

ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO SISTEMA ENZIMÁTICO FENOLOXIDASE DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

João Tadeu RIBEIRO-PAES (1), Paulo Inácio da COSTA (1), Duarte da SILVA (1), Léo Roberto BARTH (2) & Vanderlei RODRIGUES (1)

RESUMO

O sistema enzimático fenoloxidase (EC 1.10.3.1, EC 1.10.3.2) está amplamente distribuído entre os seres vivos, tendo sido descrito em diferentes espécies do reino animal e vegetal. Apesar de desempenhar um papel fundamental na formação da cápsula ou parede dos ovos de trematódeos, o sistema enzimático fenoloxidase (PO) tem sido pouco estudado nesses organismos. No presente trabalho são apresentados os resultados iniciais de imunizações de coelhos contra PO de fêmeas adultas de *S. mansoni* e tirosinase de cogumelo (Sigma). As análises imunológicas, realizadas através de imunodifusão dupla (teste de Ouchterlony) e imunoeletroforese, revelaram identidade imunitária parcial entre a PO de machos e fêmeas. Não se observou reação cruzada entre os antissoros de coelhos imunizados contra PO e aqueles com tirosinase, indicando que, embora os sítios catalíticos de ambas as enzimas devam ser semelhantes, já que atuam sobre os mesmos substratos, os determinantes antigênicos devem ser diferentes. Os resultados descritos no presente trabalho representam um primeiro passo no sentido da purificação das isoenzimas da fenoloxidase e sua posterior utilização ao estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na esclerotização da parede dos ovos de *S. mansoni*.

UNITERMOS: *Schistosoma mansoni*; Fenoloxidase; Parede dos ovos.

INTRODUÇÃO

O principal aspecto na patogênese da esquistossomose mansônica está relacionado à retenção, a nível da microcirculação hepática, dos ovos eliminados pelo parasita, o que determina uma reação inflamatória granulomatosa, que é substituída por tecido fibroso residual, estabelecendo-se, como consequência, hipertensão portal e os eventos que decorrem dessa condição patológica^{2, 29, 32, 36, 39}.

Classicamente tem sido aceito que a inflamação granulomatosa é consequência da hipersensibilidade

tardia, mediada por células T(CD4+), dirigida contra os chamados antígenos solúveis dos ovos^{15, 29, 35}. Trabalhos recentes, no entanto, têm mostrado que o granuloma é resultante de uma imbricada e interdependente rede de respostas contra os antígenos dos ovos, onde tomam parte diversos tipos celulares e seus produtos de síntese e secreção^{1, 10, 27, 31}.

Os ovos, agente primário na patogênese da esquistossomose, são protegidos do ambiente, assim como do hospedeiro vertebrado, por uma rígida parede ou

(1) Depto. de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

(2) Depto. de Pediatria - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Univ. de São Paulo.

Endereço para correspondência: Dr. Vanderlei Rodrigues - Depto. de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, SP, Brasil.

casca protetora. Atualmente, aceita-se de forma consensual que a rigidez da parede seja resultante de um processo de polimerização de proteínas precursoras denominado esclerotização ou tanização de quinonas. Tal processo envolveria a oxidação dos resíduos de tirosina, presentes em grande quantidade nas proteínas precursoras^{4, 20}. As moléculas de DOPA resultantes seriam, por ação do sistema enzimático fenoloxidase, oxidadas a quinonas, que em sendo altamente instáveis atrairiam grupos nucleofílicos, levando à formação de ligações cruzadas com proteínas e outros polímeros^{7, 22, 33}. Assim, como outras estruturas resultantes desse processo, os ovos de trematódeos são extremamente resistentes ao tratamento químico. Uma vez endurecidas, as proteínas da cápsula tornam-se insolúveis em detergentes e ácidos concentrados³⁴.

