

SCHISTOSOMA MANSONI: RESISTÊNCIA CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE INFECÇÃO PRIMÁRIA

Sílvia E. GERKEN (1) & Tomaz A. da MOTA-SANTOS (2)

RESUMO

No presente trabalho avaliou-se a resistência cutânea de camundongos ao *Schistosoma mansoni*, usando-se a orelha como sítio de infecção e de recuperação de esquistossômulos através da incubação de seus fragmentos em recipiente posto em contacto com Elac tamponado com Hepes.

Essa técnica mostrou-se eficiente na discriminação do número de esquistossômulos recuperados de camundongos normais e de camundongos previamente infectados (camundongos imunes), quando comparada à técnica de recuperação de parasitas através da digestão da pele em meio contendo collagenase. Através dessa técnica, verificou-se que camundongos imunes reduzem o parasitismo do primeiro ao sétimo dia após a reinfeção (42 a 46%). Essa resistência foi observada em portadores de infecção bissexuada (6.^a a 15.^a semanas) e unissexuada (33.^a e 34.^a semanas) e em linhagens isogênicas (C57 BL/10, CBA e F₁ do cruzamento CBA x DBA/2) e não isogênica (Swiss).

Revelando-se apropriadas ao estudo da resistência anti-esquistossomótica que se manifesta ao nível da pele, sugere-se que orelhas possam ser utilizadas como via de infecção em experimentos que visem analisar os fatores que participam da imunidade de camundongos ao *S. mansoni*.

UNITERMOS: *Schistosoma mansoni*; Resistência cutânea; Recuperação de esquistossômulos da pele.

INTRODUÇÃO

Animais de laboratório desenvolvem resistência ao *Schistosoma mansoni* que se traduz por uma redução no número de parasitas após reinfeção²⁰.

Essa resistência pode manifestar-se precocemente na pele de camundongos, 48 horas após a reinfeção^{10,12,18}. Recentemente, verificou-se que orelhas de camundongos são adequadas ao acesso das cercárias, à migração dos parasitas, como também apropriadas à recuperação dos esquistossômulos resultantes da infecção¹¹.

Utilizando essa metodologia, investiga-se neste trabalho a orelha como sítio de expressão da imunidade precoce de camundongos ao *S. mansoni*.

MATERIAL E MÉTODOS

Cercárias

Cercárias do *S. mansoni* (cepa LE, Belo Horizonte, MG, Brasil) foram obtidas de *Biomphalaria glabrata*, e concentradas¹⁶.

(1) Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

(2) Departamento de Bioquímica-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Endereço para correspondência: Profa. Sílvia Elizabeth Gerken, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, Caixa Postal 2486, CEP 30.161 Belo Horizonte, MG. — Brasil.

Camundongos

Foram utilizados camundongos machos, com 60 dias de idade no início dos experimentos, de linhagens isogênicas — C57 BL/10, CBA, F₁ do cruzamento CBA x DBA/2 — e não isogênica — Swiss, mantidos em nossa colônia. Usaram-se animais normais e infectados por meio de injeção sub-cutânea de 15-20 cercárias do *S. mansoni*.

Infecção dos camundongos

A exposição de orelhas de camundongos normais e portadores de infecção primária (animais imunes) a cercárias foi realizada segundo técnica descrita em detalhes por GERKEN et al.¹¹ e que, em resumo, consta do seguinte: camundongos previamente anestesiados eram presos a uma tábua de modo que uma de suas orelhas ficasse imersa numa suspensão com cerca de 250 cercárias. Decorridos 50 minutos de contacto com as cercárias, os camundongos eram removidos e transferidos para gaiolas, onde eram mantidos até o momento da recuperação dos parasitas.

