

OTHON DE CARVALHO BASTOS

Utilização de soros pluri-específicos no estudo da
evolução das imunoglobulinas envolvidas na resposta
imune de camundongos ao *Schistosoma mansoni* Sambon, 1.907

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas como
um dos requisitos para obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Augusto MAGALHÃES

Departamento de Parasitologia
Departamento de Microbiologia e Imunologia

CAMPINAS - SÃO PAULO



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PREÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: OTHON DE CARVALHO BASTOS

Nº de Identificação: 775388

Endereço para Correspondência: Rua Raul Pereira Q2, C 8; Jardim Paulista
Olho d'Água. São Luís -MA

Curso: IMUNOLOGIA

Nome do Orientador: Luiz Augusto Magalhães

Título da Dissertação ou Tese: (Tese): Utilização de soros pluri-específicos no estudo da evolução das imunoglobulinas envolvidas na resposta imune de camundongos ao Schistosoma mansoni Sambon, 1.907.

Data proposta para a Defesa:

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir desta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

19/01/79
Data

[Assinatura]
assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

/ /
Data

[Assinatura]
assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consulte, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

/ /
Data

[Assinatura]
assinatura do aluno

A parte experimental deste trabalho foi realizado nos Departamentos de Parasitologia e de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo.

Aos meus pais, Newton Coelho Bastos (in Me-
morian) e Neusa de Carvalho Bastos; a minha
esposa Lêda e nossos filhos Othon e Newton;
a Nizeth e demais irmãos.

Aos

Professores Luiz Augusto Magalhães e Humberto de
Araujo Rangel, pela orientação, amizade e estímu
lo que sempre me ofereceram.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Aquiles Eugênio Piedrabuena, pelo auxílio prestado na análise estatística dos dados

À Universidade do Maranhão, através do Departamento de Patologia e dos Profs. Antônio, Francisco, Aymoré, Raimundo, Léa, Macedinho e, principalmente, Moema, pelo apoio e oportunidade de especialização.

À CAPES, através da Profa. Paula Francinete Silva e Souza , responsável pelo Plano Institucional de Capacitação de Docentes, no Maranhão, pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e aos seus Professores, principalmente a Profa. Dária, pelos seus ensinamentos.

Ao Prof. Ronald da Silva Carvalho, Diretor da Escola Técnica Federal do Maranhão, pelo incentivo prestado ao desenvolvimento do ensino profissionalizante no Estado.

Aos Profs. H.A. RANGEL, L.A. MAGALHÃES, S.H. SHIMIZU, L.C . de S. DIAS, A.F. PESTANA DE CASTRO, pelas sugestões e discussão do manuscrito.

Aos colegas de laboratório, Paulo, Ajax, A. Guaraldo, Julia e Fawzi, pela amizade e ajuda na execução de algumas técnicas.

A Eliane, Marlene e demais colegas e funcionários do Departamento de Parasitologia, principalmente à Cleusa, que colaboraram neste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela colaboração prestada no desenvolvimento do presente trabalho.

A bibliotecária do Instituto de Biologia, Ana, pela gentileza dispensada no atendimento das solicitações bibliográficas.

MEUS AGRADECIMENTOS

Agracemos o auxílio prestado ao Curso de Pós-Graduação em
Imunologia pelas seguintes instituições:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia).

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA

Í N D I C E

CAPÍTULOS	Pgs.
I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAL E MÉTODOS	
1. O hospedeiro definitivo e a procedência do <i>Schistosoma mansoni</i>	8
2. O método de infecção de camundongos	9
3. Coleta do material para análise parasito-imunológica	
3.1. Obtenção de soros	10
3.2. Coleta de vermes, fígado e baço. Contagem dos granulomas hepáticos	11
4. Obtenção dos reativos biológicos	
4.1. Fracionamento do soro normal de camundongo	12
4.2. Filtração em gel	12
4.3. Eletroforese preparativa em bloco de amido	13
4.4. Imunoeletroforese	13
4.5. Imunização de coelhos	
4.5.1. Imunização com soro normal	16
4.5.2. Imunização com as frações FM e G	16
5. Dosagem de proteínas	
5.1. Proteínas totais	17
5.2. Das frações séricas	
5.2.1. Eletroforese em microzonas	17
5.2.2. Imunoeletroforese bidimensional quantitativa	18

CAPÍTULOS	Pgs.
II. MATERIAL E MÉTODOS (cont.)	
6. Identificação das imunoglobulinas	18
7. Determinação da atividade de anticorpo	19
8. Reações de imunofluorescência	19
III. RESULTADOS	
1. Evolução da infecção	22
2. Evolução das imunoglobulinas	
2,1. Padronização do método	30
2,2. Quantificação das imunoglobulinas	35
3. Especificidade das imunoglobulinas	44
IV. DISCUSSÃO	52
V. RESUMO E CONCLUSÕES	61
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICE	
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	74

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A época em que a esquistossomose surgiu é desconhecida. Entretanto, a maioria dos historiadores admite que esta doença teve sua origem no antigo Egito. Esta tese é baseada em documentos históricos, como papiros e a velha literatura Assiro-Babilônica, que descrevem a existência de um verme que ocasionava hematúrias nos indivíduos parasitados e na constatação experimental feita por Armand RUFFER, em 1.910 (PARAENSE, 1.959). Naquela ocasião, RUFFER encontrou ovos calcificados, típicos do esquistossomo, no fígado de duas múmias.

As primeiras observações sobre a biologia do *Schistosoma*, foram feitas por Theodor BILHARZ, helmintologista da Escola de Medicina de Cairo, quando comunicou ao seu professor von SIEBOLD, a existência de "um verme longo, de cor branca habitando o sistema porta dos indivíduos doentes". Reconhecendo e considerando o achado como uma nova descoberta, von SIEBOLD tornou público o trabalho de BILHARZ, em 1.852.

Desta época até a presente data, mais de cento e vinte anos se passaram e a esquistossomose, embora venha sendo estudada sob vários aspectos, permanece como um dos maiores problemas com que se defronta a Saúde Pública Mundial.

A Imunologia é uma das áreas de estudo que vem sendo utilizada na pesquisa da esquistossomose, desde 1.917, quando FUJINAMI & SUEYASU verificaram que animais infectados com *Schistosoma japonicum* eram resistentes à re-infecção (LEWERT, 1.970). Contudo, os conhecimentos relativos a imunologia da infecção esquistossomótica são, ainda, insatisfatórios. A maioria dos dados publicados, conforme pode ser verificado nas recentes revisões da literatura (WHO, 1.974; SMITHERS & TERRY, 1.976 e ANDRADE, 1.977), abordam o problema sob dois aspectos principais: o primeiro, denominado básico, procura conhecer a relação parasita-hospedeiro e o segundo, de aspecto aplicado, visa a obtenção do diagnóstico e da profilaxia da doença, através de reações sorológicas ou através de outro método que identifique os anticorpos.

Na relação esquistossomo-hospedeiro, o fato mais importante é a extraordinária tolerância do hospedeiro vertebrado para este parasita intra-vascular. Esta tolerância, permite que o parasita viva por muitos anos em contato contínuo com anticorpos e células imunologicamente competentes, sem que seja notado qualquer dano vital ao verme. A razão deste fato, a pesar de frequentes investigações, ainda não está bem esclarecida. É conhecido que, para a sobrevivência do parasita, há necessidade de um equilíbrio biológico que exige adaptações de ambas as partes.

Segundo SMITHERS & Cols. (1.977), certas modificações são observadas no *S. mansoni* a partir de 60 minutos após a invasão tegumentar, a nível de membrana cercariana . Estas modificações culminam tres horas mais tarde, quando a membrana complexa do esquistossomulo está completamente formada . HOCKLEY & McLAREN (1.973) e McLAREN & Cols. (1.977) notificaram, também, transformações ocorridas na estrutura antigênica da superfície corporal do verme, das fases larvárias à adulta, através do número e da localização de partículas intramembranas, possivelmente de natureza proteica. O encontro de antígenos do hospedeiro fazendo parte da estrutura do esquistossomo, a partir de tres horas após a invasão cercariana, é discutida como um mecanismo de evasão do verme, frente às reações imunes do hospedeiro. Porém, a presença destes antígenos mimetizantes não exclue a capacidade de reação entre o parasita e os anticorpos.

Parece que a proteção do parasita pela inclusão do antígeno do hospedeiro em sua estrutura antigênica "in vivo" não é completa e que sua sobrevivência, também, depende do estado imunitário do hospedeiro (SMITHERS & Cols., 1977).

É evidente que a resposta imune do vertebrado se modifica mediante as transformações antigênicas do parasita. Ao contrário do que ocorre com a infecção bacteriana ou viral, o hospedeiro esquistossomótico recebe múltiplas cargas antigênicas. No decurso normal da infecção, o hospedeiro é exposto a antígenos derivados, não somente do complexo mosaico antigênico somático, mas também de secreções e excreções próprias do metabolismo do verme; do ovo e da secreção eliminada pelo miracídio.

Na fase inicial da infecção, considerada fase de sensibilização do hospedeiro, as reações celulares variam de acordo com o estado imune do vertebrado. Na primeira infecção, aparece no local de penetração da larva, uma leve reação local e uma infiltração discreta de células inflamatórias, bem diferentes das reações mais intensas e mais precoces que ocorrem nos animais previamente expostos às cercárias. O processo inflamatório local é dependente das reações celulares e dos anticorpos circulantes, e ocorrem horas após a invasão larvária do tegumento, em geral 2 a 24 horas (WHO, 1974). Constam de eritema, edema e às vezes de formação de pequenas pápulas (ANDRADE, 1977). Estas reações são as responsáveis pela destruição de al

guns esquistossomulos, cujos produtos de degradação funcionam como substâncias imunogênicas.

Nas primeiras semanas após a fase de sensibilização, é frequente o aparecimento de precipitinas, acompanhadas de marcante hipergamaglobulinemia, como acontece com a maioria das moléstias infecciosas sistêmicas (SADUN & WALTON, 1.958; HILLYER & FRICK, 1.967; ANTUNES & Cols., 1.971 e KANAMURA & Cols., 1.978). Tanto na esquistossomose humana, como na experimental, ocorre grandes aumentos nos níveis da β e γ -globulinas, assim como nos da α_2 (EVANS & STIREWALT, 1.958; SMITHERS & WALKER, 1.961 e FIORILLO, 1.966), principalmente na época de maturação dos vermes, em que se verifica a deposição de ovos, pelo parasita, no tecido do hospedeiro. Provavelmente, estas modificações dos níveis séricos, são devidas ao aumento no estímulo antigênico parasitário, os quais procedem do verme adulto e do estágio larvário contido nos ovos. Entretanto, pode ser devido a outros fatores. O aumento da α_2 -globulinas, por exemplo, pode ser devido aos danos causados nos tecidos, pela oviposição no fígado e intestino, e o aumento da macroglobulina na esquistossomose crônica, tem sido sugerida ser devido a esplenomegalia (SMITHERS & TERRY, 1.969)

Os anticorpos têm sido considerados como de natureza não funcional, pelo fato de que, a resistência à infecção esquistossomótica em macacos rhesus, pode se desenvolver na ausência da elevação do nível das imunoglobulinas. Macados ex-

postos a vermes de um só sexo, ou por cercárias atenuadas (infecção na qual as fêmeas não maturam e os ovos não são produzidos), não apresentam alterações nas seroproteínas, porém, desenvolvem resistência dirigida a uma infecção normal (SMITHERS, 1.962; HSU & HSU, 1.964). Imune-soros de ratos e camundongos esquistossomóticos, não são eficazes na imunidade passiva (WHO, 1.974; PHILLIPS & Cols., 1.975; 1.977). Por outro lado, a participação das imunoglobulinas na resposta imune do hospedeiro ao *Schistosoma mansoni* é evidenciada pela elevação dos níveis séricos destas proteínas, resultante do processo imunológico após oviposição, e porque parece que sistemas supressores celulares e humorais possam ser responsáveis pela modulação da hipersensibilidade granulomatosa em torno do ovo do esquistossomo, participando na imunopatologia da doença (SMITHERS & TERRY, 1.969 e SMITHERS & Cols. 1.977)

A identificação de classes de imunoglobulinas envolvidas na resposta ao *S. mansoni* tem sido feita na esquistossomose humana (HILLYER, 1.969; ANTUNES & Cols., 1.971), relacionadas com formas clínicas (KANAMURA & Cols., 1.978) e experimentalmente em camundongos (HILLYER & FRICK, 1.967). Entretanto os dados existentes na literatura sobre as imunoglobulinas deste roedor, presentes na esquistossomose mansônica, tem sido expressos em unidades absolutas (mg/ml), não se levando em consideração o fato que os animais em observação são expostos a inúmeros estímulos antigênicos aleatórios, que podem influenciar nos valo

res finais do teor de imunoglobulinas (SHER & Cols., 1.977). Este aspecto pode ser crítico, uma vez que a quantificação de anticorpos específicos para o *S. mansoní*, por dificuldades técnicas, é sempre feito em termos relativos, não se sabendo, portanto, a quantidade absoluta de anticorpos específicos produzidos durante a infecção. Com a finalidade de reduzir este obstáculo, comparamos os níveis das diferentes imunoglobulinas provenientes de camundongos infectados com grupos de animais normais tomados como controle, mantidos em condições similares durante oito semanas de observação.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

1. O hospedeiro definitivo e a procedência do *S. mansoni*.

Foram tomados 160 *Mus musculus* albinos dos dois sexos e da raça Swiss, com 30 dias de vida, nascidos no Biotério do Departamento de Parasitologia, da Universidade Estadual de Campinas (SP). Estes animais foram pesados e divididos ao acaso em dois grupos numericamente iguais. Somente um deles foi submetido à exposição com cercárias do *S. mansoni* (grupo infectado). O outro , foi tomado como controle da experiência.

As larvas eram procedentes da linhagem mineira do verme (linhagem BH), a qual vem sendo mantida em *Biompha-*
laria glabrata albina, criada em laboratório e descendentes de caramujos coletados em Belo Horizonte (MG).

2. O método de infecção de camundongos

Decorridas quatro semanas, contadas a partir da data da exposição das *Biomphalaria glabrata* aos miracídios da linhagem mineira, os moluscos foram expostos à luz e temperatura de 28°C, por 2 horas, com a finalidade de se obter cercárias (PELLEGRINO & MACEDO, 1.955). As larvas, em número de 100, eram transportadas para tubos de ensaio de 10 ml, contendo água à temperatura de 28°C, aquecidas por lâmpadas elêtricas. Exclusivamente as caudas dos animais foram imersas na suspensão cercariana, na qual permaneceram por 2 horas. Em seguida, os camundongos eram retirados e suas caudas eram lavadas, com a finalidade de serem retiradas e contadas as partes cefálicas das cercárias que não conseguiram penetrar no tegumento. Foi determinada a diferença entre o número de cercárias contidas inicialmente na suspensão e o encontrado na recontagem das partes cefálicas. Obteve-se, assim, o número de cercárias viáveis para a infecção (MAGALHÃES, 1.969).

3. Coleta do material para análise parasito-imunológica.

3.1. Obtenção de soros.

A cada semana que se completava após a data da exposição dos camundongos às larvas infectantes, 10 animais do grupo infectado e 10 animais do grupo controle, eram pesados e sangrados pelo plexo sanguíneo braquial (LIMA & SILVA , 1 970).

O sangue coletado era deixado à temperatura ambiente, para a obtenção do soro. Logo a seguir, os soros pertencentes aos 10 indivíduos de cada grupo, eram misturados e centrifugados a 270 g, à temperatura de 0°C. Em seguida, eram distribuídos em alíquotas de 100 µl e rotulados de acordo com o grupo de origem e com a semana correspondente. O grupo dos infectados recebeu a sigla In e dos controles, Cn; sendo n equivalente ao número de semanas que transcorreram desde a data da exposição.

A conservação do material sérico foi feita por congelação e permaneceu neste estado até a realização das análises.

3.2. Coleta de vermes, fígado e baço. Contagem dos granulomas hepáticos.

Após a sangria, os camundongos foram sacrificados e suas cavidades peritoneal expostas. Em seguida, o sistema porta de cada animal foi perfundido e exemplares de *S. mansoni* foram retirados dos vasos mesentéricos e hepáticos (BRENER, 1962). Vermes, também, foram obtidos por esmagamento do fígado entre lâminas de vidro (HILL, 1956). Os esquistossomulos e esquistossomos encontrados foram contados, sendo que, os adultos foram separados por sexo.

O fígado e baço de cada animal perfundido, foram pesados em balança analítica de precisão.

Os fígados procedentes dos camundongos infectados, foram homogeneizados em água e a suspensão transportada para copos de sedimentação. A cada suspensão, foram adicionadas aproximadamente 5 gotas de formol a 40%. O sedimento, foi lavado com água e transportado para placas de Petri com base milimetrada, com a finalidade de serem contados os granulomas hepáticos em lupas estereoscópicas, de acordo com o método descrito por BRENER, PELLEGRINO & OLIVEIRA, em 1956.

