

126
Este exemplar corresponde à versão final
da tese defendida pela candidata Rosinary
de Jesus Gomes Turri e aprovada pela
Comissão julgadora.

ROSINERY DE JESUS GOMES TURRI



CONTRIBUIÇÕES AO ESTUDO IMUNO-PATOLÓGICO DA
ESOUISIOSSOMOSE MANSÔNICA, DETERMINADAS EM
Holochilus brasiliensis nanus, THOMAS 1897.

Tese apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Imunologia
do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Cam-
pinas, para obtenção do grau
de Mestre.

CAMPINAS

1989

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A DEUS SU e a IZUNOME-SAMA.

À minha filha Emanuele e ao
meu marido Rodiney.

Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel

Orientador

Prof. Dr. Othon de Carvalho Bastos

Co-Orientador

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Imunologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Maranhão.

Para sua realização nos foi concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), bolsa de mestrado e auxílio financeiro ao projeto.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Othon de Carvalho Bastos
Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel
Prof. Dr. Luís Augusto Magalhães
Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo
Prof. Dr. Tomomasa Yano
Prof. Dr. Paulo Maria Araujo
Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada
Profa. Dra. Eliana Maria Zanoti-Magalhães
Prof. Raimundo Carlos Lemos Neto
Prof. Dr. I. J. B. de Camargo
Prof. Dr. Maysés Sadiqurski
Profa. Ana Gagliardi
Ivone Garros Rosa

Rosane Guerra Libério
Márcia da Silva Rover Abreu
Deborah Lee Liao
Jussara Mesquita
Rosa Maria Cantanhede
João da Silva Almeida
Maria Aparecida de Campos Almeida
José Schiavotelo Júnior
Iacy Sipaúba Schiavotelo
Maria Salete Sipaúba Schiavotelo
Maria Aparecida Mucci Fabretti
Domingos da Silva Leite

Maria Helena S. S. de Brito

Irandaia Garcia

Funcionários e amigos dos Departamentos de Parasitologia:

Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual
de Campinas

Funcionários e amigos do Programa de Imunologia da Univer-
sidade Federal do Maranhão.

Sra. Terezinha; Sr. Cicero e Sr. João

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	6
2.1. Origem e distribuição dos roedores	6
2.2. Infecção experimental dos roedores	6
2.2.1. Isolamento da linhagem humana (H) de S.mansoni ..	7
2.2.2. Exposição dos animais silvestres às cercárias H .	7
2.3. Coleta de soros dos roedores	8
2.4. Obtenção de imune-soros reagentes	8
2.4.1. Preparação de imune-soros anti-soro total e da fracção globulina de Holochilus	8
2.4.1.1. Isolamento da fracção globulínica	9
2.4.1.2. Imunoeletroforese tipo rocket (IER)	10
2.4.2. Obtenção de soros anti-globulinas de Holochilus .	11
2.5. Estudos dos anticorpos séricos produzidos durante o processo infeccioso	11
2.5.1. Imunoeletroforese bidimensional (IEB)	11
2.5.2. Análise dos soros anti- S.mansoni por imunofluorescência	12
2.5.3. Imunodifusão radial simples dos soros anti- S. mansoni	13
2.5.3.1. Absorção do soro de roedor anti- S.mansoni com antígenos do parasita	14
2.6. Observações anátomo-patológicas de fígado e intestino do Holochilus b. nanus infectado com S.mansoni	15

3. RESULTADOS	16
3.1. Obtenção da fração globulínica	16
3.2. O soro anti-globulinas de roedores	17
3.3. Análise dos soros anti- S.mansoni , por imunoeletroforese bidimensional (IEB)	17
3.4. Comportamento dos soros anti- S.mansoni , em análise por imunodifusão radial simples	19
3.4.1. Análise do soro anti- S.mansoni absorvido por imunodifusão radial simples	21
3.5. Comportamento dos soros anti- S.mansoni , em análise por imunofluorescência indireta	21
3.6. Histopatologia	24
4. DISCUSSAO	29
5. CONCLUSAO	36
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	37

1 - INTRODUÇÃO:

A esquistossomose é uma doença que acomete 200 milhões de pessoas que habitam a Região Tropical (WHO 1980). Dos quais, 8 milhões são de brasileiros, distribuídos pelas Regiões Nordeste e Sudeste do país (FREITAS, 1972). A sua origem, entretanto, é completamente desconhecida para nós. Segundo RUFFER, 1910 (PARAENSE, 1959), esta doença existe a mais 3000 anos, uma vez que foram encontradas múmias parasitadas com **Schistosoma mansoni**.

Apesar de tratar-se de doença bastante antiga, a esquistossomose ainda se constitui grave problema para a Saúde Pública, acarretando prejuízos de ordem econômica devido a problemas médico-sociais.

Vários centros de pesquisa, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento, vêm estudando esta doença com o objetivo de conhecer a relação esquistossomo-hospedeiro, como única saída racional para aplicações de medidas profiláticas e terapêuticas eficazes, visto que, os governos desses países, lançam mão de medidas paliativas para o controle da doença, esquecendo de dar prioridade a programas educacionais de

coascientização da população, não se preocupando também, em destinar verbas para aplicações de medidas corretas de infraestrutura em Saúde Pública, o que levaria a erradicação da doença. Entre os estudos realizados, destaca-se os que envolvem a imunopatologia da esquistossomose, tanto em pacientes como também em roedores experimentais (WARREN, 1972; NASH, 1982; BASTOS, 1984a; GAMAL, 1987).

No Maranhão, embora se saiba que a esquistossomose foi introduzida no século XVII, provavelmente pelo tráfico de escravos parasitados, oriundos da África para os grandes engenhos localizados em Turiacu e Cururupu (ALVIM & FIORENE, 1974), a incidência desta parasitose continua alta. A difusão da doença, a partir destas duas localidades, atingiu toda a região da Baixada Maranhense, onde são registrados índices elevados de prevalência, segundo a SUCAM: São Bento 7,2% e Santa Helena 9,3%. Esses índices atuais, não diferem dos determinados em 1960 a despeito de grandes investimentos de recursos públicos empregados na tentativa de controlar a doença, pela SUCAM-MA. Os doentes são tratados semanalmente, e os focos são combatidos com moluscocidas. Embora, esta alta prevalência não seja verdadeira para todas as localidades da região, a maioria dos dados, justifica a hipótese de que a cadeia epidemiológica vem sendo ativada. Poder-se-ia pensar sobre dois aspectos: o primeiro, estaria relacionado com a ineficiência metodológica empregada pelos órgãos de Saúde Pública, mais precisamente a SUCAM. O segundo, algum outro fator, como por exemplo outro hospedeiro

definitivo diferente do homem, estaria influenciando na manutenção da cadeia em atividade.

Descarta-se o primeiro aspecto, pelo fato de que, a Esquistossomose, em algumas localidades da Baixada Maranhense, está controlada, sem prevalência da parasitose, com a mesma metodologia que é empregada em todo o território nacional.

Sobre o segundo aspecto, o que se sabe é que, nos campos do Município de São Bento, existem roedores silvestres que participam da cadeia epidemiológica do parasita, em paralelo ao homem.

Nesta linha de investigação, o grupo de pesquisadores do Programa de Imunologia da UFMA, sugeriu como novo modelo experimental do **S. nelsoni**, o roedor silvestre **Holochilus brasiliensis nanus** THOMAS, 1897, por ser hospedeiro definitivo do verme na Pré-Amazônia.

Alguns estudos deste modelo, natural e experimentalmente infectado com **S. nelsoni**, **Leishmania** e **Filária**, descrevem as lesões apresentadas pelo **Holochilus brasiliensis nanus** (BASTOS & cols., 1984a). Destaca-se ainda o estudos de células sanguíneas periféricas em animais nascidos em biotério e em animais do campo (BASTOS & col., 1985a); determinação de índices glicêmicos em roedores com diferentes procedências (BASTOS & col., 1985b); dosagem de fatores humorais,

tais como, imunoglobulinas (BASTOS & col., 1984b) e componentes C3 (BASTOS & col., 1984c).

As principais vantagens da utilização deste roedor, referem-se à facilidade de criação e manutenção em biotério: a esquistossomose evoluir para a forma grave, de maneira semelhante à esquistossomose humana e de ser uma espécie comprovadamente difusora da doença: por albergar grande carga parasitária: eliminar ovos viáveis pelas fezes e ser encontrada parasitada durante todo o ano (VEIGA-BOURGEUAD; LEMOS-NETO & BASTOS, 1987). Entretanto, estes dados são insuficientes para a comprovação da segunda hipótese. Faltam informações sobre o que ocorre em localidades onde o **Holochilus** é o único hospedeiro definitivo, de modo que se possa analisar comparativamente, estes dados, com as informações de outras localidades, em que o homem co-habita com os roedores. Estes estudos epidemiológicos vêm sendo feitos na Pré-Amazônia, pela equipe de pesquisadores do Programa de Imunologia da UFMA, que esperam em breve, encontrar resposta a esta indagação.

