "A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62." J Immunol **171**(4): 2127-33.
- McKee, A. S. and E. J. Pearce (2004). "CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development." J Immunol **173**(2): 1224-31.
- Medeiros, M., Jr., J. P. Figueiredo, M. C. Almeida, M. A. Matos, M. I. Araujo, A. A. Cruz, A. M. Atta, M. A. Rego, A. R. de Jesus, E. A. Taketomi and E. M. Carvalho (2003). "*Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma." J Allergy Clin Immunol **111**(5): 947-51.
- Montenegro, S. M., P. Miranda, S. Mahanty, F. G. Abath, K. M. Teixeira, E. M. Coutinho, J. Brinkman, I. Goncalves, L. A. Domingues, A. L. Domingues, A. Sher and T. A. Wynn (1999). "Cytokine production in acute versus chronic

- human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens." J Infect Dis **179**(6): 1502-14.
- Moser, D., M. Tendler, G. Griffiths and M. Q. Klinkert (1991). "A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins." J Biol Chem **266**(13): 8447-54.
- Muhlradt, P. F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth and G. Jung (1997). "Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration." J Exp Med **185**(11): 1951-8.
- Mwatha, J. K., G. Kimani, T. Kamau, G. G. Mbugua, J. H. Ouma, J. Mumo, A. J. Fulford, F. M. Jones, A. E. Butterworth, M. B. Roberts and D. W. Dunne (1998). "High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni." J Immunol **160**(4): 1992-9.
- Nyan, O. A., G. E. Walraven, W. A. Banya, P. Milligan, M. Van Der Sande, S. M. Ceesay, G. Del Prete and K. P. McAdam (2001). "Atopy, intestinal helminth infection and total serum IgE in rural and urban adult Gambian communities." Clin Exp Allergy **31**(11): 1672-8.
- Oh, J. W., C. M. Seroogy, E. H. Meyer, O. Akbari, G. Berry, C. G. Fathman, R. H. Dekruyff and D. T. Umetsu (2002). "CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation." J Allergy Clin Immunol **110**(3): 460-8.
- Okano, M., A. R. Satoskar, K. Nishizaki and D. A. Harn, Jr. (2001). "Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response." J Immunol **167**(1): 442-50.
- Oliveira, D. M., S. Gustavson, D. N. Silva-Teixeira and A. M. Goes (1999). "Nitric oxide and IL-10 production induced by PIII--a fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm antigenic preparation--associated with downregulation of in vitro granuloma formation." Hum Immunol **60**(4): 305-11.

- Pacifico, L. G. G. F., C. T.; Chiari, L. ; Oliveira, S. C. (2005). "Imunization with *Schistosoma mansoni* 22.6 KDa antigen induces partial protection against experimental infection in a recombinant protein form but not as DNA vaccine." Immuno Biology **No Prelo**.
- Pearce, E. J. (2005). "Priming of the immune response by schistosome eggs." Parasite Immunol **27**(7-8): 265-70.
- Pearce, N., J. Sunyer, S. Cheng, S. Chinn, B. Bjorksten, M. Burr, U. Keil, H. R. Anderson and P. Burney (2000). "Comparison of asthma prevalence in the ISAAC and the ECRHS. ISAAC Steering Committee and the European Community Respiratory Health Survey. International Study of Asthma and Allergies in Childhood." Eur Respir J **16**(3): 420-6.
- Platts-Mills, T. A. and L. M. Wheatley (1996). "The role of allergy and atopy in asthma." Curr Opin Pulm Med **2**(1): 29-34.
- Poser, S., B. Stickel, U. Krtisch, D. Burckhardt and B. Nordman (1989). "Increasing incidence of multiple sclerosis in South Lower Saxony, Germany." Neuroepidemiology **8**(4): 207-13.
- Prata, A. (1988). "The importance of consanguinity in hepatosplenic schistosomiasis in some endemic areas." Rev Soc Bras Med Trop **21**(2): 45-6.
- Prescott, S. L., C. Macaubas, B. J. Holt, T. B. Smallacombe, R. Loh, P. D. Sly and P. G. Holt (1998). "Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile." J Immunol **160**(10): 4730-7.
- Rabello, A. (1995). "Acute human schistosomiasis mansoni." Mem Inst Oswaldo Cruz **90**(2): 277-80.
- Rabello, A. L., M. M. Garcia, R. A. Pinto da Silva, R. S. Rocha and N. Katz (1997). "Humoral immune responses in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed up for two years after treatment." Clin Infect Dis **24**(3): 304-8.
- Randolph, D. A., C. J. Carruthers, S. J. Szabo, K. M. Murphy and D. D. Chaplin (1999). "Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma." J Immunol **162**(4): 2375-83.