4. Obtenção dos reativos biológicos.

Como reativos biológicos, foram utilizados na Imunoeletroforese Quantitativa, soros de coelhos anti-imunoglobulinas (anti-Igs) de camundongos. Estas Igs, foram isoladas a partir de soro normal dos roedores (SN) e através da seguinte metodologia:

4.1. Fracionamento do soro normal de camundongo.

Globulinas do soro normal de camundongos, foram precipitadas com Sulfato de Amônio a 50% de saturação, em pH= 8.0 e, em seguida, dialisada contra solução de NaCl 0.15 M, até reação de Nessler negativa (LIMA & SILVA, 1970). Uma nova diálise era feita com solução tampão de Fosfato de Potássio-NaCl (0.1 M; pH= 8.0), antes de cada filtração em gel.

4.2. Filtração em gel.

Seis mililitros da fração globulínica eram aplicados em colunas de 45 X 5cm de Sephadex G200 (Pharmacia), segundo FAHEY (1964). O eluente utilizado foi solução tam-

pão de Potássio-NaCl (0.1 M; pH=8.0), com fluxo médio de 70 ml por hora. Frações de 4 ml foram coletadas e suas absorvâncias determinadas a 280 nm. Cada filtração produzia tres picos individuais de proteínas e os que correspondiam às globulinas com pesos moleculares de 19S e 7S, eram concentradas separadamente em ultra-filtros (Amicon) e submetidos à eletroforese preparativa em bloco.

4.3. Eletroforese preparativa em bloco de amido.

Para o preparo do bloco de amido, foi empregado amido hidrolisado suspenso em solução tampão veronal (0.05 M; pH= 8.6). A eletroforese foi realizada com uma diferença de potencial de 250 V, por 24 horas (KUNKEL & SLATER, 1952). O mesmo tampão veronal foi utilizado para a eluição do material resultante da separação. Os eluatos eram analisados por absorvância a 280 nm e, os valores mais elevados referentes a cada pico, eram submetidos a imunoeletroforese.

4.4. Imunoeletroforese.

A imunoeletroforese unidimensional (GRABAR & BURTIN, 1964), foi utilizada para verificação do compor

tamento dos eluatos da eletroforese em bloco, frente ao anti-soro normal de camundongo. Imunoeletroforese do tipo Rocket de LAURELL, realizada conforme descrição de WEKKE (AXELSEN & Cols., 1973), serviu para a constatação da presença de uma determinada proteína nos eluatos. Os suportes utilizados foram agar para a imunoeletroforese de GRABAR & BURTIN e agarose (BIO-RAD Lab.) para a imunoeletroforese Rocket, a 1% em solução tampão veronal-HCl (0.05 M; $\text{pH} = 8.6$ e $\mu = 0.02$). As condições de forese foram de 6 V/cm, por 1,10 h e 1,5V/cm por 15 horas, respectivamente para a primeira e a segunda imunoeletroforese. A solução tampão da cuba foi a mesma utilizada para o preparo do gel.

Os eluatos que apresentavam sistemas precipitantes, na imunoeletroforese unidimensional, considerados apropriados para a obtenção de reativos biológicos, foram separados para a imunização de coelhos. Os anti-soros obtidos, foram utilizados para a quantificação das Igs de camundongos esquistossomóticos. Do fracionamento da 19S, resultou uma fração que foi utilizada para a obtenção de soros de coelhos anti-IgM de camundongos, chamada de FM e o da 7S, utilizada para a obtenção de soros anti-IgG, foi denominada de fração G.

4.5. Imunização de coelhos.

Coelhos foram imunizados com soro normal, fração FM e fração G de camundongos, obedecendo os seguintes esquemas:

4.5.1. Imunização com soro normal (SN).

Em 1 ml de adjuvante completo de Freund, foi emulsionado 1 ml de uma diluição do SN em solução salina fisiológica (0.15M), contendo 10 mg de proteínas totais. O volume final foi distribuído em 4 aliquotas e inoculadas por via intra-muscular nas patas do animal. Especialmente, as inoculações das patas traseiras, foram feitas em regiões próximas aos gânglios poplíteos (OLIVEIRA, 1.975). Decorridos 30 dias após a dose sensibilizante, os coelhos foram novamente inculados, em vários pontos distribuídos no dorso do animal, com antígeno tratado de maneira idêntica a anterior. Os anti-soros obtidos 20 dias após a última dose foram analisados por imunodifusão (OUCHTERLONY, 1.958) e apresentaram o título de 1/32, com 500 µg/ml de proteínas antigênicas.

4.5.2. Imunizaççao com as frações FM e G.

O esquema de inoculação das frações FM e G em coelhos, foi feito de maneira análoga à utilizada para o soro normal de camundongos. A única diferença apresentada foi na

concentração antigênica da dose desencadeante da resposta imune, que foi a metade da utilizada na sensibilização. Os títulos obtidos por anti-soros, foram: 1/32 com o anti-FM e 1/16 com o anti-G (OUCHTERLONY, 1.958).

5. Dosagem de proteínas.

5.1. Proteínas totais.

O teor proteico dos diferentes soros foi determinado pelo reativo de biurêto, segundo WIECHSELBAUM (1946) e/ou a 280 nm, em espectrofotômetro Zeiss, PMQ III, com cubas de quartzo e caminho óptico de 1cm.

5.2. Das frações séricas.

As seroproteínas de camundongos imunes e normais (controles), foram quantificadas por eletroforese em microzonas e por imunoeletroforese bidimensional quantitativa.

5.2.1. Eletroforese em microzonas.

Fitas de acetato de celulose contendo os soros em estudo, foram submetidas a 250 V/cuba, contendo solução tampão veronal-acetato (0.05M; pH= 8.6), por 30 minutos. O conjunto utilizado para a forese foi o Microphor (Zeiss). A densitometria foi determinada em Registrador de Extinção nº3 (Zeiss).

5.2.2. Imunoeletroforese bidimensional quantitativa.

Placas de vidro de 9 X 12 cm, cobertas com 16 ml de agarose (BIO-RAD Lab.) a 1% em tampão veronal-HCl (0.05M; pH=8.6 e $\mu=0.02$) ou solução tampão veronal-glicina/tris(0.05M; pH=8.6 e $\mu=0.02$) de SVENDSEN (AXELSEN & Cols., 1.973), foram utilizados para as imunoeletroforese bidimensional quantitativa de LAURELL, de acordo com as orientações de WEEKE, descritas em AXELSEN & Cols.(1.973). A eletroforese no primeiro sentido foi realizada com 6V/cm, por 1,10h e na segunda dimensão, 1,5 V/cm, por 15 horas. A quantificação das imunoglobulinas foi feita pela medida da área envolvida pelo precipitado, com auxílio do papel milimetrado. Multiplicamos os valores correspondentes às alturas de cada pico em milímetros por uma base determinada no quadrante superior esquerdo de cada pico, estabelecida por uma linha que bisectava a da altura.

6. Identificação das imunoglobulinas.

Para a identificação das imunoglobulinas de camundongos, foram utilizados soros padrões anti-globulinas do roedor, procedentes dos laboratórios BIONETICS (IgA, IgM e IgG2a) e da MILES (IgG1 e IgG2b). Estes soros, na segunda forese, foram colocados em canaletas abertas no gel, localizadas na faixa de migração das globulinas. A migração da globulina especificamente reconhecida pelo soro padrão, sofreu atraso e permitiu sua identificação (absorção "in situ").

7. Determinação da atividade do anticorpo.

Vermes adultos coletados em solução salina fisiológica (0.15M), foram lavados tres vezes nesta mesma solução, com intervalos de 60 minutos entre cada lavagem, à temperatura de 37°C. Em seguida, os esquistossomos foram liofilizados e adicionados, em excesso, ao soro imune de camundongos da 8ª semana de infecção (10 mg do material liofilizado em 200 µl de soro). Permaneceram tres horas neste estado, à temperatura ambiente e 12 horas a 4°C. O sobrenadante retirado foi centrifugado a 3.000 g, por 20 minutos, a 0°C e analisado por imunoeletroforese bidimensional, frente ao soro anti-FM. Em seguida, os vermes foram lavados tres vezes em solução salina tamponada com fosfatos (PBS; 0.01 M; pH=7.2) e submetidos à reação de imunofluorescência indireta, para comprovação da absorção.

8. Reações de imunofluorescência.

Foram realizadas reações de imunofluorescência indireta, entre os soros imunes de camundongos esquistossomóticos e esporocistos; cercárias; vermes e miracídios da linhagem mineira de *S. mansoni*. As reações se processaram em tubos de ensaio (cercárias e miracídios) e em cortes histológicos (esporocistos, vermes e miracídios). A leitura dos resultados foi realizada em microscópio Zeiss, contendo lâmpada HBO 200 e filtros barreira 0/47/44 e excitador I.

A obtenção dos materiais para as reações, se processou da seguinte maneira:

1. Cercárias - Foram utilizadas larvas recém-eliminadas, com duas horas de vida, as quais foram mortas pela adição de 5 gotas de formaldeído a 40%, em 100 ml da suspensão cercariana.
2. Vermes - Esquistossomos recém-coletados, foram lavados tres vezes em solução salina fisiológica (0.15M), com 1 hora de duração, cada lavagem. Em seguida, foram mergulhados em fixador de Rossman (90 ml de etanol 100% saturado com ácido pícrico e 10 ml de formaldeído a 37%), por 15 horas (NASH, 1.974). Para a inclusão em parafina e cera (9 partes para 1), os vermes foram desidratados pela série de alcoois. Após a inclusão, a peça foi cortada em tiras de 5 mm de espessura e preparada para microscopia óptica.
3. Miracídeos - Foram utilizados miracídeos obtidos de cortes histológicos de fígados parasitados e, também, recém-eclodidos de ovos isolados do mesmo órgão. As preparações para cortes histológicos, foram confeccionadas de maneira idêntica a descrita para os vermes. O procedimento para o isolamento dos ovos foi iniciado pela homogeinização dos fígados em liquidificador. Posteriormente, os ovos foram lavados com solução de NaCl a 1.7% , em penerias metálicas "granutest" com malha de 0.149; 0.074 e

0.037 mm. Em seguida, foram colocados sobre uma superfície formada por Hypaque (Winthrop) a 10%, colocado em funil de vidro. Aproximadamente, 3 horas após, os ovos foram recuperados, isentos de tecidos, por uma torneira improvisada abaixo do colo do funil.

4. Esporocistos - Caramujos parasitados com *S. mansoni* foram fixados; incluídos em parafina e montados em lâminas de microscopia, pelo método semelhante ao descrito para os vermes.

As reações de imunofluorescência indireta, foram as mesmas, tanto para os materiais que foram manuseados em tubos, como para os que foram preparados em lâminas. Sofreram três lavagens sucessivas com solução salina tamponada (PBS ; 0.01M; pH= 7.2). As lâminas foram secas parcialmente e os imunossoros, diluídos a 1/8, adicionados sobre as preparações. Foram deixados reagirem em câmara úmida, na temperatura ambiente, por 30 minutos. Após o tempo de reação, os materiais foram lavados, novamente, 3 vezes em PBS, perdurando por 5 minutos cada lavagem. O excesso de PBS foi retirado e adicionou-se o conjugado anti-globulinas 7S de camundongos produzido em cabra e marcado com isotiocianato de fluoresceína (HAYLAND Lab.), diluído a 1/50 (NETO, 1.975). O conjugado foi diluído em PBS, contendo Azul de EVANS, na diluição de 1:10.000 (NASH, 1.974). Esta reação processou-se em câmara úmida, por 45 minutos. Depois, as preparações foram lavadas em PBS e montadas em glicerina alcalinizada com tampão carbonato (pH=9.0).

RESULTADOS

1. Evolução da infecção.

O número de cercárias viáveis para a infecção, variou de 83 a 96 larvas por camundongo, nos diferentes lotes, resultando em média 90 cercárias por animal.

As médias dos valores referentes ao número de vermes e de granulomas hepáticos, encontrados no decorrer da infecção, estão apresentados na TABELA I, onde se pode verificar que os vermes adultos começaram a aparecer em épocas em que ainda se registravam o encontro de esquistossomulos e

que, a taxa mais elevada obtida na contagem de granulomas, foi verificada na 8ª semana. Pode-se observar, também, a presença de vermes dos dois sexos e de granulomas, a partir da 6ª semana, em todos os animais manuseados.

A distribuição dos pesos corporais dos animais destinados a experiência (TABELA II), não diferiu significativamente da distribuição normal (Fig. 1). Contudo, as médias dos diferentes lotes se distribuíram assimetricamente e por grupos (Fig. 2). A heterogeneidade desta variância, verificada pelo teste de Bartlett, foi altamente significativa para 15 graus de liberdade ($\chi^2 = 52.3843$). Por este motivo, o estudo do comprometimento do fígado e do baço foi investigado comparando-se a média dos pesos desses órgãos do grupo infectado, com as do grupo controle. Os resultados obtidos, foram analisados pelo teste U (TABELA III) e indicaram a ocorrência de diferenças singnificativas no peso destes órgãos, a partir da 4ª semana de infecção.

Os resultados da eletroforese em microzonas dos soros procedentes de animais pertencentes aos diferentes lotes: infectados e controles (TABELA IV), foram analisados estatísticamente e mostraram a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos nos níveis da albumina e das globulinas α e β , que se modificavam a proporção que a infecção evoluía (TABELA V). Ocorreu elevação no nível das globulinas dos animais do grupo infectado, principalmente na região da β e da γ -globulina, na 7ª e 8ª semana após a exposição. O contrário, foi verificado com a albumina, que teve seu nível sérico decrescido, nesta época.

TABELA I

Média de vermes e granulomas hepáticos encontrados nos diferentes lotes de animais infectados.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO:	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
VERMES								
machos	0.0	0.0	0.0	5.6	12.0	19.6	15.9	16.7
fêmeas	0.0	0.0	0.0	4.0	6.8	19.0	12.3	9.3
total	0.0	0.0	0.0(12)	9.6(6)	18.8	38.6	28.12	26.0
GRANULOMAS	0.	0.0	0.0	0.0	0.0	1.755	1.579	3.364

(n) = total de esquistossomulos encontrados nos lotes.

TABELA II

Peso corporal dos camundongos destinados aos diferentes lotes, antes da infecção.

Nº DO ANIMAL	LOTES	I ₁	C ₁	I ₂	C ₂	I ₃	C ₃	I ₄	C ₄	I ₅	C ₅	I ₆	C ₆	I ₇	C ₇	I ₈	C ₈
1		18,23	18,65	11,65	16,70	12,40	14,26	12,67	12,73	16,82	14,07	17,78	16,00	16,00	11,18	14,56	13,83
2		14,35	12,46	13,92	15,18	11,00	18,62	14,00	16,73	12,49	16,45	14,66	15,97	13,06	12,78	10,12	14,32
3		12,11	12,31	13,09	11,14	11,95	12,68	12,18	11,07	15,00	13,59	14,68	13,00	15,98	13,69	10,22	13,86
4		14,52	9,15	20,00	15,22	11,37	15,41	13,00	7,55	16,43	16,10	18,52	13,24	17,84	13,12	10,00	17,62
5		17,80	19,27	16,49	19,29	15,00	17,00	11,19	9,40	15,93	13,84	13,58	16,41	13,19	14,62	12,00	14,33
6		12,15	15,70	19,08	12,77	12,70	19,24	12,00	12,90	15,51	16,46	17,45	15,83	8,69	15,21	17,43	15,22
7		13,54	22,51	19,00	19,20	14,39	18,48	12,17	12,16	15,90	17,20	15,91	11,28	8,00	11,92	18,83	13,22
8		11,58	13,27	12,58	16,82	20,00	14,10	12,21	12,00	15,91	15,53	14,36	12,20	11,44	12,23	20,16	14,06
9		16,37	18,53	17,37	18,24	10,00	15,20	12,41	10,00	15,10	17,33	17,00	17,84	14,18	16,80	16,54	13,40
10		18,44	15,13	16,68	14,34	17,93	14,60	12,00	14,06	15,88	13,49	16,20	-	9,68	18,15	14,33	15,14
MÉDIA		14,91	15,70	15,98	15,89	13,77	15,95	12,38	12,26	15,49	15,40	16,00	14,64	12,80	13,97	14,41	14,50
σ (n-1)		2,64	4,04	2,99	2,69	3,15	2,23	0,73	2,99	1,18	1,52	1,66	2,24	3,32	2,22	3,76	1,27

TABELA III

Teste U (Man-Withney) aplicado às diferenças de pesos registradas entre baços e fígados de animais do grupo infectado e do grupo controle.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	BAÇO			FÍGADO		
	Umin.	n ₁	n ₂	Sig.	Umin.	n ₁ n ₂ Sig.
I	42,0	10	10	NS	39,0	10 10 NS
II	45,5	10	10	NS	45,0	10 19 NS
III	33,5	10	10	NS	36,0	10 10 NS
IV	11,0	10	10	*	8,0	10 10 **
V	35,00	8	9	NS	12,0	8 9 *
VI	13,00	10	9	**	13,0	10 9 **
VII	9,00	10	9	**	18,0	10 9 *
VIII	0,0	10	9	***	2,0	10 9 ***

Sig. = significância ao nível de 5% *; de 1% ** e altamente significativo ***
NS = não significativo.