Por ser o **Holochilus** um novo modelo experimental para o estudo da Esquistossomose (BASTOS & col., 1984a), existem poucas informações a respeito deste animal, necessitando portanto, conhecimentos sobre outros aspectos. Estudos sobre a biologia do **Holochilus** em laboratório e na Pré-Amazônia MELLO (1986) e LEMOS-NETO (1987) respectivamente; e também o papel do roedor silvestre na epidemiologia da esquistossomose (BOURGEUAD:

LEMOs-NETO & BASTOS, 1987), contribuíram para o melhor entendimento da relação **Holochilus - S. mansoní**

Objetivados em contribuir na implementação da relação **Holochilus-S. mansoní**, analisou-se a resposta imune-humoral deste hospedeiro silvestre, associada com os aspectos histo-patológicos das lesões durante 8 semanas de infecção com a linhagem humana do Esquistossomo, tomando como parâmetro, os fenômenos observados em Murinos por BASTOS (1984a). Para esta abordagem, usou-se as técnicas de: Imunoeletroforese bidimensional; imunofluorescência indireta; Imunodifusão radial simples e estudo histo-patológico de fígado e intestino dos roedores na 8a. semana de infecção.

2 - MATERIAIS E METODOS:-

2.1 PROCEDÊNCIA DOS ROEDORES SILVESTRES

Utilizou-se dez roedores silvestres, com 30 dias de vida, do Biotério da Universidade Federal do Maranhão, classificados como Holochilus brasiliensis nanus, THOMAS, 1897, e descendentes de roedores capturados na Região da Baixada Maranhense.

Dividiu-se este total de animais em dois grupos numericamente iguais:

- Grupo de animais infectados com **Schistosoma mansoni** (GI) :
- Grupo Controle da experiência (GC) .

2.2 INFECCÃO EXPERIMENTAL DOS ROEDORES.

2.2.1 Isolamento da linhagem humana (H) de S. mansonii

Os miracídios H foram obtidos de ovos de S. mansonii, isolados de fezes humanas de doentes autóctones da cidade de São Bento, localizada na Pré-Amazônia. O método utilizado seguiu as orientações descritas por BASTOS & cols., 1979, que tem por base o método de sedimentação espontânea. Em seguida, estes miracídios H foram utilizados para a infecção em massa (STANDEN, 1952) de Biomphalaria glabrata, nascidas em laboratório, e descendentes de moluscos coletados em São Bento.

2.2.2 Infecção do Holochilus brasiliensis nanus com a linhagem humana (H) de S. mansonii

Passados 30 dias da exposição dos moluscos aos miracídios da linhagem humana de Schistosoma mansonii, procedeu-se a obtenção de cercárias segundo técnica de PELEGRINO & MACEDO, 1955.

A infecção individual dos roedores foi feita pela cauda, utilizando-se 200 cercárias, contadas em lupa estereoscópica, com auxílio de uma pipeta Pasteur. As cercárias foram colocadas em tubos de ensaio de 10mL, contendo água à temperatura de 28.C, aquecidas por lâmpadas elétricas. A cauda de cada roedor foi imersa na suspensão cercariana por duas horas (OLIVIER &

STIREWALT, 1952: STIREWALT & BRONSON, 1955). Após esse período, foram retirados e mantidos em gaiolas apropriadas no Biotério.

2.3 COLETA DE SOROS DOS ROEDORES

Os animais infectados (5) e controles (5), foram sangrados semanalmente, da 1a. até a 8a. semana de infecção, por via oftálmica (RILEY, 1960). Os soros foram separados e centrifugados a 200G, por 10 minutos. Em seguida foi feito um "pool" dos soros infectados e dos controles, de acordo com a semana de infecção e foram armazenados em congelador até o momento do uso. Para identificação, os soros infectados receberam a sigla In e os controles Cn, sendo "n" equivalente ao número de semanas transcorridas, desde a data da infecção.

2.4 OBTENÇÃO DE IMUNE-SOROS REAGENTES

2.4.1 Preparação de imune-soro anti-soro total de roedor (anti-SR) e da fração globulínica de Holochilus

Animais nascidos em Biotério, descendentes de **Holochilus** capturados em São Bento, foram sangrados pelo plexo braquial. O soro obtido foi utilizado como antígeno para imunização de carneiro, proveniente do Biotério da UFMA. O antígeno foi preparado emulsionando-se 1 mL de

soro total na concentração de 10 mg/mL proteínas totais em 1 mL de adjuvante completo de Freund. Este volume foi distribuído em 10 aplicações de 0.2 mL, intradérmicas, no dorso do animal. Passados 30 dias, fez-se a segunda inoculação antiqênica com adjuvante incompleto de Freund. Após uma semana, o título mostrou-se satisfatório no soro anti-SR.

2.4.1.1 Isolamento da fração globulínica.

Para o isolamento da fração globulínica do soro de roedor, utilizou-se a eletroforese preparativa em bloco de amido (EPBA), baseada na técnica de KUNKEL & SLATER, 1952. O tampão utilizado foi o Tris-HCl 0,05M, pH 8,6. A cuba, previamente untada com Nuol, foi preenchida com 300 gr. de amido de milho (Maizena), dissolvidos em 250 mL de tampão. O conjunto foi submetido a rápida secagem em estufa.

A 1/3 da cuba, em relação ao cátodo, abriu-se a canaleta de 1 x 10 cm, a qual foi preenchida com 5 mL de soro total de roedor, previamente misturados com a Maizena retirada da canaleta até atingir a mesma consistência. O conjunto foi coberto com tampa própria, e o sistema eletroforético foi mantido em geladeira. Utilizou-se 250 V/cm, durante 24 horas, sob voltagem constante.

Após a forese o bloco de amido foi recortado em fatias de 1 x 10 cm, obedecendo a numeração da cuba (1-35). Estas fatias foram diluídas em tampão (2,0 mL/fatia), e os sobrenadantes após sedimentação, foram selecionados por imunoeletroforese tipo Rocket.

2.4.1.2 Imunoeletroforese tipo rocket (IER).

A imunoeletroforese tipo rocket (Axelsen & cols, 1973), realizou-se em placas de vidro de 9 x 11 cm, que serviram de suporte para 16 mL de agarose a 1% em tampão Tris-HCL (0,05M, pH 8,6) contendo anti-soro total de roedor diluído a 1:40, obtido em carneiro.

No total, aplicou-se 35 amostras, de aproximadamente 1 uL cada. O conjunto foi submetido a 1 V/cm, durante 15 horas. Decorrido este tempo, procedeu-se sucessivas lavagens em salina 0,15M durante 24 horas, após as quais a placa foi corada pelo Coomassie Blue. Após análise do resultado, repetiu-se a IER para as 12 frações consideradas principais. Foi selecionada a fração rica em globulinas para obtenção de soro anti-globulinas.

2.4.2 Obtenção de soro anti-globulinas de roedores.

A fração globulina obtida, foi inoculada em coelho. Um mL de Adjuvante Completo de Freund, foi emulsionado com 1 mL da fração globulina na diluição de 1/10. O volume final foi distribuído em 04 alíquotas e inoculadas por via intra-muscular nas patas do animal. As inoculações das patas traseiras foram feitas em regiões próximas aos cânchlios poplíteos (OLIVEIRA, 1975). Decorridos 30 dias após a primeira injeção, os coelhos foram inoculados novamente, em vários pontos distribuídos no dorso do animal, com antígeno preparado de maneira idêntica. Os anti-soros obtidos 20 dias após a última inoculação, foram analisados por imunodifusão (OUCHTERLONY, 1958) e apresentaram o título de 1/16.

2.5 ESTUDOS DOS ANTICORPOS SÉRICOS PRODUZIDOS DURANTE O PROCESSO INFECCIOSO

2.5.1 Imunoeletroforese Bidimensional (IEB).

Os 16 soros, 8 de GC (C) e 8 do GI (I), foram analisados por IEB (AXELSEN; KROL & WEEKE, 1973) frente ao soro anti-globulinas diluído a 1/20, em solução tampão Veronal HCl (0,05M, pH 8,6). A distribuição de amostras dos soros C e I pode ser verificada nas figuras 1 e 2. Utilizou-se o volume de 1 uL/amostra. A primeira

eletroforese foi feita com 6V/cm, durante 1 hora e 20 minutos, a segunda com 1V/cm durante 15 horas.

