

SCHISTOSOMA MANSONI: IMPLANTE DE VERMES NA CAVIDADE PERITONEAL VISANDO IMUNOPROTEÇÃO (1)

Paulo Marcos Z. COELHO (2), Sílvia E. GERKEN (2) & Carlos Alberto P. TAVARES (3)

RESUMO

Tentou-se obter imunoproteção contra infecção cercariana pela inoculação de vermes vivos na cavidade peritoneal de camundongos. Embora os vermes sobrevivessem bem nestas condições e não ocorresse postura de ovos, não foi possível obter imunoproteção. Também a inoculação de ovos viáveis por via sanguínea e peritoneal não propiciou o aparecimento de imunoproteção nos camundongos com vermes na cavidade peritoneal.

UNITERMOS: *Schistosoma mansoni*; Implante de vermes; Cavidade peritoneal; Imunoproteção.

INTRODUÇÃO

Um sistema de vacinação aplicável tem por princípio básico a obtenção de imunidade protetora, contra os agentes infecciosos, causando um mínimo de lesões ao hospedeiro.

Na esquistossomose mansônica, só se consegue de maneira consistente obter imunidade protetora por dois processos: imunidade concomitante e por infecção com cercárias ou esquistossômulos irradiados⁵. A imunidade concomitante já foi verificada em diversos hospedeiros, a saber: camundongos^{5,6,8,9,11,12,16,21}, macacos rhesus³¹, ratos^{10,25,30} e hamsters^{20,21}. Por outro lado, conforme revisão de DEAN⁵, inúmeros trabalhos mostram o efeito protetor de formas jovens irradiadas do *S. mansoni*, cercárias e esquistossômulos. Ambos os processos citados utilizam formas vivas do parasito na infecção primária. O desenvolvimento da imunidade concomitante depende da presença de vermes adultos vivos no sistema porta para, continuamente, estimularem a resposta imunoprotetora. Nesse ca-

so, verifica-se também o quadro normal da doença com as evidentes implicações patológicas. No processo de vacinação por cercárias ou esquistossômulos irradiados, ainda que a irradiação provoque a morte rápida dos organismos utilizados no processo de vacinação, muitas dúvidas ainda permanecem quanto à reprodutibilidade dos resultados. Uma série de variáveis tais como: dose ideal em Krad, variação da imunoproteção frente a diferentes cepas do *S. mansoni*, linhagens de camundongos, vias de inoculação, tempo ideal para se produzir a imunidade protetora, tempo de duração desta imunidade, pode interferir na reprodutibilidade dos resultados^{2,5,7,14,15,17,18,19,26,27,28,29}. É importante frisar que ambos os processos (imunidade concomitante ou irradiação) induzem somente a uma imunidade parcial, isto é, sempre algumas cercárias da infecção desafio conseguem atingir o estágio do verme adulto, produzindo desta maneira uma infecção ativa.

(1) Trabalho executado com auxílio financeiro do CNPq e FINEP, Brasil.

(2) Departamento de Parasitologia e Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE), ICB/UFMG.

(3) Departamento de Bioquímica-Imunologia, ICB/UFMG.

Endereço para correspondência: Prof. Paulo Marcos Z. Coelho, GIDE-ICB/UFMG. Caixa Postal 2486. CEP 30161 Belo Horizonte, MG., Brasil.

É conhecido que o ovo é o elemento fundamental na patologia da esquistossomose²² e também que os vermes de 20 dias, introduzidos na cavidade peritoneal, não migram para o sistema porta sanguíneo, não põem ovos e podem sobreviver por vários meses nestas condições^{4,23}. Logo, tornou-se consistente a hipótese de se tentar obter um tipo de imunidade concomitante pela presença de vermes na cavidade peritoneal sem a patologia clássica da doença. Também foram feitas associações com vermes na cavidade peritoneal e inóculo de ovos na veia caudal e cavidade peritoneal visando esclarecer uma possível sinergia imunoprotetora do ovo com os vermes implantados na cavidade peritoneal.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos

Foram usados camundongos de linhagens isogênicas CBA e C57 BL-10 e não isogênica, Swiss.

