

ESTUDOS SOBRE UM ANTÍGENO POLISSACÁRIDE DO *SCHISTOSOMA MANSONI*

ZILTON A. ANDRADE*
MOYSÉS SADIGURSKY*

Através da técnica de imunofluorescência foi demonstrada a presença de um antígeno polissacáride nas estruturas relacionadas com o tubo digestivo do S. mansoni, seja em cercárias, esquistossômulos ou vermes adultos.

Em soros de pacientes com esquistossomose hepato-esplênica, apenas na fração IgM apareceram anticorpos que revelaram um padrão semelhante de fluorescência.

O antígeno polissacáride, que já foi identificado como um antígeno circulante em esquistossomóticos, parece ter grande significado na imunologia e imunopatologia da esquistossomose e este assunto é discutido face aos achados da presente investigação.

Embora se saiba que o *Schistosoma mansoni*, suas formas evolutivas e seus produtos contêm uma complexa e variada gama de substâncias protéicas e polissacárides, somáticas e metabólicas, pelo menos potencialmente antigênicas, este conhecimento pouco tem ajudado a esclarecer a imunopatologia da esquistossomose, os mecanismos de resistência, ou fornecido meios para se quantificar a infecção. Um problema que tem limitado as perspectivas de tais conhecimentos é representado pela dificuldade em se obter antígenos purificados. Um dos poucos antígenos purificados até agora obtido é representado por um polissacáride de alto peso molecular (100.000 Daltons) que está localizado no tubo digestivo do verme e é por ele eliminado na circulação do hospedeiro. Este antígeno foi inicialmente detectado no soro de animais infectados com altas cargas do *S. mansoni* (Bawden & Weller, 1974) e foi depois isolado por Nash et al, 1974, a partir de extratos de vermes adultos. Este antígeno, comumente designado de "antígeno circulante esquistossomótico" (ACE) é na realidade um hapteno, mas quando conjugado à albumina bovina metilada torna-se imunogênico para coelhos (Nash, 1974). Com o auxílio da técnica de imunofluorescência e de um anti-soro (anti-ACE) produzido em coelhos foi possível se demonstrar a presença do antígeno polissacáride localizado no revestimento epitelial do tubo digestivo do verme adulto (Lichtenberg, Bawden & Shealey, 1974 e Nash, 1974), no seu "vômito" (Lichtenberg, Bawden & Shealey, 1974), bem como seqüestrado no interior das células de Kupffer do hospedeiro (Van Marck, 1975) e na urina dos portadores de esquistossomose (Bawden & Weller, 1974).

*Faculdade de Medicina da UFBa, Salvador, Bahia.

Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Recebido para publicação em 14 de junho de 1977.

Como o ACE pode ser isolado em estado puro ou quase puro e a sua importância potencial na imunopatologia da esquistossomose parece evidente, resolvemos investigar algumas características relacionadas com o mesmo: a presença e localização nos vários estádios evolutivos do *S. mansoni* de antígenos com determinantes comuns para o ACE; a presença de anticorpos nas várias classes de imunoglobulinas no soro de pacientes humanos e que mostram especificidade para os mesmos locais onde os determinantes antigênicos do ACE são encontrados nas estruturas parasitárias.

MATERIAL E MÉTODOS

Os elementos parasitários pesquisados estavam representados por cercárias, esquistossômulos logo após penetração na pele de camundongos, esquistossômulos isolados do pulmão de camundongos 5 dias após exposição cercariana, vermes adultos e ovos do *S. mansoni*. Para o emprego da técnica de imunofluorescência as cercárias e esquistossômulos de 5 dias foram colocados em lâminas, secados rapidamente e fixados em acetona desidratada gelada. Os fragmentos de pele e fígado de camundongos foram retirados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196°C), seccionados em criostato (-20°C) e os cortes de 5 micra de espessura foram fixados em acetona desidratada gelada. Paralelamente foi usado o mesmo tipo de material, mas após fixação em líquido de Bouin e inclusão em parafina, de acordo com a técnica de Sainte-Marie, 1961. As cercárias foram obtidas de caramujos naturalmente infectados e por eliminação espontânea.