- Rihet, P., C. E. Demeure, 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**(11): 2679-86.
- Rosati, G., I. Aiello, L. Mannu, M. I. Pirastru, V. Agnetti, G. Sau, M. Garau, R. Gioia and G. Sanna (1988). "Incidence of multiple sclerosis in the town of Sassari, Sardinia, 1965 to 1985: evidence for increasing occurrence of the disease." Neurology **38**(3): 384-8.
- Royer, B., S. Varadaradjalou, P. Saas, A. C. Gabiot, B. Kantelip, F. Feger, J. J. Guillosson, J. P. Kantelip and M. Arock (2001). "Autocrine regulation of cord blood-derived human mast cell activation by IL-10." J Allergy Clin Immunol **108**(1): 80-6.
- Royer, B., S. Varadaradjalou, P. Saas, J. J. Guillosson, J. P. Kantelip and M. Arock (2001). "Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10." Clin Exp Allergy **31**(5): 694-704.
- Sabin, E. A., M. I. Araujo, E. M. Carvalho and E. J. Pearce (1996). "Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*." J Infect Dis **173**(1): 269-72.
- Salek-Ardakani, S., A. D. Stuart, J. E. Arrand, S. Lyons, J. R. Arrand and M. Mackett (2002). "High level expression and purification of the Epstein-Barr virus encoded cytokine viral interleukin 10: efficient removal of endotoxin." Cytokine **17**(1): 1-13.
- Santiago, M. L., J. C. Hafalla, J. D. Kurtis, G. L. Aligui, P. M. Wiest, R. M. Olveda, G. R. Olds, D. W. Dunne and B. L. Ramirez (1998). "Identification of the *Schistosoma japonicum* 22.6-kDa antigen as a major target of the human IgE response: similarity of IgE-binding epitopes to allergen peptides." Int Arch Allergy Immunol **117**(2): 94-104.
- Sears, M. R. (1997). "Epidemiology of childhood asthma." Lancet **350**(9083): 1015-20.
- Sears, M. R. (1998). "Evolution of asthma through childhood." Clin Exp Allergy **28** **Suppl 5**: 82-9; discussion 90-1.
- Secor, W. E., H. del Corral, M. G. dos Reis, E. A. Ramos, A. E. Zimon, E. P. Matos, E. A. Reis, T. M. do Carmo, K. Hirayama, R. A. David, J. R. David

