

EVOLUÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA IMUNE DE CAMUNDONGOS AO *SCHISTOSOMA MANSONI**

Othon de Carvalho Bastos**

Humberto de Araujo Rangel***

Luiz Augusto Magalhães***

Aquiles Eugênio Piedrabuena***

BASTOS, O. de C. et al. Evolução das imunoglobulinas envolvidas na resposta imune de camundongos ao *Schistosoma mansoni*. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 18: 138 - 54, 1984.

RESUMO: Foi estudada a evolução das imunoglobulinas envolvidas na resposta imune de camundongos ao *Schistosoma mansoni* durante oito semanas de infecção, utilizando soros pluri-específicos como reativos biológicos e a técnica da imunoelektroforese bidimensional. Os resultados expressaram modulação da resposta imune humoral, tanto em soros de animais parasitados (I) como nos normais, tomados como controle (C). Aumentos relativos dos níveis de imunoglobulinas entre estes dois grupos foram constatados pela relação I/C. Foi possível verificar o aparecimento de uma resposta primária, ocorrida entre o início da doença e a segunda semana de infecção, constituída de IgM e IgA, e uma secundária, iniciada na sexta semana de infecção, constituída pelas IgA; IgG1 e IgM, com aumentos relativos de 4.5; 3 e 2 vezes normal.

UNITERMOS: *Schistosoma mansoni*. Imunoglobulinas. Esquistossomose mansônica.

INTRODUÇÃO

A identificação de classes de imunoglobulinas envolvidas na resposta do hospedeiro vertebrado ao *Schistosoma mansoni* tem sido feita na esquistossomose humana (Hillyer²⁰, 1969; Antunes e col.², 1971; Kanamura e col.²³, 1978) e experimental, utilizando-se principalmente camundongos (Hillyer e Frick²¹ 1967; Sher e col.⁴¹, 1977). Entretanto, os dados existentes na literatura sobre cinética e classes de imunoglobulinas, envolvidas na infecção esquistossomótica produzida em *Mus musculus*, têm sido expressos em uni-

dades absolutas (mg/ml), não se levando em consideração o fato de os animais em observação estarem postos a inúmeros estímulos antigênicos aleatórios que podem influenciar os valores finais do teor das gamaglobulinas. Este aspecto pode ser crítico, uma vez que a quantificação de anticorpos específicos para *S. mansoni* é sempre feita em termos relativos, não se sabendo, portanto a quantidade absoluta produzida durante a infecção.

Por outro lado, estudos da cinética e classes de anticorpos envolvidos nas infecções parasitárias são realizados utilizando-se reativos biológicos mono-específicos

* Parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

** Da Universidade Federal do Maranhão - Programa de Pesquisa e Pós-Graduação em Imunologia - Campus Universitário - Bacanga - Bloco 3 - Sala 3A - 65000 - São Luís, MA - Brasil.

*** Da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Caixa Postal 6109 - 13100 - Campinas, SP. -

de cadeias pesadas, cuja aquisição é dispendiosa para os laboratórios de pesquisa pertencentes aos países em desenvolvimento.

Com a finalidade de minimizar estas dificuldades, nesta pesquisa foram utilizados soros pluriespecíficos para serem comparados os níveis das diferentes imunoglobulinas encontradas em camundongos esquistossomóticos com os detectados em grupos de animais normais, tomados como controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Hospedeiro Definitivo e Procedência do S. mansoni.

Foram tomados 160 *Mus musculus* albinos (dos dois sexos) 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 aleatoriamente em dois grupos numericamente iguais. Um desses grupos foi submetido à infecção por cercárias de *S. mansoni* da linhagem BH. O outro grupo foi utilizado como controle da experiência.

Método de Infecção de Camundongos.

Decorridas quatro semanas, contadas a partir da data da exposição das *Biomphalaria glabrata* aos miracídeos da linhagem mineira, os moluscos foram expostos à luz e a temperatura de 28°C, por duas horas, com a finalidade de se obter cercárias (Pellegrino e Macedo³⁹, 1955). As larvas eram transportadas para tubos de ensaio de 10ml, contendo água à temperatura de 28°C, aquecidos por lâmpadas elétricas. A cauda de cada roedor foi imersa em suspensão contendo 100 cercárias, assim permanecendo por duas horas. Em seguida, os camundongos eram retirados e suas caudas lavadas, com a finalidade de serem separadas e contadas as partes cefálicas das cercárias que não conseguiram penetrar pelo tegumento. Foi determinada a diferença entre o número de cercárias contidas inicialmente na suspensão e o encontrado na recontagem. Obteve-se, assim,

o número de cercárias penetrantes (Magalhães²⁷, 1969).

Coleta de Material para Análise Parasito-Imunológica.

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 do grupo controle eram pesados e sangrados pelo plexo braquial (Lima e Silva²⁶, 1970).

O sangue, dos 10 indivíduos de cada grupo, coletado no mesmo tubo, era deixado à temperatura ambiente, para a obtenção do soro. Logo a seguir, os soros eram centrifugados a 270g, à temperatura de 0°C. Em seguida, eram ministrados e distribuídos em alíquotas de 100 μ l 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 transcorridas desde a data da exposição.

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

2. Coleta de Vermes e Contagem de Granulomas Hepáticos.

Após a sangria, os camundongos foram sacrificados e suas cavidades peritoneais expostas. Em seguida, o sistema porta de cada animal foi perfundido e exemplares de *S. mansoni* foram retirados dos vasos mesentéricos e hepáticos (Brener⁶, 1962). Vermes, também, foram obtidos por esmagamento do fígado entre lâminas de vidro (Hill¹⁹, 1956). Os esquistossomos encontrados foram contados, sendo que os adultos foram separados por sexo.

Os fígados procedentes dos camundongos infectados foram homogeneizados em água e a suspensão transportada para os 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 hepáti-

cos em lupas estereoscópicas, de acordo com o método descrito por Brenner e col.⁷ em 1956.

Obtenção de Reativos Biológicos.