Os esquistossômulos penetrantes foram obtidos após a aplicação de uma grande quantidade de cercárias sobre a pele previamente epilada do abdômen do camundongo. Após intervalos de 10 a 20 minutos, foram retirados fragmentos da pele, os quais foram distendidos em papelão e fixados ou congelados. Os esquistossômulos pulmonares foram obtidos de camundongos infectados com 500 cercárias. Cinco dias após a exposição cercariana os camundongos foram sacrificados, removidos os pulmões e os esquistossômulos isolados de acordo com a técnica descrita por Perez et al, 1974.

Os vermes adultos e ovos estavam contidos em fígados de camundongos infectados experimentalmente.

A localização dos determinantes antigênicos para ACE foi realizada através da técnica de imunofluorescência indireta, usando-se um anti-soro específico anti-ACE obtido em coelhos seguido de um soro antiglobulina de coelho conjugado com fluoresceína. O antígeno polissacáride foi isolado a partir de extratos de vermes adultos. A técnica para isolamento e para a imunização de coelhos foi feita de acordo com Nash et al, 1974. O soro fluoresceinado foi obtido comercialmente (Hyland Laboratories, Los Angeles, Califórnia, EUA).

As preparações em lâminas contendo as estruturas parasitárias foram inicialmente lavadas em solução salina tamponada (pH 7,2), em seguida tratada por 30 minutos com soro anti-ACE, lavada 3 vezes em solução salina tamponada e colocadas em contato por 30 minutos com o soro antiglobulina fluoresceinado diluído em salina com 1 : 10.000 de azul de Evans e depois lavadas novamente. As preparações foram montadas em glicerol tamponado e examinadas dentro de 24 horas com um microscópio Zeiss de fluorescência, equipado com uma lâmpada halogenada de 100 watts, filtros apropriados para o isotiocinato de fluoresceína e filtro protetor BG-52. Como controles foram examinadas ao mesmo tempo secções tratadas com soro normal de coelhos ou com soro de coelhos que receberam injeções de albumina bovina metilada, seguido do soro antiglobulina fluoresceinado. Também foram examinadas secções tratadas apenas com salina tamponada, seguida ou não de tratamento com o anti-soro fluoresceinado.

Para o estudo de possíveis anticorpos anti-ACE presentes em soros de pacientes humanos se recorreu a um "pool" de soros obtidos de 8 pacientes com esquistossomose hepato-esplênica comprovada.

As lâminas contendo cercárias, esquistossômulos, vermes adultos e ovos foram incubadas com os soros humanos em diluição de 1:2, 1:4 e 1:8 e em seguida lavadas e tratadas com soro antiglobulina humana produzido em coelhos e conjugado à fluoresceína (Hyland Laboratories). Estes soros eram específicos anti-IgG, IgM, IgE e IgA. Antes do seu uso cada anti-soro foi testado através de imuno-eletroforese contra soro humano total e cada vez forneceu apenas uma linha de precipitação. Foram, também, diluídos em salina com Azul de Evans, sendo que estas diluições variavam conforme as necessidades de 1:8 até 1:80. Secções representativas foram também coradas pela hematoxilina-eosina e pelo método do ácido-periódico de Schiff (PAS) antes e após a digestão pela diástase salivar para realização de estudo morfológico.

RESULTADOS

Os determinantes antigênicos para ACE foram detectados apenas nas estruturas relacionadas com o tubo digestivo nos estádios evolutivos do *S. mansoni*. Na região cefálica das cercárias os determinantes antigênicos para ACE apareceram numa estrutura (Fig. 1) identificada como o esôfago primordial, fino e alongado, e numa pequena bifur-



Fig. 1. O primórdio do esôfago e da bifurcação cecal aparecem fluorescentes no interior da porção cefálica da cercária. Anticorpo anti-ACE seguido de antiglobulina fluoresceïnada de coelho. 300x. Ampliada à esquerda.

cação terminal, provavelmente o primórdio do cécum. Um aspecto semelhante foi observado no esquistossômulo de 5 dias (Fig. 2) onde o esôfago já se alongou ainda mais e a bifurcação cecal já se torna bem evidente. No esquistossômulo que recém-penetrou na pele, as secções transversais ao mesmo mostram um ponto de fluorescência brilhante e específica que pode ser também identificada como esôfago primitivo (Fig. 3). Nos vermes adultos, machos e fêmeas, o revestimento epitelial intestinal, que é também PAS-positivo, exibe uma intensa fluorescência verde-maçã específica para determinantes do ACE. Todavia não foi possível detectar qualquer grau de fluorescência específica nos ovos de *S. mansoni*, em qualquer dos seus estádios de maturação. As preparações controles referidas acima forneceram sempre resultados negativos.