- and D. A. Harn, Jr. (1996). "Association of hepatosplenic schistosomiasis with HLA-DQB1*0201." J Infect Dis **174**(5): 1131-5.
- Sher, A., D. Fiorentino, P. Caspar, E. Pearce and T. Mosmann (1991). "Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection." J Immunol **147**(8): 2713-6.
- Silveira, A. M., G. Gazzinelli, L. F. Alves-Oliveira, J. Bethony, A. Gazzinelli, C. Carvalho-Queiroz, M. C. Alvarez, F. C. Lima-Silva, A. Prata, P. T. LoVerde and R. Correa-Oliveira (2004). "Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures." Trans R Soc Trop Med Hyg **98**(9): 514-9.
- Sleigh, A. C., K. E. Mott, R. Hoff, M. L. Barreto, E. A. Mota, J. H. Maguire, I. Sherlock and T. H. Weller (1985). "Three-year prospective study of the evolution of Manson's schistosomiasis in north-east Brazil." Lancet **2**(8446): 63-6.
- Smart, J. M. and A. S. Kemp (2002). "Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease." Clin Exp Allergy **32**(5): 796-802.
- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." Bmj **299**(6710): 1259-60.
- Strachan, D. P. (2000). "Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis"." Thorax **55 Suppl 1**: S2-10.
- Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, S. Akira, K. Okumura, C. Ra and H. Ogawa (2002). "Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity." J Clin Invest **109**(10): 1351-9.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." Immunity **11**(4): 443-51.
- Tavares-Neto, J. and A. Prata (1990). "Hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni, in relation to race and socioeconomic level, in Catolandia-Bahia]." Rev Soc Bras Med Trop **23**(1): 37-42.

- Tendler, M., C. A. Brito, M. M. Vilar, N. Serra-Freire, C. M. Diogo, M. S. Almeida, A. C. Delbem, J. F. Da Silva, W. Savino, R. C. Garratt, N. Katz and A. S. Simpson (1996). "A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 269-73.
- Thomas, P. G., M. R. Carter, O. Atochina, A. A. Da'Dara, D. Piskorska, E. McGuire and D. A. Harn (2003). "Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism." J Immunol **171**(11): 5837-41.
- Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, C. da Costa, T. Miethke, C. J. Kirschning, H. Hacker and H. Wagner (2001). "Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells." J Biol Chem **276**(33): 31332-9.
- van den Biggelaar, A. H., C. Lopuhaa, R. van Ree, J. S. van der Zee, J. Jans, A. Hoek, B. Migombet, S. Borrmann, D. Luckner, P. G. Kremsner and M. Yazdanbakhsh (2001). "The prevalence of parasite infestation and house dust mite sensitization in Gabonese schoolchildren." Int Arch Allergy Immunol **126**(3): 231-8.
- van den Biggelaar, A. H., R. van Ree, L. C. Rodrigues, B. Lell, A. M. Deelder, P. G. Kremsner and M. Yazdanbakhsh (2000). "Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10." Lancet **356**(9243): 1723-7.
- van der Kleij, D., E. Latz, J. F. Brouwers, Y. C. Kruize, M. Schmitz, E. A. Kurt-Jones, T. Espevik, E. C. de Jong, M. L. Kapsenberg, D. T. Golenbock, A. G. Tielens and M. Yazdanbakhsh (2002). "A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization." J Biol Chem **277**(50): 48122-9.
- van der Kleij, D., A. H. van den Biggelaar, Y. C. Kruize, K. Retra, Y. Fillie, M. Schmitz, P. G. Kremsner, A. G. Tielens and M. Yazdanbakhsh (2004). "Responses to Toll-like receptor ligands in children living in areas where schistosome infections are endemic." J Infect Dis **189**(6): 1044-51.
- Van der Kleij, D., A. Van Remoortere, J. H. Schuitemaker, M. L. Kapsenberg, A. M. Deelder, A. G. Tielens, C. H. Hokke and M. Yazdanbakhsh (2002).