O sistema enzimático fenoloxidase (PO) está amplamente distribuído entre os seres vivos, tendo sido descrito em fungos, helmintos, crustáceos e, principalmente, insetos^{5, 8, 9, 19, 21, 33, 34}. Em insetos as fenoloxidases foram divididas em dois subtipos, mais comumente designadas como tirosinase (EC 1.10.3.1) e lacases (EC 1.10.3.2). Muito embora se atribua à PO um papel fundamental na formação da cápsula dos ovos de trematódeos^{13, 16, 17}, os aspectos físico-químicos e bioquímicos desse sistema enzimático têm sido pouco estudados nesses organismos. Os trabalhos realizados com técnicas histoquímicas nas décadas de 40 e 50, sobretudo em *Fasciola hepatica*, permitiram estabelecer uma relação consistente entre as fenoloxidases e o processo de esclerotização dos ovos. Os resultados desses trabalhos foram, em 1959, criticamente revisados por SMYTH & CLEGG³⁰, um clássico sobre o assunto. No gênero *Schistosoma* os estudos sobre o sistema PO resumem-se a algumas análises nas quais, a partir de técnicas manométricas e histoquímicas, estabeleceu-se a afinidade da enzima para alguns substratos fenólicos e que sua ocorrência estaria restrita às glândulas vitelínicas das fêmeas^{3, 24, 25, 26}.

O avanço no conhecimento acerca dos mecanismos moleculares envolvidos na formação da casca dos ovos, aliado a um melhor entendimento sobre a química das ligações cruzadas e dos aspectos físico-químicos e imunológicos do sistema PO, encerra grande importância prática, na medida em que podem fundamentar a elaboração de novas estratégias no combate à esquistossomose.

No presente trabalho são apresentados os resultados

parciais da caracterização eletroforética e imunoquímica do sistema PO, o que representa um ponto de partida para obtenção da(s) enzima(s) purificada(s) e sua posterior utilização em estudos voltados para o processo de esclerotização da parede dos ovos do *Schistosoma mansoni*.

MATERIAL E MÉTODOS

Parasita e manutenção do parasita. Foi utilizada, neste trabalho, a cepa LE de *Schistosoma mansoni*, proveniente de Belo Horizonte e mantida no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, desta Faculdade, através de passagens seriadas em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* (cepas Ineru e BH) e em camundongos Swiss. Cada camundongo era inoculado, por via subcutânea, com 200 cercárias. Os vermes adultos eram recuperados através da perfusão portal, realizada 6 semanas após a inoculação das cercárias, conforme a técnica descrita por SMITHERS & TERRY (1965)²⁸. Para obtenção de infecções unissexuais (vermes imaturos), os camundongos eram expostos a cercárias obtidas de *Biomphalaria* infectados com um único miracídio.

Preparação das amostras. Os vermes eram suspensos na presença de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,8 (1:1, w/v) e homogeneizados em Potter. Centrifugados a 3.000g durante 20 minutos. O sobrenadante era usado como fonte de enzimas. Para efeito comparativo, algumas extrações foram realizadas em tampão fosfato contendo Triton 5%. Todos os procedimentos de extração foram realizados a 4°C.

Deteção de fenoloxidase em gel de poliácridamida. A separação eletroforética foi realizada a 4°C. Voltagem inicial 50V e corrente 40 mA. Após entrada das amostras no gel de separação aplicava-se voltagem constante igual a 90V. Como solução tampão dos eletrodos era usado Tris 25 mM, glicina 0,12 M, pH 8,3. Após eletroforese, o gel era lavado em água destilada a 4°C durante 10 minutos. A incubação era feita a 30°C, durante 10 minutos, na presença de 4-metil catecol 25mM (4-MC-Sigma). Adicionava-se a seguir 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH - Sigma) 1,5 mM (concentração final), dissolvido com etanol 25%.

Produção de anticorpos e testes imunológicos. Anticorpos contra fenoloxidase foram produzidos a partir da eletroforese de extratos totais de fêmeas adultas. Após eletroforese, as regiões correspondentes às 3 bandas contíguas de migração mais lenta eram seccionadas

do gel, homogeneizadas em PBS 0,1 M, pH 7,2, concentradas em uma centrífuga Speed Vac, ressuspensas em 3,0 ml de PBS e misturadas em igual volume de adjuvante completo de Freund (Gibco). Dois coelhos da raça New Zeland pesando aproximadamente 1.500 g foram inoculados em 5 sítios (0,5 ml/sítio). Esse procedimento foi repetido por 4 vezes em intervalos constantes de 7 dias. A partir da 5ª semana as inoculações passavam a ser realizadas com adjuvante incompleto de Freund (Gibco). Esse procedimento era, também, repetido durante 4 semanas. Para produção de anticorpos contra tirosinase de cogumelo, cada coelho foi inoculado, a cada 7 dias, com 125 µg de tirosinase (Sigma), diluída em PBS 0,1 M, pH 7,2. As inoculações foram realizadas, essencialmente, como descrito acima. O soro de um coelho não imunizado foi usado como controle negativo. As análises imunológicas foram realizadas através do teste de imunodifusão dupla e imunoelektroforese. O teste de imunodifusão dupla foi realizado