As preparações tratadas com soro humano e antiglobulinas fluoresceinadas mostraram padrões de fluorescência variadas tanto para os estádios evolutivos do *S. mansoni*, como e sobretudo em relação à classe de imunoglobulina (IgG, IgM, IgE e IgA) pesquisada. Os anticorpos contidos na fração IgM apresentaram o mesmo padrão de fluorescência com as estruturas parasitárias que o anti-soro para ACE (Fig. 4). A intensidade da fluorescência foi fraca para as cercárias e esquistossômulos, mas bem intensa e seletiva para vermes adultos, quando todo o revestimento epitelial do tubo digestivo se destacava com fluorescência específica. Todavia, anticorpos presentes na fração IgM também se fixavam nos ovos maduros do *S. mansoni*, em contraste com os anticorpos anti-ACE.

Os anticorpos presentes na fração IgG se fixam difusamente em toda a estrutura dos vermes adultos, mas curiosamente deixam negativo o revestimento epitelial do tubo digestivo (Fig. 5). Os ovos (Fig. 6) aparecem fortemente fluorescentes tanto no interior da casca, como na franja peri-ovular, a qual exibe uma estrutura hialina eosinófila nas preparações coradas pelo H. E. Nas preparações examinadas, apenas aquelas tratadas com anti-soro anti-IgG revelaram a franja peri-ovular fluorescente. As cercárias e esquistossômulos exibiram fluorescência predominante ao nível do tegumento ou cutícula. Tal aconteceu também nas preparações de verme adulto tratadas com anti-IgE. Esta fração mostrou também intensa fluorescência ovular.

As preparações tratadas com anti-IgA não mostraram fluorescência específica, tendo sido todas negativas.

Um sumário dos achados relacionados com a presença de anticorpos humanos nas suas respectivas frações Ig e suas ligações com estruturas do *S. mansoni* aparece na Tabela I.

TABELA I

Anticorpos Presentes no Soro de Pacientes com Esquistossomose Hepato-Esplênica e seu Padrão de Reação com Estruturas do *S. Mansoni*, segundo o Emprego da Imunofluorescência

Classe de Ig	Cercária	Esquistossômulo na Pele	Esquistossômulo no Pulmão	Verme Adulto	Ovos
Ig	Tegumento	Difuso	Difuso	Difuso Exceto Revestimento Intestinal	Miracídio e Franja Peri-ovular
IgM	Tegumento	Tubo Digestivo	Tubo Digestivo	Intestino	Miracídio
IgE	Negativo	Negativo	Tegumento	Negativo	Miracídio
IgA	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

COMENTÁRIOS

É interessante que os determinantes antigênicos do ACE tenham sido encontrados apenas em estruturas do tubo digestivo do *S. mansoni*, identificáveis desde a fase de

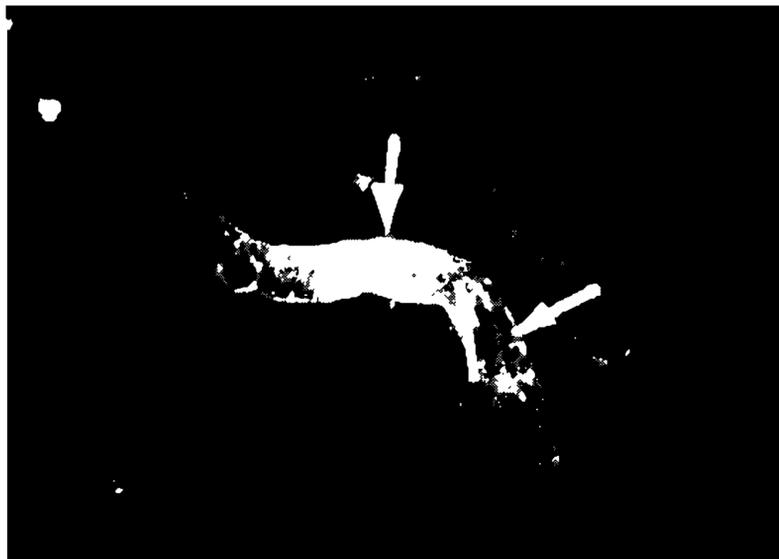


Fig. 2. Esquistossômulo isolado do pulmão de camundongo 5 dias após exposição cercariana. Os anticorpos fluorescentes (anti-ACE) revelam o esôfago e a bifurcação cecal (setas) 150x.