2.5.2 Análise dos soros anti-S. mansonii por imunofluorescência

A imunofluorescência indireta (SADUN & col. 1969) foi realizada, sobre cortes histológicos de vermes adultos. Para tanto, procedeu-se da seguinte forma: vermes recém colhidos foram lavados três vezes em solução salina fisiológica (0,15M), com uma hora de duração cada lavagem (BASTOS, 1979). Em seguida, foram colocados em Fixador de Rossman (90 mL de etanol 100% saturado com ácido pícrico e 10 mL de formaldeído a 37%), por 15 horas (NASH, 1974). Após a fixação os vermes foram incluídos em parafina e cera (9 : 1) e cortes de 5 μ m foram obtidos conforme procedimentos histológicos rotineiros.

REAÇÕES: Para retirada da parafina, as lâminas foram colocadas em estufa: submetidas a banhos de xilol sucessivos, de 15 minutos cada. Procedeu-se, então, a hidratação dos cortes pela série de álcoois (100% a 10%), e duas lavagens sucessivas com solução salina tamponada (pH 7,2 0,01M) de dez minutos cada. Após esse procedimento, as lâminas foram secas parcialmente e numeradas de acordo com a semana de infecção dos roedores (1S, 2S, 8S). Os soros

imunes diluídos em série, a partir de 1/10 até 1/640, juntamente com os respectivos controles, foram adicionados sobre os cortes. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos, em estufa à 37.C. Após o tempo da reação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, por 10 minutos cada lavagem. Com as lâminas parcialmente secas, colocou-se conjugado anti-IgA ou anti-IgM de camundongo (MELOY LAB) ou anti-IgG de rato (HAYLAND LAB) marcados com isotiocianato de fluoresceína, diluídos 1/50 em Azul de Evans, previamente diluído em solução PBS pH 7,2 a 1:10.000 (NASH, 1974). A reação durou 45 minutos, em câmara úmida, à 37.C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS e montadas em glicerina alcalinizada com tampão carbonato (pH 9,0). A leitura dos resultados foi realizada em microscópio Zeiss, contendo lâmpada de halogênio 12V 100W e filtros barreira FT 510 LP 520.

2.5.3 Imunodifusão radial simples dos soros anti-S.mansonii.

Para esta finalidade, preconizou-se a técnica de MANCINI & cols., 1965. A identificação das imunoglobulinas dos **Holochilus**, foi feita com soros padrões (anti-imunoglobulinas de camundongos obtidos em coelhos) procedentes do Departamento de Imunologia da

UNICAMP. Estes anti-soros (anti-IgM: anti-IgA e anti-IgG2a), foram diluídos em 15 mL de agarose (BIO RAD Lab) a 1% em Tampão Veronal Acetato, 0,1M , pH 8,6 , (Barbitone Acetate Buffer Electrophoresis, OXGIDE LTDA) , na proporção de 1/30. Deixou-se reagir 10uL dos soros controles (C1 a C8) e infectados (I1 a I8) durante 24 horas. A revelação foi feita com Coomassie Blue. Os diâmetros dos halos de precipitação, foram medidos e comparados com aqueles dos soros padrões de camundongos (Mouse Immunoglobulin-Meloy Lab.)

2.5.3.1 Absorção de soro de roedor anti-S. mansoni com antígenos do parasita.

Vermes adultos liofilizados foram pulverizados em oral e homogeneizados com 1,5 mL de PBS pH 7,2. Uma aliquota de 1 mL de pool do soro de **Holochilus** referentes a 8a. semana de infecção, foi incubada com 1 ml do homogeneizado por 45 min. a 37. C. Após a incubação, o soro foi centrifugado a 1.500 rpm por 15 min. a 4.C (SHER & cols, 1977). Retirou-se 1 mL do sobrenadante para armazenamento em congelador. Adotou-se a técnica de imunodifusão radial simples, para testar os soros absorvido e não absorvido, diluídos 1/30 em agarose, frente aos soros anti-IgA e IgM de camundongo e soro anti-IgG de rato.

Deixou-se reagir por 18 horas à temperatura ambiente, antes da revelação com Coomassie Blue.

2.6 OBSERVAÇÕES ANATOMO-PATOLÓGICAS DE FÍGADO E INTESTINO DO Holochilus b. nanus INFECTADO COM S. nansoni

Ao término da 8a. semana de infecção, os Holochilus infectados foram necropsiados. Retirou-se os vermes contidos no fígado e mesentério, pela técnica de perfusão (BRENER, 1962). Foi retirado fígado e intestino para fixação em solução de formol a 10%. Procedeu-se à técnica rotineira de inclusão em parafina. Os cortes histológicos de 5 µm foram corados com hematoxilina-eosina para exame em microscopia óptica comum.

3 - - RESULTADOS:

3.1 OBTENÇÃO DA FRACÃO GLOBULÍNICA

Para análise das 35 frações de soro normal de *Holochilus* obtidas pela Eletroforese Preparativa em Bloco de Amido (EPBA), utilizou-se soro de carneiro anti-soro total de roedor, o qual apresentou um título de 1/32, quando testado por difusão dupla frente ao antígeno específico, na concentração de 500 ug/mL. As frações obtidas na EPBA foram também analisadas por espectrofotometria em U.V. ($\lambda = 280$ nm). As 12 alíquotas que apresentaram DO mais altas foram submetidas a imunoeletroforese tipo Rocket contra soro de carneiro anti-soro total de roedor na diluição de 1/20, como padronizado anteriormente. Das 12 frações, escolheu-se aquela que apresentou sistema precipitante homogêneo e com mobilidade eletroforética associada com a fração globulina, para a imunização de coelhos e obtenção de soro anti-globulinas.

3.2 O SORO ANTI-GLOBULINAS DE ROEDORES

O soro anti-globulinas apresentou o título superior a 1/16, quando analisado por dupla difusão em gel. Este dado, permitiu a utilização deste soro para análises dos soros anti-*S.mansoni*, por imunoeletroforese bidimensional.

3.3 ANÁLISE DOS SOROS ANTI-*S.mansoni* POR IMUNOELETROFORESE BIDIMENSIONAL (IEB).

A análise dos 16 soros, realizada em lâminas de agarose que foram submetidas à IEB (Figs. 1 e 2), demonstrou reações de precipitação em todos os pontos de aplicação dos soros em análise.

Dos sistemas precipitantes, destacaram-se bandas que permaneceram próximas ao ponto de aplicação e, também, outras mais eletronegativas (1 a 5), que apresentaram mudanças nas áreas reativas, de acordo com o período de infecção. Embora não se tenha identificado as classes de imunoglobulinas, houve indicação que ocorreu aumento de Igs, desde a primeira semana de infecção. Além disso, ficou demonstrado que mais de 5 sistemas estão envolvidos com o processo de evolução do verme no interior do hospedeiro e os títulos cresceram concomitantemente ao processo infeccioso.

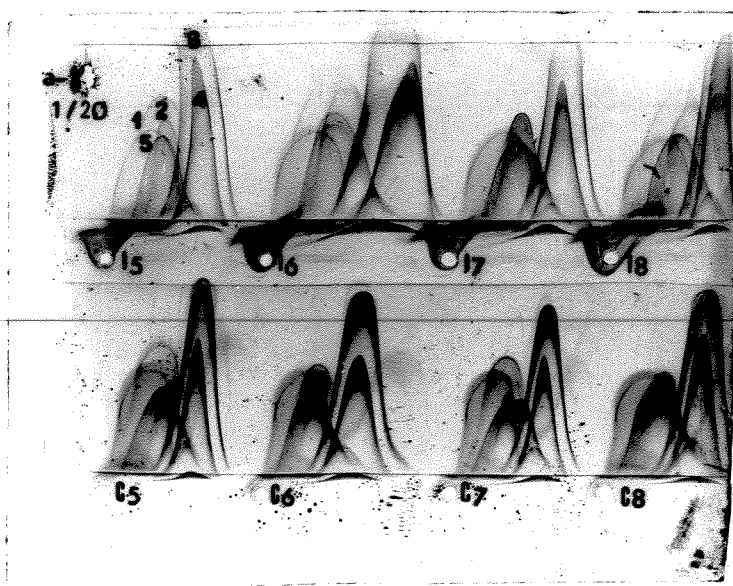
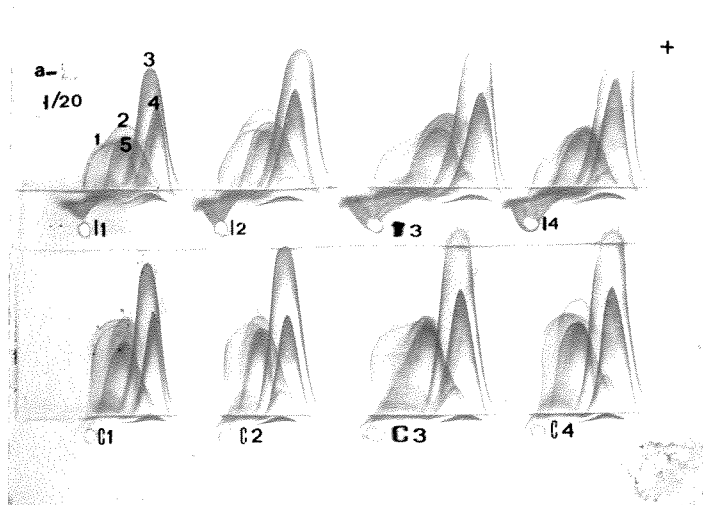