conforme o método descrito por OUCHTERLONY em 1949 (in CLAUSEN, 1970) ⁶. A imunoelektroforese foi realizada em lâminas de microscópio, conforme descrito por SCHEIDEGGER (1955) ²³. As condições para eletroforese adotadas foram: voltagem de 12 V por lâmina, tempo de corrida 1,15 horas. Tampão dos eletrodos: Tris - 0,23 M, glicina - 0,6 M, EDTA.Na₂ 7,5 mM, azida sódica 20 mM, pH 8,6. As lâminas foram coradas com Comassie Blue (0,15%) ou com Azocarmin (0,5%).

Dosagem de proteínas. A análise quantitativa de proteínas foi realizada conforme o método descrito por HARTREE (1972) ¹¹, usando-se concentrações conhecidas de albumina diluída em água desionizada.

RESULTADOS

O padrão eletroforético obtido para extratos de fêmeas adultas (Fig. 1) caracterizou-se pela presença de um conjunto de 3 bandas contíguas e uma quarta banda com migração mais anódica. Tais bandas podiam ser vistas no gel como regiões de cor alaranjada, 2 a 3 minutos após adição de MBTH. O 4-MC mostrou ser o melhor substrato para revelação do sistema fenoloxidase. Por outro lado, não houve alteração no padrão de bandas quando a fonte de enzima foi o sobrenadante após extração com Triton, sugerindo ausência de atividade ligada à membrana (Fig. 1, canaleta 2).

Os resultados obtidos com a imunodifusão dupla (Fig. 2) mostraram que apenas um dos coelhos (C.2) imunizado com o sistema fenoloxidase do parasita fêmea, correspondendo às 3 bandas de migração mais

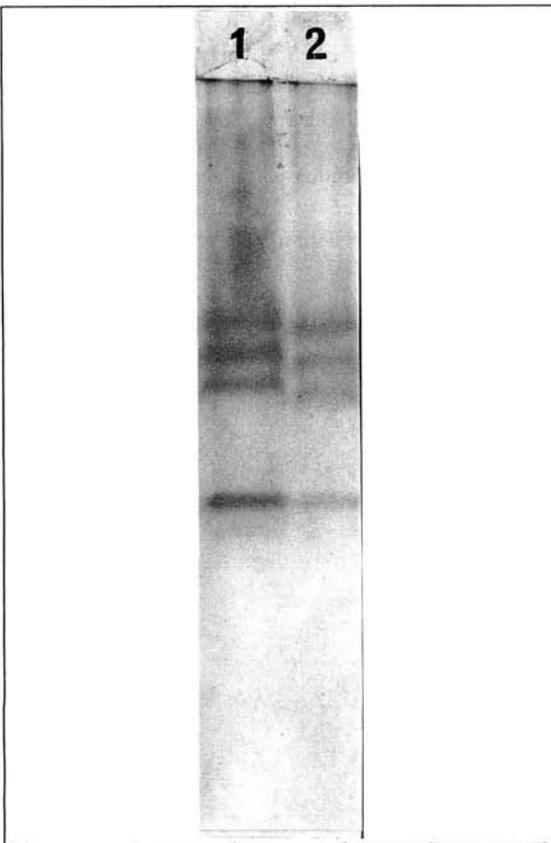


Fig. 1 - Atividade de fenoloxidase em gel de poliacrilamida para extratos de fêmeas adultas de *S. mansoni*, obtidos sem (1) e com (2) Triton 5%. Revelados com 4-MC (25 mM) e MBTH (1,5 mM). Aplicado 0,9mg de proteína total em cada canaleta.

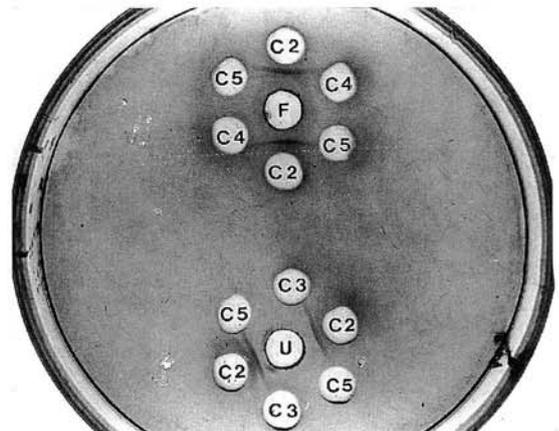


Fig. 2 - Linhas de imunoprecipitação formadas a partir de extratos de fêmeas adultas (F) e machos imaturos (U), na presença de soro anti-PO (C.2); anti-tirosinase (C.3 e C.4) e controle (C.5).