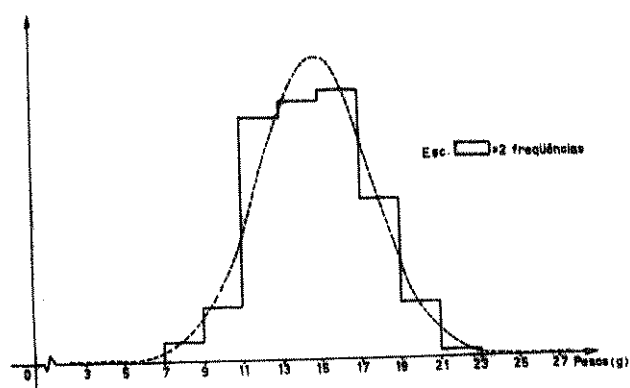


Fig. 1 - Distribuição dos pesos corporais dos camundongos tomados para a experiência.

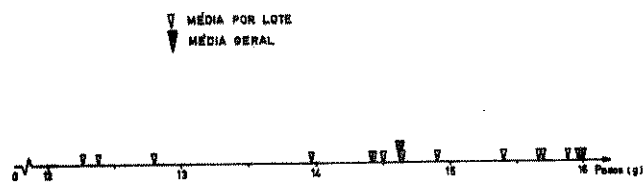


Fig. 2 - Médias dos pesos corporais dos camundongos tomados para a experiência, reunidos em lotes.

TABELA IV

Quantificação de proteínas séricas de camundongos normais ou infectados com *Schistosoma mansoni*, determinada por eletroforese em microzonas.

LOTES DE CAMUNDONGOS	PROTEINAS TOTAIS (mg/ml)	FRAÇÕES ELETROFORÉTICAS (%) Alb.				
GRUPO CONTROLE						
C ₁	48	48	5	24	16	7
C ₂	58	50	5	20	15	10
C ₃	60	46	9	16	18	11
C ₄	53	56	5	14	14	11
C ₅	55	46	4	17	17	16
C ₆	60	41	5	19	18	17
C ₇	52	41	7	26	14	12
C ₈	66	52	8	17	14	9
GRUPO INFECTADO						
I ₁	55	47	7	17	19	10
I ₂	60	43	10	18	16	13
I ₃	56	47	9	16	16	12
I ₄	58	47	9	18	16	10
I ₅	61	42	7	19	21	11
I ₆	62	37	7	20	21	15
I ₇	50	37	7	15	24	17
I ₈	73	35	5	16	24	20

TABELA V

Análise estatística comparativa entre os dados referentes a proteínas séricas dos grupos infectados e controle.

PROTEÍNAS SÉRICAS	GRUPOS				TESTES	ESTATÍSTICOS		
	CONTROLE		INFECTADO			t	U	Fisher
	$\bar{X}$	σ	$\bar{X}$	σ				
Totais (mg/ml)	56,50	5,65	59,37	6,71	0,926	23	-	
Albumina (%)	47,50	5,18	41,87	5,00	22,35*	-	-	
Globulinas (%)								
α^1	6,0	1,77	7,6	1,59	-	16*	p=0,0406*	
α^2	19,12	4,08	17,3	1,68	-	2,0	-	
β	14,5	4,20	19,6	3,42	-	10,5**	-	
γ	11,6	3,37	1,35	3,58	-	22,0	-	

σ = desvio padrão

$\bar{X}$ = média

* = significativo ao nível de 1%

** = significativo ao nível de 5%

2. Evolução das imunoglobulinas.

2.1. Padronização do método.

Foram utilizados, no presente trabalho, tres imune-soros de coelhos anti-imunoglobulinas de camundongos, para a quantificação das imunoglobulinas (Igs) dos soros de animais dos grupos infectado (I) e controle (C): anti-FM 1; anti-FM e anti-G . Os soros de camundongos, analisados por Imunoelctroforese Bidimensional, frente a estes reativos biológicos, apresentaram tres sistemas precipitantes bem definidos (Figs. P1 a P6). Foi observado, com qualquer um dos imune-soros utilizados, relação linear entre as áreas delimitadas por estas precipitações e as quantidades de soros de camundongos aplicadas (Fig. P1). Os valores obtidos com replicatas, apresentaram variações em volta de 10%, consideradas dentro dos limites do erro estabelecido pelo método.

A identificação dos 3 sistemas precipitantes foi realizada através da técnica de absorção "in situ", utilizando padrões anti-Igs de camundongos, tal como pode ser observado na Figura P2, indicando que este sistema precipitante corresponde a Ig da classe M (IgM). Utilizando idêntica metodologia, foi possível constatar que o Pico 1, correspondia a IgG1 (Figs. P4 e P5) e o pico 3, a IgA (Fig. P3). Com o imune-soro anti-G, os tres sistemas precipitantes obtidos, numerados de 1 a 3, foram identificados como sendo IgG1; IgG2b e IgG2a, respectivamente (Fig. P6).

Notificamos que, o soro padrão anti -
-IgG1, reagiu com a IgA de camundongo (Fig. P4), como reflexo
da dificuldade da obtenção de reativos mono-específicos de
cadeias pesadas.

A localização destas proteínas, foi
correspondente às suas mobilidades eletroforéticas.

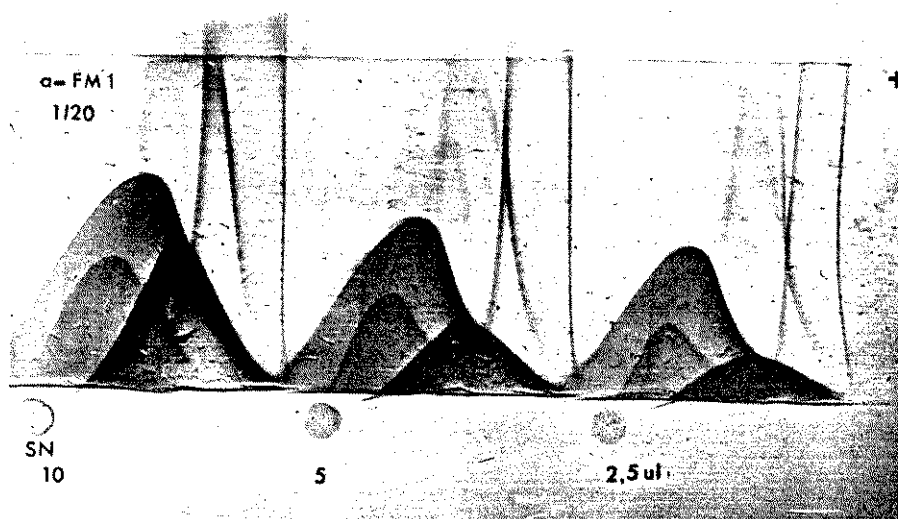


Fig. P1 - Variação volumétrica do soro normal de camundongo e conseqüentes modificações nas áreas dos diferentes sistemas precipitantes.

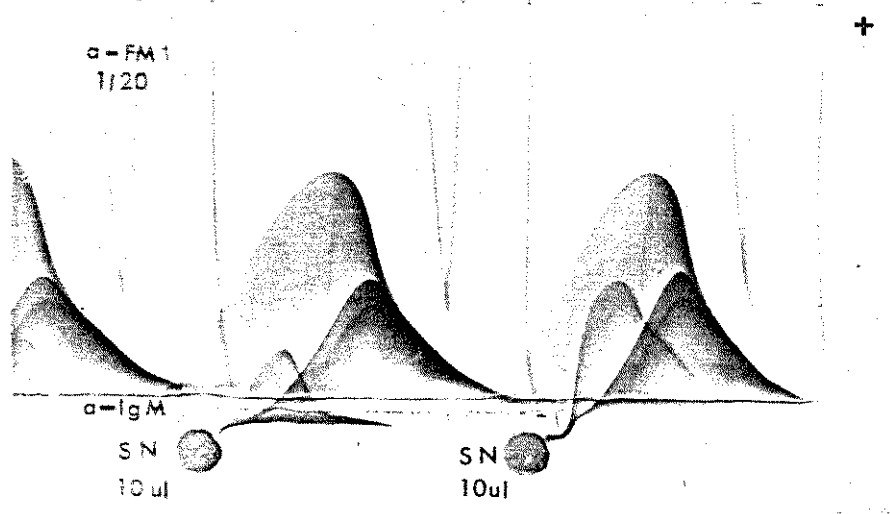


Fig. P2 - Identificação da IgM.

α -FM
1/20

+

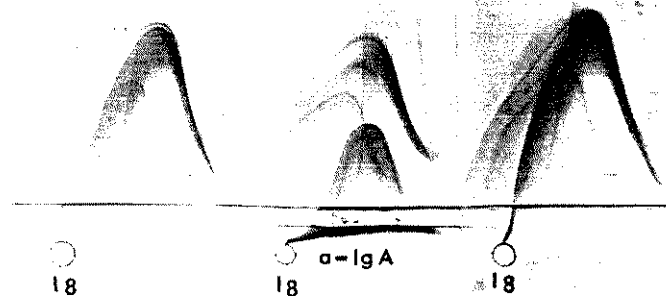


Fig. P3 - Identificação da IgA.

 α -FM
1/20

+

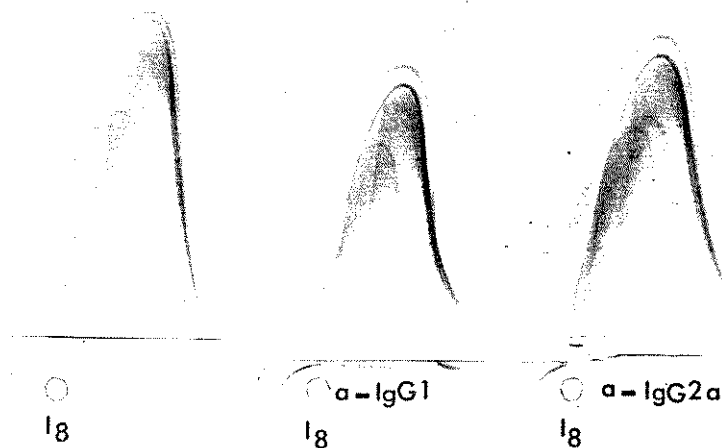


Fig. P4 - Identificação da IgG1 e IgG2.

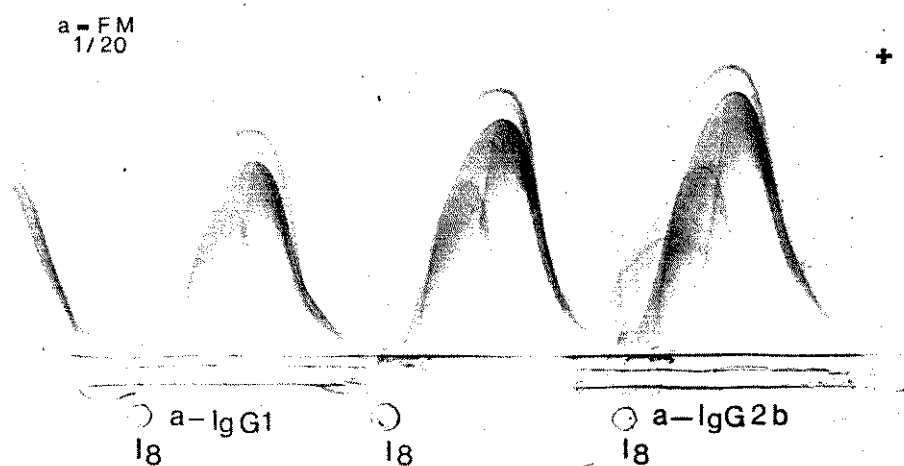


Fig. P5 - Identificação da IgG1 e IgG2.

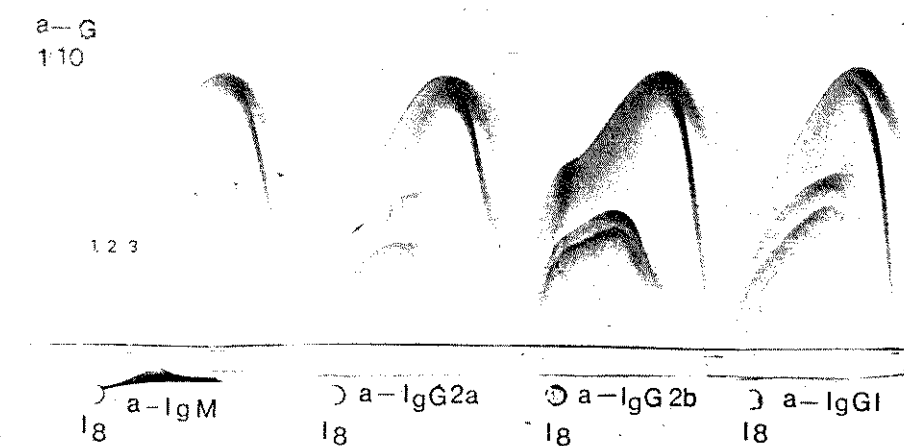


Fig. P6 - Identificação da IgG2a e IgG2b.

2.2. Quantificação das imunoglobulinas.

A comparação dos padrões das reações de imunoeletroforese bidimensional quantitativa, obtidas com soros dos diferentes lotes de camundongos, mostrou que o teor das imunoglobulinas variou durante o período de observação, tanto no grupo controle, como no grupo infectado (Fig. Q1 e Q2). Esta observação pode ser feita com qualquer dos imuni-soros disponíveis. Como se pode observar nas Figs. Q1 e Q2, não houve paralelismo entre as variações ocorridas dentro dos lotes controle (C) e às apresentadas nos lotes infectados (I).

Os dados referentes a quantificação das diversas classes de Igs, estão dispostos nas Figs. Q3 a Q7, onde se verifica, a grosso modo, que ocorreram alterações quantitativas durante o período de observação, tanto no grupo I, como no grupo C. Pode-se observar, também, que as variações que ocorreram no grupo C, apresentam um aspecto cíclico sinusoidal. A comparação das curvas de evolução das imunoglobulinas do grupo C com o I, mostram que, no que se refere a IgM; IgA e IgG1, as duas curvas são aparentemente paralelas da 1ª até a 5ª semana de observação, após o que aparecem nítidas diferenças quantitativas nos níveis das imunoglobulinas dos dois grupos. Houve uma aparente paralelismo entre os dois grupos, durante o período de observação, no que diz respeito aos níveis das imunoglobulinas IgG2a e IgG2b.

A análise estatística dos dados quantitativos (teste de WILCOXON) evidenciou que os dois grupos diferem significativamente, no que se refere ao teor de IgG1 (Apêndice E3c). A análise de variância mostrou que os dois grupos, também, diferem significativamente, quando comparados a partir da 6ª semana após a exposição, no tocante ao teor de IgA (Apêndice E4d) e IgM (Apêndice E2f). Em concordância com o aparente paralelismo observado nas Figs. Q6 e Q7, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos C e I, no que se refere ao teor de imunoglobulinas IgG2a e IgG2b (Apêndices E4b; E4c e E5b; E5c).

Considerando que houve variação ampla do teor das Igs no grupo C, ao longo do período de observação, não se pode atribuir um alto significado aos valores de concentração absoluta de imunoglobulinas do grupo I. Em decorrência deste fato, o teor das Igs do grupo I será melhor representado, indicando-se quantas vezes seu nível é maior ou menor do que o do grupo C. Isto pode ser feito através da relação de resultados obtidos no grupo I e C correspondente (I/C), levando-se em consideração que os valores I/C , situados entre 0.8 e 1.2, devem ser incluídos na faixa considerada de variação normal, uma vez que as variações das replicatas é igual ou inferior a 20%. A representação da relação I/C , ao longo do período de observação,

mostra que, nas primeiras semanas, houve elevação do teor da IgM, seguido por um aumento da IgA (Fig. Q8). Após esta elevação, os níveis destas Igs voltaram praticamente à normalidade, entre a 3ª e 5ª semana e, em seguida, os níveis da IgA; IgG1 e IgM, começaram a aumentar consideravelmente, chegando a atingir, na 8ª semana, a valores correspondentes a 4.5; 3 e 2, respectivamente.

