

IMUNIDADE CELULAR NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

S. LEVY (1), L. M. B. SANTOS (2), S. KOPERSZTYCH (1), C. C. MUSATTI (2),
L. C. da SILVA (1), H. SETTE Jr. (1) e N. F. MENDES (2)

RESUMO

A imunidade mediada por células foi investigada em 34 pacientes portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatintestinal. Foram realizados testes *in vivo* envolvendo a reatividade cutânea a antígenos comuns e sensibilização ao dinitroclorobenzeno (DNCB), e, testes *in vitro*, com transformação blástica de linfócitos frente a fitohemaglutinina (PHA) e determinação dos linfócitos T e B através de formação de rosáceas com eritrócitos de carneiro e eritrócitos humanos sensibilizados com anticorpo e complemento, respectivamente. Os resultados mostraram que a imunidade celular avaliada pelos testes mencionados está preservada na maioria dos indivíduos estudados. No entanto, aproximadamente 1/3 (um terço) dos pacientes mostraram respostas deprimidas à PHA na presença de plasma autólogo embora mostrassem níveis normais de resposta quando em plasma homólogo. Pacientes adultos apresentaram porcentagens diminuídas de positividade a alguns dos antígenos empregados nos testes intradérmicos, porém responderam normalmente à sensibilização pelo DNCB.

INTRODUÇÃO

O ciclo evolutivo do *S. mansoni* no hospedeiro apresenta formas antigênicas distintas conseguindo, de certa forma, burlar o sistema imunológico, e desse modo, garantir a sobrevivência do parasita por longo período de tempo. Em virtude dessa variação antigênica, a imunidade adquirida pelo homem ao *S. mansoni* se desenvolve de maneira lenta e gradual, tornando-se máxima após várias re-infecções^{4, 8,9}. Evidências experimentais indicam que a imunidade celular deve ter papel importante na resistência adquirida^{2,6} e na patogenia da doença⁵.

São raros os trabalhos que abordam a participação da resposta imune celular na esquistossomose mansônica humana, destacando-se o trabalho de WOLFSON & col.¹⁸ no qual foi demonstrada a produção de fator inibidor da

migração de leucócitos (L.I.F.), em indivíduos que apresentavam reação de hipersensibilidade cutânea tardia aos antígenos do parasita. O presente trabalho apresenta uma avaliação da imunidade celular durante a infecção pelo *S. mansoni*, através da utilização de testes cutâneos de hipersensibilidade tardia a antígenos de agentes infecciosos comuns, sensibilização cutânea ao dinitroclorobenzeno (DNCB), cultura de linfócitos estimulados por fitohemaglutinina (PHA), além da determinação porcentual e em número absoluto dos linfócitos T e B.

MATERIAL E MÉTODOS

1) **Pacientes e controles** — Foram estudados 34 pacientes portadores de esquistossomo-

(1) Hospital das Clínicas da F.M.U.S.P. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

(2) Escola Paulista de Medicina

se mansônica na forma hepatintestinal sem nenhum tipo de tratamento, divididos em dois grupos de acordo com a faixa etária: a) **Grupo P. J.** — pacientes jovens com idade variando entre 6 e 20 anos, com média de idade de 15 anos, sendo 6 do sexo masculino e 7 do feminino — 13 casos; b) **Grupo P.A.** — pacientes adultos com idade variando entre 23 e 47 anos, com média de idade de 31 anos, sendo 12 do sexo masculino e 9 do feminino — 21 casos.

Os controles estudados também foram divididos em dois grupos: a) **Grupo C. J.** — indivíduos normais jovens com idade variando entre 2 e 20 anos, com média de idade de 10 anos, sendo 13 do sexo masculino e 14 do feminino — 27 casos; b) **Grupo C.A.** — indivíduos normais adultos com idade variando entre 23 e 45 anos, com média de idade de 33 anos, sendo 16 do sexo masculino e 14 do feminino — 30 casos.