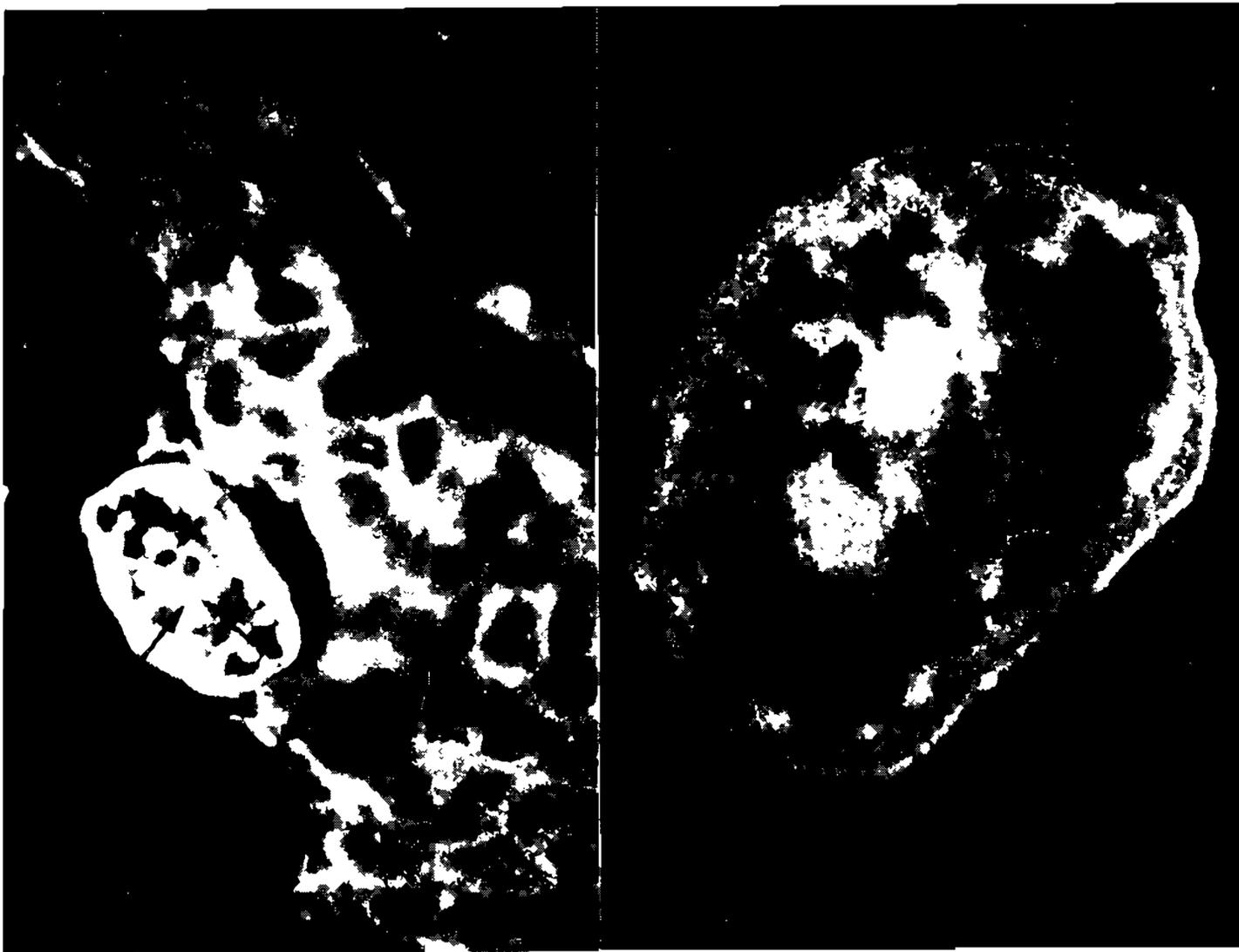


Fig. 3. Secção da pele de camundongo mostrando esquistossômulo penetrando na camada córnea da epiderme. O ponto fluorescente central (seta) representa um corte transversal do esôfago primitivo. Anti-ACE seguido de antiglobulina fluoresceïnada de coelho. 300x. Ampliado à esquerda.