Fig. 1 e 2 - Imunoeletroforese bidimensional dos soros. Normais (C) e infectados (I) com *S. mansoni* durante oito semanas de observação. Agarose a 1% em solução tampão veronal - HCl (0,05 M : pH: 8,6) 1. corrida 6 V/cm : 1,20 H : 2. corrida 1 V/cm , 15 H.)

3.4 COMPORTAMENTO DOS SOROS ANTI-S. MANSONI EM ANÁLISE DE IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES.

A análise dos soros por imunodifusão radial, demonstrou que as imunoglobulinas A, M e G2a estão envolvidas na resposta imune ao S. mansonii.

Nas primeiras semanas, em ordem decrescente, as concentrações foram registradas da seguinte forma: IgG2a, IgA e IgM (Fig. 3).

Entre a terceira e a quinta semanas de infecção, registrou-se discreto aumento de IgA e substancial elevação da IgM. A IgG2a ficou abaixo da relação I/C igual a 1 (fig. 3).

No período final, a maior concentração de imunoglobulina foi representada pela IgA, seguida da IgM e da IgG2a.

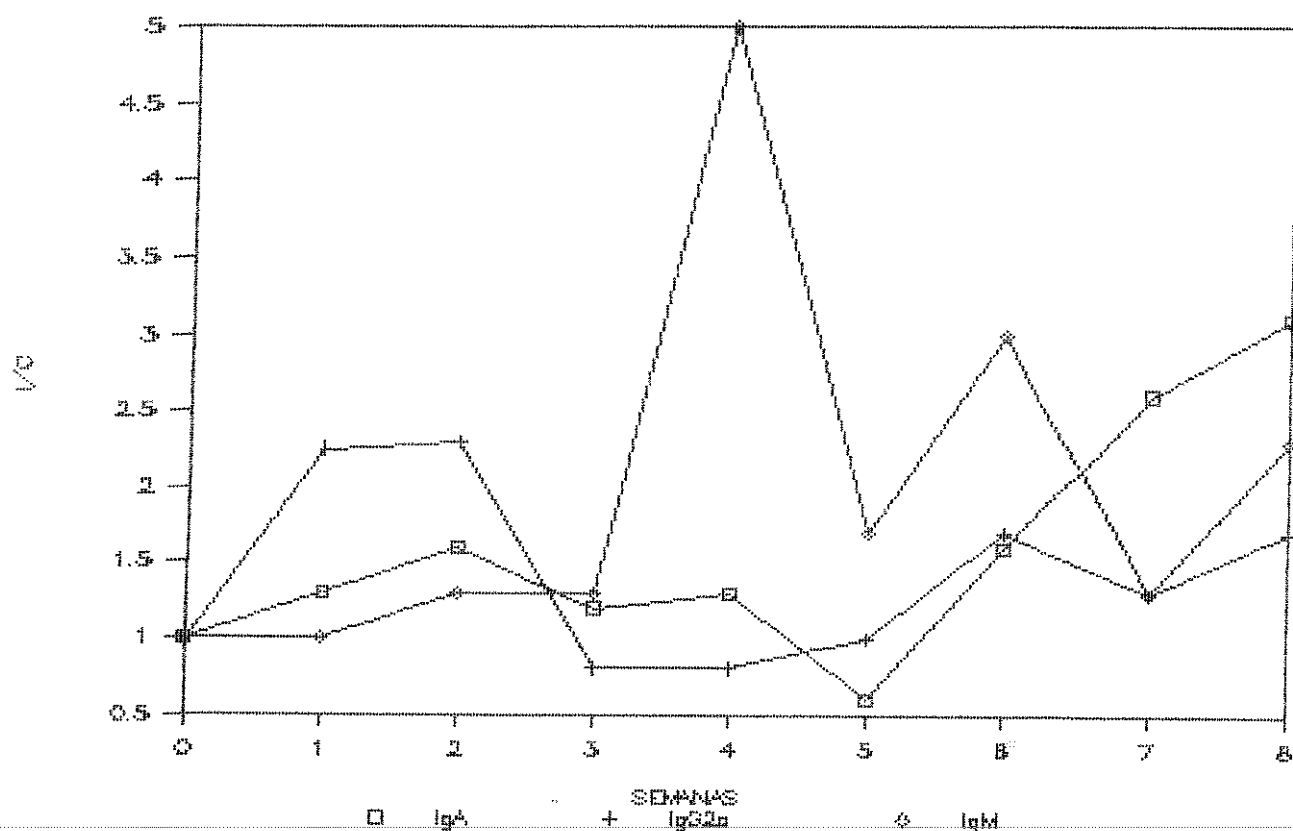


Fig. 3 - Relação entre o diâmetro dos halos dos soros infectados e controles (I/C) das imunoglobulinas: IgG2a, IgA e IgM, nas diferentes semanas de infecção, frente aos soros anti-Ig2A, anti-IgA e anti-IgM de camundongo, técnica de imunodifusão radial simples.

3.4.1 Análise do soro anti-S.mansoni absorvido, por imunodifusão radial simples

Para verificar-se a especificidade das Igs contidas nos soros dos roedores infectados, analisadas por imunodifusão radial simples frente aos soros anti-IgG2a, anti-IgA e anti-IgM de camundongo, fez-se a absorção de pool de soro na 8a. semana de infecção com antígenos de vermes adultos. Observou-se que ocorreu redução nos halos de precipitação, quando o soro absorvido foi testado contra os soros anti-IgA e IgM de camundongo. O que demonstrou que houve absorção da IgA e IgM específicas para os antígenos dos vermes adultos, embora a absorção não fosse completa, possivelmente porque restaram, no soro absorvido, imunoglobulinas A e M com especificidade para outros antígenos (do ovo, para antígenos de reação cruzada ou para antígenos metabólicos). Não observou-se halo de precipitação com o soro de cabra anti-IgG de rato. Atribuiu-se esse fato a uma desnaturação desse soro.

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DOS SOROS ANTI-S.MANSONI

Os resultados referentes a cada semana de infecção, tiveram suas médias determinadas, a partir de três leituras com vermes adultos, e estão apresentados na Tabela 1. Os resultados foram reprodutíveis com IgM e IgG em

reações focais. A IgA apresentou título mais alto na sétima semana de infecção, quando a reação foi focal.

Nas reações focais, verificou-se que a IgG permaneceu com o título elevado durante toda a infecção, e que a IgM apresentou-se com variações, tendo dois pontos de deflexão, registrados na segunda e quarta semanas.

Os Soros Controles não apresentaram fluorescência.