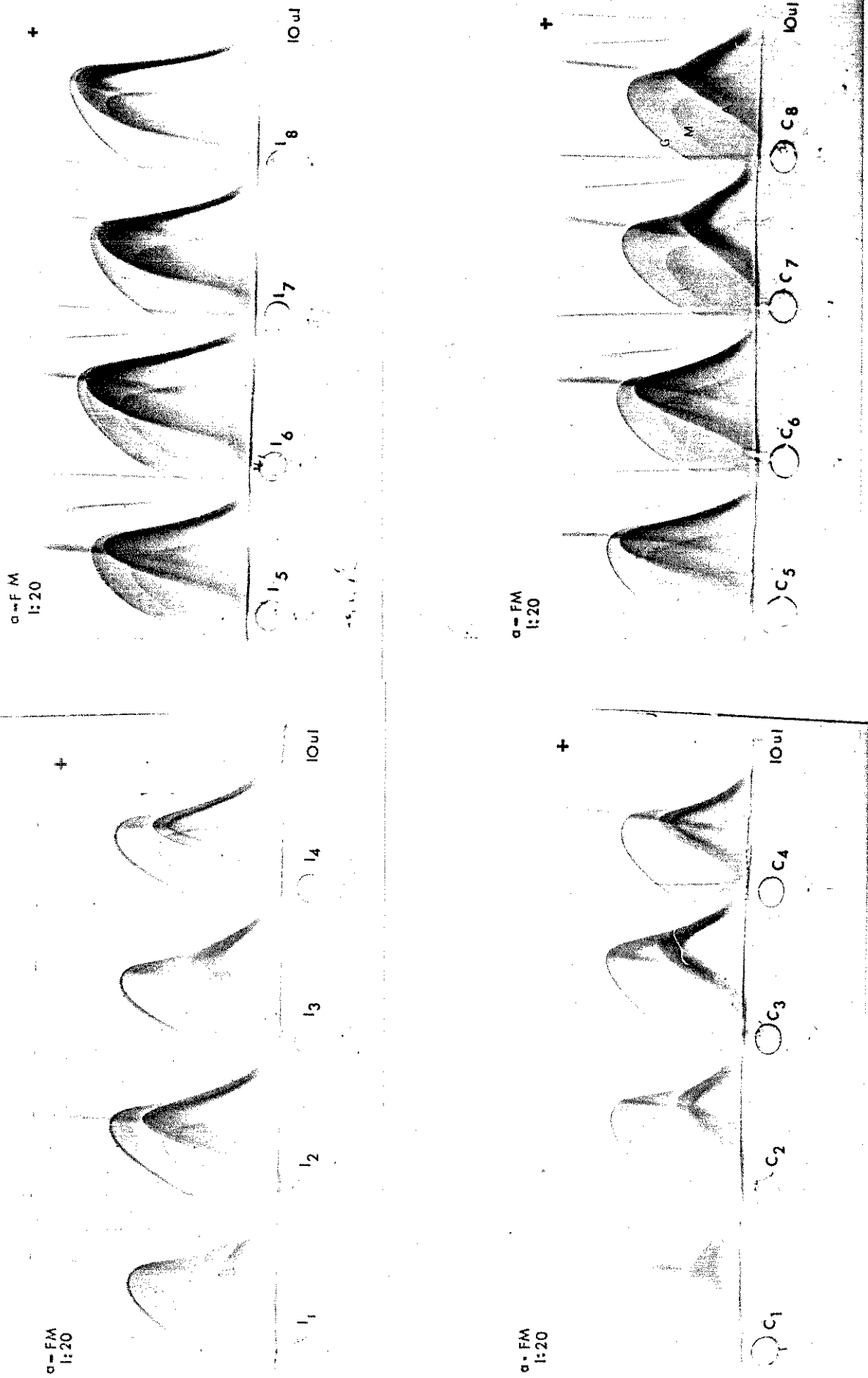


Fig. 91 - Reações utilizadas na quantificação das imunoglobulinas M; A e G1.

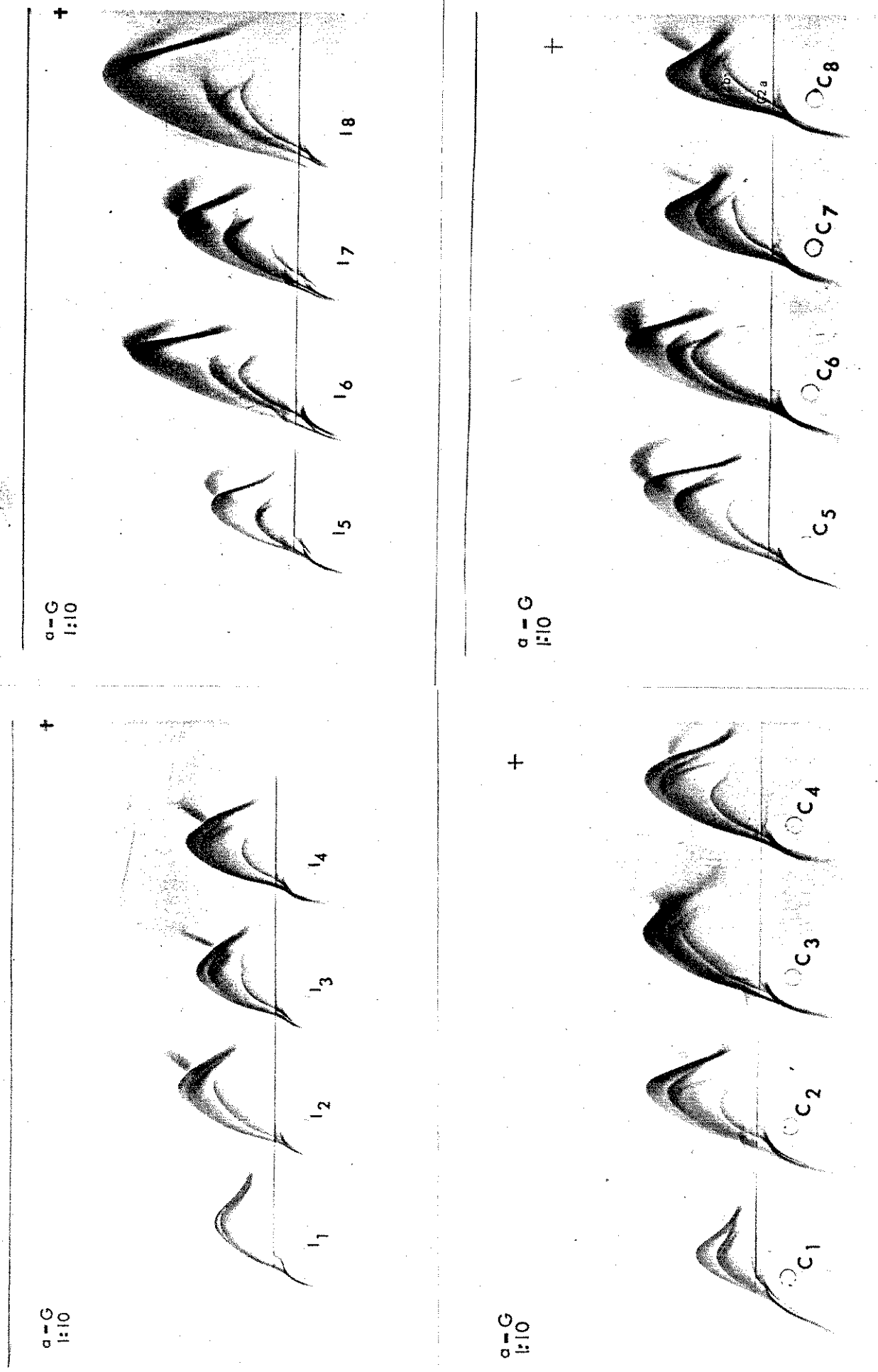


Fig. Q2 - Reações utilizadas na quantificação das imunoglobulinas IgG2a e IgG2b.

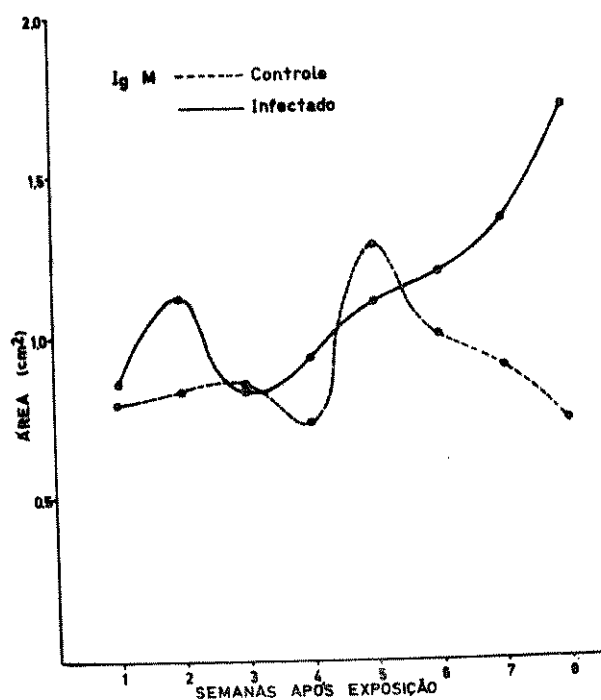


Fig. Q3 - Resultado da quantificação da IgM

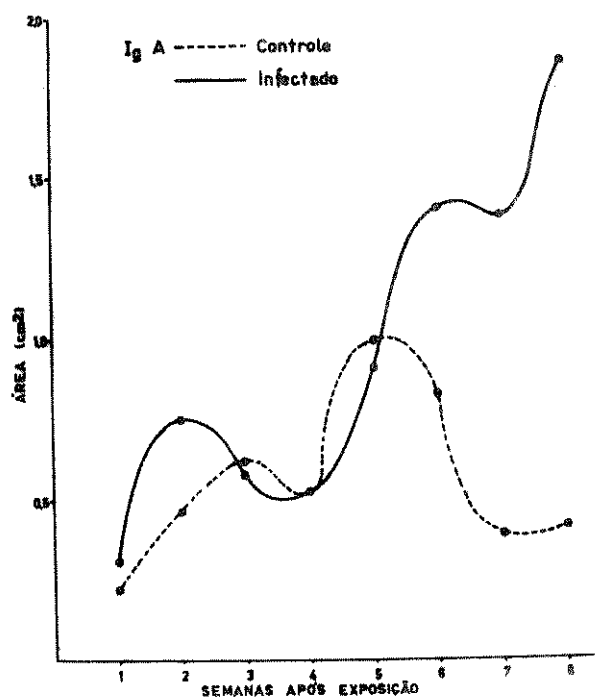


Fig. Q4 - Resultado da quantificação da IgA.

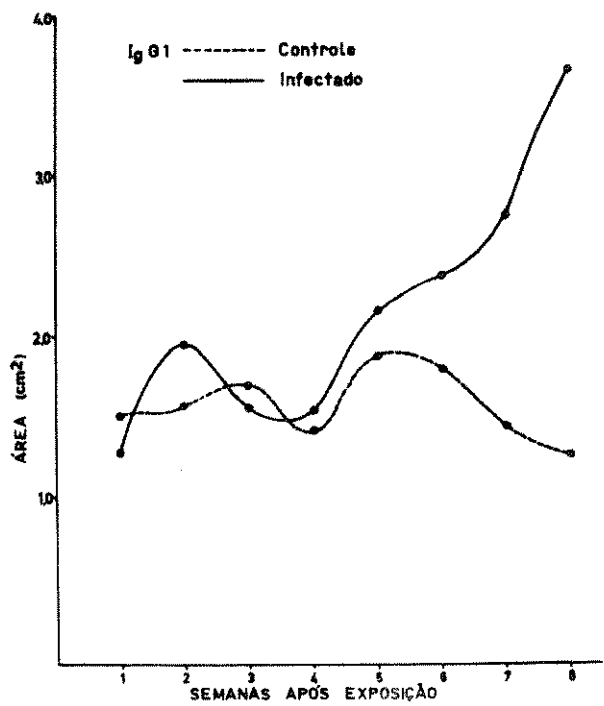


Fig. Q5 - Resultado da quantificação da IgG1.

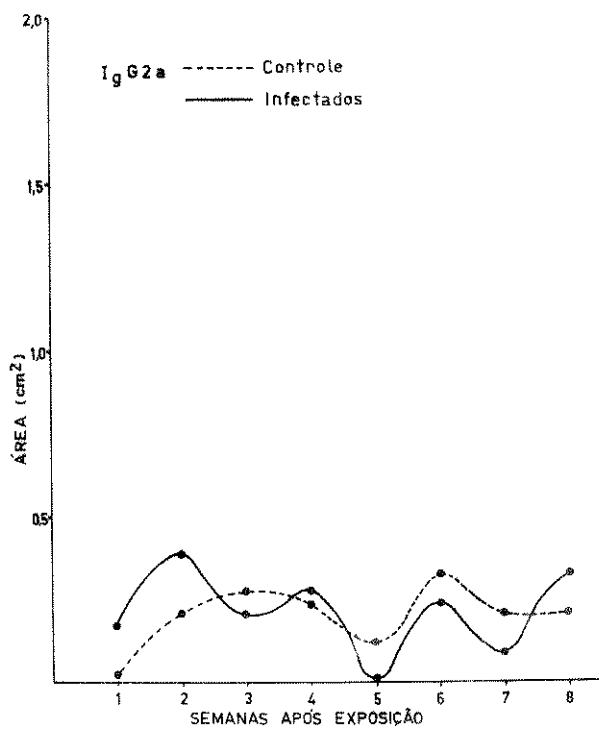


Fig. Q6 - Resultado da quantificação da IgG2a.

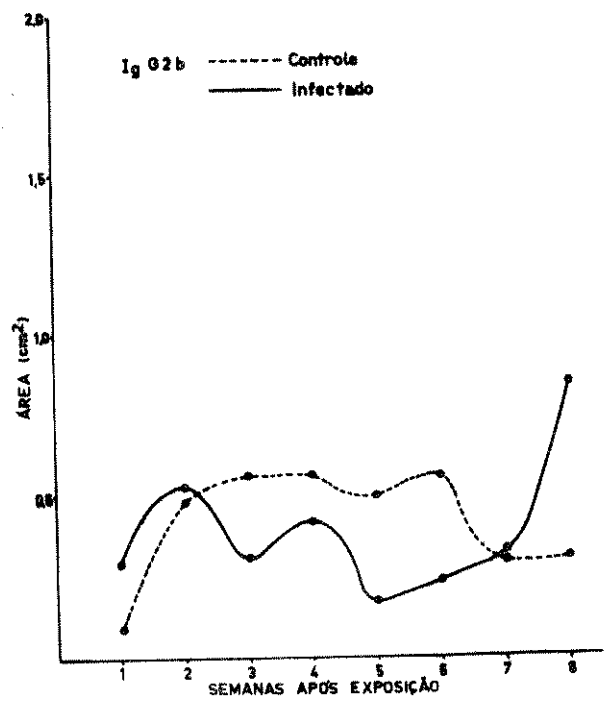


Fig. Q7 - Resultado da quantificação da IgG2b.

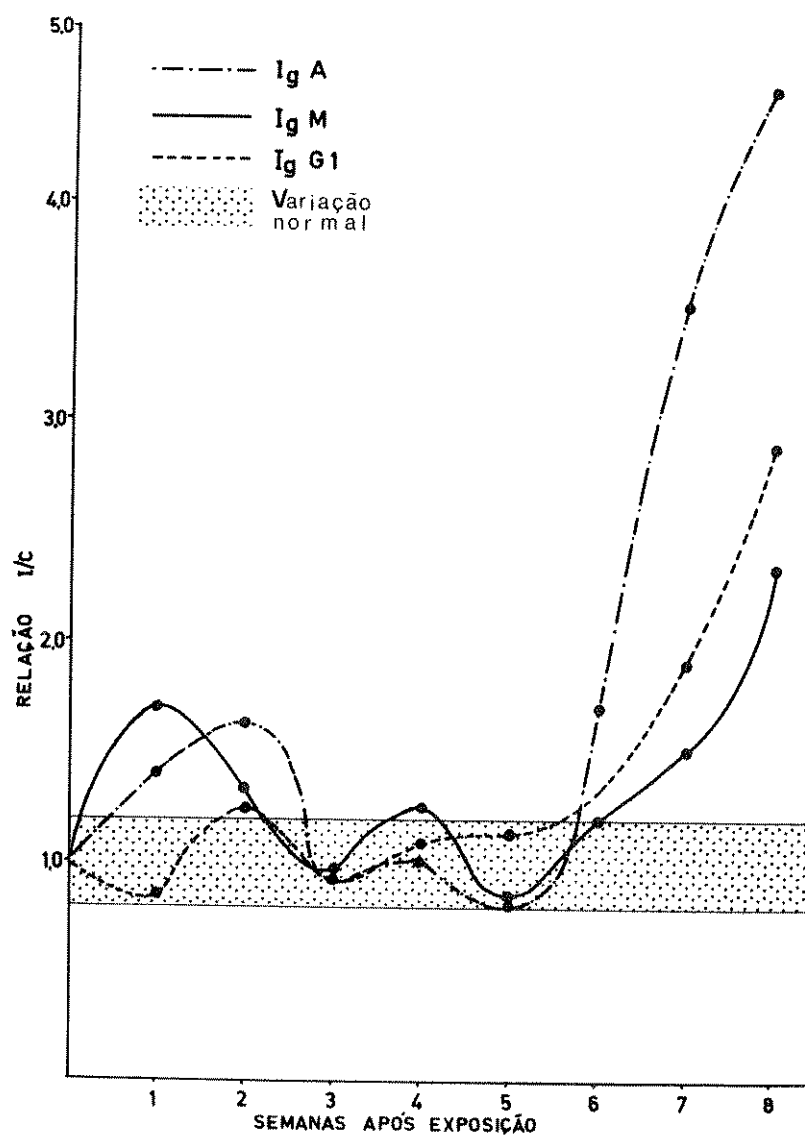


Fig. Q8 - Relação entre os teores das imunoglobulinas IgM; IgA e IgG1, dos lotes de animais infectados (I) e controles (C).

3. Especificidade das imunoglobulinas.

A capacidade dos soros de camundongos reagirem com antígenos de *S. mansoni*, foi verificada, usando a imunoeletroforese bidimensional e a reação de imunofluorescência indireta.