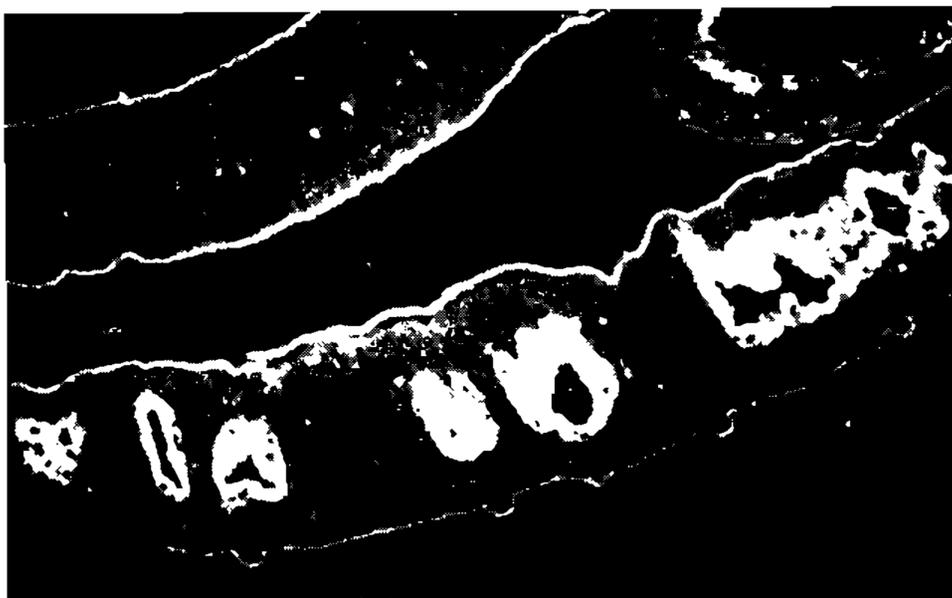


Fig. 4. Anticorpos IgM presentes no soro de pacientes com esquistossomose se fixam no revestimento interno do tubo digestivo do *S. mansoni*. Reação de imunofluorescência indireta. 100x.



Fig. 5. Fluorescência difusa produzida numa secção de *S. mansoni* por anticorpos IgG presentes no soro de esquistossomóticos. Notar ausência de fluorescência na camada mais interna (revestimento epitelial) do tubo digestivo. Reação de fluorescência indireta. 200x.



Fig. 6. Secção de um ovo maduro do *S. mansoni* no interior do fígado de camundongo. Os anticorpos IgG do soro humano se fixam no miocárdio e na franja peri-ovular. Reação de imunofluorescência indireta. 150x.

cercária. A este respeito devemos lembrar que o ACE foi detectado na circulação de "hamsters" já 18 dias após a exposição cercariana (Bawden & Weller, 1974), o que indica que o parasita ainda em estádios imaturos é capaz de produzir o antígeno. É possível que com técnicas mais sensíveis se possa identificar o ACE ainda em fases mais recentes da infecção. Uma vez que o antígeno é liberado pelos vermes adultos e não pelos ovos é também possível que a medida da sua concentração no soro surja como um índice adequado para se avaliar a carga parasitária.

Na presente investigação, os anticorpos IgM presentes no soro de portadores de esquistossomose hepato-esplênica mostraram o mesmo padrão de distribuição de fluorescência no *S. mansoni* que os anticorpos produzidos contra o ACE. Recentemente se observou (Helden et al, 1975) que os soros obtidos de indivíduos humanos com infecção esquistossomótica recente produzem uma imunofluorescência "focal" ao longo do tubo intestinal em secções do esquistossoma adulto. Este padrão "focal" de fluorescência foi mais prevalente nos grupos mais jovens, mas depois gradualmente mudou para um padrão de fluorescência difusa com o progredir da idade e presumivelmente com infecções mais crônicas. Estes dados são compatíveis com a suposição de que inicialmente na infecção esquistossomótica se formam anticorpos IgM (que são aqueles da imunização inicial) contra o ACE e que mais tarde surgem anticorpos IgG contra vários determinantes e que condicionam um padrão difuso de fluorescência no *S. mansoni*.