Cepa do *Schistosoma mansoni*

Foi utilizada a cepa LE (BH) do *S. mansoni*. Esta cepa é mantida nos laboratórios do GIDE (Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose) há mais de 20 anos, por passagem em hamster e *Biomphalaria glabrata*.

Obtenção de vermes de 20 dias e inoculação na cavidade peritoneal de camundongos receptores

Foram inoculadas 500 cercárias, via subcutânea, em camundongos albinos. Vinte dias após, os camundongos foram sacrificados e perfundidos com a solução balanceada de Hanks (técnica de PELLEGRINO & SIQUEIRA²² com pequenas modificações). Os vermes obtidos foram então lavados por sedimentação, por 3 vezes, em solução de Hanks. Foram contados em microscópio estereoscópico e um inóculo de cerca de 50 vermes por ml foi injetado na cavidade peritoneal dos camundongos receptores.

Obtenção de ovos viáveis de *S. mansoni*

Os ovos foram obtidos de fígado de hamsters previamente infectados com 200 cercárias de *S. mansoni*, segundo técnica de JAMES & COLLEY¹³.

Experimento I — Camundongos com vermes na cavidade peritoneal e imunoproteção contra desafio por cercárias

Aos 90 dias após o inóculo dos vermes na cavidade peritoneal, os camundongos "vacinados" e seus respectivos controles foram submetidos à infecção transcutânea por 100 cercárias (técnica de BARBOSA et al.¹). Vinte dias pós o desafio, os camundongos foram sacrificados e submetidos à técnica de PEREIRA et al.²⁴, para recuperação de vermes na cavidade peritoneal, e usou-se a técnica descrita por PELLEGRINO & SIQUEIRA²², modificada, para recuperação de vermes do sistema porta. Os vermes foram contados separadamente. O grau de desenvolvimento dos vermes em função da idade (110 dias dos vermes na cavidade peritoneal e 20 dias da infecção desafio, obtidos do sistema porta) permitiu distinguir facilmente as duas populações.

Experimento II — Vermes na cavidade peritoneal de camundongos mais ovos viáveis inoculados via sanguínea e via peritoneal visando imunoproteção

Nos grupos com vermes na cavidade peritoneal e respectivos controles, foram inoculados 1.800 ovos viáveis, por duas vezes, nos 60.^o e 70.^o dias após implantação dos vermes, via veia caudal e via cavidade peritoneal. Quinze dias após o último inóculo, os grupos foram desafiados com 100 cercárias, por via transcutânea (técnica de BARBOSA et al.¹). Vinte dias após a exposição cercariana, os camundongos foram sacrificados para recuperação de vermes da cavidade peritoneal e do sistema porta. Os vermes das duas localizações foram contados separadamente, como descrito no Experimento I.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student, análise de variância e o teste de Scheffé³².

RESULTADOS

A Tabela I mostra a recuperação dos vermes do sistema porta de camundongos de

diferentes linhagens que tinham ou não vermes implantados na cavidade peritoneal (Experimento I).

TABELA I

Recuperação de vermes do sistema porta de camundongos de diferentes linhagens que receberam implantes de vermes na cavidade peritoneal (CP)

Experimento	Linhagem dos camundongos	Dia da infecção desafiado após implante dos vermes na C.P. (100 cercárias, via transcutânea)	Recuperação dos vermes do Sistema Porta (21 dias após infecção com cercárias)	
			Normais (n)	Com vermes na cavidade peritoneal (n)
1	Swiss	120.º	31,4 ± 11,0 (11)	30,2 ± 7,7 (11)
2	Swiss	100.º	13,9 ± 9,5 (14)	16,0 ± 8,2 (12)
3	Swiss	135.º	20,8 ± 11,2 (8)	16,3 ± 7,3 (9)
4	CBA	75.º	32,9 ± 8,7 (11)	25,4 ± 14,1 (6)
5	CBA	100.º	40,8 ± 10,0 (6)	47,1 ± 20,4 (10)
6	C57 BL/10	75.º	30,2 ± 12,5 (10)	30,3 ± 14,0 (8)

Média e desvio padrão da recuperação de vermes da cavidade peritoneal:

Experimento 1 = 13,9 ± 11,8; 2 = 5,5 ± 1,1; 3 = 20,0 ± 16,1;

4 = 14,4 ± 5,9; 5 = 18,2 ± 4,7; 6 = 11,4 ± 6,9.