Recuperação dos parasitas

As recuperações dos esquistossômulos das orelhas infectadas foram realizadas no período de um a sete dias de pós-infecção, de acordo com técnica descrita, em detalhes, anteriormente¹¹. Orelhas infectadas de camundongos mantidos sob anestesia eram removidas cirurgicamente e reduzidas a fragmentos de 300 micrômetros em máquina apropriada. Os fragmentos eram incubados a 37°C por quatro horas em solução salina de Earle contendo 0.5% de hidrolisado de lactoalbumina, uma unidade/ml de estreptomina e uma unidade/ml de penicilina (Elac) e tamponada com HEPES em pH 7.4. Após esse tempo, a solução de incubação era centrifugada. Em seguida, realizava-se a contagem dos esquistossômulos contidos no sedimento.

Em alguns experimentos, os esquistossômulos foram obtidos das orelhas segundo método de SMITHERS & GAMMAGE¹⁸: as orelhas retiradas dos animais anestesiados eram picotadas em frascos contendo meio para cultura de células (RPMI — 1640), previamente tamponado com HEPES e contendo 5% de soro fetal bovino, estreptomina, penicilina e 0,05% de co-

lagenase. Após incubação durante a noite em estufa de CO₂ mantida a 37°C, o líquido recolhido de cada frasco era centrifugado. Procedia-se, então, à contagem dos esquistossômulos do sedimento.

A imunidade adquirida era calculada através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ imunidade} = \frac{\text{MEC} - \text{MEI}}{\text{MEC}} \times 100$$

na qual MEC e MEI significam médias de parasitas recuperados dos grupos de camundongos normais e imunes, respectivamente.

Análise estatística

Para avaliar o grau de significância dos ensaios de imunidade adquirida ao nível da pele, empregou-se o teste "t" de Student.

RESULTADOS

Avaliou-se a expressão da imunidade em orelhas de camundongos expondo-se animais normais e portadores de infecção primária às cercárias e recuperando-se esquistossômulos da pele entre o 1.º e o 7.º dia após a infecção. Recupera-se menor número de parasitas da pele de camundongos imunes que da pele de camundongos normais submetidos à mesma carga parasitária. As diferenças entre os dois grupos (imunidade) variam de 42% a 46% (Figura 1).

A Tabela 1 mostra que apesar de o emprego de colagenase para a digestão da pele ter possibilitado maior recuperação de parasitas, os níveis de imunidade observados na pele digerida por essa enzima são semelhantes àqueles obtidos quando fragmentos foram incubados em contacto com Elac. Esses resultados demonstram a capacidade de discriminação do número de parasitas recuperados dos grupos de camundongos normais e imunes, por qualquer das duas técnicas.

A investigação quanto à resistência à reinfecção de camundongos em diferentes fases da infecção primária mostrou redução no número de esquistossômulos da pele, variando de 31 a 55%, no período de 6 a 15 semanas após exposição prévia ao *S. mansoni* (Tabela 2).

Na Tabela 3 verifica-se imunidade cutânea em camundongos de linhagens isogênicas e não isogênica.

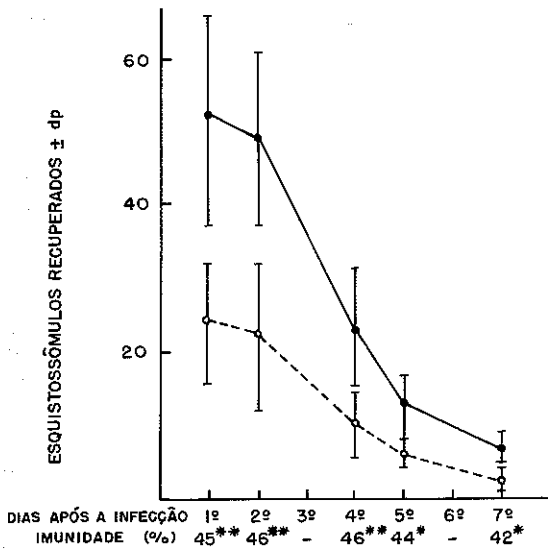


Fig. 1 — Recuperação de *Schistosoma mansoni* da pele de orelhas de camundongos normais e com infecção crônica. Orelhas de camundongos normais (●—●) e com 12 semanas após infecção primária com *S. mansoni* (●....●) foram expostas a 250 ± 18 cercárias por 50 minutos. Nos dias seguintes elas foram coletadas e seus fragmentos incubados em Elac a fim de se recuperarem os esquistossômulos (n = 7 a 9).