Na imunoeletroforese quantitativa foram utilizados soros de coelhos anti-imunoglobulinas (anti-Igs) de camundongos. Estas Igs foram isoladas a partir de soro normal dos roedores (SN), através da seguinte metodologia:

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 e Silva²⁶, 1970). Uma nova diálise foi feita com solução tampão de fosfato de potássio NaCl (0.1 M; pH = 8.0), antes de cada filtração em gel.

2. Filtração em gel.

Seis mililitros da fração globulínica foram aplicados em colunas de 45 x 5 cm de Sephadex G200 (Pharmacia), segundo Fahey e col.¹² (1964). O eluente utilizado foi solução tampão de fosfato de potássio (0,05M, pH = 8) com fluxo médio de 70ml por hora. Frações de 4ml foram coletadas e suas absorvâncias determinadas a 280 nm. Cada filtração produzia três picos individuais de proteínas e as que correspondiam às globulinas com pesos moleculares de 19S e 7S, eram concentradas separadamente em ultrafiltros (Amicon) e submetidas à eletroforese preparativa em bloco.

3. Eletroforese preparativa em bloco de amido.

Para 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 250V, por 24 h (Kunkel e Slater²⁴, 1952). O mesmo tampão veronal foi utilizado para a eluição do material resultante da separação. Os eluatos

foram analisados por absorvância em 280 nm e os que apresentaram valores mais elevados, referentes a cada pico, foram submetidos a imunoeletroforese.

4. Imunoeletroforese.

A imunoeletroforese unidimensional (Grabar e Burtin¹⁷, 1964) foi utilizada para verificação do comportamento dos eluatos obtidos da eletroforese em bloco, frente ao anti-soro normal de camundongo. A técnica da imunoeletroforese do tipo Rocket de Laurell foi realizada conforme descrição de Wekke (Axelsen e col.³, 1973), e serviu para identificar proteínas nos eluatos. Os suportes utilizados foram ágar para a imunoeletroforese de Grabar e Burtin¹⁷ e agarose (BIO-RAD Lab.) para a imunoeletroforese Rocket, a 1% em solução tampão veronal-HCl (0.05 M; pH=8.6 e $\mu=0.02$). As condições de forese foram de 6 V/cm, por 1,10 h e 1,5 V/cm, por 15 h, respectivamente para a primeira e a segunda imuno-eletroforese. A solução tampão da cuba foi a mesma utilizada para o preparo do gel.

Os eluatos que, na imunoeletroforese unidimensional, apresentaram sistemas precipitantes, 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 dos camundongos esquistossomóticos. Da eletroforese da 19S resultou uma fração que foi utilizada para a obtenção de soros de coelho anti-IgM de camundongos, denominada fração FM. Do fracionamento da 7S resultou a fração G, utilizada para a obtenção de soros de coelho anti-IgG.

5. Imunização de coelhos.

Foram imunizados coelhos com soro normal (SN), frações FM e G de camundongos, obedecendo os seguintes esquemas:

a. 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 10mg de proteínas to-

tais. O volume final foi distribuído em 4 alíquotas e inoculadas por via intramuscular nas patas do animal. Especialmente, as inoculações das patas traseiras foram feitas em regiões próximas aos gânglios poplíteos (Oliveira³⁶, 1975). Decorridos 30 dias após a dose sensibilizante, os coelhos foram novamente inoculados, 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 (Ouchterlony³⁷, 1958) e apresentaram o título precipitante de 1/32, quando testados com o antígeno na concentração de 500 µg de proteína/ml.

b. Imunização com as frações FM e G.

O esquema de inoculação das frações FM e G em coelhos foi análogo ao utilizado para o soro normal de camundongos. Contudo, a concentração antigênica da dose desencadeante da resposta imune foi a metade da utilizada na sensibilização. Os títulos dos anti-soros, obtidos por imuno-difusão, foram: 1/32, para o anti-FM, e 1/16, para o anti-G (Ouchterlony³⁷, 1958).

Dosagem de Proteínas.

1. Proteínas totais.

O teor protéico dos diferentes soros foi determinado pelo reativo do biurêto, segundo Wiechselbaum⁴⁶ (1946), e/ou a 280nm, em espectrofotômetro Zeiss, PMQ III, com cubas de quartzo e caminho óptico de 1 cm.

2. Das frações séricas.

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

a. Eletroforese em microzonas.

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

(Zeiss). A densitometria foi determinada em Registrador de Extinção nº3 (Zeiss).

b. Imuno-eletroforese bidimensional quantitativa.

Placas de vidro de 9 x 12cm, cobertas com 16ml de agarose (BIO-RAD Lab.) a 1% em tampão veronal-HCl (0.05M; pH= 8.6 e $\mu = 0.02$) de Svendsen (Axelsen e col.³, 1973), foram utilizadas para a imuno-eletroforese bidimensional quantitativa de Laurell, de acordo com as orientações de Weeke, descritas em Axelsen e col.³ (1973). A eletroforese no primeiro sentido foi realizada com 6V/cm, por 1,10h, e na segunda dimensão, 1,5 V/cm, por 15h. A quantificação das imunoglobulinas foi feita pela medida da área envolvida pelo precipitado, com auxílio de papel milimetrado. Multiplicamos os valores correspondentes às alturas de cada pico em milímetros por uma base determinada no quadrante superior esquerdo da precipitação, estabelecida por uma linha que bisectava a da altura.

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, sofre atraso e permite sua identificação (absorção "in situ").

Determinação da Atividade do Anticorpo.

Vermes adultos depositados em solução salina fisiológica (0.15M) foram lavados três vezes nesta mesma solução, com intervalos de 60 min 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 3 horas neste estado, à temperatura ambiente, e 12 horas a 4°C. O sobrenadante retirado foi

centrifugado a 3.000g, por 20 min, a 0°C e analisado por imunoeletroforese bidimensional, frente ao soro anti-FM. Em seguida, o liofilizado foi lavado três vezes em solução salina tamponada com fosfatos (PBS; 0.01M; pH= 7.2) e submetido à reação de imunofluorescência indireta, para comprovação da observação.