- "Triggering of innate immune responses by schistosome egg glycolipids and their carbohydrate epitope GalNAc beta 1-4(Fuc alpha 1-2Fuc alpha 1-3)GlcNAc." J Infect Dis **185**(4): 531-9.
- Velupillai, P., E. A. dos Reis, M. G. dos Reis and D. A. Harn (2000). "Lewis(x)-containing oligosaccharide attenuates schistosome egg antigen-induced immune depression in human schistosomiasis." Hum Immunol **61**(3): 225-32.
- Webster, M., P. G. Fallon, A. J. Fulford, A. E. Butterworth, J. H. Ouma, G. Kimani and D. W. Dunne (1997). "IgG4 and IgE responses to *Schistosoma mansoni* adult worms after treatment." J Infect Dis **175**(2): 493-4.
- Weiss, S. T. (2000). "Parasites and asthma/allergy: what is the relationship?" J Allergy Clin Immunol **105**(2 Pt 1): 205-10.
- Williams, M. E., S. Montenegro, A. L. Domingues, T. A. Wynn, K. Teixeira, S. Mahanty, A. Coutinho and A. Sher (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**(4): 946-54.
- Wynn, T. A. and A. W. Cheever (1995). "Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis." Curr Opin Immunol **7**(4): 505-11.
- Wynn, T. A., A. W. Cheever, M. E. Williams, S. Hieny, P. Caspar, R. Kuhn, W. Muller and A. Sher (1998). "IL-10 regulates liver pathology in acute murine Schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease." J Immunol **160**(9): 4473-80.
- Yazdanbakhsh, M., A. van den Biggelaar and R. M. Maizels (2001). "Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease." Trends Immunol **22**(7): 372-7.
- Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner and R. van Ree (2002). "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis." Science **296**(5567): 490-4.
- Yssel, H., P. Schneider and H. Spits (1993). "Production of IL4 by human T cells and regulation of differentiation of T-cell subsets by IL4." Res Immunol **144**(8): 610-6.
- Zaccone, P., Z. Fehervari, F. M. Jones, S. Sidobre, M. Kronenberg, D. W. Dunne and A. Cooke (2003). "*Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity

- of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes." Eur J Immunol **33**(5): 1439-49.
- Zhu, Z., R. J. Homer, Z. Wang, Q. Chen, G. P. Geba, J. Wang, Y. Zhang and J. A. Elias (1999). "Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production." J Clin Invest **103**(6): 779-88.
- Zouain, C. S., S. Gustavson, S. C. Oliveira, V. Azevedo, J. B. Alves and A. M. Goes (2000). "The role of IL-10 and IgG1 in the protection and granulomatous response in *Schistosoma mansoni* P24-immunized mice." Vaccine **19**(9-10): 1218-24.
- Zouain, C. S., S. Gustavson, D. N. Silva-Teixeira, C. Contigli, V. Rodrigues, Jr., M. F. Leite and A. M. Goes (2002). "Human immune response in schistosomiasis: the role of P24 in the modulation of cellular reactivity to *Schistosoma mansoni* antigens." Hum Immunol **63**(8): 647-56.
- Zouain, C. S., P. L. Falcao, T. S. Goes, M. F. Leite and A. M. Goes (2004). "*Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates in vitro granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4, and CD86 expression in humans." Immunol Lett **91**(2-3): 113-8.
- Zuany-Amorim, C., C. Creminon, M. C. Nevers, M. A. Nahori, B. B. Vargaftig and M. Pretolani (1996). "Modulation by IL-10 of antigen-induced IL-5 generation, and CD4+ T lymphocyte and eosinophil infiltration into the mouse peritoneal cavity." J Immunol **157**(1): 377-84.

12. ANEXOS

ANEXO I – QUESTIONÁRIO ISAAC

SERVIÇO DE IMUNOLOGIA
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

NOME: _____

Endereço: _____

Número de Inclusão : _____ DATA : ___/___/___

IDADE: _____ DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ () MASC () FEM.