Outro aspecto de interesse a respeito do ACE decorre de alguns indícios que sugerem estar o mesmo envolvido na patogenia da glomerulopatia esquistossomótica. Um antígeno que circula e que aparece na urina de animais e pessoas infectadas pelo *S. mansoni*, os quais formam anticorpos específicos contra o mesmo, tem o potencial necessário para produzir lesão renal. O ACE é identificado na circulação ou na urina em casos de infecções maciças (Bawden & Weller, 1974) e aparece seqüestrado nas células de Kupffer do hospedeiro (Van Marck, 1975). Estes dados podem fornecer uma explicação para o aparecimento de lesões renais apenas em portadores de esquistossomose hepato-esplênica, com hipertensão porta e circulação colateral o que poderia desviar o ACE do filtro sinusoidal hepático (Andrade et al, 1971) para a circulação sistêmica. Por outro lado, em eluatos obtidos de rins humanos com glomerulopatia esquistossomótica foram identificados anticorpos que na imunofluorescência se fixavam no revestimento epitelial do tubo digestivo do *S. mansoni* (Hoshino-Shimuziro et al, 1975 e Moriearty & Brito, 1977). Todavia, devemos levar em conta de que há pelo menos mais um antígeno polissacáride circulante e que também parece ter sua origem no tubo digestivo do *S. mansoni* (Deeler et al, 1976). Este antígeno é de baixo peso molecular (30.000 Daltons) e, ao contrário do ACE que é anódico, ele é catódico. Assim sendo, é possível que este segundo antígeno polissacáride seja o mesmo, ou esteja relacionado com o antígeno "M" encontrado por Carlier et al, 1975 na urina de portadores de esquistossomose. Estes autores encontraram uma correlação direta entre a presença do antígeno "M" urinário e os níveis totais de IgE. Neste particular é de interesse notar que os anticorpos presentes na fração IgE dos soros humanos não mostraram fixação com estruturas do tubo digestivo do *S. mansoni* nas condições técnicas descritas neste trabalho. Isto sugere ausência de reação cruzada entre "M" e ACE, falta de relação entre IgE e o antígeno "M", ou uma origem diferente para o antígeno "M" e o segundo antígeno polissacáride acima referido, embora as principais características já conhecidas desses antígenos sejam semelhantes.

Resta saber se o ACE teria algum papel na indicação da resistência. Pelo que se presume, após a extrapolação de dados experimentais, a resistência no homem seria induzida pela presença de vermes adultos que liberariam antígeno ou antígenos, os quais condicionariam uma reação imunológica fundamentalmente humoral dirigida contra os esquistossômulos. Dentro desta perspectiva o ACE mereceria ser investigado. Em trabalhos realizados *in vitro* em nosso laboratório não conseguimos demonstrar ação letal do soro de coelhos anti-ACE contra os esquistossômulos obtidos do pulmão de camundongos. Resta verificar se esta ação existiria contra esquistossômulos ainda mais jovens, obtidos logo após a penetração, que parecem mais vulneráveis à agressão imunológica (Capron

et al, 1974 e Murrel et al, 1975). Todavia não foi ainda demonstrado que os anticorpos anti-ACE estão de qualquer maneira relacionados com aqueles anticorpos que lesam os esquistossômulos *in vitro*, seja agindo isoladamente (Clegg & Smithers, 1972 e McLaren et al, 1975) ou em colaboração com células do hospedeiro (Butterworth et al, 1977 e Capron et al, 1974). De qualquer maneira, pelo menos alguns destes efeitos letais *in vitro* não parecem apresentar correlação com a imunidade *in vivo* (Murrel, 1975 e Sher et al, 1974). Assim sendo, a possibilidade de um efeito protetor dos anticorpos anti-ACE merece ser ainda bem investigada, uma vez que a secreção e excreção de ACE pelos parasitas adultos e a presença de determinantes antigênicos para ACE no esquistossômulo estaria de acordo com a hipótese de que a imunidade à reinfeção seja estimulada pelo verme adulto e orientada contra o esquistossômulo (Smithers & Terry, 1967).