2) **Testes cutâneos de hipersensibilidade tardia** — Foi utilizada uma bateria com os seguintes antígenos: tuberculina a 1/1000, PPD 2 U.T., Tricofitina a 1/5, Levedurina a 1/100 e *Escherichia coli* (*E. coli*) a 1/1000. Todos os antígenos foram injetados intradermicamente em volumes de 0,1 ml cada e a enduração foi medida em milímetros após 48 horas. Os diâmetros de enduração iguais ou maiores do que 5 mm foram anotados como reações positivas.

3) **Sensibilização ao 2,4 dinitroclorobenzeno** — (DNCB) — A sensibilização dos pacientes e dos controles ao DNCB foi realizada utilizando técnica previamente descrita¹³. Doses sensibilizantes de 2000 µg de DNCB dissolvidas em 0,1 ml de acetona foram mantidas em contacto com a pele da região dorsal, em uma área de 2 cm², durante 48 horas. Todos haviam sido testados anteriormente com 100 µg de DNCB para eliminar a possibilidade de sensibilização prévia. Após 20 dias, fez-se um teste de contacto com 100 µg em local da pele diferente do utilizado para a sensibilização. Reações cutâneas apresentando eritema e enduração após 48 h com ou sem vesiculação ou bolhas foram assinaladas como positivas.

4) **Determinação de linfócitos T e B em sangue periférico** — Foi utilizada técnica des-

crita anteriormente^{12,14}. Os linfócitos T foram determinados através da sua capacidade de formação de rosáceas com eritrócitos de carneiro (E) e os linfócitos B, através da formação de rosáceas com eritrócitos humanos sensibilizados com anticorpo e complemento (HEAC).

5) **Cultura de linfócitos com fitohemaglutinina (PHA)** — Utilizou-se técnica descrita em trabalhos anteriores¹⁰, sendo as culturas de linfócitos dos pacientes realizadas na presença de 20% de soro autólogo ou homólogo normal. Os linfócitos dos doadores normais foram cultivados somente em presença de soro homólogo normal. Os resultados foram expressos em forma de índice de Estimulação (I.E.), obtido através da relação:

$$\text{I.E.} = \frac{\text{Incorporação de } ^3\text{H timidina com PHA}}{\text{Incorporação de } ^3\text{H timidina sem PHA}}$$

RESULTADOS

1) **Testes cutâneos de hipersensibilidade tardia** — A porcentagem de positividade das reações cutâneas de hipersensibilidade tardia aos diferentes antígenos empregados pode ser analisada na Tabela I. A comparação estatística realizada entre os grupos de indivíduos jovens (P.J. + C.A.) mostrou que os indivíduos jovens respondem em menor proporção que os indivíduos adultos a 4 dos 6 antígenos empregados. A porcentagem de positividade entre os pacientes adultos foi significativamente menor, que nos controles adultos, em relação a 3 dos antígenos empregados. Por outro lado, a análise estatística comparando os grupos de pacientes jovens (P.J.) e controles jovens (C.J.) não mostrou diferenças significativas (Tabela II).

2) **Determinação de linfócitos T e B** — A porcentagem de linfócitos T no sangue periférico dos pacientes foi significativamente menor do que no grupo controle. No entanto, o número absoluto de linfócitos T, assim como de linfócitos totais e células B não diferiu entre pacientes e controles (Tabela III).

TABELA I

Porcentagem de positividade de reações cutâneas de hipersensibilidade tardia a tuberculina, P.P.D., tricofitina, levedurina, *E. coli* e dinitroclorobenzeno (DNCB) em pacientes e controles

Grupos	Tuberculina	P.P.D.	Tricofitina	Levedurina	<i>E. coli</i>	D.N.C.B.
P.J.	16% (3/19)	16% (3/19)	17% (3/18)	58% (11/19)	16% (3/19)	96% (23/24)
P.A.	37% (12/32)	45% (14/31)	35% (11/31)	75% (24/32)	23% (7/24)	90% (27/30)
C.J.	22% (5/23)	5% (1/21)	13% (3/23)	77% (20/26)	27% (4/15)	88% (15/17)
C.A.	70% (21/30)	67% (20/30)	63% (19/30)	67% (20/30)	70% (21/30)	93% (28/30)

Os números entre parênteses representam a relação entre o número de reações positivas e o número de reações realizadas