NÍVEL SÓCIO-ECONÔMICO : (RENDA FAMILIAR)

() ATÉ UM SALÁRIO MÍNIMO () ENTRE 5 E 10 SALÁRIOS MÍNIMOS

() ENTRE 1 E 2 SALÁRIOS MÍNIMOS () MAIS DE 10 SALÁRIOS MÍNIMOS

() ENTRE 2 E 5 SALÁRIOS MÍNIMOS

| | | |
|-----------------------------------|--|-----------------|
| Quantos habitantes na casa: _____ | | |
| Tabagismo | Sim () Não () | |
| | Quantidade: _____ cigarros / Tempo: ___ () meses () anos | |
| Outros tabagistas na casa | Sim () Não () Quantos: _____ | |
| Fogão à lenha: | Sim () | Não () |
| Diesel | Grãos | Polens |
| Sim () Não () | Sim () Não () | Sim () Não () |
| Outros poluentes | Sim () Não () | |
| | Quais: _____ | |

QUESTIONÁRIO I

1. Alguma vez na vida teve chiado no peito ou falta de ar (cansaço) ?

Sim Não

caso a resposta seja NÃO, passe para a pergunta numero 6.

2. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito ou falta de ar (cansaço) ?

Sim Não

3. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve quantas crises de chiado no peito ou de falta de ar ?

nenhuma crise

1 a 3 crises

4 a 12 crises

mais de 12 crises

4. Nos últimos 12 (doze) meses, você acordou a noite com chiado no peito ou com falta de ar?

nenhuma

menos de uma noite por semana

uma ou mais noites por semana

5. Nos últimos 12 (doze) meses, seu chiado no peito ou falta de ar, foi tão forte, a ponto de impedir que você falasse normalmente ?

Sim Não

6. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve chiado no peito ou falta de ar, após exercícios físicos?

Sim Não

7. Nos últimos 12 (doze) meses, você tem tido crises de tosse seca, à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória ?

Sim Não

QUESTIONÁRIO II

1. Qual a frequência de suas gripes ou resfriado ?
 uma ou duas por ano.
 uma vez por mês.
 mais de uma vez por mês
2. Alguma vez na vida você teve problema de espirros, coriza (corrimento nasal), coceira ou obstrução nasal, quando não estava resfriado ou gripado ?
 Sim Não
3. Em qual dos últimos 12 (doze) meses este problema ocorreu ?
 Janeiro Maio Setembro
 Fevereiro Junho Outubro
 Março Julho Novembro
 Abril Agosto Dezembro
4. Nos últimos 12 (doze) meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por esses sintomas nasais (espirros, coriza, coceira ou entupimento) ?
 nenhuma
 pouco (alguns minutos ou poucas horas do dia)
 moderado (uma parte do dia – manhã, tarde ou noite)
 muito (sintomas diários e constantes)
5. Quando você tem contato com poeira, mofo ou cheiro forte, você tem coceira, espirros ou coriza ?
 Sim Não
6. Quando isso acontece você tem coceira nos olhos ou coceira na garganta ?
 Sim Não

QUESTIONÁRIO III


1. Alguma vez na vida você teve irritações ou coceira na pele (eczema), que apareciam e desapareciam por pelo menos, mais de uma vez por ano ?
() Sim () Não
2. Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) afetaram algum desses seguintes locais :
dobras dos cotovelos, atrás do joelho, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos ?
() Sim () Não
3. Quando bebê, você apresentava brotoejas ou assaduras de difícil controle em pescoço, bochechas, atrás das orelhas, ou na área das fraldas?
() Sim (...) Não

QUESTIONÁRIO IV

1. Alergia a medicamentos, bebidas ou alimentos ?
() Sim () Não Qual: _____
2. Algum familiar direto (PAI, MÃE, IRMÃO, FILHOS, AVÓS OU TIOS) apresenta alguma manifestação alérgica (ASMA, RINITE, URTICÁRIA OU DERMATITE) ?
() Sim () Não Qual: _____
3. Nos últimos 15 dias fez uso de algum tipo de medicamento para a sua doença ?
() Sim () Não Qual: _____
4. Você tem alguma outra doença que necessita uso de medicamentos ?
() Sim () Não Qual: _____

OBSERVAÇÕES A CRITÉRIO DO MÉDICO :