TABELA I

CORRELACAO DO PADRAO FLUORESCENTE EM CORTES DE VERMES ENTRE AS CLASSES
ESPECIFICAS DE ANTICORPOS E AS DIFERENTES SEMANAS DE INFECCAO DO
HOLOCHILUS BRASILIENSIS NANUS COM **SCHISTOSOMA MANSONI**

Semanas de Infeccao	TITULO MEDIO DAS REACOES DE IFI PARA VERMES ADULTOS					
	FOCAL			DIFUSA		
	IgA	IgM	IgG *	IgA	IgM	IgG *
1a.	1/160	1/320	1/640	-	-	1/10
2a.	1/160	1/20	1/640	-	-	1/40
3a.	1/40	1/320	1/160	-	-	-
4a.	1/160	1/20	1/640	-	1/10	1/80
5a.	1/20	1/320	1/80	-	-	1/20
6a.	1/40	1/320	1/640	-	-	1/10
7a.	1/640	1/320	1/160	-	-	1/20
8a.	1/10	1/10	1/80	-	-	1/10

* Soro de cabra anti-IgG de rato marcado com isotiocianato de fluoresceína

3.6 HISTOPATOLOGIA

As secções de fígado e intestino, apresentam ovos do S. mansoni em diferentes estágios de maturação. Em torno dos ovos, observou-se graus diferentes de reacção inflamatória. Esta graduação vai desde ovos com discreta reacção inflamatória, reacção granulomatosa periovular exsudativa com polimorfonucleares, neutrófilos e eosinófilos reacção granulomatosa periovular produtiva com predominância de macrófagos e formações granulomatosas predominantemente de carácter fibroso. Um aspecto que chama atenção é o tipo de reacção que se processa ao nível da camada do intestino. Ao nível da mucosa, os granulomas são predominantemente exsudativos, com grande número de eosinófilos, formando por vezes, verdadeiros micro-abcessos, o que parece favorecer a eliminação dos ovos. Ao nível das camadas mais profundas (submucosa, muscular e serosa), predominam os granulomas em estágios mais avançados de evolução (produtivos e fibrosos), o que sugere um mecanismo de sequestração a este nível (Figs. 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

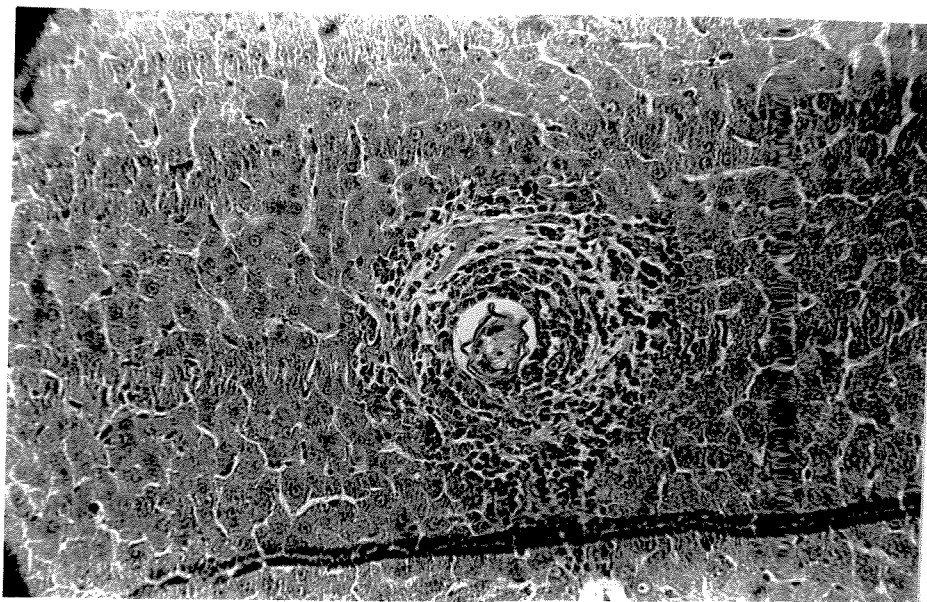


Fig. 4 - Fígado apresentando granuloma periovular com predominância de macrófagos e poucos polimorfonucleares. (H.E., 200x)

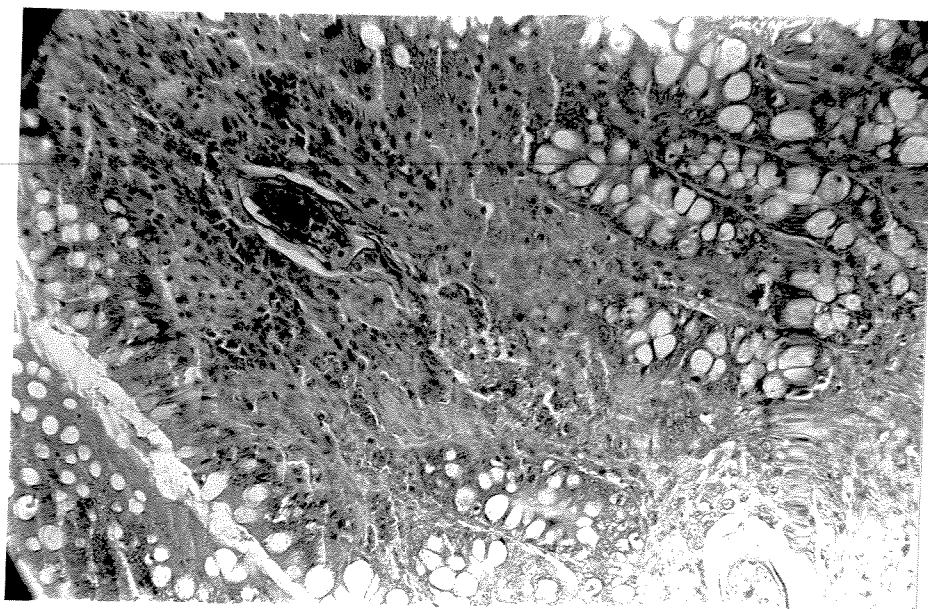


Fig. 5 - Intestino mostrando discreta reação periovular em papila. (H.E., 122x)

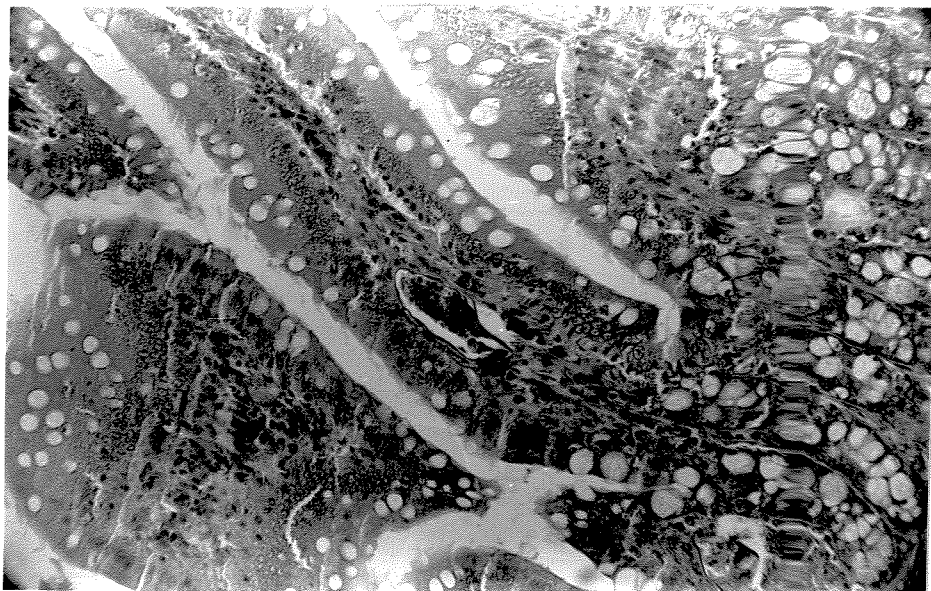


Fig. 6 - Ovo do *S. mansoni* em papila intestinal sem reação inflamatória em torno. (H.E., 122x)

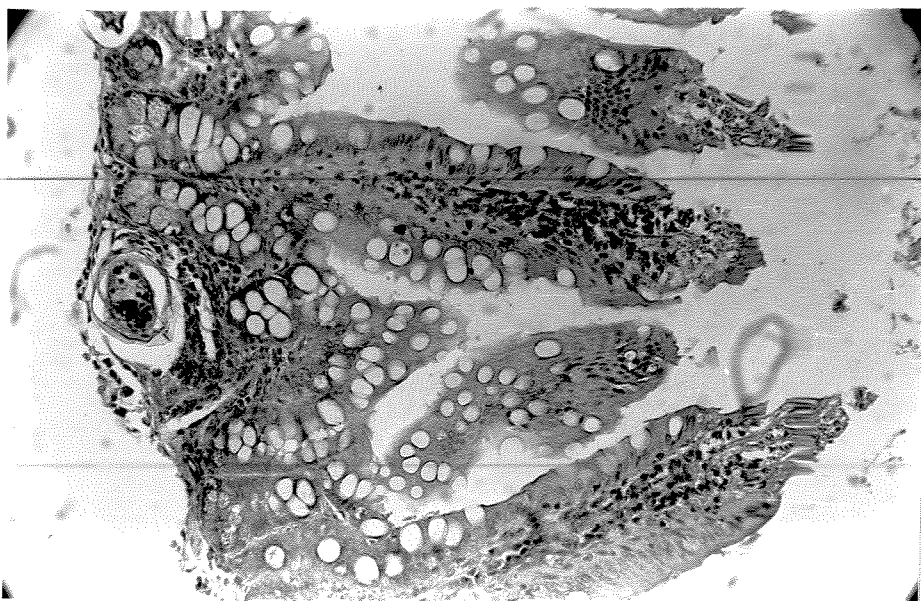


Fig. 7 - Mucosa de intestino com reação granulomatosa exsudativa inicial em torno do ovo. (H.E., 200x)