(n) = número de animais em cada grupo

A análise estatística, pelo teste t de Student, não detectou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as médias de recuperação de vermes do sistema porta dos camundongos "vacinados" e as médias de seus respectivos controles.

A Tabela II mostra os resultados da tentativa de se obter imunoproteção contra infecção desafiado com cercárias pela presença simultânea de vermes na cavidade peritoneal e ovos inoculados na cavidade peritoneal ou na veia caudal (Experimento II).

TABELA II

Recuperação de vermes do sistema porta de camundongos (Swiss) que receberam implante de vermes na cavidade peritoneal e ovos viáveis inoculados por via sanguínea ou na cavidade peritoneal

	Grupo I (Com vermes na cavidade peritoneal)			Grupo II (Sem vermes na cavidade peritoneal)		
	GI 1	GI 2	GI 3	GII 1	GII 2	GII 3
	Ovos inoculados na veia caudal	Ovos inoculados na cavidade peritoneal	Sem ovos	Ovos inoculados na veia caudal	Ovos inoculados na cavidade peritoneal	Sem ovos
Média de vermes recuperados do sistema porta e desvio padrão	26,8 ± 8,7	16,3 ± 4,0	16,0 ± 7,1	21,3 ± 5,7	19,1 ± 6,6	16,8 ± 7,0
(n) =	(9)	(8)	(10)	(11)	(10)	(4)

Média de vermes recuperados da cavidade peritoneal ± desvio padrão = GI 1 = 10,9 ± 4,1; GI 2 = 8,7 ± 2,6; GI 3 = 11,4 ± 4,8

n = número de animais em cada grupo

A análise de variância e o teste de Scheffé não detectaram diferença estatisticamente significativa entre as médias de recuperação de

vermes do sistema porta dos dois grupos estudados decorrente da infecção desafiado).

DISCUSSÃO

Os resultados das Tabelas I e II mostram que não foi possível induzir um estado de imunoproteção em camundongos contra infecção cercariana pela presença de vermes vivos na cavidade peritoneal, isto não ocorrendo nem mesmo por injeção simultânea de ovos viáveis, seja por via sanguínea ou cavidade peritoneal.

Tais resultados, em parte, reforçam os achados de DEAN et al.⁶, que verificaram que o grau de imunidade na esquistossomose estaria diretamente relacionado com o grau de imunopatologia desenvolvida no animal. Estes resultados foram posteriormente corroborados por WILSON et al.³³. Ainda neste sentido, a maioria dos experimentos conduzidos com vermes de um só sexo, portanto sem presença de ovos e, conseqüentemente, sem patologia apreciável, não resultaram na indução de imunoproteção ou, se resultaram, esta imunoproteção se manifestou de maneira pouco significativa^{3,5,8}. De acordo com GERKEN⁹, a imunidade por vermes unisexuados só se expressaria de maneira detectável após período superior a 33 semanas da primo infecção. Assim, na extensa revisão de DEAN⁶, verifica-se que alguns poucos autores conseguiram algum grau de proteção só com a presença de vermes unisexuados (machos ou fêmeas) e vermes irradiados inférteis. Por outro lado, alguns autores conseguiram imunoproteção inoculando somente ovos na veia caudal de camundongos normais⁵. Conforme estas últimas considerações, vermes ou ovos poderiam, em determinadas circunstâncias, induzir a um estado de imunoproteção, embora estes resultados não sejam corroborados pela maioria dos autores que trabalharam nesta linha. Pelo exposto, pode-se inferir que os mecanismos que regem imunidade adquirida na esquistossomose murina são ainda sujeitos a muita polêmica e, na literatura, são comumente detectados resultados conflitantes. Provavelmente, inúmeras variáveis tais como: linhagem dos camundongos, cepa do *S. mansoni*, via do inóculo da primo infecção, processo e tempo de imunização, idade e sexo dos animais, influíram nos resultados obtidos pelos diversos autores.