ANEXO II – SUBMISSÃO E APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

|  MINISTERIO DA SAUDE - Conselho Nacional de Saude - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS (versão outubro/99) Para preencher o documento, use as indicações da página 2. | | | | |
|---|--|---|---|----------------|
| 1. Projeto de Pesquisa: "Avaliação da Gravidade da Asma e da Resposta Imune a Antígenos de <i>Schistosoma mansoni</i> em Indivíduos Asmáticos Residentes em Áreas Endêmicas em Espetrasomose" | | | | |
| 2. Área do Conhecimento (Ver relação no verso) IMUNOLOGIA | | 3. Código: 2.11 | 4. Nível: (So áreas do conhecimento 4) | |
| 5. Área(s) Temática(s) Especial (s) (Ver fluxograma no verso) | | 6. Código(s): | 7. Fase: (Só área temática 3) I () II () III () IV () | |
| 8. Unitermos: (3 opções) ASMA, SCHISTOSOMA, ATOPIA | | | | |
| SUJEITOS DA PESQUISA | | | | |
| 9. Número de sujeitos No Centro: Total: | | 10. Grupos Especiais: <18 anos () Portador de Deficiência Mental () Embrião/Feto () Relação de Dependência (Estudantes, Militares, Presidiários, etc) () Outros () Não se aplica (X) | | |
| PESQUISADOR RESPONSÁVEL | | | | |
| 11. Nome: MARIA ILMA ANDRADE SANTOS ARAÚJO | | | | |
| 12. Identidade: 1521037 | 13. CPF.: 112834325-87 | 19. Endereço (Rua, n.º): RUA JOÃO DAS BOTAS, S/N | | |
| 14. Nacionalidade: BRASILEIRA | 15. Profissional: MÉDICA/FARMACÊUTICA | 20. CEP: 40110-160 | 21. Cidade: SALVADOR | 22. U.F. BA |
| 16. Maior Titulação: DOUTOR | 17. Cargo: FARMACÊUTICA BIOQUÍMICA | 23. Fone: (71) 237-7353 | 24. Fax: (71) 245-7110 | |
| 18. Instituição a que pertence: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA | | | 25. E-mail: mia@ufba.br | |
| Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Data 07/04/2004 <i>Maria Ilma Andrade Santos Araújo</i> Assinatura | | | | |
| INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO | | | | |
| 26. Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA | | 29. Endereço (Rua, n.º): RUA JOÃO DAS BOTAS, S/N | | |
| 27. Unidade/Órgão: HUPES - SERVIÇO DE IMUNOLOGIA | 30. CEP: 40110-160 | 31. Cidade: SALVADOR | 32. U.F. BA | |
| 28. Participação Estrangeira: Sim () Não (X) | 33. Fone: (71) 237-7353 | 34. Fax: (71) 245-7110 | | |
| 35. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X) Nacional () Internacional () (Anexar a lista de todos os Centros Participantes no Brasil) | | | | |
| Termo de Compromisso (do responsável pela instituição) :Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução Nome: <u>MOYSE SAGURSKY</u> Cargo: <u>VICE-DIRETOR DO HUPES</u> Data: <u>11.15.2004</u> <i>Moyse Sagursky</i> Assinatura Prof. Moyse Sagursky Vice-Diretor do HUPES | | | | |
| PATROCINADOR | | | | |
| Não se aplica (X) | | | | |
| 36. Nome: | | 39. Endereço | | |
| 37. Responsável: | | 40. CEP: | 41. Cidade: | 42. UF |
| 38. Cargo/Função: | | 43. Fone: | 44. Fax: | |
| COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP | | | | |
| 45. Data de Entrada: 18.06.2004 | 46. Registro no CEP: 71/2004 | 47. Conclusão: Aprovado (X) Data: 01.09.2004 | 48. Não Aprovado () Data: _____ | |
| 49. Relatório(s) do Pesquisador responsável previsto(s) para: Ao VGLMNO Data: / / Data: / / | | | | |
| Encaminhado a CONEP: 50. Os dados acima para registro () 51. O projeto para apreciação 52. Data: 01.07.2004 | | 53. Coordenador(a) do Comitê de Ética em Pesquisa: <i>[Assinatura]</i> Anexar o parecer consubstanciado | | |
| COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP | | | | |
| 54. Nº Expediente: | 56. Data Recebimento: | 57. Registro na CONEP: | | |
| 55. Processo: | | | | |
| 58. Observações: | | | | |