Reações de Imunofluorescência

Foram realizadas reações de imunofluorescência indireta entre os soros imunes de camundongos esquistossomóticos e os esporocistos, cercárias, vermes e miracídios da linhagem mineira de *S. mansoni*. As reações se processaram em todos 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, filtros barreira 0/47/44 e excitador I.

A obtenção do material para as reações processou-se da seguinte maneira:

1. *Cercárias* — Foram utilizadas larvas, com duas horas de vida. As cercárias foram mortas pela adição de 5 gotas de formaldeído a 40%, em 100ml de suspensão cercariana.
2. *Vermes* — Esquistossomos recém-coletados, foram lavados três vezes em solução salina fisiológica (0.15M), durante uma hora. Em seguida, foram mergulhados em fixador de Rossman (90 ml de etanol 100% saturado com ácido pícrico e 10ml de formaldeído a 37%), por 15 h (NASH, 1974). Para a inclusão, a peça foi cortada em tiras de 5m μ de espessura e preparada para microscopia óptica.
3. *Miracídios* — Foram utilizados miracídios 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 homogeneização dos fígados em liquidificador. Posteriormente,

os ovos foram lavados com solução de NaCl a 1.7%, em peneiras metálicas "granutest", com malhas de 0.149; 0.074 e 0.037mm. Em seguida, foram depositados sobre a superfície de uma solução de Hypaque (Winthrop) a 10% contida em funil cuja abertura estava cerrada; três horas após, a torneira do funil foi aberta e os ovos foram recuperados, isentos de tecidos.

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 o material manuseado em tubos, como para o preparo em lâminas. Os esporocistos foram lavados três vezes com solução salina tamponada (PBS; 0.01M; pH= 7.2). As lâminas foram secas parcialmente e os imune-soros, diluídos a 1/8, adicionados sobre as preparações, deixando-se reagir em câmara úmida, na temperatura ambiente, por 30 min. Após este período, o material foi novamente lavado em PBS, 3 vezes por 5 min. O excesso de PBS foi retirado adicionando-se o conjugado antiglobulinas 7S de camundongo produzido em cabra, marcado com isotiocianato de fluoresceína (Hayland Lab.) e diluído a 1/50 (Lemos Neto²⁵, 1975). O conjugado foi diluído em PBS, contendo azul de Evans, na diluição de 1:10.000 (Nash³², 1974). Esta reação processou-se em câmara úmida, por 45 min. Depois, as preparações foram lavadas em PBS e montadas em glicerina alcalinizada com tampão carbonato (pH = 9.0).

RESULTADOS

Evolução da Infecção.

A percentagem de cercárias que conseguiu penetrar variou de 83% a 96%, nos diferentes lotes, resultando que, em média, penetram 50 cercárias por animal.

As médias dos valores referentes ao número de vermes e de granulomas hepáticos, encontrados no decorrer da infecção, foram 20 e 2.000 respectivamente. Verificou-se, também, que os vermes adultos começaram a aparecer em épocas em que ainda se registravam o encontro de esquistossomos.

A distribuição dos pesos corporais dos animais destinados a experiência não diferiu significativamente da distribuição normal. Contudo, as médias dos diferentes lotes distribuíram-se assimetricamente e por grupos. A heterogeneidade desta variância, verificada pelo teste de Bartlett, foi altamente significativa para 15 graus de liberdade ($X^2 = 52,3843$). 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 e indicaram a

ocorrência de diferenças significativas no peso destes órgãos, a partir da 4ª semana de infecção.

Os resultados da eletroforese em microzonas dos soros oriundos dos animais pertencentes aos diversos lotes de infectados e de controles foram analisados estatisticamente e mostraram diferenças significativas entre os grupos no que se refere aos níveis de albumina e das globulinas α e β . Estes níveis modificaram-se a proporção que a infecção evoluiu (Tabela 1). Ocorreu elevação no nível das globulinas dos animais do grupo infectado, principalmente na região da β e γ -globulina, nas 7ª e 8ª semanas após a exposição. A albumina apresentou queda do nível sérico nesta época.

Evolução das Imunoglobulinas.

1. Padronização do método.

Foram utilizados, no presente trabalho,

TABELA 1

Análise estatística comparativa entre os dados referentes a proteínas séricas dos grupos infectados e controle, obtidos durante oito semanas de estudo.

Proteínas Séricas	Grupos Controle		Infectado		Testes		Estatísticos	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	t	U	Fisher	
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	6,00	1,77	7,60	1,59	-	16*	p = 0,0406*	
α^2	19,12	4,08	17,30	1,68	-	2,00	-	
β	14,50	4,20	19,60	3,42	-	10,50**	-	
γ	11,60	3,37	13,50	3,58	-	22,00	-	

σ = desvio padrão

\bar{X} = média

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

três imune-soros de coelhos anti-imunoglobulinas de camundongos, para a quantificação das imunoglobulinas (Igs) dos soros dos animais dos grupos infectados (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 três sistemas precipitantes bem definidos (Fig. 1). 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. Os valores obtidos com replicadas, apresentaram variações em volta de 10%, consideradas dentro dos limites de erro estabelecidos para o método.

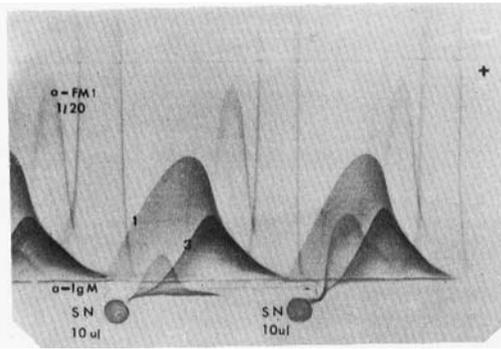


Fig. 1 — Identificação da IgM, por absorção "in situ". Soro normal de camundongo (SN) precipitado frente ao anti-soro (a-FM₁) diluído, e ao soro padrão (a-IgM), colocado na canaleta. O pico 1 corresponde a IgG1 e o pico 3 a IgA.