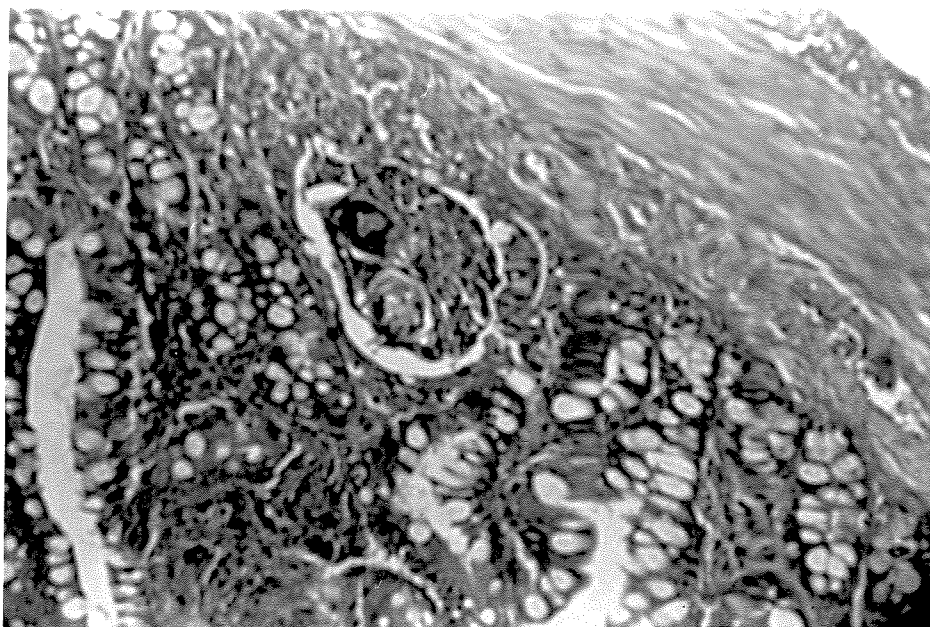


Fig. 8 - Ovos do *S. mansoni* em intestino circundado por numerosos pclimorfonucleares com predominância de eosinófilos. (H.E., 100x)

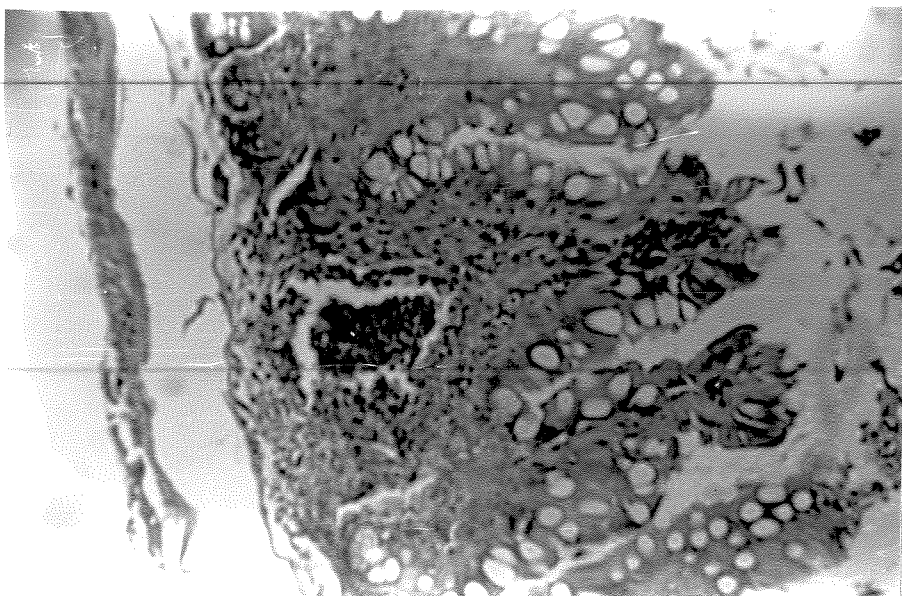


Fig. 9 - Microabcesso com predomínio de eosinófilo, em papila intestinal. (H.E., 100x)

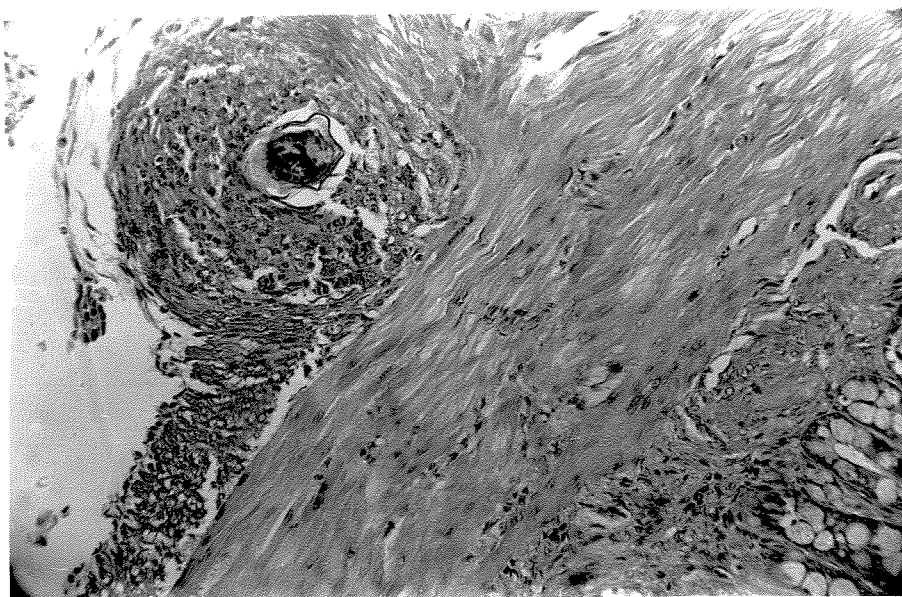


Fig. 10 - Granuloma com macrófagos e fibroblastos comprometendo camada muscular e serosa de intestino. (H.E., 100x)

4. - DISCUSSÃO:

O roedor silvestre vêm sendo intensivamente estudado como reservatório da esquistossomose (MARTINS & cols., 1955; AMORIM, 1962; BORDA, 1972; ANTUNES & cols., 1973; KAWAZOE & cols., 1976; DIAS & cols., 1980; CARVALHO, 1982); como elemento importante da cadeia epidemiológica na Pré-Amazônia. (VEIGA BORGEAU & col., 1987), e como excelente modelo experimental de várias parasitoses (BASTOS & col., 1984a).

O presente trabalho aborda aspectos da relação esquistossomo-Holochilus, ainda não demonstrados em nenhuma das publicações acima citadas.

A estimativa dos anticorpos anti-S. mansonii verificados durante 8 semanas de observação, informa a cinética da resposta imune plasmática, durante a evolução parasitária.

Inicialmente, foi pensado realizar um estudo imunológico com reativos produzidos em nosso próprio laboratório.

Entretanto, dificuldades de ordem técnica e econômica, não permitiram a realização desta intenção. Contudo, foi possível obter um reativo anti-globulinas de roedor, capaz de demonstrar a ocorrência de aumento na concentração de Igs durante o processo infeccioso.

A escolha do eluato para obtenção do soro anti-globulinas na segunda IER, deveu-se ao fato desta fração revelar-se a mais anódica e apresentar um sistema precipitante homogêneo.

O soro anti-globulinas, de roedor obtido em coelho, foi utilizado para os estudos dos soros anti-**S. mansonii**, por apresentar bom título de anticorpos (1:16) e por reagir, em dupla difusão, com o soro total de roedores apresentando, pelo menos, um sistema precipitante.