Os soros obtidos dos animais pertencentes aos lotes C, apresentaram reações negativas com quaisquer das técnicas empregadas (Figs. E3; E6a e E8a).

A imunoeletroforese bidimensional dos soros previamente absorvidos com vermes liofilizados, indicou uma acentuada redução das áreas correspondentes às imunoglobulinas IgM; IgA; IgG1 e IgG2 (Fig. E1). Em concordância com este fato, os vermes liofilizados, utilizados na absorção, quando submetidos ao teste de imunofluorescência, mostraram-se fortemente positivos (Fig. E2).

As reações de imunofluorescência indireta, foram feitas, seja utilizando-se cortes histológicos de esquistossomos; esporocistos e miracídios, seja utilizando miracídios e cercárias íntegras. Os resultados obtidos, sumariados na TABELA VI, indicam que reações positivas podem ser observadas, a partir da 39 semana de infecção, quando se utilizam cortes histológicos de esquistossomos. Inicialmente, a positividade destas reações pode ser observada no tubo digestivo do esquistossomo, tal como exemplificado na Fig. E4a e b, onde foram utilizados so

ros de animais com 4 semanas de infecção. Com os soros das semanas subsequentes, a positividade se estende para além do tubo digestivo, sendo que, nas últimas semanas, todo o corpo do verme apresentou-se fluorescente, acentuando-se o tegumento e o tubo digestivo (Figs. E5 a e b).

Utilizando cercárias íntegras, foi possível determinar reações positivas frente a soros de animais com 4 semanas de infecção. Com estes soros, foram observados reações positivas nas extremidades da parte cefálica das cercárias, conforme pode ser visualizada na Fig. E6b. Com os soros dos animais com 6 a 8 semanas de infecção, observou-se positividade crescente do tegumento da larva (Figs. E7a e b).

Com os miracídios, a positividade pode ser verificada a partir da 4ª semana de infecção, nos cílios e tegumento. A princípio, estas reações foram discretas, intensificando-se quando os soros das semanas subsequentes foram utilizados (Fig. E8b). As reações realizadas com os soros controles, foram todas negativas (Fig. E8a). Idênticas observações foram verificadas em miracídios contidos em cortes histológicos de fígados de camundongos infectados (Fig. E9a).

Nos esporocistos, as reações positivas em cercárias começaram a aparecer na 6ª semana após infecção e em cercárias e nas paredes do esporocistos, da 7ª semana em diante (Fig. E9b).

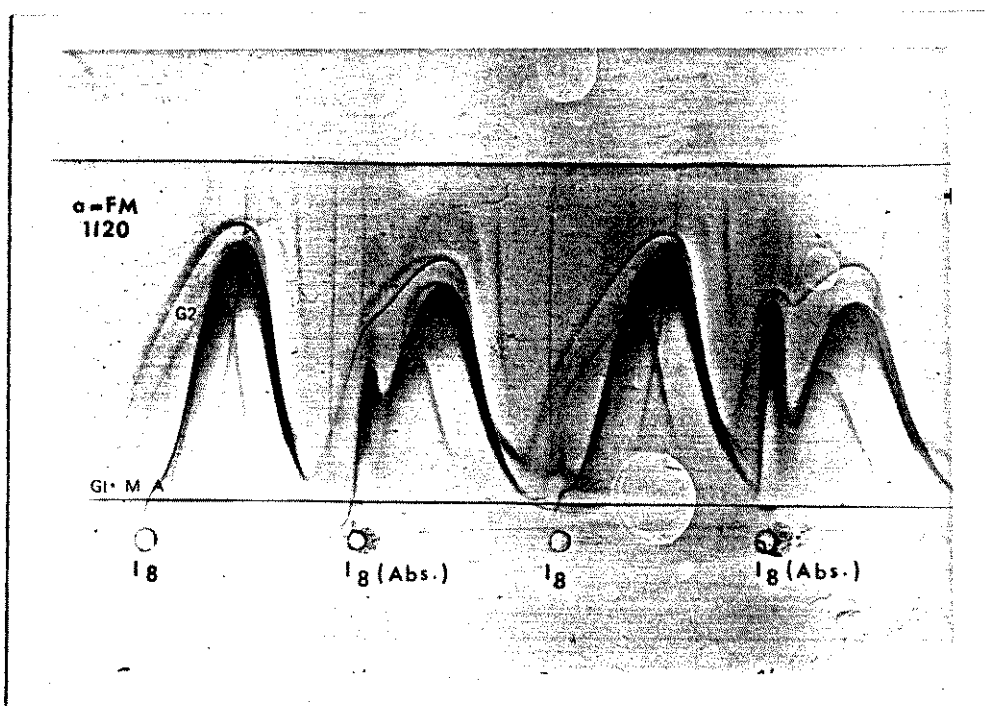


Fig. E1 - Especificidade das imunoglobulinas IgM; IgA; IgG1 e IgG2, para o *S. mansoni*, com o soro I₈ absorvido.

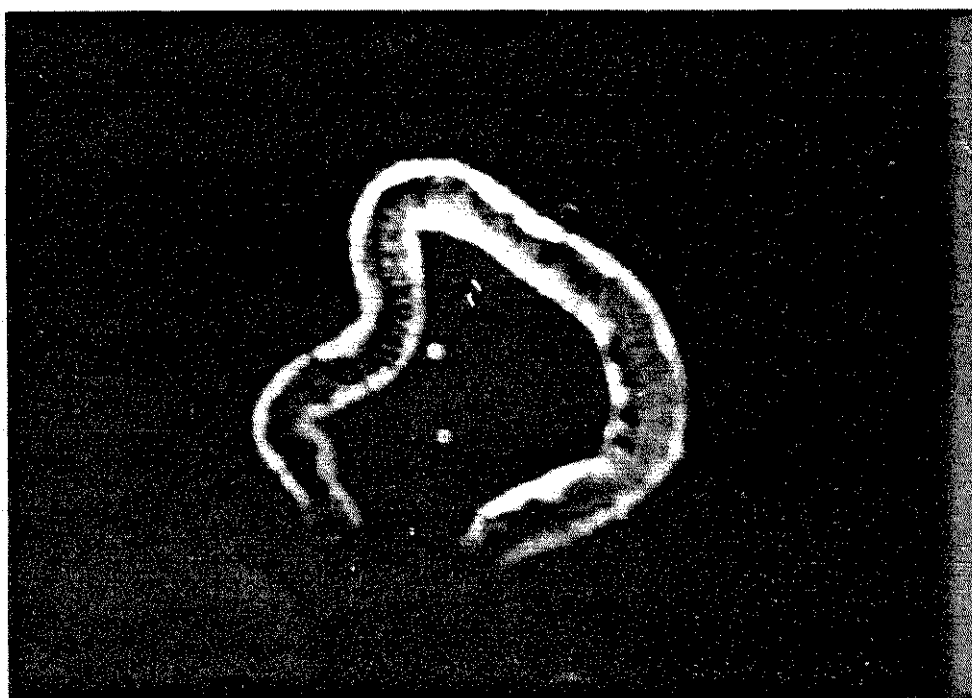


Fig. E2 - Imunofluorescência positiva para vermes utilizados na absorção do soro I₈.

TABELA VI

Reações de imunofluorescência obtidas com soros imune de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* e diferentes estágios evolutivos do verme.

SOROS	REAÇÕES EM TUBOS		REAÇÕES EM CORTES HISTOLÓGICOS		
	miracídios	cercárias	miracídios	esporocistos	esquistossomos
I ₁	-	-	-	-	-
I ₂	-	-	-	-	-
I ₃	-	-	-	-	+ -
I ₄	-	+ -	-	-	+
I ₅	+	-	+	-	+
I ₆	++	++	++	+	++
I ₇	+++	+++	+++	++	+++
I ₈	+++	+++	+++	+++	+++
C ₈	-	-	-	-	-

In e Cn = soro imune (I) e controle (C) obtidos semanalmente (n) após exposição
 Reações: negativas (-) e positivas (+), em diferentes intensidades.

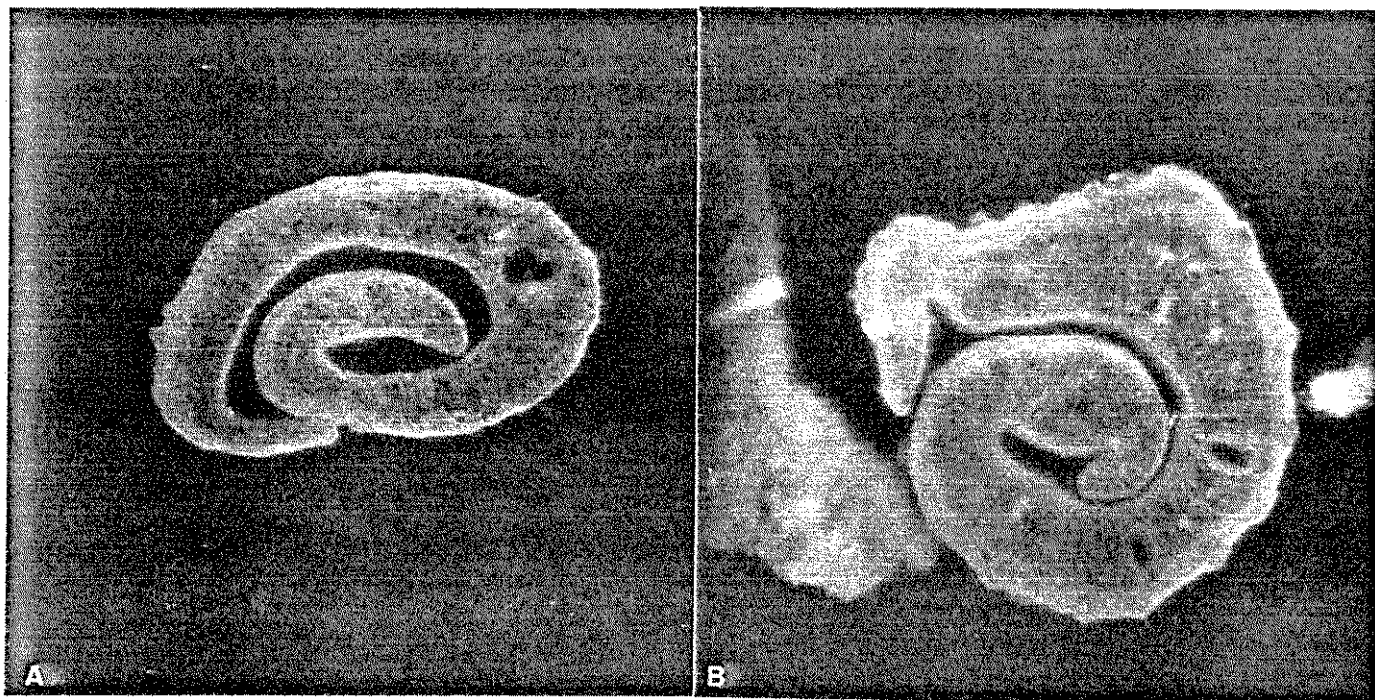


Fig. E3 - Reações de imunofluorescência negativas para vermes, com soros I_1 (A) e C_8 (B).

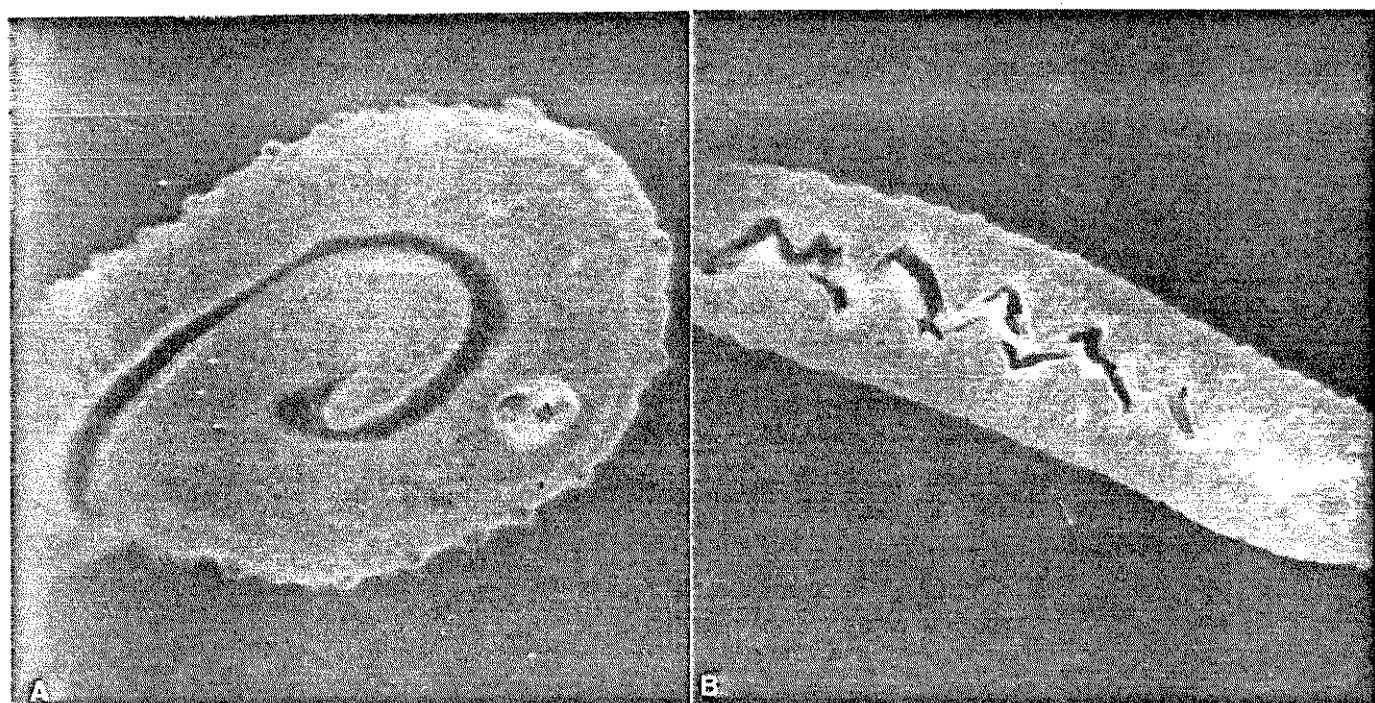


Fig. E4 - Reações de imunofluorescência positiva para vermes, com os soros I_4 (A) e I_5 (B).

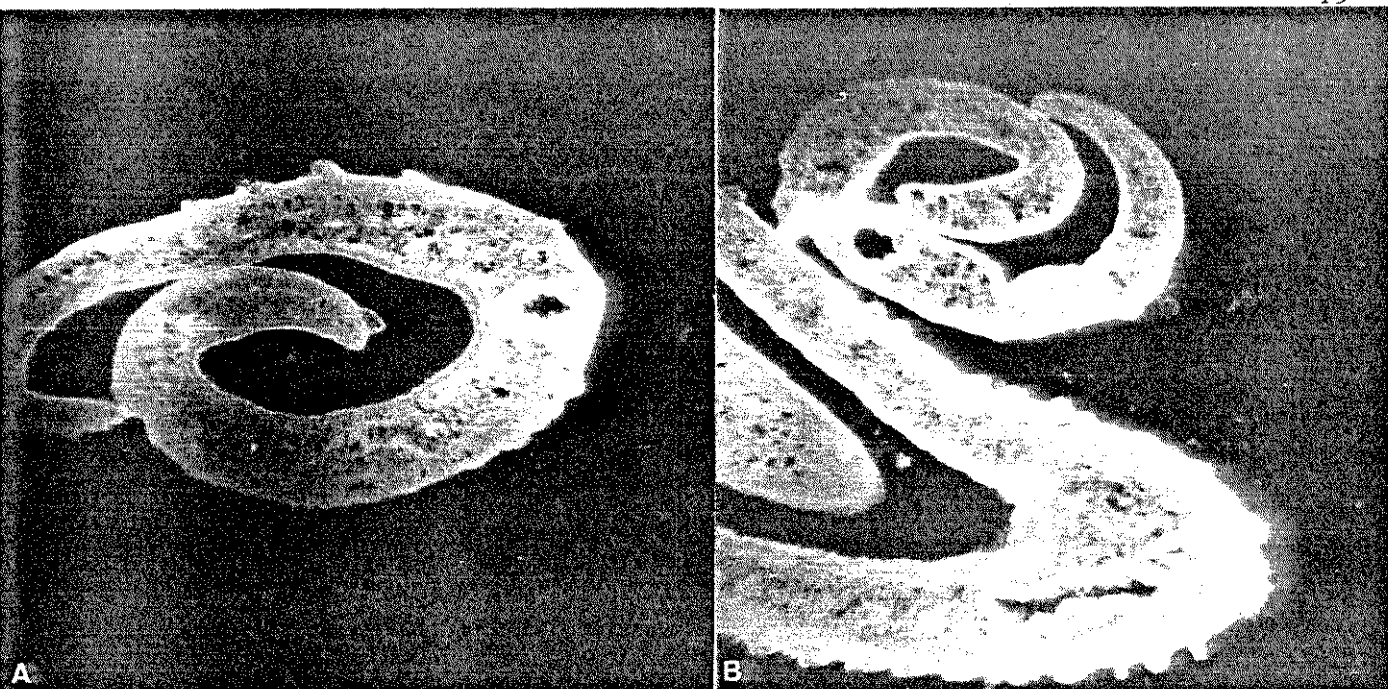


Fig. E5 - Reações de imunofluorescência positiva para vermes, com os soros I_6 (A) e I_8 (B).