A identificação dos três sistemas precipitantes foi realizada através da técnica de absorção "in situ", utilizando padrões anti-Igs de camundongos, tal como pode ser observado na Fig. 1, que mostra um sistema precipitante correspondente a Ig da classe M (IgM). Utilizando idêntica metodologia, foi possível constatar que o Pico 1 correspondia a IgG1 e o pico 3, a IgA. Com o imune-soro anti-G foram obtidos, também, sistemas precipitantes e identificados como sendo IgG1, IgG2b e IgG2a, respectivamente.

O soro padrão anti-IgG1 reagiu com IgA de camundongos como reflexo da dificuldade da obtenção de reativos mono-específicos de cadeias pesadas.

A localização destas proteínas foi correspondente às suas mobilidades eletroforéticas.

2. Quantificação das imunoglobulinas.

A comparação dos padrões das reações de imunoelctroforese bidimensional quantitativa, obtidas com soros dos camundongos dos diferentes lotes, mostrou que o teor das imunoglobulinas variou durante o período de observação, tanto no grupo controle como no grupo infectado (Fig. 2). Esta observação pode ser feita com qualquer dos imune-soros disponíveis, principalmente com o soro anti-G, utilizado para quantificar as imunoglobulinas G2a e G2b. Como se pode observar na Fig. 2, 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. 3 a 7, 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 apresentaram um aspecto cíclico sinusoidal. A comparação das curvas de evolução das imunoglobulinas do grupo C com o I mostraram, no que se refere a IgM, IgA e IgG1, que as duas curvas são aparentemente paralelas da primeira até a quinta semana de observação, após o que apareceram nítidas diferenças quantitativas nos níveis dessas imunoglobulinas, nos dois grupos. Houve, durante o período de observação, aparente paralelismo entre os dois grupos, 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 diferiram significativamente, no que se refere ao teor da IgG1. A análise de variância mostrou que os dois grupos, também, diferiram significativamente, quan-

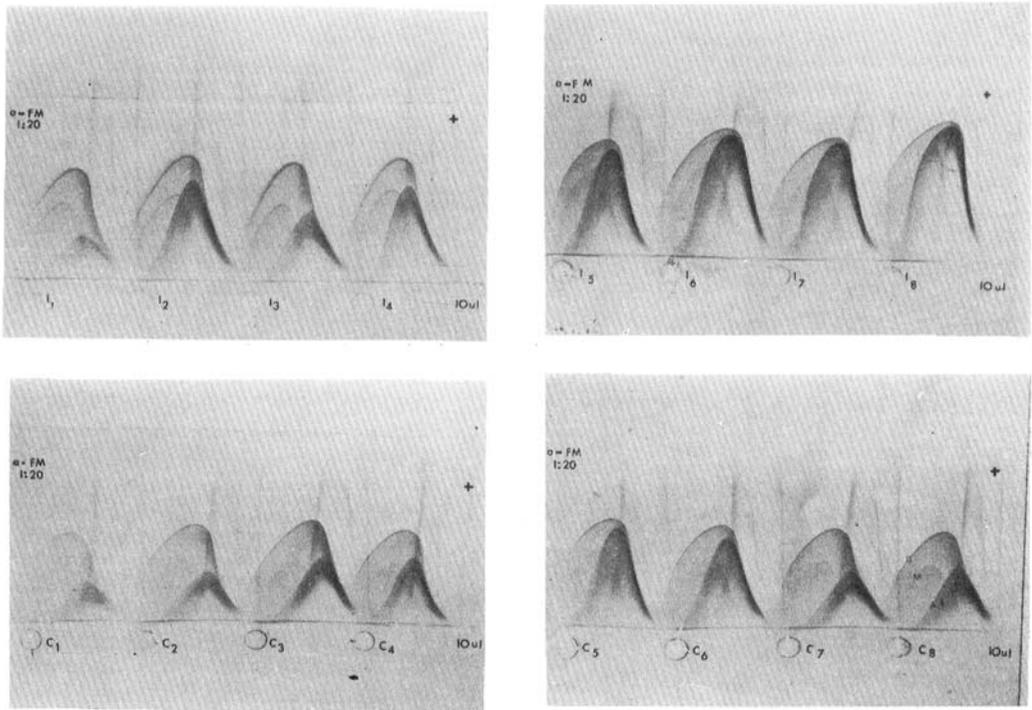


Fig. 2 – Padrão imunoelctroforético dos soros de camundongos dos grupos infectados com *S. mansoni* (In) e controle (Cn), durante as semanas de observação (n).

do comparados a partir da 6ª semana após a exposição, no tocante ao teor de IgA. Em concordância com o aparente paralelismo observado nas Figs. 6 e 7, não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos C e I, no que se refere ao teor das imunoglobulinas IgG2a e IgG2b.

Considerando que ao longo do período de observação houve variação ampla do teor da Igs no grupo C, 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 grupo C. Isto pode ser feito através da relação dos 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 foi 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. 8). 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.

3. Especificidade das Imunoglobulinas.

Foi verificada a capacidade dos soros de camundongos reagirem com os antígenos de

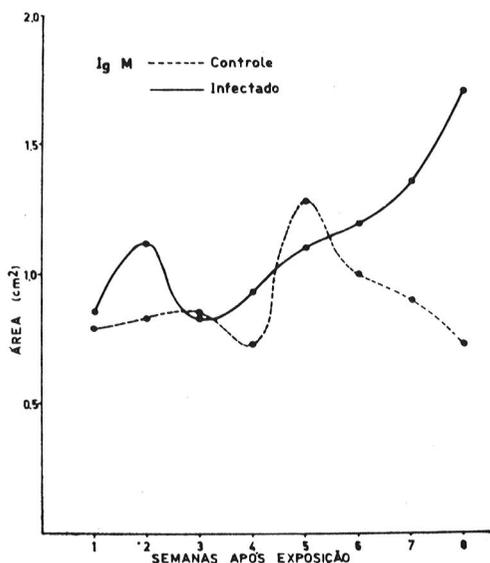


Fig. 3 - Resultado da quantificação da IgM, por imunoeletroforese bidimensional, encontrado em soros de camundongos pertencentes aos grupos infectado e controle, diferenciados por semanas de infecção.