*p < 0,05 **p < 0,01

Os dados contidos na Tabela 4 revelam redução significativa do número de parasitas recuperados de orelhas de camundongos portadores de infecção primária por cercárias de um só sexo, em dois dos seis experimentos executados.

DISCUSSÃO

A análise dos eventos que ocorrem na pele nas primeiras horas após a infecção se torna essencial para o entendimento da imunidade ao *S. mansoni*, desde que a resistência ao parasita pode se expressar nesse local^{10,12,18}.

Com a finalidade de desenvolver um modelo experimental para o estudo da imunidade anti-esquistossomótica, a pele das orelhas de camundongos foi investigada como via de acesso ao parasita e como local de recuperação dos esquistossômulos por meio da incubação de seus fragmentos em contacto com salina¹¹.

No trabalho presente, o emprego dessa técnica permitiu verificar redução significativa do parasitismo em camundongos portadores de infecção crônica quando expostos a cercárias do *S. mansoni* (Figura 1, Tabelas I, II e III).

TABELA I

Obtenção de esquistossômulos da pele de orelhas de camundongos normais e com infecção crônica após digestão enzimática ou incubação em Elac

Experimentos	Fragmentos das orelhas incubadas em:					
	Colagenase			Elac		
	Camundongos Normais	Camundongos Infectados	% de redução	Camundongos Normais	Camundongos Infectados	% de redução
1	34 ± 14	18 ± 09	47*	22 ± 07	13 ± 07(+)	41*
2	80 ± 16	38 ± 18	52*	33 ± 08	14 ± 08	58**

(a) média ± dp

Orelhas de camundongos normais ou portadores de infecção crônica (12 semanas após infecção primária) foram expostas a 250 ± 20 cercárias por 50 minutos. Dois dias após, os esquistossômulos foram recuperados de fragmentos de orelhas submetidos à digestão enzimática (colagenase) por 16 horas ou incubados (em Elac) por 4 horas (n = 7 a 10)

* p < 0,05; ** p < 0,01

Morte de esquistossômulos na pele já havia sido sugerida por GHANDOUR & WEBBE¹³ e GLEGG & SMITHERS³, quando constataram, pela prova de exclusão do corante, morte de cerca de 30% dos esquistossômulos poucos minutos após sua penetração na pele de camundongos normais, e comprovada por SMITHERS & GAMMAGE¹⁸ e SMITHERS & MILLER¹⁹ ao observarem que grande parte das cercárias que penetravam em camundongos normais não era

recuperada da pele digerida por colagenase, dois dias após a infecção. Utilizando a metodologia de recuperação de esquistossômulos que migram de fragmentos de tecidos para um meio salino, GERKEN et al.¹¹ evidenciaram também que um grande número de parasitas que penetraram não era recuperado de orelhas de camundongos normais. Nos camundongos esquistossomóticos há um acréscimo dessa eliminação inicial ("não específica"), que se deve aos

T A B E L A II

Recuperação de *Schistosoma mansoni* da pele de orelhas de camundongos esquistossomóticos em diferentes fases da infecção primária

Semanas após infecção	Esquistossômulos recuperados		% de imunidade
	Camundongos normais	Camundongos infectados	
4	48 ± 12	46 ± 14 (*)	—
6	69 ± 25	32 ± 22	54*
8	54 ± 13	28 ± 07	48**
9	42 ± 15	20 ± 16	52**
10	43 ± 06	27 ± 04	37**
12	47 ± 10	21 ± 09	55**
13	44 ± 12	26 ± 11	41**
14	32 ± 07	17 ± 11	47*
15	32 ± 07	22 ± 08	31*

(a) média ± dp

No segundo dia após a infecção, orelhas de camundongos normais ou com infecção crônica foram coletadas a fim de se recuperarem os esquistossômulos por incubação de seus fragmentos em Elac. (n = 7 a 9).