lenta (Fig. 1), apresentou uma boa resposta imunitária frente ao extratos totais de fêmeas, machos adultos e machos provenientes de infecções unissexuais (Fig. 2 e 3). Por outro lado, estes mesmos extratos não mostraram reação imunitária na presença do soro de animais imunizados contra tirosinase de cogumelo (Fig. 2 e 4). Apesar do padrão enzimático do sistema fenoloxidase ser diferente entre machos e fêmeas (RIBEIRO-PAES, 1993)¹⁸, determinantes antigênicos comuns aos dois sexos podem ser constatados através da imunodifusão realizada com o soro anti-PO de fêmeas e extratos totais de ambos os sexos (Fig. 3).

O padrão de imunoprecipitado obtido nos experimentos de imunoeletroforese (Fig. 5) caracterizou-se pela presença de 3 arcos de imunoprecipitação para extratos de fêmeas e 6 arcos para machos, na presença do soro do coelho (C.2) imunizado contra PO de fêmeas. Como observado nos testes de imunodifusão dupla, os soros dos animais imunizados contra tirosinase de cogumelo não apresentaram reação imunológica detectável aos extratos de machos e fêmeas, assim como os soros dos animais imunizados contra PO não reagiram com a tirosinase de cogumelo (Fig. 6), o que sugere ausência de identidade imunológica entre essas proteínas.

DISCUSSÃO

Como já descrito na introdução deste trabalho,

muito do que hoje se conhece sobre os aspectos bioquímicos da fenoloxidase advém dos trabalhos realizados com insetos³⁸. Entre os trematódeos e, particularmente, no gênero *Schistosoma* há pouca informação disponível no que se refere aos aspectos cinéticos e conformacionais desse sistema enzimático. Para WELLS & CORDINGLEY (1991)³⁷, o papel da fenoloxidase na formação das ligações cruzadas tem sido relegado como decorrência da dificuldade para se testar a ação desse sistema enzimático sobre as proteínas precursoras da cápsula dos ovos e pela série de lacunas no conhecimento dos mecanismos químicos envolvidos em tal processo.

Os estudos com a fenoloxidase no gênero *Schistosoma* foram realizados, quase que exclusivamente, através de técnicas histoquímicas, sobretudo nas décadas de 40 e 50³⁰. Esses trabalhos permitiram estabelecer uma forte correlação entre a formação dos ovos em trematódeos e o sistema PO. Trabalhos posteriores, utilizando técnicas espectrofotométricas e manométricas, determinaram a especificidade da enzima para alguns substratos fenólicos^{16, 24, 25, 26}. Tais estudos, no entanto, não avançaram no sentido de uma melhor caracterização bioquímica da fenoloxidase.

O perfil eletroforético para fêmeas adultas (Fig. 1), representa parte de um trabalho mais geral (RIBEIRO-PAES, 1993)¹⁸, que define, pela primeira vez, um pa-

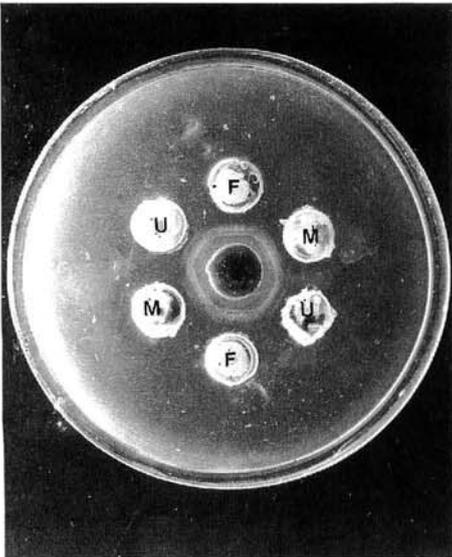


Fig. 3 - Linhas de imunoprecipitação formadas entre o soro anti-PO (coelho 2 - poço central) e extratos de fêmeas adultas (F), machos adultos (M) e machos imaturos (U).