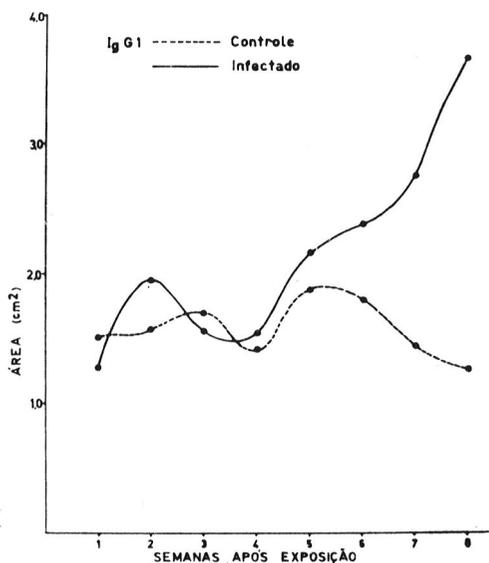


Fig. 5 - Resultado da quantificação da IgG1, por imunoeletroforese bidimensional, encontrado em soros de camundongos pertencentes aos grupos infectado e controle, distintos por semana de infecção.

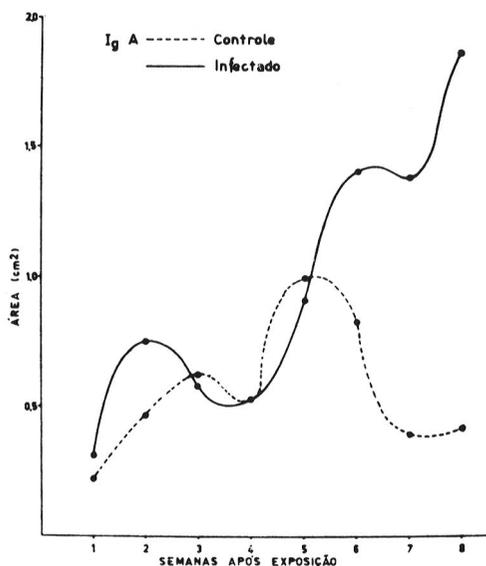


Fig. 4 - Resultado da quantificação da IgA, por imunoeletroforese bidimensional, obtido em soros de camundongos pertencentes aos grupos infectado e controle, diferenciados por semanas de infecção.

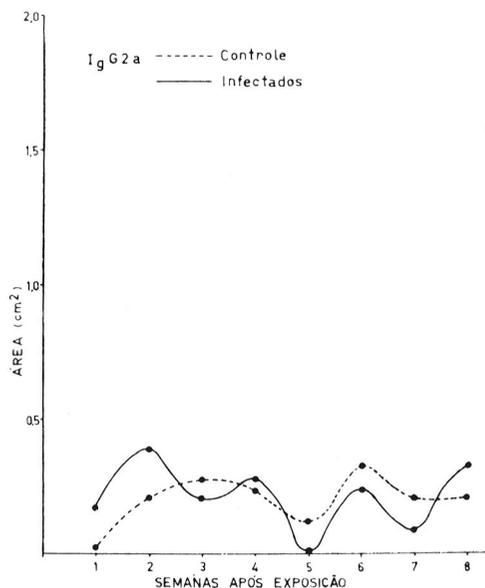


Fig. 6 - Resultado da quantificação da IgG2a, por imunoeletroforese bidimensional encontrado em soros de camundongos pertencentes aos grupos infectado e controle, diferenciados por semanas de infecção.

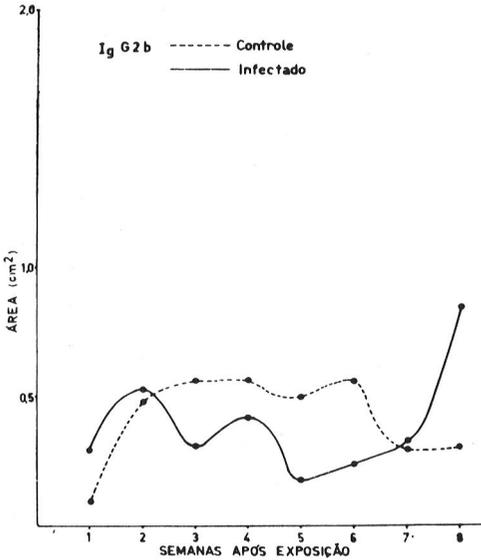


Fig. 7 - Resultado da quantificação da IgG2b, por imunoeletroforese bidimensional encontrado em soros de camundongos pertencentes aos grupos infectado e controle, diferenciados por semanas de infecção.

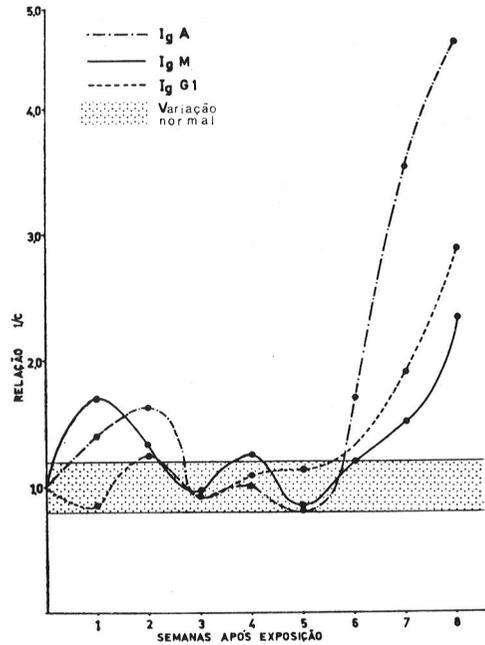


Fig. 8 - Influência do tempo de infecção sobre a relação (I/C) entre o teor de imunoglobulinas IgM, IgA e IgG₁ dos animais infectados (I) e dos seus respectivos controles (C).

S. mansoni, 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.

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. 9). Em concordância com este fato, os vermes liofilizados, utilizados na absorção, quando submetidos ao teste de imunofluorescência, mostraram-se fortemente positivos.