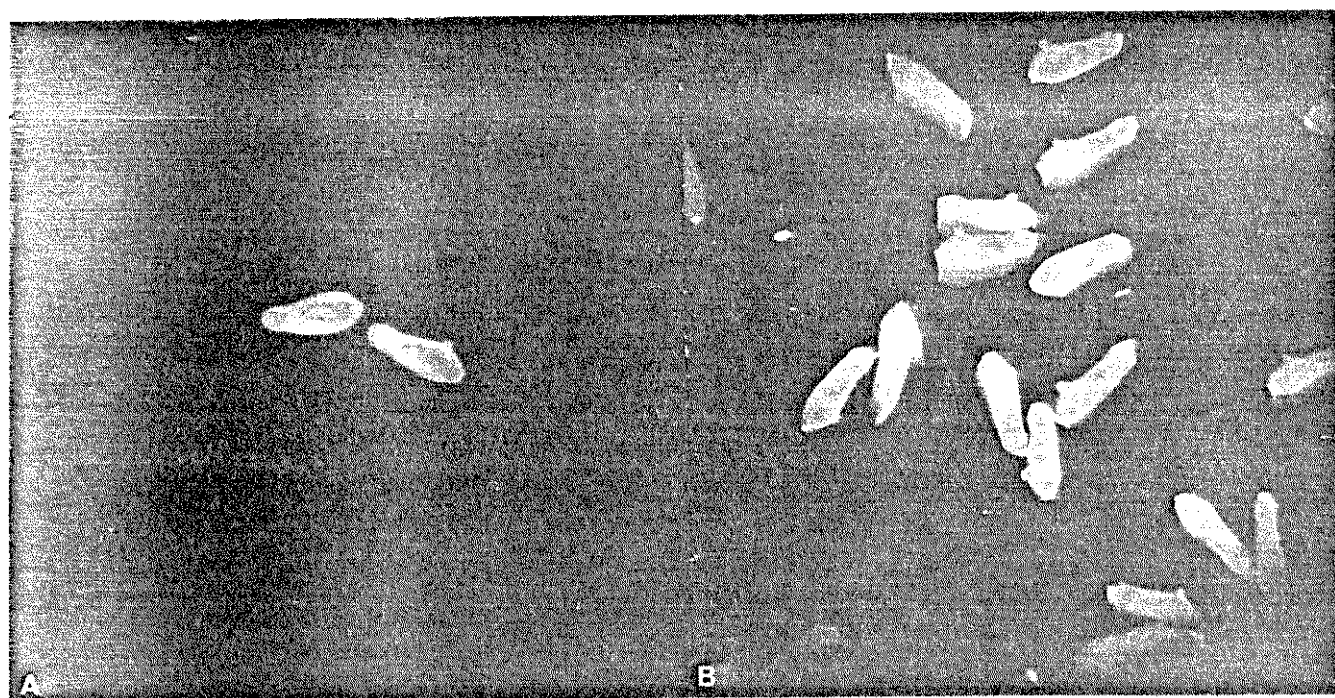


Fig. E6 - Reações de imunofluorescência negativa e positiva para cercárias, com os soros I_1 (A) e I_4 (B), respectivamente.

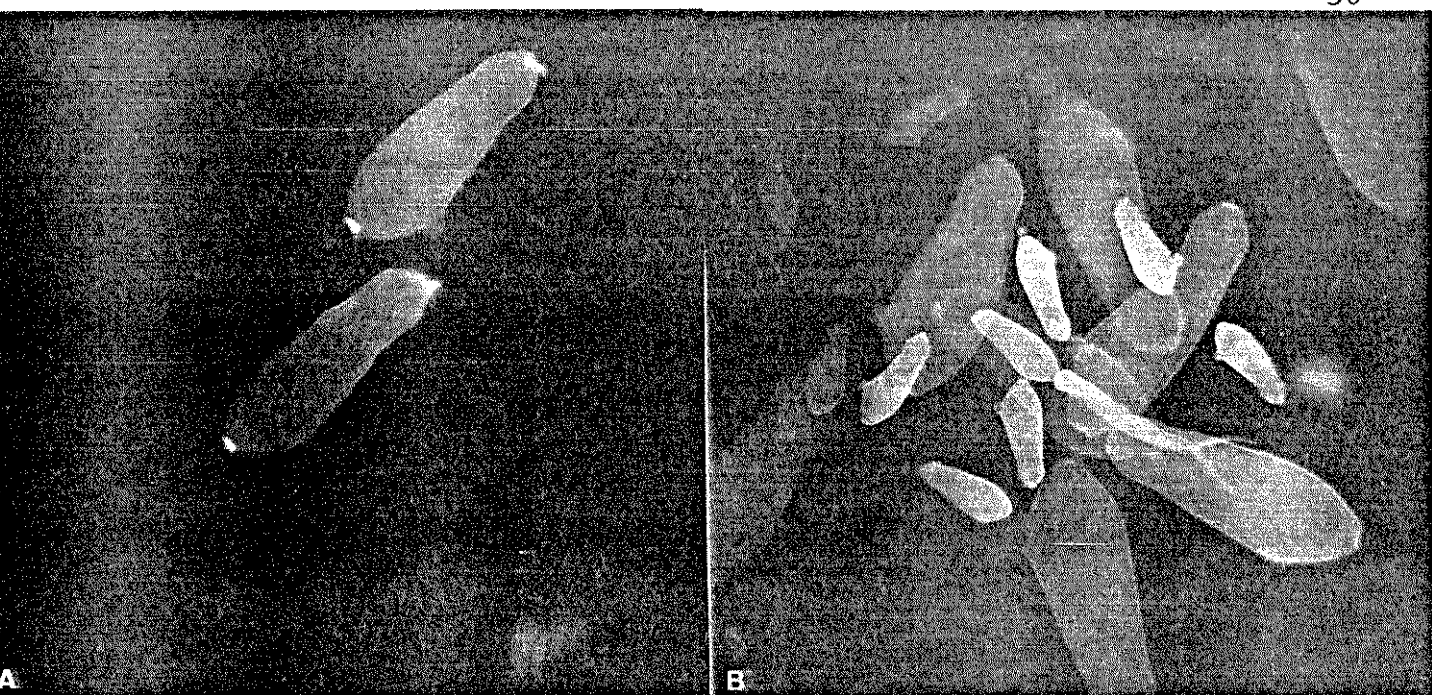


Fig. E7 - Reações de imunofluorescência positiva para cercárias, com soros I_6 (A) e I_8 (B).

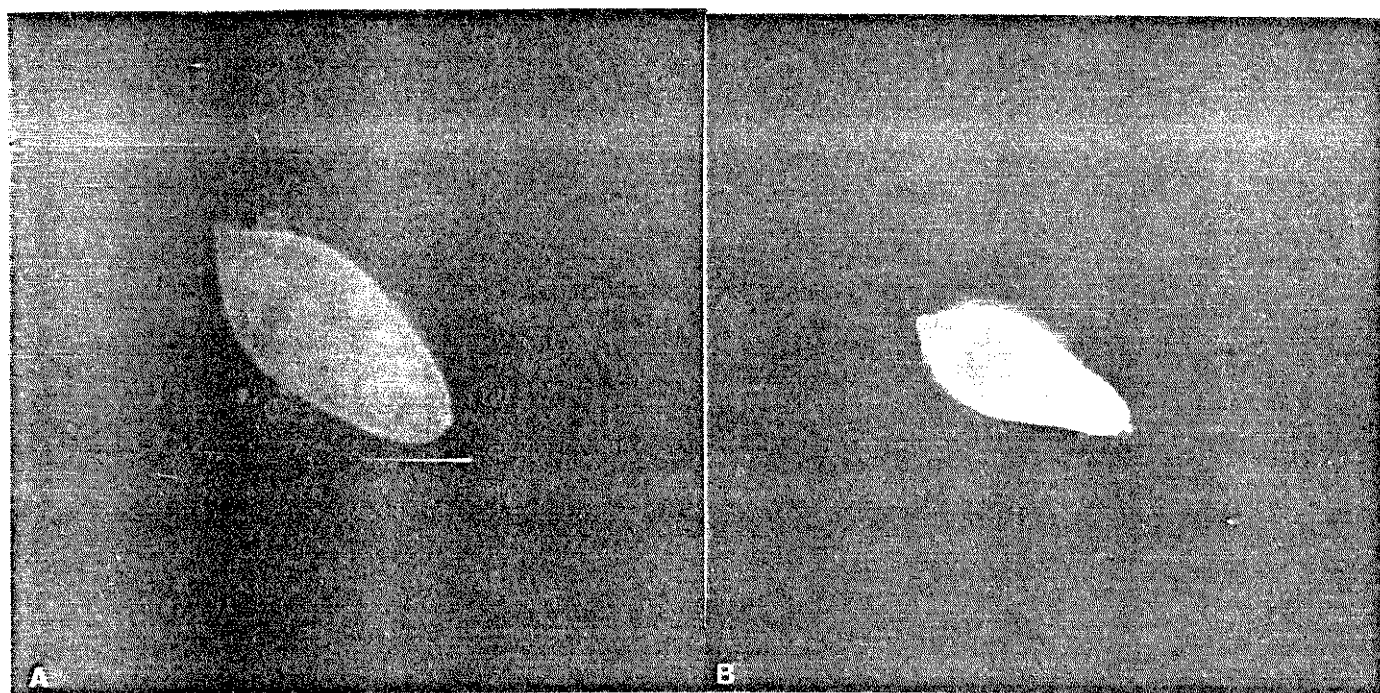


Fig. E8 - Reações de imunofluorescência negativa e positiva para miracídios, com os soros C_8 (A) e I_8 (B), respectivamente.

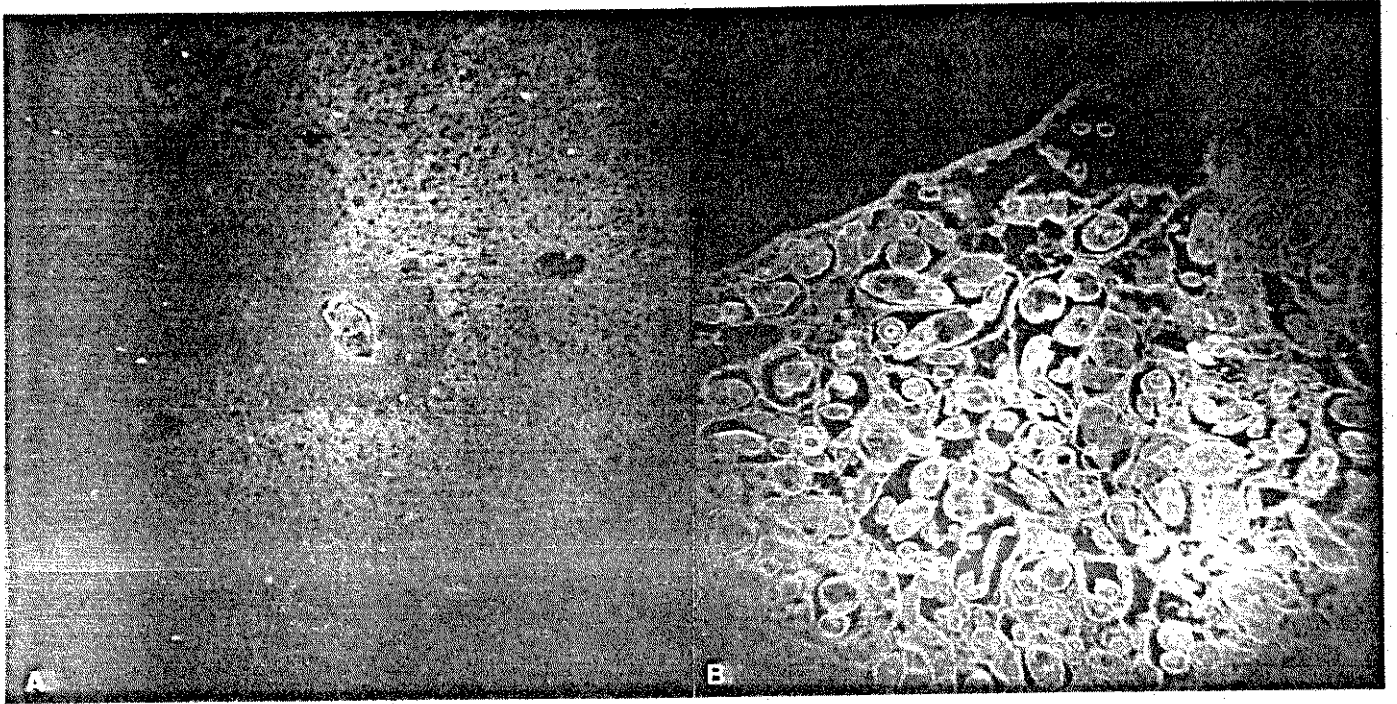


Fig. E9 - Reações de imunofluorescência positivas em cortes histológicos para miracídios (A) e para esporocistos (B) , com o soro I₈.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

A infecção experimental de camundongos com *Schistosoma mansoni* é fácil de ser estabelecida, desde que se observe dois fatores considerados importantes por GHANDOUR & WEBBE (1.973), para maior aproveitamento do potencial energético das cercárias na invasão do tegumento do hospedeiro: a utilização de larvas recém-emergidas e de camundongos jovens. Na realização do presente trabalho, foram observados os fatores idade das cercárias (2 horas) e idade do hospedeiro vertebrado (30 dias), e os resultados obtidos na evolução da parasitose mostraram que todos os animais expostos ao verme, estavam parasitados.

Vários resultados obtidos durante a infecção, não diferiram dos dados demonstrados por outros autores. O número de cercárias viáveis para a infecção de camundongos, foi semelhante ao encontrado por OLIVER & STIREWALT (1.952), precursores do método de infecção através da cauda do animal e por MAGALHÃES & CARVALHO (1.968), quando compararam o poder infectante da linhagem mineira com a linhagem paulista do verme. Exemplares de *S. mansoni* tornaram-se adultos em épocas em que ainda se registrava a presença de vermes jovens, comparando-se destarte o "amadurecimento assincrônico dos vermes", analisado por BRENER (1.956), ao comparar seus dados com os que foram publicados por FAUST & Cols. em 1.934, e recentemente por BARBOSA & Cols. (1.978). As datas em que foram registrados o aparecimento de granulomas hepáticos (6ª semana) e o pico destas reações tóxicas (8ª semana), assim como, a média de parasitas recuperados por animal, foram, também, resultados coincidentes com os da literatura especializada (BRENER, 1.956; 1.959 e WARREN, 1.967).

A eletroforese foi aplicada nos soros dos animais pertencentes aos diferentes lotes infectados e controles, ao contrário do que tem sido feito em outros trabalhos de metodologia semelhante, que utilizam uma mistura (pool) de soros de animais normais como controle da experiência, durante todo o período de observação. A análise dos perfis eletroforético das proteínas séricas, mostrou que houve variações quantitativas, tanto nos lotes infectados como nos controles correspon

dentes. Estas variações, não foram estatisticamente significativas, quando comparadas entre os lotes de cada grupo, isoladamente. Contudo, se levarmos em consideração que o erro da dosagem das proteínas e das frações eletroforéticas não é maior do que 10% , teremos que admitir que as flutuações dos níveis das proteínas totais não estão incluídas no limite do erro de dosagem, consequentemente podem ser atribuídas alterações reais nos níveis destas proteínas.

A comparação feita entre os dados dos grupos controle e infectado, demonstrou alterações estatísticas das frações β e γ -globulinas e hipoalbuminemia. Estes resultados são concordantes com as observações feitas desde a década de 50, tanto na esquistossomose humana (FIORILLO, 1.954), como na experimental (EVANS & STIREWALT, 1.957; 1.958; SADUN & WALTON, 1.958). Alguns autores, como De WITT & WARREN (1.959), não encontraram hipoalbuminemia em camundongos esquistossomóticos e concluíram ser possível a síntese de albumina pelo parênquima hepático não totalmente destruído pelo parasita. Porém, outros trabalhos realizados em seguida, confirmaram as observações que vinham sendo encontradas no homem (FIORILLO, 1.966) e em modelos experimentais (SMITHERS & WALKER, 1.961). Estes dois últimos autores acrescentaram, ainda, que o decréscimo no nível da albumina, ocorria ao mesmo tempo em que um marcante aumento intra-vascular de seus "catabólitos" era registrado por isotópos, sugerindo ser esta a causa principal da hipoalbuminemia.

Esta ocorrência seria devido ao insuficiente anabolismo desta proteína pelo fígado parasitado. As causas imunológicas destes fenômenos, são bastante discutidas e consideradas como resultantes de estímulos antigênicos específicos e inespecíficos. Os específicos correriam por conta das secreções e excreções procedentes de vermes e do estágio larvário contido nos ovos, e os inespecíficos, decorrentes de lesões tissulares provocadas pelo *S. mansoni* no fígado (SMITHERS & TERRY, 1.959).