* p < 0,05; ** p < 0,01

T A B E L A III

Recuperação de esquistossômulos da pele de orelhas de camundongos de linhagens isogênicas (CBA e F₁ — CBA x DBA/2) e não isogênica (Swiss) normais e com infecção crônica

Linhagem dos camundongos	Semanas após a infecção primária	Esquistossômulos recuperados		% de imunidade
		Normais	Infectados	
CBA	8	47 ± 06	27 ± 08 (*)	43**
	12	98 ± 20	47 ± 14	52**
F ₁	8	96 ± 14	54 ± 15	45**
	14	92 ± 13	54 ± 20	42**
Swiss	8	87 ± 17	59 ± 13	32**
	14	63 ± 15	41 ± 12	35*

(a) média ± dp

Orelhas de camundongos normais ou com infecção crônica foram expostas a cercárias.

No segundo dia após, os esquistossômulos foram recuperados de fragmentos de orelhas incubadas em Elac (n = 7 a 10).

* p < 0,05; ** p < 0,01

T A B E L A IV

Recuperação de esquistossômulos da pele de orelhas de camundongos normais e portadores de infecção esquistossômica primária com cercárias de um só sexo

Número do experimento	Infecção primária		Esquistossômulos recuperados		% de imunidade
	Semanas após	Sexo das cercárias (n.º)	Normais	Infectados	
1	14	♂ (15 ± 05)	36 ± 23	37 ± 09 (*)	—
2	26	♂ (12 ± 04)	40 ± 10	36 ± 11	10
3	13	♂ (12 ± 03)	54 ± 15	40 ± 12	26
	33	♂ (15 ± 06)	49 ± 11	22 ± 10	55**
4	33	♀ (13 ± 07)	45 ± 10	38 ± 11	16
5	34	♂ (15 ± 05)	82 ± 21	31 ± 13	62**

(a) média ± dp

Orelhas de camundongos normais ou infectados com cercárias de um só sexo foram expostas a cercárias.

No segundo dia após, os esquistossômulos foram recuperados de fragmentos de orelhas incubados em Elac (n = 7 a 9).

** p < 0,001

efeitos da infecção primária (Figura 1, Tabela II). Esses achados estão de acordo com SMITHERS & GAMMAGE¹⁸ que observaram menor parasitismo em camundongos com infec-

ção primária crônica que em animais normais, após recuperarem esquistossômulos da pele tratada com collagenase.

A esses achados se contrapõem os resultados obtidos por DEAN & MANGOLD⁶, quando auto-radiografaram órgãos de camundongos imunes submetidos a reinfeção com cercárias marcadas com ⁷⁵Se. Julgaram esses autores que haveria pouca ou nenhuma eliminação de esquistossômulos na pele de camundongos imunes. A técnica utilizada por esses autores não discrimina entre os focos originados de esquistossômulos mortos ou vivos. Parasitas mortos radioativos ou seus fragmentos radioativos podem impressionar o filme de auto-radiografia do mesmo modo como parasitas vivos radioativos encontrados no tecido infectado. Observaram no sexto dia igual número de focos nos pulmões de camundongos imunes e normais. Contudo, não recuperaram nesse sítio número de esquistossômulos equivalentes ao de focos. Esses resultados nos fazem pensar que nem todos os focos radioativos pela leitura auto-radiográfica são indicadores de parasitas vivos nos tecidos. Além disso, a semelhança quanto aos números de parasitas obtidos dos pulmões e do sistema porta, tanto em camundongos normais como também nos imunes, indica que a redução do número de esquistossômulos nos pulmões não é um artifício de técnica. Parece, portanto, que no sexto dia, parte dos parasitas em camundongos imunes já não é recuperada por perfusão dos pulmões e poderia ter sido eliminada em período pré-pulmonar, mais próximo da reinfeção.