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 2, indicam que reações positivas podem ser observadas a partir da 3ª semana de infecção, quando se utilizam cortes histológicos de esquistossomos. Inicialmente, a positividade destas reações pode ser observada no tubo digestivo do esquistossomo. Isto ocorreu quando foram utilizados soros de animais com 4 semanas de infecção. Com os soros das semanas subsequentes, a positividade se estendeu para além do tubo digestivo, sendo que, nas últimas semanas, todo corpo do verme apresentou-se fluorescente, acentuando-se o tegumento e o tubo digestivo.

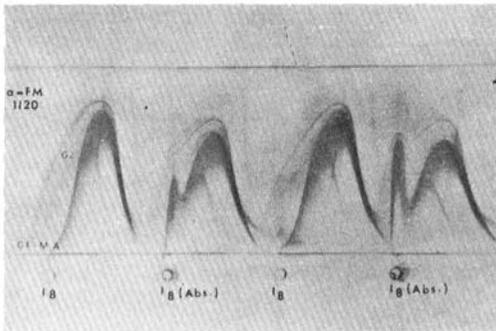


Fig. 9 — Padrão imunoeletróforético do soro dos animais com 8 semanas de infecção (Ig), após absorção com vermes liofilizados (IgAbs).

Utilizando cercárias íntegras, foi possível determinar reações positivas frente a soros de animais com 4 semanas de infecção. Com estes soros, foram observadas reações positivas nas extremidades da parte cefálica das cercárias. Com os soros dos animais com 6 a 8 semanas de infecção, observou-se positividade crescente do tegumento da larva.

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

Nos esporocistos, as reações positivas em cercárias começaram a aparecer na 6^a semana após infecção, e em cercárias e nas paredes dos esporocistos, da 7^a semana em diante.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A infecção experimental de camundongos com *Schistosoma mansoni* é fácil de ser estabelecida, desde que se observe dois fatores considerados importantes por Ghan-

dour e Webbe¹⁶ (1973), 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 do hospedeiro vertebrado (30 dias). 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 mostrados por outros autores. O número de cercárias, viáveis para a infecção de camundongos, foi semelhante ao encontrado por Oliver e Stirewalt^{3,5} (1952), precursores do método de infecção através da cauda do animal, e por Magalhães e Carvalho^{2,8} (1968), 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 ao "amadurecimento assíncrono dos vermes", analisado por Brener⁵ (1956), ao comparar seus dados com os que foram publicados por Faust e col.^{1,3}, em 1934, e recentemente por Barbosa e col.⁴ (1978). As datas em que foram registrados o aparecimento de granulomas hepáticos (6^a semana) e o pico destas reações tetrínicas (8^a semana), assim como a média de parasitas recuperados por animal, foram, também, resultados coincidentes com os da literatura especializada (Brener⁵ 1956; Brener e col.⁷, 1956 e Warren^{4,5}, 1967).

A eletroforese foi aplicada nos soros dos animais pertencentes aos diferentes lotes infectados e controles. A análise dos perfis das proteínas séricas mostrou que houve variações quantitativas, tanto nos lotes infectados como nos controles correspondentes. Estas variações não foram estatisticamente significativas quando comparadas isoladamente entre os lotes de cada grupo. Contudo, se levarmos em consideração que o erro da dosagem das proteínas e das frações eletroforéticas não é maior do que 10%, há que se admitir que as flutuações dos níveis das proteínas totais não estão incluídas no li-

TABELA 2

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.

mite do erro de dosagem e, conseqüentemente devem ser atribuídas a alterações reais nos níveis destas proteínas.

A comparação feita entre os dados dos grupos controle e infectado mostrou a ocorrência de alterações estatísticas muito significantes das frações β e γ - globulinas, além de hipoalbuminemia. Estes resultados são concordantes com as observações feitas desde a década de 50, tanto na esquistossomose humana (Fiorillo¹⁴, 1954) como na experimental (Evans e Stirewalt^{10, 11}, 1957, 1958; Sadun e Walton⁴⁰, 1958). Alguns autores, como de Witt e Warren⁹ (1959), 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 (Fiorillo¹⁵, 1966) e em modelos experimentais (Smithers e Walker⁴³, 1961). Estes dois últimos autores acrescentaram que o decréscimo no nível da albumina ocorria ao mesmo tempo em que um marcante aumento intravascular de seus "catábolitos" era registrado por isótopos, 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 ines-

pecíficos, decorrentes de lesões tissulares provocadas pelo *S. mansoni* no fígado (Smithers e Terry⁴², 1969).

Como sabemos, o método da eletroforese 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 mesmos, durante a infecção, poderão ser feitas individualmente, utilizando métodos imunológicos.

Habitualmente, no estudo da evolução das diferentes classes de Imunoglobulinas, tem sido utilizado o método de Mancini e col.²⁹ (1965), comparando-se uma mistura (pool) de soros dos animais infectados. Este método tem alta sensibilidade e é excelente para a 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 0,5ml/animal, o que requer grande número de camundongos para esta finalidade. 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. Têm sido inúmeras as tentativas de obtenção das cinco maiores classes de Igs de camundongos. Os métodos utilizados foram os mais variados possíveis. A maioria deles empregou a separação em DEAE-celulose como passo principal (Kalpaktsoglou e col.²², 1973), outros usaram a eletroforese em zona combinada com cromatografia de troca-iônica (Fahey e col.¹², 1964), 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 de purificação do material eletro-separado, com a técnica de eletro-focalização (Murgita e Vas³¹, 1970). Em nosso

trabalho, por exemplo, frações que foram consideradas puras por imunoeletroforese unidimensional, quando utilizadas para a imunização de coelhos, induziram a formação de soros pluri-específicos (cadeias leves e pesadas). Para contornar estas dificuldades, têm sido utilizados camundongos isogênicos portadores de mielomas (Fahey e col.¹², 1964). A manutenção de camundongos isogênicos requer laboratórios especiais e técnicos capacitados para selecionar geneticamente estes animais, e a obtenção de células de mieloma para o implante requer a importação de material produzido no exterior.