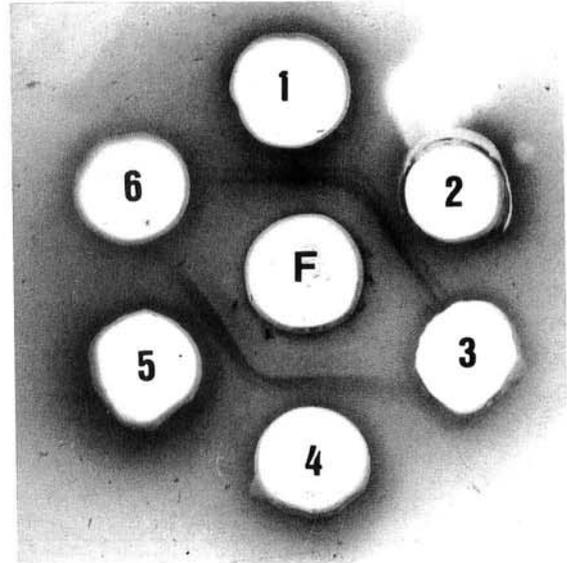


Fig. 4 - Linhas de imunoprecipitação formadas entre extratos de fêmeas (F) e soro anti-PO (1, 2, 4 e 5) e anti-tirosinase (3 e 6).

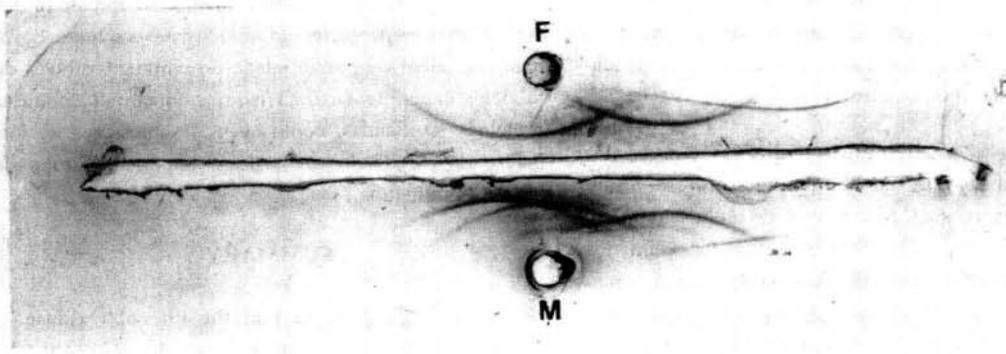


Fig. 5 - Arcos de imunoprecipitação entre o soro anti-PO (canaleta central) e extratos de fêmeas (F) e machos adultos (M).

drão de migração eletroforética para fenoloxidase em machos e fêmeas adultas de *S. mansoni*. Os extratos de machos adultos e imaturos apresentaram um padrão caracterizado pela presença de uma banda forte e uma banda secundária, com migração pouco mais anódica. As fêmeas, por sua vez, como se observa na Figura 1, apresentaram um padrão mais complexo caracterizado por um conjunto de três bandas contíguas e uma quarta banda com migração mais anódica. Não se observou atividade de fenoloxidase nos extratos de fêmeas provenientes de infecções unissexuais (imaturos). Esse resultado, no entanto, necessita de confirmações adicionais, uma vez que o estudo do perfil eletroforético para fêmeas imaturas foi comprometido pela dificuldade encontrada para obtenção de infecções unissexuais com fêmeas.

Os resultados provenientes das análises eletroforéticas permitem supor alguma atividade de PO em machos, dado que vai de encontro a publicações anteriores, nas quais postula-se que a fenoloxidase não ocorreria no exemplar macho de *S. mansoni*, estando sua ocorrência restrita às glândulas vitelínicas das fêmeas^{3, 25, 26}. Através das análises eletroforéticas objetivou-se, na verdade, dar início a um trabalho voltado para obtenção das diferentes isoenzimas da fenoloxidase em sua forma pura. Os experimentos de imunização de coelhos com a região do gel que se cora para fenoloxidase representaram um segundo passo nesse sentido.