P.J. — Pacientes jovens

P.A. — Pacientes adultos

C.J. — Indivíduos normais jovens

C.A. — Indivíduos normais adultos

TABELA II

Comparação estatística entre proporções de positividade aos testes cutâneos nos grupos estudados

Grupos	Antígenos	Tuberculina	P.P.D.	Tricofitina	Levedurina	<i>E. coli</i>	D.N.C.B.
(P.J. x C.J. x P.A. x C.A.)		$\chi^2 = 19,25$ $P < 0,001$	$\chi^2 = 25,05$ $P < 0,001$	$\chi^2 = 18,05$ $P < 0,001$	$\chi^2 = 2,46$ $P > 0,30$	$\chi^2 = 21,17$ $P < 0,001$	$\chi^2 = 1,05$ $P > 0,70$
(P.J. + C.J.) x (P.A. + C.A.)		$\chi^2 = 12,2$ $P < 0,001$	$\chi^2 = 21,5$ $P < 0,001$	$\chi^2 = 12,8$ $P < 0,001$	—	$\chi^2 = 6,0$ $P < 0,02$	—
P.J. x C.J.		Teste exato de Fisher $P = 0,276$	Teste exato de Fisher $P = 0,111$	Teste exato de Fisher $P = 0,320$	—	Teste exato de Fisher $P = 0,245$	—
P.A. x C.A.		$\chi^2 = 6,84$ $P < 0,01$	$\chi^2 = 3,0$ $P > 0,05$	$\chi^2 = 5,2$ $P < 0,05$	—	$\chi^2 = 14,7$ $P < 0,001$	—

P.J. — Pacientes jovens

C.J. — Indivíduos normais

P.A. — Pacientes adultos

C.A. — Indivíduos normais adultos

TABELA III

Médias dos valores absolutos e percentuais de linfócitos T e B no sangue periférico de pacientes com esquistossomose mansônica e indivíduos normais

	Pacientes	Controles
L/mm ³	1873	1806
T/mm ³	1188	1308
B/mm ³	307	307
T% (*)	66	72
B%	16	17

(*) Diferença estatisticamente significante entre pacientes e controles (Teste Mann-Whitney $P < 0,04$)

L/mm³ — linfócitos totais por mm³

T/mm³ — linfócitos T por mm³

B/mm³ — linfócitos B por mm³

3) Resposta proliferativa de linfócitos à PHA

— Os índices de estimulação obtidos em culturas de linfócitos de pacientes, em plasma autólogo e homólogo, bem como os obtidos com linfócitos de doadores normais em plasma homólogo, acham-se representados na Tabela IV. A resposta proliferativa dos linfócitos dos pacientes não diferiu significativamente da observada com linfócitos normais, quando cultivados em plasma homólogo. Linfócitos de alguns pacientes mostraram índices de estimulação mais baixos, quando o plasma do próprio paciente foi utilizado na cultura.

TABELA IV

Índices de estimulação obtidos pela cultura de linfócitos com P.H.A. de pacientes e controles

Controles	Pacientes	
	Plasma autólogo	Plasma homólogo
	23	41
23	15	39
25	10	32
29	80	149
29	75	75
30	43	81
31	14	84
35	14	32
40	51	19
41	8	38
52	11	40
53	28	33
53	13	59
55	28	NR
60	50	42
62	29	55
65	73	32
71	275	286
73	71	117
79	52	34
81	71	169
85	56	53
95	59	156
102	70	156
136	114	60
141	21	99
150	73	103
167	NR	22
176	10	13
212	21	45
225	11	21
	33	12
	14	12
	NR	32

NR = Não realizado

Teste de Wilcoxon para amostras não independentes realizado entre os índices de estimulação dos pacientes em plasma autólogo e plasma homólogo. $P < 0,01$
 Teste de Mann-Whytney entre os índices de estimulação de linfócitos dos pacientes em plasma homólogo e os índices dos controles em plasma homólogo. $P < 0,12$

DISCUSSÃO

A diferença observada entre os grupos de indivíduos jovens (P.J. + C.J.) e adultos (P.A. + C.A.) em relação aos testes intradérmicos de leitura tardia era, de certa forma, esperada desde que os antígenos utilizados exigem exposição prévia, à qual os indivíduos do grupo jovem poderiam ainda não ter sido expostos. O grupo dos pacientes adultos (P.A.)