Os comportamentos destes soros plurivalentes frente aos soros GI e GC, não foram suficientes para propiciar a identificação de classes de imunoglobulinas. Entretanto, como foi observado em camundongos por ATTA (1981) e BASTOS (1984c). Os soros dos roedores infectados, quando comparados aos soros controles, apresentaram alterações na concentração de alguns componentes de acordo com o período de infecção. Os soros GI desde a 1a. até a 8a. semanas, apresentaram como característica uma banda de precipitação próxima ao ponto de aplicação. Não observou-se o mesmo com os soros GN, o que nos levou a pensar

tratar-se de uma alteração sérica que estaria ocorrendo em função da infecção. As bandas (1 a 5) com migração nas áreas de Gama e Beta globulinas apresentaram mudanças nas áreas reativas em relação as suas correspondentes nos soros GN. As alterações mais evidentes ocorreram a partir da 5a. semana de infecção, com aumento nas áreas reativas dessas frações, ficando patente que ocorreu aumento de Igs, que amplificou sua concentração a medida que o processo infeccioso evoluía. Atribuiu-se essas alterações a fase pos-postural, a partir da qual surgem os granulomas hepáticos (AITA, 1981; BASTOS, 1984c).

Considerando que, em publicações anteriores (ANTUNES & cols. 1971; MOTA-SANTOS & cols., 1976; SHER & cols., 1977; KANAMURA & cols., 1979 e BASTOS & cols., 1984c), as principais classes de imunoglobulinas envolvidas na resposta as *S. mansonii* em camundongos e no homem eram: IgM, IgA, IgG e IgE e considerando a necessidade de complementação destes estudos em roedores silvestres, para que se tenha idéia da cinética destes anticorpos, foram feitas análises com reativos específicos para imunoglobulinas de camundongos por sabermos, em estudos prévios, que estes reativos são capazes de identificar proteínas de roedores silvestres: de ratos e de hamster, em reações cruzadas.

Foi feita a quantificação da IgG2a, levando-se em consideração a informação publicada a respeito da resposta imune humoral em camundongos (SHER & col., 1977), que evidencia a presença desta imunoglobulina no processo de defesa orgânica, e

de que o **Holochilus** é filogeneticamente próximo deste animal. O nível elevado desta imunoglobulina, encontrado nas duas primeiras semanas de infecção, pode estar relacionado com a bateria antígenoica parasitária, resultante de secreções e excreções (metabólicas) do parasita, assim como, de antígenos somáticos.

A concentração mais alta da IgA, em relação à IgM, ainda neste mesmo período inicial, coincide com os resultados encontrados por BASTOS e cols., (1984c) quando determinaram a evolução da resposta imune humoral em camundongos.

A elevação da concentração da IgM no período correspondente entre a 3. e a 5. semanas de trabalho, não coincide com os resultados obtidos em outros trabalhos realizados em camundongos (SHER & cols., 1977; BASTOS e cols., 1984c) mas, acredita-se estar relacionada com a reatividade dos roedores à presença de novos antígenos parasitários, como os da estrutura superficial do ovo e os da secreção larvária, utilizados para a eclosão.

O nível detectado da IgG2a que foi abaixo de 1 (I/C), ainda neste mesmo período, possivelmente está relacionado com o desenvolvimento de parasitas naturais do **Holochilus**, nos animais do GC. Cabe afirmar que, esta possibilidade, não influenciou na quantificação de IgG2a em outros períodos da sequência, porque os níveis apresentados foram registrados acima da relação $I/C = 1$.

O nível mais alto da IgA, em relação a IgM e a IgG2a, no período final da experiência, coincide com os resultados encontrados por outros autores em ratos, camundongos e em homens (ANTUNES & cols., 1971; Bastos e cols., 1984c).

A especificidade dessas imunoglobulinas foi verificada em imunodifusão radial (IDR), com soro de roedor silvestre infectado na 8. semana, frente aos soros padrões.

Apesar de se conhecer da literatura, a importância da IgE na resposta imune a infecção por **S. mansoni**, tanto em modelos experimentais como no homem. Não foi possível quantificar essa Ig, uma vez que mesmo existindo um aumento dramático da IgE na infecção por helmintos, a concentração dessa Ig é baixa e somente uma fração do total é parasita-específica, o que dificulta sua análise.

A técnica de imunofluorescência indireta para esquistossomose é conhecida desde 1960 (SADUN & cols., 1960): as suas deficiências para um diagnóstico de precisão têm sido discutidas, a respeito da preparação do material antigênico, reações cruzadas com outras parasitoses, facilidade de manuseio e custo operacional. Trata-se de uma reação de alta sensibilidade (93% a 97%) e especificidade (96%), segundo MADDISON (1986). A utilização dos vermes adultos fixados em Rossman visou preservar a antigenicidade do polissacarídeo (proteoglican) associado ao intestino do helminto (NASH, 1978)

A fixação deste material foi feita em parafina, mesmo sendo conhecido o fato da presença da autofluorescência dos tecidos (AMBROISE-THOMAS, 1969), por esta particularidade não influenciar em nossos resultados, uma vez que se dispunha de soros controles e realizou-se reacções de absorção. Não preocupou-se com reacções cruzadas com **Trichinella spiralis** por não se tratar de um problema de saúde pública nacional.

A reacção cruzada entre soros específicos para cadeia pesada de Igs camundongos e ratos, existe também para as imunoglobulinas de roedores silvestres, animais filogeneticamente bem próximos deles. A comprovação destas reacções foi verificada previamente em lâminas de difusão em gel, no programa de imunologia da UFMA (dados não publicados).

De modo geral, a análise do comportamento dos soros anti-**S. mansoni** por IFI, não diferiu do demonstrado na IDR e na literatura. A participação da IgA, apenas nas primeiras semanas de infecção, está de acordo com o que foi verificado em pacientes por KANAMURA & cols. (1979), que detectou a IgA na fase intestinal da doença; estes dados concordam, também, com as observações de ANTUNES & cols., 1971) quando estudaram a esquistossomose humana em Minas Gerais.

O uso de biorreativos comerciais, permitiu a complementação desses estudos, dando informações mais específicas quanto às classes de imunoglobulinas, mesmo tratando-se de

reações cruzadas, apesar de não excluir a possibilidade de participação de outras Igs que não foram quantificadas.

A despeito de métodos altamente sofisticados, atualmente utilizados na quantificação de imunoglobulinas, os métodos que utilizou-se (imunodifusão radial e imunofluorescência), foram suficientes para nos dar a informação necessária sobre a modulação da resposta imune humoral, nos roedores parasitados, ao nível de compara-los com as informações existentes na literatura especializada.

Os estudos anátomo-patológicos realizados no fígado e intestino afetados pelos esquistossomos da linhagem humana, demonstraram que, nas condições realizadas, não foram encontradas diferenças significativas ao ponto de se distinguir imunogenicidade diferente entre as linhagens humana e silvestre do verme, na época conhecida como a de maior gravidade para o hospedeiro, determinada pelo pico da oviposição.

5 - CONCLUSÕES:

A análise geral dos dados que obteve-se, permitiu as seguintes conclusões:

1. A resposta imune humoral anti-**S. manson**i em roedores silvestres da espécie **Holochilus brasiliensis nanus**, ocorreu a partir da primeira semana de infecção parasitária:
2. As imunoglobulinas M, G e A, estão envolvidas na reatividade imunológica do **Holochilus brasiliensis nanus** ao **S. manson**i
3. Os antígenos do esquistossomo da linhagem humana, induzem processos patológicos similares aos induzidos pela linhagem esquistossomática silvestre.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALVIM, M. de C. & FIOUENE, S. Situação atual da esquistossomose mansonii do Maranhão. Rev. Soc. Parasitol. Doenças Trop. Maranhão, 1 (1): 49-74, 1974.
- AMBROISE-THOMAS, P. Etude sero-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Lyon, 1969 (Ph.D. thesis Université de Lyon).
- AMORIM, J. P. - Roedores selvagens como disseminadores de ovos de Schistosoma mansonii no Nordeste do Brasil. Rev. Inst. Med. trop., S. Paulo, 4: 397-402, 1962.
- ANTUNES, C. M. P.; MILWARD DE ANDRADE, R.; KATS, N.; COELHO, P. M. Z. & PELLEGRINO, J. - Role of Nectonys squamipes squamipes in the epidemiology of Schistosoma mansonii infection. Ann. trop. Med. Parasitol., 67 (1) : 67-73, 1973.
- ANTUNES, L. J.; REIS, A. P.; PELLEGRINO, J.; TAVARES, C. A. & KATS, N. - Immunoglobulins in human Schistosomiasis mansonii J. Parasitol., 57 (3) : 539-42, 1971.

ATTA, A. M.: MAGALHÃES, L. A.: RANGEL, H. de A. Esquistossomose mansônica II - Evolução dos níveis de proteínas séricas e do perfil eletroforético por técnicas de imunoelektroforese quantitativa. Rev. Saúde Públ., S. Paulo, 15 : 194-204, 1981

AXELSEN, N. H. ; KROL, J. & WEEKE, B. A manual of quantitative immunoelektroforesis: methods and applications. Oslo. Unersitestsforlaget, 1973.