No que se refere às análises imunológicas pode-se dizer que elas permitiram estabelecer, num primeiro

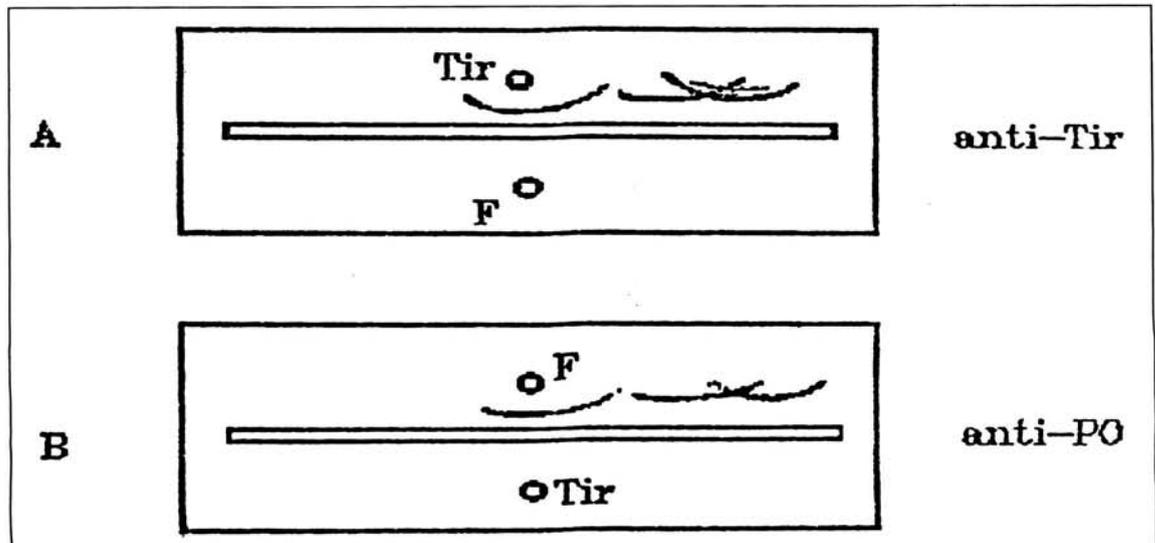


Fig. 6 - Arcos de imunoprecipitação entre o soro anti-tirosinase (A) e anti-PO (B), contra extratos de fêmeas adultas (F) e tirosinase (Tir).

momento do trabalho, algumas características e um padrão de resposta da proteína, através de dois métodos de análise: imunodifusão radial dupla (teste de Ouchterlony) e microimunoeletroforese.

As análises imunológicas realizadas através das técnicas de imunodifusão e imunoeletroforese foram coerentes entre si, qual seja, através de ambos os métodos ficou evidenciado resposta imunitária para um dos coelhos imunizados contra PO (coelho 2) e outro contra tirosinase de cogumelo (coelho 3). Em ambos os testes houve formação de bandas de imunoprecipitado entre o soro anti-PO, contra extratos de fêmeas adultas, machos adultos e unissexuais (Fig. 2 a 6). Esses resultados indicam algum tipo de identidade imunitária entre machos e fêmeas, determinado pelas proteínas que ocupam a região do gel que se cora para PO, a partir de extratos de fêmeas adultas. A possibilidade, mais remota, de que a resposta seja determinada por alguma outra proteína, presente nessa região do gel não poderia, no entanto, ser descartada. Tal resultado reforça ainda os achados decorrentes dos experimentos de eletroforese, onde se constata a existência de alguma atividade de fenoloxidase em machos¹⁸.

Através dos testes de imunodifusão e imuno-eletroforese não se detectou reação cruzada entre os antissoros do coelho 2 (anti-PO) e tirosinase de cogumelo ou vice-versa (Fig. 4 e 6). Evidenciando que, embora os sítios catalíticos de ambas as enzimas devam ser semelhantes, pois atuam sobre os mesmos substratos, os determinantes antigênicos podem ser diferentes. Nesse contexto, é importante observar que a tirosinase de cogumelo, cujo método de extração e purificação encontra-se padronizado, tem sido usada em experimentos de polimerização *in vitro*^{12, 33}, o que representa uma abordagem válida, considerando as propriedades catalíticas das enzimas, no entanto, os resultados acima descritos afastam a possibilidade de purificação da fenoloxidase de *S. mansoni* através do uso de anticorpos anti-tirosinase como ligantes em cromatografia de afinidade.

Até o presente não foram bem estabelecidos alguns dos aspectos químicos envolvidos nas ligações cruzadas, assim como não há uma prova cabal sobre a participação da fenoloxidase nesse processo. A obtenção de anticorpos contra as isoenzimas da fenoloxidase definem um ponto de partida para outros projetos de pesquisa, voltados à purificação dessas enzimas e sua posterior aplicação para estudos de polimerização *in vitro*, contri-

buindo, dessa forma, para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na oogênese do *S. mansoni*, além da possibilidade do emprego, através de modelos experimentais *in vivo*, dos anticorpos contra as proteínas purificadas, como agentes supressores na formação da parede dos ovos desse importante grupo de parasitas humanos.