O método da imunoeletroforese quantitativa bidimensional tem a vantagem de não exigir a utilização destes soros, conseqüentemente 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 estatística 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 e com os dados de outros autores que observaram elevação nos níveis das β e γ - globulinas, a partir da época da oviposição (Smithers e Terry⁴², 1969). As três 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 (Hillyer²⁰, 1969; Antunes e col.², 1971 e Kanamura e col.³³, 1978); murina (Hillyer e Frick²¹, 1967; Deeldler⁸, 1973 e Sher e col.⁴¹, 1977) e em outras infecções parasitárias produzidas por protozoários, como malária e tripanossomose (PAHÖ³⁸, 1967).

O valor dos dados quantitativos absoluto das Igs tem pouco significado, considerando-se que o nível dessas proteínas sofre flutuações amplas durante o desenvolvimento dos animais (Ohwaki e col.³³, 1977; Haaijman e col.¹⁸, 1977), 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 ambiente. 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. 8), evidenciou aspectos clássicos da resposta imune encontrada em animais que tenham recebido dois estímulos antigênicos consecutivos. Estes aspectos têm sido observados em camundongos convencionais a axênicos, utilizando-se antígenos timo dependentes ou não (Ohwaki e col.³³, 1977). A resposta primária, caracterizada pela IgM e IgA, ocorrida entre a primeira e a segunda semanas após a infecção, deve-se provavelmente a estímulos antigênicos de cercárias e esquistossomos. A resposta secundária, caracterizada pela IgG1, IgA e IgM, ocorreu a partir da 6ª semana após a infecção, possivelmente devido a antígenos provenientes de vermes adultos, aos ovos dos parasitas e aos tecidos desnaturados por secreções destas formas evolutivas do verme. Nesta data, foi também observado aumento significativo dos pesos do baço e do fígado.

O aparecimento de anticorpos da classe IgM como primeira Ig efetora da resposta imune, tem sido encontrada na esquistossomose (Kanamura e col.²³, 1978) e em várias outras infecções, como toxoplasmose (Amato Neto e col.¹, 1972) e doença de Chagas (Vattuone e col.⁴⁴, 1973). A presença da IgA nas duas respostas, com destaque na secundária, pode ser explicada como resul-

tante 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 e col.⁴¹, 1977).

Não foi observada a formação de anticorpos entre a 3ª e 5ª semanas após a infecção. Este período de latência da resposta imune é coincidente com o registrado por Mota-Santos e col.³⁰, em 1976, que observaram 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 das Igs verificado durante a infecção se deve a uma produção de anticorpos específicos para antígenos provenientes do parasita, demonstrado pela imunoelectroforese bidimensional com soros previamente absorvidos e pelas reações de imunofluorescência indireta, utilizando diferentes estágios evolutivos do parasita. Estes dados coincidem com os Okot-Kotber³⁴ (1978) e indicaram que os primeiros anticorpos formados são específicos para o tubo digestivo do parasita, sugerindo serem estes antígenos altamente imunogênicos.

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

BASTOS, O. de C. et al. [The evolution of immunoglobulins involved in the immune response to mice infected with *Schistosoma mansoni*.] *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 18: 138 - 54, 1984.

ABSTRACT: The evolution of immunoglobulins involved in the immune response of mice infected with *Schistosoma mansoni* was studied by using plurispecific sera and the bi-dimensional immunoelectrophoresis technique. Determinations of the level of different immunoglobulins in infected animals and control groups which were maintained under similar conditions detected significant variations in both groups over the 8 weeks of observation. The study of the relationship (I/C) between the level of immunoglobulins of the infected animals (I) and that of corresponding control (C) showed that the infected animals presented a primary response (1-2 weeks after infection date) and a secondary response that was initiated in the 6th week of infection, with levels of IgA, IgG and IgM that were respectively 4.5, 3 and 2 times higher than those of corresponding control.

UNITERMS: *Schistosoma mansoni*. Immunoglobulins. Schistosomiasis.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. AMATO NETO, V.; CAMARGO, M.E.; MENDONÇA, J.S.; LEVI, G. C. & OSEKA, G. W. Observações sobre a pesquisa de anticorpo IgM anti-toxoplasma por imunofluorescência no soro de pacientes com toxoplasma adquirida, forma linfoglandular. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 14: 264-72, 1972.
2. ANTUNES, L. J.; REIS, A. P.; PELLEGRINO, J.; TAVARES, C. A. & KATZ, N. Immunoglobulins in human schistosomiasis mansoni. *J. Parasit.*, 57: 539-42, 1971.
3. AXELSEN, N. H.; KROL, J. & WEEKE, B. A *manual of quantitative immunoelectrophoresis: methods and applications*. Oslo, Universitetsforlaget, 1973.
4. BARBOSA, M.A.; PELLEGRINO, J.; COELHO, P. M. Z. & SAMPAIO, I. B. M. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20: 121-32, 1978.
5. BRENER, Z. Observações sobre a infecção do camundongo pelo *S. mansoni*. *Rev. bras. Malar.*, 8: 565-75, 1956.
6. BRENER, Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da esquistossomose mansônica. Belo Horizonte, 1962. [Tese de Cátedra - Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade de Minas Gerais]
7. BRENER, Z.; PELLEGRINO, J. & OLIVEIRA, F. C. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. Aplicação do método de isolamento de granulomas do fígado de camundongos. *Rev. bras. Malar.*, 8:583-7, 1956.
8. DEELDER, A. M. Immunology of experimental infections with *Schistosoma mansoni* in the swiss mouse and *Fasciola hepatica* in rabbit. *Acta Leidensia*, 39: 1-107, 1973.
9. DeWITT, W. B. & WARREN, K. S. Hepatosplenic schistosomiasis in mice. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 8: 440-6, 1959.
10. EVANS, A. S. & STIREWALT, M. A. Sorologic reactions in *Schistosoma mansoni* infection. III. Ionographic fractionation of sera of mice with progressive disease. *Exp. Parasit.*, 6: 8-17, 1957.
11. EVANS, A. S. & STIREWALT, M. A. Sorologic reactions in *Schistosoma mansoni* infection. IV - Comparative ionographic study of sera of hamster, mice, and albino rats. *Exp. Parasit.* 7: 165-77, 1958.
12. FAHEY, J. L.; WUNDERLICH, J. & MISHEL, R. The immunoglobulins of mice. I - Four major classes of immunoglobulins; 7S Y², 7S Y¹, Y_{1A} (β₂A), and Y_{1M} globulins. *J. exp. Med.*, 120: 223-41, 1964.