diferiu significativamente do grupo dos controles adultos (C.A.) em relação à tuberculina, tricofitina e *E. coli*, fato este que sugere certa depressão de resposta celular aos antígenos empregados. Em relação à levedurina não houve diferença significativa entre todos os grupos analisados, o que demonstra uma exposição precoce a este antígeno. Todos os grupos analisados comportaram-se de maneira semelhante ao teste de sensibilização ao DNCB, isto é, responderam positivamente na maior parte dos casos, demonstrando normalidade de resposta dos pacientes esquistossomóticos estudados, em relação à sua capacidade de montar resposta primária do tipo celular. Estes resultados demonstram que os linfócitos T ainda não sensibilizados têm sua capacidade de resposta preservada.

Quanto à determinação de linfócitos T e B, julgamos que a diminuição porcentual dos linfócitos T entre os pacientes, não deve se refletir na capacidade imune celular *in vivo*, uma vez que o número absoluto permaneceu em níveis normais.

A resposta proliferativa dos linfócitos à PHA de 8 dos pacientes mostrou-se aquém dos valores mínimos observados com linfócitos de indivíduos normais, quando cultivados na presença de plasma autólogo. Esta depressão não parece devida a um defeito intrínseco dos linfócitos desde que tais células passam a responder normalmente quando na presença de plasma homólogo normal.

Fatores bloqueadores influenciando sobre a resposta mediada por células tem sido descritos em uma série de patologias nas quais a imunidade celular se encontra deficitária^{7,11,16}.

Diversos pesquisadores tem evidenciado a existência de imuno-complexos circulantes no soro de pacientes esquistossomóticos^{1,15}. BUTTERWORTH & col.³ demonstraram que complexos antígeno-anticorpo podem inibir a atuação de células sobre esquistossômulos de *S. mansoni*. É possível que imuno-complexos circulantes possam estar implicados na depressão de transformação blástica observada quando linfócitos de alguns dos nossos pacientes foram cultivados em plasma autólogo.

Considerando que a maioria de nossos pacientes respondeu aos testes de avaliação de imunidade celular, dentro dos padrões de nor-

malidade, não parece provável que a instalação da esquistossomose esteja relacionada à depressão na competência imunológica.

Por outro lado, alguns pacientes adultos apresentaram respostas diminuídas a um ou mais dos testes empregados e, além disso, o nosso estudo focalizou apenas indivíduos com a forma hepatintestinal.

É necessário lembrar que os nossos pacientes ainda não haviam sido submetidos a nenhuma forma de tratamento. Seria importante comparar os dados obtidos antes e após o tratamento, desde que, várias das drogas anti-esquistossomóticas tem efeito imunossupressor¹⁷ e a destruição dos parasitas leva à liberação de antígenos com subsequente formação de imuno complexos circulantes.

S U M M A R Y

Cell-mediated immunity in Schistosomiasis mansoni

Cell-mediated immunity was investigated in 34 patients with hepato-intestinal schistosomiasis mansoni.

The *in vivo* T-cell response was investigated by cutaneous reactivity to ubiquitous antigens and sensitization with dinitrochlorobenzene (DNCEB). The *in vitro* tests included lymphocyte cultures stimulated by phytohemagglutinin (PHA) and T-cell enumeration by rosette formation. This research indicates that the cellular immune response, evaluated by the tests herein mentioned is preserved in most of the patients. Minor deficiencies were detected, however. Nearly one third of the patients' lymphocyte cultures showed depressed response to PHA, in the presence of autologous plasma, although it was normal in homologous plasma.