Comparado à técnica descrita em 1980 por SMITHERS & GAMMAGE¹⁸, o método utilizado neste trabalho mostrou-se similarmente eficiente em discriminar diferenças no número de parasitas recuperados de camundongos normais e imunes (Tabela I).

Imunidade cutânea em camundongos esquistossomóticos foi observada, inicialmente, na 6.^a semana após a infecção primária e se manteve até os experimentos realizados na 15.^a semana (Tabela II). De maneira geral, esses animais desenvolvem resistência máxima em seis a oito semanas e a conservam por mais de um ano após exposição às formas infectantes⁵.

O aparecimento da imunidade cutânea em camundongos com infecção bissexuada (Tabela II) coincidiu com a fase na qual as fêmeas adultas iniciam a postura de ovos². Entretanto,

animais com infecção unissexuada apresentam frequentemente graus de imunidade inferiores aos observados naqueles com infecções bissexuadas^{1,8,14,15}. A retenção de ovos, principalmente ao nível do intestino, e os antígenos por eles liberados poderiam estar exercendo efeito potenciador ("adjuvante") de mecanismos que já se encontrariam previamente ativados nos hospedeiros por cercárias, esquistossômulos e/ou vermes. Entretanto, nas infecções unissexuadas, níveis significativos de imunidade foram observados em camundongos apenas quando o período entre a infecção primária e a reinfeção foi igual ou superior a 33 semanas (Tabela IV). Esses resultados sugerem que a sensibilização provocada por cercárias, esquistossômulos e vermes parece não ser suficientemente intensa para provocar níveis elevados de imunidade cutânea e que o aparecimento de resistência na pele seria antecipado pela postura de ovos pelas fêmeas.

Nas infecções bissexuadas não se tornaram aparentes grandes diferenças na imunidade cutânea que pudessem ser atribuídas às linhagens de camundongos empregadas (Tabela III). Contudo, são controversas as experiências com esse enfoque^{4,7,15,17}.

Os resultados desse trabalho mostram que o emprego da pele das orelhas de camundongos possibilita que se discriminem diferenças no número de esquistossômulos devidas a resistência à reinfeção. Além disso, a escolha desse sítio apresenta facilidades quanto à infecção animal e à remoção cirúrgica do tecido a ser incubado¹¹ e dispensa a depilação mecânica que pode afetar componentes da epiderme envolvidos na penetração das cercárias⁹.

Do exposto, sugere-se que a pele das orelhas pode ser usada como via de infecção em experimentos que visem analisar os fatores que participam da imunidade de camundongos ao *S. mansoni*.

SUMMARY

Schistosoma mansoni: cutaneous resistance in mice with primary infection

Evaluation of the cutaneous resistance of mice to *Schistosoma mansoni* was performed using the pinna of the ear as the site of infec-

tion and recovery of schistosomules by incubating the ear fragments in HEPES-buffered. Elac medium.

This method was found to be effective for counts of recovered schistosomules in normal and previously infected (immune) mice when compared with the technique of skin digestion in a collagenase containing medium.

A decrease of 42% to 46% of the parasitism was shown to occur in immune mice from days 1 to 7. This resistance was observed in mice with bisexual (6-15 weeks) and unisexual (33-34 weeks) infections, as well as in inbred (C57 BL/10, CBA and F₁ from CBA x CBA2 crossing) and outbred Swiss animals.