SUMMARY

Immunological Aspects of the Phenol Oxidase Enzymatic System of *Schistosoma mansoni*

The phenol oxidase enzymatic system (EC 1.10.3.1, EC 1.10.3.2) is widespread in different species of the animal and vegetal kingdom. Despite its importance in the eggshell formation of the trematodes phenol oxidase (PO) has been little studied in these organisms, mainly in *S. mansoni*. This report presents the initial results concerning the immunization of rabbits with PO of *S. mansoni* and mushroom tyrosinase. The immunological analysis done by means of double immunodiffusion (Ouchterlony) and immunoelectrophoresis techniques revealed some immunological identity between the PO of males and females. It was not seen cross reaction between the antisera against PO and tyrosinase, what suggests that the antigenic determinants of both enzymes are different in spite of their catalytic sites being similar, since they act over the same substrate. The results reported here represent a first step in way to obtain the PO isoenzymes in their pure form and should open new insights for further studies on the molecular mechanisms involved in the sclerotization process of the *S. mansoni* eggshell.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Olinda Mara B. Trevilato e Vânia Fernandez pela contribuição técnica e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMIRI, P.; LOCKSLEY, R.M.; PARSLOV, T.G. et al. - Tumour necrosis factor restores granulomas and induces egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, 356: 604-607, 1992.
2. ANDRADE, Z. & GRIMAUD, J.A. - Morphology of chronic collagen resorption: a study on the late stages of schistosoma granuloma involution. *Amer. J. Path.*, 132: 389-399, 1988.
3. BENNETT, J.L.; SEED, J.L. & BOFF, M. - Fluorescent histochemical