Portanto, nossas conclusões, fundamentadas em nossos resultados, obtidos com a cepa LE do *S. mansoni*, com as linhagens de camundongos estudadas e com a abordagem metodológica utilizada, nos permitem afirmar que, vermes vivos implantados na cavidade peritoneal de camundongos, mesmo com inoculação simultânea de ovos viáveis pela via circulatória ou peritoneal, não induzem a um estado de imunoproteção contra infecções desafio por cercárias.

SUMMARY

Schistosoma mansoni: implantation of worms into the peritoneal cavity aiming at the induction of immunoprotection

An attempt has been made to induce immunoprotection against cercarial infection through inoculation of live worms into the peritoneal cavity of mice. Although the worms were able to survive normally under these conditions, and no egg-laying could be detected, immunoprotection was obtained. Likewise, the inoculation of viable eggs, by circulatory and peritoneal routes, did not provide immunoprotection in mice with worms in the peritoneal cavity.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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: 121-132, 1978.
2. BICKLE, Q. D.; ANDREWS, B. J.; DOENHOFF, M. J.; FORD, M. J. & TAYLOR, M. G. — Resistance against *Schistosoma mansoni* induced by highly irradiated infections; studies on species specificity of immunization and attempts to transfer resistance. Parasitology, 90: 301-312, 1985.
3. BICKLE, Q. D.; BAIN, J.; MCGREGOR, A. & DOENHOFF, M. — Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. III — The failure of primary infections with cercariae of one sex to induce resistance to reinfection. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 73: 37-41, 1979.
4. COELHO, P. M. Z.; PELLEGRINO, J.; PEREIRA, L. H. & MELLO, R. T. — Migration of schistosomula (*Schistosoma mansoni*) collected from hamster and inoculated intraperitoneally in mice. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 70: 161, 1976.
5. DEAN, D. A. — A review of *Schistosoma* and related general: acquired resistance in mice. Exp. Parasit., 55: 1-104, 1983.