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Rua Pedro Feijó 240, Canal - Ambulatório Magalhães Neto 3.º andar, Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
Cep: 40.160-170 - Salvador, BA. Telefax: (71) 203-2740 E-mail: cep_mco@zipmail.com.br

1/2

PARECER/RESOLUÇÃO N.º 71/2004.

Registro CEP: 71/2004 de 18.06.2004.

Projeto de Pesquisa: "Avaliação da gravidade da asma e da resposta imune a antígenos de *Schistosoma mansoni* em indivíduos asmáticos residentes em áreas endêmicas em Equistossomose".

Pesquisadora Responsável: Maria Ilma Andrade Santos Araújo, Doutora, Médica e Farmacêutica Bioquímica da Universidade Federal da Bahia.

Equipe de Pesquisadores: Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Doutor, Professor Titular da Disciplina de Imunologia Clínica da Universidade Federal da Bahia; Luciana Santos Cardoso, Mestranda em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, e Manoel Medeiros Júnior, Mestre, Coordenador do Ambulatório de Alergia do HUPES. Universidade Federal da Bahia.

Instituição: Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia.

Área do conhecimento: 4.01, Nível D, Grupo III.

Objetivos: Gerais — 1) avaliar como a infecção por *Schistosoma mansoni*, (S.M), modula a resposta imune a aeroalergenos e atenua as manifestações clínicas em indivíduos asmáticos e 2) identificar antígenos de SM, (SM), capazes de modular a resposta imune envolvida na patogênese da asma e Específicos — I) caracterizar a resposta imunológica específica para aeroalergenos em indivíduos asmáticos infectados por helmintos antes e após o tratamento para helmintíase; II) identificar antígenos de S.M e testar a capacidade destes antígenos em modular a resposta imune de indivíduos asmáticos e III) determinar se a infecção pelo S.M interfere na gravidade da asma e se o tratamento das helmintíases modifica o curso clínico da mesma.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Rua Padre Pezô 240, Canela - Ambulatório Magalhães Neto 3.º andar, Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde.
 Cep: 40.160-170 - Salvador, BA. Telefax: (71) 203-2740 E-mail: cep_mco@zipmail.com.br

2/2

Súmula: Trata-se de estudo prospectivo de 12 semanas em que serão aplicados questionários dirigidos a amostras populacionais divididas em dois grupos: I) de intervenção e II) de controle, nos distritos de Buri, Camarões e Sempre Viva no município do Conde – Bahia, área endêmica para S.M. O tamanho da amostra será por conveniência onde os incluídos, após assinatura do "Termo de Consentimento Pré-Esclarecido", serão submetidos a medida do fluxo expiratório semanalmente nos intervalos dos 3 primeiros meses de tratamento e 3 meses após término deste e, mensalmente, a avaliações clínicas, espirométrica e exames laboratoriais; Além disso responderão a questionário de gravidade da asma. Os pacientes incluídos serão tratados para helmítiase por seis meses e após três meses do tratamento serão reavaliados. **Serão excluídos:** 1) indivíduos que fizeram uso de anti-histamínicos à exceção de Cetotifeno e Astemizol, nas últimas 72 horas, Beta₂ Adrenérgicos e Xantinas nas últimas 72 horas, corticóides e antileucotrienos nos últimos 30 dias, beta-bloqueadores ou inibidores da enzima da angiotensina convertase nos últimos sete dias; 2) portadores de dermatoses nas áreas de teste cutâneo, gestantes ou alguma impossibilidade de colaboração e 3) indivíduos do grupo II com positividade para helminto em um dos três parasitológicos de fezes realizados na inclusão. Os dados dos níveis de IgE total, IgE e IgG específicos serão apresentados como médias + SD, enquanto os dados da avaliação fenotípica e marcadores de ativação celular serão apresentados em percentagem e as diferenças entre os grupos e intra-grupos serão comparadas através de testes paramétricos ou não-paramétricos para mensurar proporções. O "Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido" será assinado por todos os incluídos.