Since the pinna of the ear proved to be very useful in the study of antischistosomal resistance in mice, at skin level, it is suggested that it should be utilized as standard infection route to study the factors affecting the immunity to *S. mansoni* in mice.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a José de Souza Filho, Aparecida de Fátima Soares de Oliveira, Rita de Cássia Soares França e Maria Ester Soares de Oliveira pela assistência técnica. Somos gratos ao Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE) pelo fornecimento das cercárias utilizadas neste trabalho. Esta pesquisa contou com o auxílio financeiro do CNPq-PIDE V (40.3809/82 — 40.3806/82) e FINEP (n° 433).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BICKLE, Q.; BAIN, J.; MC GREGOR, 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.
2. BRENER, Z. — Observações sobre a infecção do camundongo pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. bras. Malariol.*, 8: 565-575, 1956.
3. CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. — Death of schistosome cercariae during penetration of the skin. II. Penetration of mammalian skin by *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 58: 111-128, 1968.
4. COLLEY, D. G. & FREEMAN, G. L. — Differences in adult *Schistosoma mansoni* worm burden requirements for the establishment of resistance to reinfection in inbred mice. I. CBA/J and C57 BL/6 mice. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 29: 1279-1285, 1980.
5. DEAN, D. A. — A review of *Schistosoma* and related genera: acquired resistance in mice. *Exp. Parasit.*, 55: 1-104, 1983.
6. DEAN, D. A. & MANGOLD, B. L. — Autoradiograph analysis of resistance to reinfection with *Schistosoma mansoni* in mice. Evidence that the liver is a major site of worm elimination. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 33: 97-103, 1984.
7. DEAN, D. A.; BUKOWSKI, M. A. & CHEEVER, A. W. — Relationship between acquired resistance, portal hypertension and lung granulomas in ten strains of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 30: 806-814, 1981.
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, 1978.
9. FUKUYAMA, K.; TZENG, S.; McKERROW, J. & EPSTEIN, W. L. — The epidermal barrier to *Schistosoma mansoni* infection. *Curr. Probl. Derm.*, 11: 185-193, 1983.
10. GERKEN, S. E.; CORREA-OLIVEIRA, R. & MOTA-SANTOS, T. A. — Local de morte do *Schistosoma mansoni* no camundongo. *Ciênc. e Cult.*, 32: 617, 1980.
11. GERKEN, S. E.; OLIVEIRA, A. F. S.; CORREA-OLIVEIRA, R. & MOTA-SANTOS, T. A. — *Schistosoma mansoni*: infecção experimental de camundongos através da orelha e quantificação do parasitismo na pele. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 28: 381-388, 1986.
12. GERKEN, S. E.; MOTA-SANTOS, T. A.; VAZ, N. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; DIAS DA SILVA, W. & GAZZINELLI, G. — Recovery of schistosomula of *Schistosoma mansoni* from mouse skin; involvement of mast cells and vasoactive amines. *Braz. J. med. Biol. Res.*, 17: 301-307, 1984.
13. 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 cercariae and of the host. *Int. J. Parasit.*, 3: 784-794, 1973.
14. HARRISON, R. A.; BRICKLE, Q. & DOENHOFF, M. J. — Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Evidence that the mechanisms which mediate resistance during early patent infections may lack immunological specificity. *Parasitology*, 84: 93-110, 1982.
15. OLIVIER, L. & SCHNEIDERMAN, M. — Acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection in laboratory animals. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 2: 289-306, 1953.
16. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. — A simplified method for the concentration of cercariae. *J. Parasit.*, 41: 329-333, 1955.

17. SMITH, M. A. & CLEGG, J. A. — Different levels of immunity to *Schistosoma mansoni* in the mouse: the role of variant cercariae. *Parasitology*, 80: 479-486, 1979.
18. SMITHERS, S. R. & GAMMAGE, K. — Recovery of *Schistosoma mansoni* from the skin, lungs and hepatic portal system of naive mice and mice previously exposed to *S. mansoni*: evidence for two phases of parasite attrition in immune mice. *Parasitology*, 89: 289-300, 1980.
19. SMITHERS, S. R. & MILLER, K. L. — Protective immunity in murine schistosomiasis mansoni: evidence for two distinct mechanisms. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 29: 832-841, 1980.
20. WORLD HEALTH ORGANIZATION — Immunology of schistosomiasis. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 51: 553-595, 1974.

Recebido para publicação em 10/11/86.