13. FAUST, E. C.; JONES, C. A. & HOFFMAN, W. A. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III - Biological studies. 2 - The mammalian phase of the life cycle, Puerto Rico. *J. Publ. Hlth trop. Med.*, 10: 133-96, 1934.
14. FIORILLO, A. M. Estudo eletroforético do soro de pacientes portadores de esquistossomose mansoni hepatoesplênica. *Hospital*, Rio de Janeiro, 45: 647-51, 1954.
15. FIORILLO, A. M. Electroforese das proteínas do sangue na esquistossomose mansônica forma hepatoesplênica. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 8: 1-8, 1966.
16. GHANDOUR, A. M. & WEBBE, G. 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: 789-94, 1973.
17. GRABAR, P. & BURTIN, P. *Immuno-electrophoretic analysis*. Amsterdam, Elsevier Publ., 1964.
18. HAAIJMAN, J. J.; VAN DEN BERG, P. & BRINKHOF, J. Immunoglobulin class and subclass levels in the serum of CBA mice throughout life. *Immunology*. 32: 923-927, 1977.
19. HILL, J. Chemoterapeutic studies with laboratory infections of *S. mansoni*. *Ann trop. Med. Parasit.*, 50: 39-48, 1956.
20. HILLYER, G. V. Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections. IV - Human infections. *Exp. Parasit.*, 25: 376-81, 1969.
21. HILLYER, G. V. & FRICK, L. P. Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections I - Mouse infections. *Exp. Parasit.*, 20: 321-5, 1967.
22. KALPAKTSOGLU, P. K.; HONG, R. & GOOD, R. A. The five classes of immunoglobulins in normal C3H and BALB/c mice. *Immunology*, 24: 303-14, 1973.
23. KANAMURA, H. Y.; HOSHINO-SHIMIZU, S. & SILVA, L. C. Pattern of class-specific fluorescent antibodies according to the stagen of the infection in human schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20: 76-81, 1978.
24. KUNKEL, H. G. & SLATER, R. J. Electrophoresis in a starch supporting medium. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 80: 42-4, 1952.
25. LEMOS NETO, R. C. Estudo comparativo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens mineira e paulista do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Campinas, 1975 [Dissertação de Mestrado - Instituto de Biologia da UNICAMP].
26. LIMA, A. O. & SILVA, W. D. *Imunologia, imunopatologia e alergia*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1970.
27. MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. 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.*, 3: 249-50, 1969.
28. MAGALHÃES, L. A. Técnica para avaliação da viabilidade de penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. *Hospital*, Rio de Janeiro, 75: 1663-6, 1969.
29. MANCINI, G.; CARBONARA, C. O. & HEREMANS, J. F. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*. 2: 238-54, 1965.
30. MOTA-SANTOS, T. A.; GAZZINELLI, G.; RAMALHO PINTO, F. J.; PELLEGRINO, J. & SILVA, W. D. da Immunodepression in mice following *Schistosoma mansoni* infection. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 18: 246-50, 1976.
31. MURGITA, R. A. & VAS, S. I. Isoelectric separation of mouse immunoglobulins. *J. Immunol.*, 104: 514-7, 1970.
32. NASH, T. E. Localization of the circulating antigen with the gut of *Schistosoma mansoni*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 23: 1085-7, 1974.
33. OHWAKI, M.; YASUTAKE, N.; YASUI, H. & OGURA, R. A comparative study on the humoral immune response in germ-free and conventional mice. *Immunology*, 32: 43-8, 1977.

34. OKOT-KOTBER, B. M. The development of stage-characteristic immunofluorescence pattern in experimental schistosomiasis in mice. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 72: 255-62, 1978.
35. OLIVER, L. & STIREWALT, M. A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 38: 19-23, 1952.
36. OLIVEIRA, A. R. Considerações sobre antígenos obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. *Summa Phytopathologica*, 1: 61-4, 1975.
37. OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 5: 1-78, 1958.
38. PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Immunologic aspects of parasitic infections*. Washington, D. C., 1967. (Scient. publ., 50).
39. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. A simplified method for the concentration of cercariae. *J. Parasit.*, 41: 329-30, 1955.
40. SADUN, E. H. & WALTON, B. C. Studies on the host parasite relationships to *Schistosoma mansoni*. II - Quantitative changes in the concentration of serum proteins in humans and rabbits. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 7: 550-4, 1958.
41. SHER, A.; McINTYRE, S. & von LICHTENBERG, F. *Schistosoma mansoni*: kinetics and class specificity of hypergamaglobulinemia induced during murine infection. *Exp. Parasit.*, 41: 415-22, 1977.
42. SMITHERS, S. R. & TERRY, R. The immunology of schistosomiasis. *Advanc. Parasit.*, 7: 41-93, 1969.
43. SMITHERS, S. R. & WALKER, P. J. Serum protein changes in monkey infected with *Schistosoma mansoni*, with special reference to the metabolism of albumin. *Exp. Parasit.*, 11: 39-49, 1961.
44. VATTUONE, N. H.; SZARFMAN, A. & GONZALES-CAPPA, S. M. Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' Disease). *J. trop. Med. Hyg.*, 76: 45-7, 1973.
45. WARREN, K. S. A comparison of Puerto Rican, Brazilian, Egyptian and Tanzanian strains of *Schistosoma mansoni* in mice; penetration of cercariae, maturation of schistosomes and production of liver disease. *Trans. roy. trop. Med. Hyg.*, 61: 795-802, 1967.
46. WEICHSELBAUM, T. E. An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *Amer. J. clin. Path. Techn.*, 10: 40-9, 1946.

Recebido para publicação em 05/04/1983
Reapresentado em 24/11/1983
Aprovado para publicação em 26/11/1983