BASTOS, O. de C. - Utilização de soros pluri-específicos no estudo da evolução das imunoglobulinas envolvidas na resposta imune de camundongos ao Schistosoma mansoni, Sambon , 1907. Campinas, 1979. Tese de (doutorado). UNICAMP, Instituto de Biologia.

-----: SADIGURSKY, M.: NASCIMENTO, M. do D. S. B.: BRAZIL, R. P. & HOLANDA, J. C. de. : Holochilus brasiliensis nanus Thomas, 1897. Sugestão de modelo experimental para filariose, leishmaniose e esquistossomose Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 26 (6) 307-15, 1984a.

-----: BRITTO, M. H. S. S. de.: SCHIAVOTELO, M. S. S. & SOUZA, E. P. de Variações dos níveis do componente C do complemento em Holochilus brasiliensis nanus experimentalmente infectados com Schistosoma mansoni. Rev. Saúde públ., S. Paulo 18 (1) : 41-6, São Paulo, 1984b.

-----: RANGEL, H. DE A.; MAGALHAES, L. A.; PIEDRABUENA, A. E.
- Evolução das imunoglobulinas envolvidas na resposta imune de
camundongos ao Schistosoma mansonii. - Rev. Saúde públ., S. Paulo, 18
: 138-54, 1984c.

-----: SILVA, S. M. P.; LEAL, G. M. J. P. & BACELAR-NETO, J. M.
Variações nos níveis das células sanguíneas periféricas
encontradas em Holochilus brasiliensis nanus Thomas, 1897
infectados com S. mansonii Sambon, 1907, próprio da Pré-Amazonia.
Rev. Saúde públ., 19: 431-7, São Paulo, 1985a.

-----: LEAL, G. M. J. P. & SALGADO, B. J. L. Observações sobre
os níveis glicêmicos de Holochilus brasiliensis nanus Thomas,
1897-Hospedeiro natural do Schistosoma mansonii na pré-Amazônia Rev.
Saúde públ. S. Paulo, 19 (6):521-30, 1985a.

BORDA, C. E. - Infecção natural e experimental de alguns roedores pelo
Schistosoma mansonii Sambon, 1907. Belo Horizonte, 1972. Tese
(Mestrado), UFMG.

BRENER, Z. - Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da
esquistossomose mansônica. Belo Horizonte, 1962. Tese de Cátedra -
UFMG - Faculdade de Odontologia e Farmácia.

CARVALHO de M. Sobre a importância de Nectomys squamipes na epidemiologia da esquistossomose mansonii no município de Sumidouro, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1982. Tese (mestrado). Rio de Janeiro, Escola de Saúde Pública.

DIAS, L. C. S.; PIRES, F. d'A.; PINTO, A. C. W. - Parasitological and ecological aspects of Schistosomiasis mansonii in the Vally of the Paraíba do Sul river (São Paulo state, Brazil) 1 : Natural infection of small animals with Schistosoma mansonii.

FREITAS, C. A. Situação atual da esquistossomose no Brasil. Rev. Bras. Malar. Doenç. trop., 24 : 3-19, 1972.

GAMAL, M. A. & ABDELFATTAH, M. A. Immunopathology of Experimental Schistosoma Mansonii: Immunohistochemical Localization of Parasite Antigens in the Host Tissue. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 82: 89-94, 1987.

KANAMURA, H. Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; CAMARGO, M. E. & SILVA, L. C. da. Class Specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of Schistosomiasis mansonii Ann. J. trop. Med & Hyg., 28 (2) : 242-48, 1971.

- KAWAZOE, U. & PIZA, J. T. Roedores silvestres e marsupiais como possíveis reservatórios do Schistosoma ho3.mansoni na Represa Americana, São Paulo. In : Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 12. e Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, 1. Belém, - PA, 1976 - Resumo 108.
- KUNKEL, H. G. & SLATER, R. J. Electrophoresis in a starch supporting medium. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 80 : 42-4, 1952.
- LEMO NETO, R. C.; VEIGA-BORGEAUD, T.; PETER F. & BASTOS, O. C. - Constatações sobre a importância dos roedores silvestres (Holochilus brasiliensis nanus, Thomas, 1897) na epidemiologia da esquistossomose mansônica - Brasil. - Caderno de Pesquisa, 2 (1) : 86-99, São Luis, Jul/Dez., 1986.
- MADDISON, S. E. Schistosomiasis. In : Walls, K. W.; Schantz, P. M. Immunodiagnosis of parasitic diseases. New York, Academic, 1986. v. 1, cap. 1. p. 1 - 37.
- MANCINI, G.; CARBONARA, C. C. & HEREMANS, J. F. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2 : 238-54, 1965.
- MARTINS, A. V.; MARTINS, G. & BRITO R. S. - Reservatórios silvestres do Schistosoma mansoni no estado de Minas Gerais. Rev. bras. Malariol
Doenz. trop., 7 : 259-65, 1955.

MELLO, D. A. - Estudos sobre o ciclo biológico de Holochilus brasiliensis (Cricetidae, rodentia) em laboratório Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Zoologia, 2 (2) : 181-92, 1986.

MOTA-SANTOS, T. A.; GAZZINELLI, G.; RAMALHO PINTO, F. J.; PELLEGRINO, J. & SILVA, W. D. de Immunodepression in mice following Schistosoma mansoni infection. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 18 : 246-50, 1976.

NASH, T. E. Localization of the circulating antigen with the gut of Schistosoma mansoni. Am. J. trop. Med. Hyg., 23 : 1085-7, 1974.

NASH, T. E. - Schistosome infections in humans: Perspectives and recent findings. Ann. Intern. Med., 97 : 740 - 54, 1982.

NASH, T. E.; OTTESEN, E. A. & CHEEVER, A. W. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. II modulation of antibody response. Am. J. trop. Med. & Hyg., 27 : 944 - 9, 1978.

OLIVEIRA, A. R. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. Summa Phytopathol., 1 : 61-4, 1975.

OLIVER, L. & STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of Schistosoma mansoni. J. Parasitol., 38 : 19-23, 1952.

- DUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy, 5 : 1-78, 1958.
- PARAENSE, W. L. Histórico. Rev. bras. Malar. e Doenc. trop., 11 : 105, 1959.
- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. A simplified method for concentration of cercariae J. Parasitol., 41 : 329-30, 1955.
- RILEY, V. - Adaptation of orbital bleeding technique to rapid serial blood studies. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104 : 751, 1960.
- SADUN, E. H. : WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. I. Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of Schistosomiasis in humans. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 10 : 289-91, 1960.
- SHER, A. : MCINTYRE, S. & VON LICHTENBERG, F. Schistosoma mansoni Kinetics and class specificity of hypergammaglobulinemia induced during murine infection. Exp. Parasit., 41 : 415-22, 1977.
- STANDEN, O. D. Experimental of Australorbis glaberatus with S. mansoni I. Individual and mass infection to temperature and season. Ann. trop. Med. Parasitol., 46 : 48-53, 1952.
- STIREWALT, M. A. & BRONSON, J. F. Description of a plastic mouse restraining case. J. Parasitol., 41 : 328, 1955.

VEIGA-BORGEAUD, LEMOS-NETO, R. C., & BASTOS, O. DE C. Etude de la
Dynamique de Population d'Holochilus brasiliensis (Rongeurs,
cricétidé), réservoir sauvage de Schistosoma mansoni (Baixada do
Maranhão, São Luiz, Brésil). Mammalia, 51, (2): 249-57, 1987.

WARREN, S. K. The Immunopathogenesis of Schistosomiasis a multidisci-
plinary approach. Trans. R. Soc. trop Med & Hyg., 66 (3): 417-32,
1972. J. Parasitol., 41: 329-30, 1955.

WHO. EXPERT COMMITTEE ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF SHISTOMIASIS. WHO
Tech. Rep. Ser. (643), 20, 1980 Rev. Parasitol., 26: 751, 1980.

WILLIAMS, J. S. & ANDERSON, R. I. Fluorescent anti-
bodies for serodiagnosis of schistosomes in tissues. Rev. Parasitol., 26: 289-91, 1980.

WILLY, S. & VON LICHTENBERG, P. Schistosoma mansoni
and class specificity of hyperimmune sera induced dur-
ing infection. Rev. Parasitol., 23: 415-22, 1977.

WILSON, J. Experimental of Austroloporia glauca with S.
mansoni. Individual and mass infection to temperature and season.
Rev. Parasitol., 46: 48-51, 1957.

WILSON, J. & BACCHUS, L. P. Description of a elastic coar-
se. J. Parasitol., 41: 328, 1955.