6. DEAN, D. A.; BUKOWSKI, M. A. & CHEEVER, A. W. — Relationship between acquired resistance, portal hypertension and lung granuloma in ten strains of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 30: 806-814, 1981a.
7. DEAN, D. A.; MANGOLD, B. L.; GEORGI, J. R. & JACOBSON, R. H. — Comparison of *Schistosoma mansoni* migration patterns in normal and irradiated cercaria-immunized mice by means of autoradiographic analysis; evidence that worm elimination occurs after the skin phase in immunized mice. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 33: 86-96, 1984.
8. DEAN, D. A.; MINARD, P.; STIREWALT, M. A.; VANNIER, W. E. & MURRELL, K. D. — Resistance of mice to secondary infection with *Schistosoma mansoni*. I. Comparison of bisexual and unisexual initial infections. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 27: 951-956, 1978a.
9. GERKEN, S. E. — *Schistosoma mansoni*: Resistência cutânea de camundongos normais e portadores de infecção primária. Belo Horizonte, 1986. (Tese de Doutorado — Dept.º de Parasitologia, ICB/UFMG).
10. GOES, A. M. — Estudos *in vivo* dos mecanismos de imunidade protetora dependente de anticorpos que atuam na morte de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* em ratos Holtzman. Belo Horizonte, 1984. (Tese de doutorado — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Minas Gerais).
11. HARRISON, R. A.; BICKLE, Q. & DOENHOFF, M. J. — Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Evidence that the mechanism which mediate resistance during early patent infections may lack immunological specificity. *Parasitology*, 84: 93-110, 1982.
12. HUNTER, G. W.; GRANDALL, R. E.; ZICKAFOOSE, D. E. & PURVIS, Q. B. — Studies on schistosomiasis. XVIII. Some factors affecting resistance to *Schistosoma mansoni* infections in albino mice. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 11: 17-24, 1962.
13. JAMES, S. L. & COLLEY, D. G. — A method for isolation of *Schistosoma mansoni* egg. *J. Parasit.*, 60: 1043-1044, 1974.
14. JAMES, S. L.; LUCAAS, S. B. & DOBINSON, A. R. — Pathology associated with vaccination against *Schistosoma mansoni* in mice using cryopreserved radiation-attenuated schistosomula. *J. Helminth.*, 59: 51-55, 1985.
15. LEWIS, F. A.; HIENY, S. & SHER, A. — Evidence against the existence of specific *Schistosoma mansoni* subpopulations which are resistant to irradiated vaccine-induced immunity. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 34: 86-91, 1985.
16. LONG, E.; DOENHOFF, M. & BAIN, J. — Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. 2. The time at which resistance to reinfection develops. *J. Helminth.*, 52: 87-191, 1978.
17. MANGOLD, B. L. & DEAN, D. A. — The migration and survival of gammairradiated *Schistosoma mansoni* larvae and the duration of host parasite contact in relation to induction of resistance in mice. *Parasitology*, 88: 249-266, 1984.
18. MASTIN, A. J.; BICKLE, Q. D. & WILSON, R. A. — *Schistosoma mansoni*: migration and attrition of irradiated and challenge schistosomula in the mouse. *Parasitology*, 87: 87-102, 1983.
19. MHLAREN, D. J.; PEARCE, E. J. & SMITHERS, S. R. — Site potential for challenge attrition in mice, rats, and guinea pigs vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Paras. Immunol.*, 7: 29-44, 1985.
20. MONGE, E.; COELHO, P. M. Z. & TAVARES, C. A. P. — Estudos imunológicos em hamsters (*Cricetus auratus*) infectados com *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 28: 239-245, 1986.
21. OLIVIER, L. & SCHNEIDMANN, M. — Acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection in laboratory animals. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 2: 289-306, 1953.
22. PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A. F. — Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev. bras. Mal.*, 8: 589-597, 1956.
23. PEREIRA, L. H.; COELHO, P. M. Z.; FONSECA, J. J. A.; BREDT, A. & PELLEGRINO, J. — Migration of *Schistosoma mansoni* larvae in the albino mouse. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 14: 306-309, 1972.
24. PEREIRA, L. H.; PELLEGRINO, J.; MELLO, R. T.; VALADARES, T. E. & COELHO, P. M. Z. — New approach for the screening of antischistosomal agents on early developing forms of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 16: 123-126, 1974.
25. PEREZ, H. A.; CLEGG, J. Q. & SMITHERS, S. R. — Acquired immunity to *Schistosoma mansoni* in the rat: measurement of immunity by the lung recovery technique. *Parasitology*, 69: 349-359, 1974.
26. SHER, A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; HIENY, S. & HUSSAIN, R. — Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. IV. Analysis of the role of immunoglobulins E antibodies and mast cells. *J. Immunol.*, 131: 1460-1465, 1983.
27. SHER, A.; HIENY, S. & JAMES, S. — Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae. VI. Influence of the major histocompatibility complex. *Paras. Immunol.*, 6: 319-328, 1984.
28. SIMPSON, A. J. G.; AMES, S. L. & SHER, A. — Identification of surface antigens of schistosomula of *Schistosoma mansoni* recognized by antibodies from mice immunized by chronic infection and by exposure to highly irradiated cercariae. *Infect. Immun.*, 41: 591-597, 1983.

29. SMITH, M. A. & CLEGG, J. A. — *Schistosoma mansoni*: decay of resistance induced by gamma irradiated cercariae in the mouse. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 8: 190-192, 1984.
30. SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. — Acquired resistance to experimental infection of *Schistosoma mansoni* in albino rat. *Parasitology*, 55: 611-717, 1965.
31. SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. — Resistance to experimental infection with *Schistosoma mansoni* in rhesus monkey induced by transfer of adult worms. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 61: 517-523, 1967.
32. SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. G. — *Statistical methods*. Iowa, Iowa State University Press, 1967.
33. WARREN, K. S. — The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 66: 417-434, 1972.
34. WILSON, R. A.; COULSON, P. S. & McHUGH, S. M. — A significant parte of "concomitant immunity" of mice to *Schistosoma mansoni* is the consequence of a leaky hepatic portal system, not immune killing. *Paras. immunol.* 5: 595-601, 1983.

Recebido para publicação em 9/3/1987.