Adult patients presented lower percentage of delayed cutaneous reactions to some ubiquitous antigens, but responded normally to DNCEB sensitization.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Drs. Neil Ferreira Novo e Elias Rodrigues de Paiva pela maneira dedicada com que elaboraram a parte estatística.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOUT, D.; SANTORO, F.; CARLIER, Y.; BINA, J. C. & CAPRON, A. — Circulating immune complexes in schistosomiasis. *Immunology* 33: 17-22, 1977.
2. BUCHANAN, R. D.; FINE, D. P. & COLLEY, D. G. — *Schistosoma mansoni* infection in mice depleted of thymus-dependent lymphocytes. II — Pathology and altered pathogenesis. *Amer. J. Path.* 71: 207-218, 1973.
3. BUTTERWORTH, A. E.; REMOLD, H. G.; HOUBA, V.; DAVID, J. R.; FRANKS, D.; DAVID, P. H. & STURROCK, R. F. — Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: mediation by IgG and inhibition by antigen antibody complexes. *J. Immunol.* 118: 2230-2236, 1977.
4. CLARKE, V. de V. — The influence of acquired resistance in the epidemiology of bilharziasis. *Centr. Afr. J. Med.* 12(b) (Suppl.): 1-30, 1966.
5. DAVIS, B. H.; MAHMOUD, A. A. F. & WARREN, K. S. — Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* eggs in thymectomized and bursectomized chickens. *J. Immunol.* 113: 1064-1067, 1974.
6. FINE, D. P.; BUCHANAN, R. D. & COLLEY, D. G. — *Schistosoma mansoni* infection in mice depleted of thymus-dependent lymphocytes. I — Eosinophilia and immunologic responses to a schistosomal egg preparation. *Amer. J. Path.* 17: 193-206, 1973.
7. GATTI, R. A. — Serum inhibitors of lymphocyte response. *Lancet* 1: 1351-1352, 1971.
8. GERBER, J. H. — Bilharziasis in Boajibu. *J. Trop. Med. Hyg.* 55: 52-58, 1952.
9. KLOETZEL, K. & RODRIGUES DA SILVA, J. — Schistosomiasis mansoni acquired in adulthood: behaviour of egg counts and the intradermal test. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 16: 167-169, 1967.
10. LEVY, S.; KOPERSZTYCH, S.; MUSATTI, C. C.; SOUEN, J. S.; SALVATORE, C. A. & MENDES, N. F. — Cellular immunity in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 130: 160-164, 1978.
11. McFARLIN, D. E. & OPEBHELM, J. J. — Impaired lymphocyte transformation in ataxia-telangiectasia in part due to a plasma inhibitory factor. *J. Immunol.* 103: 1212-1222, 1969.
12. MELLO, J. F.; LEVY, S.; FREIRE, C. A. R. & MENDES, N. F. — Localization of T and B lymphocytes in human adenoid, tonsil, appendix and Peyer's patches. *Allergol. et Immunopath.* 4: 325-332, 1976.

LEVY, S.; SANTOS, L. M. B.; KOPERSZTYCH, S.; MUSATTI, C. C.; SILVA, L. C. da; SETTE Jr., H. & MENDES, N. F. — Imunidade celular na esquistossomose mansônica. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 20:323-328, 1978.

13. MENDES, E. & RAPHAEL, A. — Impaired delayed hypersensitivity in patients with South American blastomycosis. *J. Allergy* 47: 17-22, 1971.
14. MENDES, N. F.; TOLNAI, M. E. A.; SILVEIRA, N. P. A.; GILBERTSEN, R. B. & METZGAR, R. S. — Technical aspects of rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte binding (T) lymphocytes. *J. Immunol.* 111: 860-867, 1973.
15. SANTORO, F.; BOUT, D.; WATTRE, P. & CAPRON, A. — Imunocomplexos na esquistossomose. I — Utilização da fixação de complemento para sua detecção. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 18: 152-156, 1976.
16. TALWAR, G. P.; KRISHNAM, A. D.; MEHRA, V. L.; BLUM, E. A. & PEARSON, J. M. H. — Evaluation of cell-mediated immune responses in untreated cases of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 12: 195-203, 1972.
17. WEBSTER, L. T.; BUTTERWORTH, A. E.; MAHMOUD, A. A. F.; MNGOLA, E. N. & WARREN, K. S. — Suppression of delayed hypersensitivity in schistosome-infected patients by Nidazole. *New Engl. J. Med.* 292: 1144-1147, 1975.
18. WOLFSON, R. L.; MADDISON, S. E. & KAGAN, I. G. — Migration inhibition of peripheral leucocytes in human schistosomiasis. *J. Parasit.* 109: 123-128, 1972.

Recebido para publicação em 31/3/1978.