Como sabemos, o método da eletoforese em microzonas, permite quantificar as alterações que ocorrem nas cinco principais frações séricas, caracterizadas pelas suas mobilidades eletroforéticas. Contudo, o soro contém maior número de componentes identificados (53 proteínas séricas humanas) e as alterações quantitativas dos componentes, durante a infecção, poderá ser feita individualmente, utilizando métodos imunoquímicos.

Habitualmente, no estudo da evolução das diferentes classes de imunoglobulinas, tem sido utilizado o método de MANCINI & Cols. (1.965), comparando-se uma mistura (pool) de soros dos animais normais, tomados como padrão, com os soros dos animais infectados. Este método tem alta sensibilidade e é excelente para determinação de quantidades absolutas de imunoglobulinas, porém, tem o inconveniente de exigir soros mono-específicos. A preparação deste tipo de soro, apresenta numerosos problemas, tendo em vista que, a quantidade

média de soro obtida por camundongo é de 0.5 ml/animal, o que requer grande número de camundongos para este fim. Por outro lado, a quantidade das diferentes imunoglobulinas nestes soros é baixa, sendo que a obtenção destas proteínas em estado de pureza, exige uma grande quantidade de material inicial. Tem sido inúmeras, as tentativas de obtenção das cinco maiores classes de Igs de camundongo. Os métodos utilizados, foram os mais variados possíveis. A maioria deles empregaram a separação em DEAE-celulose como passo principal (KALPAKTSOGLU & Cols. 1.973); outros usaram a eletroforese em zona combinada com cromatografia de troca-iônica (FAHEY & Cols., 1.964), com ou sem prévia precipitação das globulinas pelo sulfato de amônio; outros, ainda, incluíram a filtração em gel ou eletroforese preparativa, seguida por várias formas de cromatografia em coluna e, por fim, combinações entre eletroforese em zona e purificação do material eletro-separado, com a técnica de eletro-focalização (MURGITTA & VAS, 1.970). Em nosso trabalho, por exemplo, frações que foram consideradas puras por imuno-eletroforese unidimensional, quando utilizadas para a imunização de coelhos, induziram a formação de soros pluri-específicos (cadeias leves e pesadas). Para contornar estas dificuldades, tem sido utilizados camundongos isogênicos portadores de mielomas (FAHEY & Cols., 1.964). A manutenção de camundongos isogênicos, requer laboratórios especiais e técnicos capacitados para selecionarem geneticamente estes animais, e a obtenção de células mielóides para o implan-

te, requer a importação do material produzido no exterior.

O método da imunoeletroforese quantitativa bidimensional, tem a vantagem de não exigir a utilização destes soros, consequentemente, qualquer laboratório medianamente equipado, poderá obter soros pluri-específicos que permitam quantificar as Igs em estudo. Utilizando este método, foi-nos possível dosar as Igs de camundongos envolvidas na resposta imune ao *S. mansoni*.

A análise estatísticas dos dados dos grupos controle e infectado, indicou a existência de alterações significativas a partir da 6ª semana de infecção, em concordância com os dados da eletroforese em microzonas (TABELA IV) e com os dados de outros autores que observaram elevação nos níveis das β e γ -globulinas, a partir da época da oviposição (SMITHERS & TERRY, 1.969). As tres imunoglobulinas que se destacaram como principais participantes da resposta imune do camundongo ao *S. mansoni* : IgG1; IgA e IgM, também, foram encontradas participando da imunidade na esquistossomose humana (HILLYER, 1.969; ANTUNES & Cols., 1.971 e KANAMURA & Cols., 1.978); murina (HILLYER & FRICK, 1.967; DEELDER, 1.973 e SHER & Cols., 1.977) e em outras infecções parasitárias produzidas por protozoários, como malária e tripanosomose (PAHO, 1.967).

O valor dos dados quantitativos absolutos das Igs, tem pouco significado, consierando-se que o nível dessas proteínas sofre flutuações amplas durante o desenvolvimen

to dos animais (OHWAKI & Cols., 1.977; HAAIJMAN & Cols., 1.977), chegando muitas vezes a duplicar a concentração inicial, como foi observado no presente trabalho. Essas flutuações se devem principalmente a vários estímulos antigênicos, decorrentes da manutenção dos animais em biotério e da própria variação ambiental. Tendo em vista as alterações que ocorrem normalmente nos animais de observação, o estudo do desenvolvimento das imunoglobulinas deve ser feito, comparando-se animais da mesma raça e idade, submetidos às mesmas condições ambientes durante o período do experimento. Nestas condições, foi possível estimar quantas vezes o nível das Igs dos animais infectados aumentou em relação aos do grupo controle.

O perfil sorológico resultante da relação I/C (Fig. Q8), evidenciou aspectos clássicos da resposta imune encontrada em animais que tenham recebido dois estímulos antigênicos consecutivos. Estes aspectos tem sido observados em camundongos convencionais e axênicos, utilizando-se antígenos timo dependente ou não (OHWAKI, 1.977). A resposta primária, caracterizada pela IgM e IgA, ocorrida entre a primeira e a segunda semana após a infecção, se deve provavelmente à estímulos antigênicos específicos de cercárias e esquistossomos. A resposta secundária, caracterizada pela IgG1; IgA e IgM, ocorreu a partir da sexta semana após a infecção, possivelmente devido a antígenos provenientes de vermes adultos; aos ovos dos parasitas e aos tecidos desnaturados por secreções destas formas evo

lutivas do verme. Nesta data, foi também observado aumento significativo de pesos de baço e fígado. Como se vê, este estágio é bastante complexo, porque envolve respostas imune a nível celular (comprometimento do fígado e baço) e humoral.

O aparecimento de anticorpos da classe IgM como primeira Ig efetora da resposta imune, tem sido encontrada na esquistossomose (KANAMURA & Cols., 1.978) e em várias outras infecções, como toxoplasmose (AMATO NETO & Cols., 1.972) e na doença de Chagas (VATTUONE & Cols., 1.973). A presença da IgA nas duas respostas, com destaque na secundária, pode ser explicada como resultante de reações celulares ocorridas a nível de plasmócitos localizados em mucosas do trato respiratório e gastroentérico, específicas a antígenos do primeiro e segundo estágio, respectivamente.

Tem sido demonstrado que, os anticorpos da classe IgG1, estão presentes nos soros de camundongos parasitados com *S. mansoni* (SHER & Cols., 1.977).

Não foi observada a formação de anticorpos entre a 3ª e 5ª semana após a infecção. Este período de latência da resposta imune, é coincidente com o registrado por MOTA-SANTOS & Cols., em 1.976, que observaram um estado de depressão imunológica em camundongos esquistossomóticos, avaliado pela capacidade dos linfócitos esplênicos formarem "rosetas" e de produzirem anticorpos "in vitro" frente a antígenos timo dependentes: hemácias de carneiro.

O aumento de Igs verificado durante a infecção se deve a uma produção de anticorpos específicos para antígenos provenientes do parasita, demonstrados pela imunoeletroforese bidimensional, com soros préviamente absorvidos e pelas reações de imunofluorescência indireta, utilizando diferentes estágios evolutivos do parasita. Estes dados coincidem com os de OKOT-KOTBER (1.978) e indicam que os primeiros anticorpos formados são específicos para o tubo digestivo do parasita, sugerindo que estes antígenos são altamente imunogênicos.

O conjunto de dados mostrou que, utilizando-se soros pluri-específicos de fácil obtenção e expressando-se as alterações quantitativas pela relação I/C, foi possível estudar a evolução da resposta imune na esquistossomose, obtendo-se dados comparáveis com os encontrados na literatura. Isto nos permite admitir que esta metodologia pode ser utilizada no estudo de outras respostas imunes.

CAPÍTULO V

RESUMO E CONCLUSÕES

Com a finalidade de verificar a possibilidade de estudar a evolução das imunoglobulinas de camundongos envolvidas na resposta imune ao *Schistosoma mansoni*, utilizando soros pluri-específicos, lotes de animais foram infectados com o parasita (grupo I) e seus comportamentos parasitológicos foram comparados com os de animais normais, tomados como controle da experiência (grupo C), por meio da imunoeletroforese bidimensional quantitativa.

As alterações foram estudadas, quer dentro dos lotes dos dois grupos, quer comparando um grupo com o outro, expressando-se estas comparações pelo aumento relativo expresso pela relação I/C.

A especificidade das imunoglobulinas, durante a infecção esquistossomótica, foi estudada por imunoeletroforese bidimensional e pela reação de imunofluorescência in direta. Os resultados obtidos indicaram que:

1. Houve flutuação nos níveis das imunoglobulinas dos camundongos pertencentes ao grupo I e grupo C, quando os grupos foram estudados isoladamente, durante o período de observação.
2. As flutuações não foram paralelas, principalmente a partir da 6ª semana após a infecção em diante, quando se observou elevação dos níveis das imunoglobulinas IgG1; IgA e IgM.
3. A expressão das imunoglobulinas pela relação I/C, permitiu verificar o aparecimento de uma resposta primária, ocorrida entre o início da infecção e a segunda semana após esta data, constituída de IgM e IgA, e uma secundária, iniciada na sexta semana de infecção, constituída pela IgG1, IgA e IgM, com aumentos relativos de 4.5; 3 e 2 vezes o normal.
4. Este aumento de imunoglobulinas se deve a produção de anticorpos específicos para antígenos do *Schistosoma mansoni*.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMATO NETO, V.; CAMARGO, M.E.; MENDONÇA, J.S.; LEVI, G.C.; & OSELKA, G. W. - 1.972. Observações sobre a pesquisa de anti corpos IgM anti-toxoplasma por imunofluorescência no soro de pacientes com toxoplasma adquirida, forma linfoglandular. *Rev. Inst. Med. trop. de São Paulo*, 14: 264.

ANDRADE, Z.A. - 1.977. Imunologia da esquistossomose. In Pro gresso da Imunologia das Parasitoses. Ed. C.E. TOSTA, *Soc. Bras. Med. trop. de Brasília*:42.

- ANTUNES, L.J.; REIS, A.P.; PELLEGRINO, J.; TAVARES, C.A. & KATZ, N. - 1.971. Immunoglobulins in human schistosomiasis mansonii. *J. Parasit.*, 57: 539.
- AXELSEN, N.H.; KRØL, J. & WEEKE, B. - 1.973. A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications. Universitetsforlaget- Oslo.
- BARBOSA, M.A.; PELLEGRINO, J.; COELHO, P. M. Z. & SAMPAIO, I.B.M. - 1.978. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansonii* in mice. *Rev. Inst. Med. trop. de São Paulo.*, 20:121.
- BAZIN, H. - 1.966. Les immunoglobulines de la souris. I. Obtention des immunosérums spécifiques leur correspondant. *Ann. Inst. Pasteur.*, 111: 544.
- BRENER, Z. - 1.956. Observações sobre a infecção do camundongo pelo *S. mansonii*. *Rev. Bras. de Malariol. e Doeng. trop.*, 8:565.
- BRENER, Z. - 1.959. Esquistossomose experimental. *Rev. Bras. de Malariol. e Doeng. trop.*, 11:473.

BRENER, Z.; PELLEGRINO, J. & OLIVEIRA, F.C. - 1.956. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. Aplicação do método de isolamento de granulomas do fígado de camundongos. *Rev. Bras. de Malariol. e Doenç. trop.*, 8 :583

BRENER, Z. - 1.962. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da esquistossomose mansônica. Tese de cátedra. Belo Horizonte.

De WITT, W.B. & WARREN, K.S. - 1.959. Hepato-splenic schistosomaliasis in mice. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 8:440.

DEELDER, A.M. - 1.973 - Immunology of experimental infections with *Schistosoma mansoni* in the swiss mouse and *Fasciola hepatica* in rabbit. *Acta Leidensia*, 39: 25.

EVANS, A.S. & STIREWALT, M.A. - 1.958. Serologic reactions in *Schistosoma mansoni* infection. III. Ionographic fractionation of sera of mice with progressive disease. *Expl. Parasitol.* 6:8

EVANS, A.S. & STIREWALT, M.A. - 1.958. Serologic reactions in *Schistosoma mansoni* infection. IV. Comparative ionographic study of sera of hamster, mice, and albino rats. *Expl. Parasit.* 7: 165.

- FIORILLO, A.M. - 1.954. Estudo eletroforético do soro de pacientes portadores de esquistossomose mansoni hepatesplênica. Hospital (Rio), 45: 647.
- FIORILLO, A.M. - 1.966. Electroforese das proteínas do sangue na esquistossomose mansônica forma hepatesplênica. *Rev. Inst. Med. trop. de São Paulo.*, 8:1.
- GHANDOUR, A.M. & WEBBE, G. - 1.973. A study of the death of *Schistosoma mansoni* cercariae during penetration of mammalian host skin: the influence of the ages of the cercariae and of the host. *Int. J. Parasit.*, 3: 789.
- GRABAR, P. & BURTIN, P. - 1. 964. Immuno-electrophoretic analysis. Amsterdam, London, New York. Elsevier Publishing Company.
- HAAIJMAN, J.J.; van den BERG, P. & BRINKHOF, J. - 1.977. Immunoglobulin class and subclass levels in the serum of CBA mice throughout life. *Immunol.*, 32:923.
- HILL, J. - 1.956. Chemoterapeutic studies with laboratory infections of *S. mansoni*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 50: 39.

HILLYER, G.V. & FRICK, L.P. - 1.967. Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections: I - Mouse infections. *Expl. Parasit.*, 20: 321.

HILLYER, G.V. - 1.969. Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections: IV - Human infections. *Expl. Parasit.*, 25: 376.

HOCKLEY, D.J. & McLAREN, D.J. - 1.973. *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercariae to adult worm. *Int. J. Parasit.*, 3: 13.

HSU, S.Y. & HSU, H.F. - 1.964. Serum protein changes in rhesus monkeys during immunization and following challenge by *Schistosoma mansoni*. *Zeit. Tropenmed. Parasit.*, 15:43.

KALPAKTSOGLU, P.K.; HONG, R. & GOOD, R.A. - 1.973. The five classes of immunoglobulins in normal C3H and BALB/c mice. *Immunol.*, 24: 303.

KANAMURA, H.Y.K. - 1.976. Estudo de anticorpos anti- *Schistosoma mansoni* como subsídio ao diagnóstico sorológico da esquistossomose. Tese de mestrado apresentado ao Inst. de Cienc.Bioméd. da USP.

- KANAMURA, H.Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S. & SILVA, L.C. - 1.978. Pattern of class-specific fluorescent antibodies according to the stage of the infection in human schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. de São Paulo.*, 20: 76.
- KUNKEL, H.G. & SLATER, R.J. - 1.952. Electrophoresis in a starch supporting medium. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 80: 42.
- LEWERT, R.M. - 1.970. Schistosomes - In G. J. JACKSON; R. HERMAN & J. SINGER - Immunity to parasitic animals. The Rockefeller University, N.Y., 2:981.
- LIMA, A.O. & SILVA, W.D. - 1.970. Imunologia, Imunopatologia e Alergia. 1ª Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio.
- MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. - 1.968. Determinação do número de cercárias provenientes de cepas diferentes de *Schistosoma mansoni* que conseguem penetrar, sob determinadas condições de laboratório, em *Mus musculus*. *Rev. Soc. Bras. Med. trop.* 5:249.
- MAGALHÃES, L.A. - 1.969. Técnica para avaliação da viabilidade de penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* e *Mus musculus*. *Hospital (Rio)*, 75: 1.663.

- MANCINI, G.; CARBONARA, C.O. & HEREMANS; J.F. - 1.965. Immunochemical quantification of antigens by single radial immuno diffusion. *Immunochemistry*, 2: 238.
- McLAREN, D.J.; HOCKLEY, D.J.; GOLDRING, O.L. & HAMMOND, B.J. - 1.977. The tegumental membrane of *Schistosoma mansoni*: A model for studying the nature and function of intramembraneous particles. *Proc. 1 st Int. Cong. Low temp. Biol. Micros., Cambridge*: 79.
- MOTA-SANTOS, T.A.; GAZZINELLI, G.; RAMALHO-PINTO, F.J.; PELLEGRINO, J. & SILVA, W.D. da. - 1.976. Immunodepression in mice following *Schistosoma mansoni* infection. *Rev. Inst. Med. trop. de São Paulo*, 18: 246.
- MURGITA, R.A. & VAS, S.I. - 1.970. Isoelectric separation of mouse immunoglobulins. *J. Immunol.*, 104: 514.
- NETO, R.C.L. - 1.975. Estudo comparativo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens mineira e paulista do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1.907. Tese de mestrado apresentada ao Inst. de Biol. da UNICAMP.
- NASH, T.E. - 1.974. Localization of the circulating antigen with the gut of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 23: 1.085.

- OHWAKI, M.; YASUTAKE, N.; YASUI, H. & OGURA, R. - 1.977. A comparative study on the humoral immune response in germ-free and conventional mice. *Immunol.* 32: 43.
- OKOT-KOTBER, B.M. - 1.978. The development of stage-characteristic immunofluorescence pattern in experimental schistosomiasis in mice. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 72: 255.
- OUCHTERLONY, O. - 1.958. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis; In *Progr. Allerg.*, 5: 1.
- OLIVER, L. & STIREWALT, M.A. - 1.952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.* 38:19.
- OLIVEIRA, A.R. - 1.975. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonóculo. *Summa Phytopathologica*, 1: 61.
- Pan American Health Organization (PAHO) - 1.967. Immunologic aspects of parasitic infections. Scientific Publication nº 50.
- PARAENSE, W.L., 1.959. - Histórico. *Rev. Bras. Malariol. e Doenç. trop.*, 11: 105.

- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D.G. - 1.955. A simplified method for the concentration of cercariae. *J. Parasit.*, 41: 329.
- PHILLIPS, S.M.; REID, W.A.; BRUCE, J.I.; HEDLUND, K.; COLVIN, R.C.; CAMPBELL, R. DIGGS, C.L. & SADUN, E.H. - 1.975. The cellular and humoral immune response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. I. Mechanisms during initial exposure. *Cell. Imm.*, 19: 99.
- PHILLIPS, S.M.; REID, W.A.; KHOURY, P.B. & DOUGHTY, B.L. - 1.977. The cellular and humoral immune response to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. IV . A posteriori interpretations. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 26: 48.
- SADUN, E.H. & WALTON, B.C. - 1.958. Studies on the host parasite relationships to *Schistosoma mansoni*. II. Quantitative changes in the concentration of serum proteins in humans and rabbits. *Am. J. Hyg.* 7: 500.
- SHER, A.; MCINTYRE, S. & van LICHTENBERG, F. - 1.977. *Schistosoma mansoni*: Kinetics and class specificity of hypergammaglobulinemia induced during murine infection. *Exp. Parasit.* 41: 415.

FAHEY, J.L.; WUNDERLICH, J. & MISHEL, R. - 1.964. The immuno - globulins of mice. I - Four major classes of immunoglobulins: 7S γ^2 , 7S γ^1 , $\gamma_{1A}(\beta_{2A})$, and 18S γ_{1M} -globulins. *J. Expl. Med.* 120: 223.

SMITHERS, S.R. & WALKER, P.J. - 1.961. Serum protein changes in monkey infected with *Schistosoma mansoni*, with special reference to the metabolism of albumin. *Expl. Parasit.*, 11:39.

SMITHERS, S.R. - 1.962. Stimulation of acquired resistance to *Schistosoma mansoni* in monkeys: role of eggs and worms. *Expl. Parasit.* 12: 263.

SMITHERS, S.R. & TERRY, R. - 1.969. The immunology of schistosomiasis. *Advanc. Parasit.*, 7:41.

SMITHERS, S.R. & TERRY, R. - 1.976. The immunology of schistosomiasis. *Advanc. Immunol.*, :399.

SMITHERS, S.R.; McLAREN, D.J. & RAMALHO-PINTO, F.J. - 1.977 - Immunity to schistosomes: the target. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 26: 11.

VATTUONE, N.H.; SZARFMAN, A. & GONZALEZ-CAPPA, S.M. - 1.973.
Antibody response and immunoglobulin levels in humans with
acute ou chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas'Disease)
J. trop. Med. Hyg., 61:795.

WARREN, K.S. 1.967. A comparison of Puerto Rican, Brazilian ,
Egyptian and Tanzanian strains of *Schistosoma mansoni* in mice;
penetration of cercariae, maturation of schistosomes and pro
duction of liver disease. *Tras. Roy. trop. Med. Hyg.*, 61:795.

WEICHSELBAUM, T.E. - 1.946. An accurate and rapid method for
the determination of protein in small amount of blood serum
and plasma. *Amer. J. Clin. Path. Tech.*, 10:40.

World Health Organization (WHO) - 1.974. Immunology of schisto
somiasis (Memoranda). *Bull. Wlth. Org.*, 51: 553.

APÊNDICE

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

1. Referentes à quantificação de áreas da IgA.

13

APÊNDICE E1a

Valores correspondentes às quantificações (A e B) das áreas da IgA

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	INFECTADOS			CONTROLE		
	A	B	TOTAL	A	B	TOTAL
I	0,33	0,30	0,63	0,23	0,22	0,43
II	0,73	0,77	1,50	0,49	0,44	0,93
III	0,60	0,56	1,16	0,64	0,60	1,24
IV	0,51	0,54	1,05	0,48	0,56	1,04
V	0,92	0,88	1,80	1,10	0,88	1,98
VI	1,48	1,30	2,78	0,84	0,80	1,64
VII	1,43	1,32	2,75	0,39	0,39	0,78
VIII	1,95	1,76	3,71	0,40	0,43	0,83
TOTAL	7,95	7,43	15,38	4,57	4,32	8,89

Total Geral = 24,27

$\bar{X} = 0,7584375$

APÊNDICE E1b

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	n ₁	n ₂
Tratamentos (Trat.)	1	1,31625	1,31625	3,961	1,0	7,8
Semanas (Seman.)	7	2,61689	0,37384	1,218	7,0	7,2
Quantificações (Qut.)	1	0,01853	0,01853	0,573	1,1	1,3
Trat. X Seman.	7	2,15153	0,30731	749,765**		
Trat. X Qut.	1	0,02518	0,02518	31,086***		
Seman. X Qut.	7	0,02496	0,00357	44,074*		
Trat. X Seman. X Qut.	7	0,00568	0,00081			
TOTAL	31					

C.V. = 3,75%

APÊNDICE E1c

DIFERENÇA ENTRE O GRUPO INFECTADO E O CONTROLE DA IGA, ANALISADA PELO TESTE DE WILCOXON.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	INFECTADO		CONTROLE	
	$\Delta(A-B)$	RANKS Positivos Negativos	$\Delta(A-B)$	RANKS Positivos Negativos
I	0,03	1,5	0,01	1,0
II	0,04	-	0,05	5,0
III	0,04	-	0,04	3,5
IV	0,03	4,0	0,08	-
V	0,04	-	0,22	7,0
VI	0,18	6,0	0,04	3,5
VII	0,11	7,0	0,00	-
VIII	0,19	8,0	0,03	2,0
TOTAL		26,5	22,0	6,0

$T_{mín. I.} = 9,5 > 4$ NS para $N = 7$

$T_{mín. I.} = 6 > 2$ NS para $N = 7$

APÊNDICE E1d

TESTE DE U ENTRE AS MEDIDAS DOS GRUPOS INFECTADOS E CONTROLE DA IgA, NAS ÚLTIMAS TRES SEMANAS.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	INFECTADO		CONTROLE	
	$\bar{X}$	RANKS	$\bar{X}$	RANKS
VI	2,78	5,0	1,64	3,0
VII	2,75	4,0	0,78	1,0
VIII	3,71	6,0	0,83	2,0
T O T A L		15,0		6,0

U.I. = 9.0

U.C. = 0*

U. min. = 0 < 3; Sig. (p = 0,05)

2. Referentes à quantificação de áreas IgM.

APÊNDICE E2a

Valores correspondentes às quantificações (A e B) das áreas da IgM.

SEMANA APÓS EXPOSIÇÃO	INFECTADOS			CONTROLE			
	A	B	TOTAL	A	B	TOTAL	TOTAL GERAL
I	0,85	0,85	1,70	0,74	0,84	1,58	3,28
II	1,14	1,11	2,25	0,82	0,84	1,66	3,91
III	0,85	0,82	1,67	0,87	0,84	1,71	3,38
IV	1,00	0,85	1,85	0,63	0,84	1,47	3,32
V	1,15	1,05	2,20	1,49	1,08	2,57	4,77
VI	1,12	1,26	2,38	1,05	0,96	2,01	4,39
VII	1,61	1,10	2,71	0,90	0,90	1,80	4,51
VIII	1,78	1,62	3,40	0,76	0,70	1,46	4,86
TOTAL	9,50	8,66	18,16	7,26	7,00	14,26	32,42

APÊNDICE E2b

Distribuição dos valores obtidos da quantificação da IgM.

SEMANA APÓS EXPOSIÇÃO	QUANTIFICAÇÕES			TRATAMENTOS		
	A.1+A.C	B.I+B.C	TOTAL	I	C	TOTAL
I	1,59	1,69	3,28	1,70	1,58	3,28
II	1,96	1,95	3,91	2,25	1,66	3,91
III	1,72	1,66	3,38	1,67	1,71	3,38
IV	1,63	1,69	3,32	1,85	1,47	3,32
V	2,64	2,13	4,77	2,20	2,57	4,77
VI	2,17	2,22	4,39	2,38	2,01	4,39
VII	2,51	2,00	4,51	2,71	1,80	4,51
VIII	2,54	2,32	4,56	3,40	1,46	4,86
TOTAL	16,76	15,66	32,42	18,16	14,26	32,42

APÊNDICE E2c

QUANTIFICAÇÃO	TRATAMENTOS		
	INFECTADOS	CONTROLE	TOTAL
A	9,50	7,26	16,76
B	8,66	7,00	15,66
TOTAL	18,16	14,26	32,42

$$\bar{X} = 1,013125$$

APÊNDICE E2d

Análise de variância

CAUSAS DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F	n ₁	n ₂
Tratamentos (Trat.)	1	0,475313	0,475313	3,671	1,08	7,84
Semanas (Seaman.)	7	0,773987	0,110570	0,925	9,28	8,73
Quantificações	1	0,037813	0,037813	2,157	2,15	4,70
Trat. X Seman.	7	0,868187	0,124027	6,689*		
Trat. X Quant.	1	0,010512	0,010512	0,567		NS
Trat. X Quant.	7	0,109288	0,015613	0,841		NS
Trat. X Seman.X Quant.	7	0,129788	0,018541			
TOTAL	31	2,404888				

*Significativa

C V = 13,44 %

APÊNDICE E2e

DIFERENÇA ENTRE GRUPO INFECTADO E CONTROLE DE Igm, ANALISADA PELO TESTE DE WILCOXON.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	INFECTADO		CONTROLE	
	(A-B)	RANKS Positivos Negativos	(A-B)	RANKS Positivos Negativos
I	0,00	-	0,10	-
II	0,03	1,5	0,02	-
III	0,03	1,5	0,03	2,0
IV	0,15	5,0	0,21	-
V	0,10	3,0	0,41	7,0
VI	0,14	-	0,09	4,0
VII	0,31	7,0	0,00	-
VIII	0,16	6,0	0,06	3,0
TOTAL		24,0	16,0	12,0

T mñn. I. = 4 > 2; NS para N = 7

T mñn, C. = 12 > 2; NS para N = 7

APÊNDICE E2f

TESTE DE U ENTRE AS MÊDIAS DOS GRUPOS INFECTADOS E CONTROLE DE IgM , NAS ÚLTIMAS TRÊS SEMANAS.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	INFECTADO		CONTROLE	
	$\bar{X}$	RANKS	$\bar{X}$	RANKS
VI	2,38	4,0	2,01	3,0
VII	2,71	6,0	1,80	2,0
VIII	3,40	5,0	1,46	1,0
TOTAL		15,0	6,0	

U.I. = 9,0

U.C. = 0*

U min. = 0 > 3; * Sig. (p = 0,05)

3. Referentes à quantificação de IgG 1

APÊNDICE E3a

TESTE DE WILCOXON PARA GRUPO INFECTADO.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	DETERMINAÇÕES						
	A	B	$\bar{X}$	di	RANKS	Pos.	Neg.
I	1,38	1,20	1,29	0,18	4,0	4,0	-
II	2,00	1,92	1,96	0,08	2,0	2,0	-
III	1,61	1,54	1,57	0,07	1,0	1,0	-
IV	1,54	1,54	1,54	0,00	0,0	0,0	-
V	2,32	2,00	2,16	0,32	6,0	6,0	-
VI	2,24	2,52	2,38	0,28	5,0	-	5,0
VII	2,80	2,70	2,75	0,10	3,0	3,0	-
VIII	3,90	3,41	3,65	0,49	7,0	7,0	-
Total						23,0	5,0

I mñn. = 5 > 2 NS para n = 7; Aceito nível 0,5 %

APÊNDICE E3b

TESTE DE WILCOXON PARA GRUPO CONTROLE.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	DETERMINAÇÕES						
	A	B	$\bar{X}$	di	RANKS	Pos.	Neg.
I	1.42	1.60	1.51	-0.22	-7.0	-	7.0
II	1.57	1.60	1.58	-0.17	-5.0	-	5.0
III	1.80	1.60	1.70	0.20	6.0	6.0	-
IV	1.43	1.40	1.41	0.03	1.0	1.0	-
V	1.92	1.84	1.88	0.08	2.5	2.5	-
VI	1.84	1.76	1.80	0.08	2.5	2.5	-
VII	1.50	1.40	1.45	0.10	4.0	4.0	-
VIII	1.40	1.14	1.27	0.30	8.0	8.0	-

I mñn. = 12 > 4 NS para n = 8; Aceito nível 0,5 %

APÊNDICE E3c

TESTE DE U PARA ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS DADOS DOS GRUPOS
CONTROLE E INFECTADO.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	MÉDIAS ARTIMÉTICAS			
	CONTROLE(C)	INFECTADO(I)	RANKS C	RANKS I
I	1,51	1,29	1	2
II	1,58	1,96	3	6
III	1,70	1,57	4	7
IV	1,41	1,54	5	12
V	1,88	2,16	8	13
VI	1,80	2,38	9	14
VII	1,45	2,75	10	15
VIII	1,27	3,65	11	16
TOTAL			51	85

$$U.C. = 64 + 36 - 85 = 15$$

$$U. \text{ m} \acute{i}n. = 15; \text{ Sig. para } n = 16;$$

$$U.I. = 64 + 36 - 51 = 49$$

$$p \% = 0,41$$

4. Referentes à quantificação de IgG 2 a

APÊNDICE E4a

Valores referentes a quantificação (A e B) da IgG2a.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	INFECTADO			CONTROLE		
	A	B	TOTAL	A	B	TOTAL
I	0,18	0,16	0,34	0,02	0,02	0,04
II	0,39	0,40	0,79	0,11	0,12	0,23
III	0,21	0,21	0,42	0,30	0,27	0,30
IV	0,18	0,19	0,37	0,14	0,14	0,28
V	0,01	0,01	0,02	0,12	0,12	0,24
VI	0,24	0,24	0,48	0,33	0,33	0,66
VII	0,08	0,10	0,18	0,21	0,22	0,43
VIII	0,36	0,30	0,66	0,21	0,21	0,42

APÊNDICE E4b

TESTE "t" PRA GRUPOS INFECTADOS E CONTROLE DA IgG 2a

GRUPO	$\bar{x}_D$	s_D	t
INFECTADO	0,0250	0,005	0,564
CONTROLE	0,0625	1,782	0,099

APÊNDICE E4c

TESTE DE U ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS INFECTADOS E CONTROLES DA IgG 2a.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	INFECTADO		CONTROLE	
	$\bar{X}$	RANKS	$\bar{X}$	RANKS
I	0,17	7,0	0,02	2,0
II	0,39	16,0	0,11	4,0
III	0,21	10,0	0,28	13,0
IV	0,18	8,0	0,14	6,0
V	0,01	1,0	0,12	5,0
VI	0,24	12,0	0,33	14,5
VII	0,09	3,0	0,21	10,0
VIII	0,33	14,5	0,21	10,0

TOTAL 91,5 64,5

U.I. = 35,5 U.C. = 28,5

U. mín. = 28,5 > 4 para N = 7

5. Referentes a quantificação de áreas IgG 2b

APÊNDICE E5a

VALORES REFERENTES A QUANTIFICAÇÃO DOS GRUPOS INFECTADOS E CON
TROLES IgG 2b.

SEMANAS APÓS EXPOSIÇÃO	INFACTADOS			CONTROLE		
	A	B	TOTAL	A	B	TOTAL
I	0,30	0,28	0,58	0,07	0,12	0,19
II	0,64	0,63	1,27	0,54	0,42	0,96
III	0,33	0,30	0,63	0,54	0,58	1,12
IV	0,42	0,49	0,84	0,56	0,56	1,12
V	0,18	0,18	0,36	0,52	0,48	1,00
VI	0,25	0,24	0,49	0,56	0,56	1,12
VII	0,33	0,34	0,67	0,30	0,30	0,60
VIII	0,84	0,84	1,68	0,30	0,33	0,63

APÊNDICE E5b

TESTE "t" PARA GRUPOS INFECTADOS E CONTROLE DA IgG 2b.

GRUPO	$\bar{X}_D$	S_D	t
INFECTADO	0,75	1,2817	1,655
CONTROLE	0,75	3,0589	0,693

APÊNDICE E5c

TESTE DE U ENTRE AS MÉDIAS DOS GRUPOS INFECTADOS E CONTROLES DA IgG 2b.

SEMANA APÓS EXPOSIÇÃO	INFECTADO		CONTROLE	
	$\bar{X}$	RANKS	$\bar{X}$	RANKS
I	0,29	4,0	0,9	1,0
II	0,63	15,0	0,48	10,0
III	0,31	6,5	0,56	13,0
IV	0,42	9,0	0,56	13,0
V	0,18	2,0	0,50	11,0
VI	0,24	3,0	0,56	13,0
VII	0,33	8,0	0,30	5,0
VIII	0,84	16,0	0,31	6,5
TOTAL		63,5	72,5	
U.I. =		36,5	U.C. = 27,5	
U. m̄n. = 27,5 > 16; NS para N = 7				