- localization of phenol oxidase in female *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 64: 941-944, 1978.
4. BYRAM, J.E. & SENFT, A.W. - Structure of the *Schistosoma* eggshell - amino acid analysis and incorporation of labelled amino acids. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 28: 539-547, 1979.
5. CANICATTI, C. & SEYMOUR, J. - Evidence for phenoloxidase activity in *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) brown bodies and cells. *Parasit. Res.*, 77: 50-53, 1991.
6. CLAUSEN, J. - Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. In: WORK, T. S. & WORK, E., ed. - *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Amsterdam, North Holland Publ., 1972. v. 1, p. 397-572.
7. CORDINGLEY, J.S. - Trematode eggshells: novel protein biopolymers. *Parasit. today*, 3: 341-344, 1987.
8. DURRANT, H.J.; RATCLIFFE, N.A.; HIPKIN, C.R.; ASPAN, A. & SODERHALL, K. - Purification of the pro-phenol oxidase enzyme from haemocytes of the cockroach *Blaberus discoidalis*. *Biochem. J.*, 289: 87-91, 1993
9. GILLESPIE, J.P.; BIDOCHKA, M.J. & KHACHATOURIANS, G.G. - Separation and characterization of grasshopper hemolymph phenoloxidases by Sodium Dodecyl Sulfate - polyacrilamide gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 98C: 351-358, 1991.
10. HAGAN, P. & WILKINS, H.A. - Concomitant immunity in schistosomiasis. *Parasit. today*, 9: 3-6, 1993.
11. HARTREE, E.F. - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.*, 48: 422-427, 1972.
12. JOHNSON, K.S.; TAYLOR, D.W. & CORDINGLEY, J.S. - Possible eggshell protein gene from *Schistosoma mansoni*. *Molec. Biochem. Parasit.*, 22: 89-100, 1987.
13. MA, L. - Trace elements and polyphenoloxidase in *Clonorchis sinensis*. *J. Parasit.*, 49: 197-203, 1963.
14. MANSOUR, T.E. - Effect of serotonin on phenol oxidase from the liver fluke *Fasciola hepatica* and from others sources. *Biochim. biophys. Acta*, 30: 492-500, 1958.
15. MITCHELL, G.F.; TIU, W.U. & GARCIA, E.G. - Infection characteristics of *Schistosoma japonicum* in mice and relevance to the assesment to Schistosomes vaccines. *Advanc. Parasit.*, 30: 167-200, 1991.
16. NELLAIAPPAN, K. & RAMALINGAM, K. - Specificity of the enzyme phenoloxidase and possible pathway of sclerotization in *Parapleurus sauridae*. *J. Parasit.*, 66: 217-219, 1980.
17. NELLAIAPPAN, K.; DEVASUNDRAI, A.F. & CHANDAYUTHAPANI, S. - Properties of phenol oxidase in *Fasciola gigantica*. *Parasitology*, 99: 403-407, 1989.
18. RIBEIRO-PAES, J. T. - *Caracterização do sistema enzimático fenoloxidase em Schistosoma mansoni*. *Ribeirão Preto, 1993*. (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).
19. ROCH, P.; CANICATTI, P. & SEYMOUR, S. - Tetrameric structure of the active phenoloxidase evidenced in the coelomocytes of the echinoderm *Holothuria tubulosa*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102B: 349-355, 1992.
20. RODRIGUES, V.; CHAUDRI, M.; KNIGHT, M. et al. - Predicted structure of a major *Schistosoma mansoni* eggshell protein. *Molec. Biochem. Parasit.*, 32: 7-14, 1989.
21. ROLLE, R.S.; MARSHALL, M.R.; WEI, C.I. & CHEN, J.S. - Phenoloxidase forms of the florida spiny lobster: immunological and spectropolarimetric characterization. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97B: 483-489, 1990.
22. SCHAEFFER, J.; KRAMER, K.J.; GARBOW, J.R. et al. - Aromatic cross-links in insect cuticle: detection by solid-state ¹³C and ¹⁵N NMR. *Science*, 235: 1200-1204, 1987.
23. SCHEIDEGGER, J.J. - Une micro-méthode de l'immuno-electrophorese. *Intern. Arch. Allergy*, 7: 103-110, 1955.
24. SEED, J.L.; BOFF, M. & BENNETT, J.L. - Phenol oxidase activity: induction by in vitro incubation. *J. Parasit.*, 64: 283-289, 1978.
25. SEED, J.L. & BENNETT, J. L. - *Schistosoma mansoni*: phenol oxidases role in eggshell formation. *Exp. Parasit.*, 49: 430-441, 1980.
26. SEED, J.L.; KILTS, C.D. & BENNETT, J.L. - *Schistosoma mansoni*: tyrosine, a putative *in vivo* substrate of phenol oxidase. *Exp. Parasit.*, 50: 33-44, 1980.
27. SHER, A. - Schistosomiasis. Parasiting the cytokine system. *Nature*, 36: 565-566, 1992.
28. SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. - Infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology*, 55: 695-700, 1965.
29. SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. - Immunity in schistosomiasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 160: 826-840, 1969.
30. SMYTH, J.D. & CLEGG, J.A. - Egg-shell formation in Trematodes and Cestodes. *Exp. Parasit.*, 8: 286-323, 1959.
31. STADECKER, M.J. - The role of T-cell anergy in the immunomodulation of schistosomiasis. *Parasit. today*, 8: 199-204, 1992.
32. VON LICHTENBERG, F. - Consequences of infections with Schistosomes. In: ROLLINSON, D. & SIMPSON, A.J.G., ed. - *The biology of Schistosomes: from genes to latrines*. London, Academic Press, 1987. p. 185-232.
33. WAITE, J.H. & RICE-FICHT, A.C. - Presclerotized eggshell protein from the liver fluke *Fasciola hepatica*. *Biochemistry*, 26: 7819-7825, 1987.
34. WAITE, J.H. - The phylogeny and chemical diversity of quinone-tanned glues and varnishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97B: 19-29, 1990.
35. WARREN, K.S.; DOMINGO, E.O. & COWAN, R.T.B. - Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Amer. J. Path.*, 51: 735-745, 1967.
36. WARREN, K.S. - Pathophysiology and pathogenesis of hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 44: 280-294, 1968.

37. WELLS, K. & CORDINGLEY, J.S. - *Schistosoma mansoni*: eggshell formation is regulated by pH and calcium. *Exp. Parasit.*, 73: 295-310, 1991.
38. WRIGHT, T.R.F. - The genetics of biogenic amine metabolism, sclerotization and melanization in *Drosophila melanogaster*. *Advanc. Genet.*, 24: 127-222, 1987.
39. WYLER, D.J. - Why does liver fibrosis occurs in schistosomiasis? *Parasit. today*, 8: 277-279, 1992.

Recebido para publicação em 20/12/1993.

Aceito para publicação em 08/07/1994.