Comentários: Estudo prospectivo de 12 semanas, contemplando objetivos relevantes para a saúde das pessoas e das populações, com métodos muito bem estruturados. As intervenções nos pacientes não ferem a integridade dos mesmos e possibilitam diagnóstico e tratamento necessário, não acessível aos investigandos na grande maioria dos casos. Projeto orçamentário viável, detalhado, financiado pelo CNPq. "Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido" claro e mantendo assegurados os direitos éticos dos pesquisados. **Projeto aprovável**

Salvador, 17 de Setembro de 2004.

Decisão Plenária: APROVADO

Coordenador: _____

UFBA - Universidade Federal da Bahia
 Prof. Dr. Antônio dos Santos Barreto
 Coordenador do Comitê de Ética
 em Pesquisas Humanas
 MCO - Universidade Federal da Bahia

Observação importante: toda a documentação anexa ao protocolo proposto e rubricada pela Pesquisadora, arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste à mesma, faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução.

ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

SERVIÇO DE IMUNOLOGIA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. EDGARD SANTOS – UFBA

Rua Augusto Viana, s/n – Canela – CEP 40140.000 – Salvador-BA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O presente estudo tem a finalidade de avaliar a associação entre a asma e a infecção por helmintos e você está sendo selecionado para participar deste estudo, na condição de voluntário.

Esta participação, implica na sua concordância em submeter-se, periodicamente, durante um ano, aproximadamente, a exames para determinar a presença de alergia e parasitoses, que consistem em: responder a um questionário com perguntas sobre alergias, submeter-se a exames clínicos, além da coleta de amostras de sangue e de amostras de fezes.

Serão colhidas amostras de 20mL de sangue venoso, com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis. Pretendemos dosar no sangue a presença de algumas proteínas que podem se elevar ou não nas doenças alérgicas e parasitárias após estimulação com as proteínas do *S. mansoni* a serem testadas. Quando da marcação do dia do exame, o voluntário receberá os frascos coletores de fezes, que deverão ser devolvidos, para que possamos realizar os exames parasitológicos.

As pessoas que se submeterem aos exames receberão, se desejarem, os resultados dos mesmos. No caso de detectarmos a presença de parasitas intestinais, você será tratado gratuitamente e, no caso de observarmos a presença de doença alérgica, você receberá instruções para o tratamento da mesma.

Qualquer dúvida que você tenha sobre o que está escrito neste consentimento ou sobre os procedimentos que constam desse projeto de pesquisa, poderá entrar em contato com Dra. Maria Ilma Araujo, coordenadora do projeto, médica do Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, Rua Augusto Viana, s/n – Canela, telefone (071)237-7353, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Ambulatório Magalhães Neto, na pessoa do Dr. Antônio Barata, no endereço Rua Padre Feijó, 240 - Canela. Caso você decida deixar de participar do estudo em qualquer momento, mesmo depois de assinar este consentimento, você continuará, sem prejuízos, sendo acompanhado pelo Serviço de Imunologia.

Afirmo que compreendi o que está escrito acima e concordo em participar deste projeto de pesquisa, voluntariamente. _____, ____/____/____.

Assinatura: _____ Ficha n.º: _____

Nome: _____