SUMMARY

Antigens sharing determinants with a circulating schistosomal antigen (CSA) haven been demonstrated in the digestive tract of cercariae, skin penetrating and 5-day schistosomula and adult worms, but not in the eggs of *Schistosoma mansoni*, by using indirect fluorescence and anti-CSA prepared in rabbits.

IgM antibodies in the serum of patients with hepatosplenic schistosomiasis showed a similar pattern of fluorescence as anti-CSA antibodies, but also bound to mature eggs. IgG antibodies gave a diffuse staining of parasitic structures and IgE antibodies attached to eggs and schistosomulum tegument. IgA antibodies against *S. mansoni* were not detected in the sera of infected patients.

These findings may explain the appearance of CSA before the development of adult worms in experimental infections, and also the presence of antibodies that bind to worm intestinal structures in sera from early human infections.

The potential significance of CSA antibodies in schistosomal glomerulopathy and in resistance to re-infection seems apparent.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, Z. A., ANDRADE, S.G., & SADIGURSKY, M. (1971) Renal changes in patients with hepatosplenic schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20 :77-83.
- BAWDEN, M. P. & WELLER, T. H. (1974) *Schistosoma mansoni* circulating antigen: Detection by complement fixation in sera from infected hamsters and mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 23 :1088-1091.
- BUTTERWORTH, A. E., DAVID, J. R., FRANKS, D., MAHMOUD, A.A.F., DAVID, P. H., STURROCK, R. F. & HOUBA, V. (1977). Antibody-dependent cell-mediated damage to ⁵¹Cr-labelled schistosomula of *Schistosoma mansoni*. I – Damage by purified eosinophils. *Journal of Experimental Medicine* 145 :136-150.
- CAPRON, A., CAPRON, M., DUPAS, H., BOUT, D. & PETITPREZ, A. (1974) Étude *in vitro* des phénomènes immunologiques dans la schistosomiase humaine et expérimentale. I. Étude comparative *in vitro* de l'activité lethal d'immunesérum sur les formes immatures et sur les adultes de *Schistosoma mansoni*. *International Journal of Parasitology* 4 :613-623.
- CARLIER, I., BOUT, D., INA, J.C., CAMUS, D., FIGUEIREDO, J.F.M. & CAPRON, A. (1975) Immunological studies in human schistosomiasis. I. Parasitic antigen in urine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24 :949-954.
- CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. (1972) The effects of immune rhesus monkey serum on schistosomula of *Schistosoma mansoni* during cultivation *in vitro*. *International Journal of Parasitology* 2 :79-98.
- DEELER, A. M., KLAPPE, H. T. M., ARDWEG, G. J. M. J. & MEERBEKE, E. H. E. M. (1976) *Schistosoma mansoni*: Demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. *Experimental Parasitology* 40 :189-197.
- HELDEN, H. P. T., TERPSTRA, W. J., OKOT-KOTBER, B. M. & EYAKUZE, V. M. (1975) Are there stage-characteristic immunofluorescence pattern in schistosomiasis? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 69 :309-311.
- HOSHINO-SHIMIZIO, S., BRITO, T., CANTO, A.L., KANAMURA, H. Y. & SILVA, L. C. (1975) Detection of schistosomal antigen (*S. mansoni*) in human kidneys obtained at autopsy (Preliminary report). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 17 :394-397.
- LICHTENBERG, F. V., BAWDEN, M. P. & SHEALEY, S. H. (1974). Origin of circulating antigen from the schistosome gut. An immunofluorescence study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 23 :1088-1091.
- McLAREN, D. J., CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. (1975). Acquisition of host antigens by young *Schistosoma mansoni* in mice: correlation with failure to bind antibody *in vitro*. *Parasitology* 70 :67-75.
- MORIEARTY, P. L. & BRITO, E. (1977). Elution of renal anti-schistosoma antibodies in human schistosomiasis mansoni. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (a ser publicado).

- MURREL, K. D., DEAN, D. A. & STAFFORD, E. E. (1975). Resistance to infection with *Schistosoma mansoni* after immunization with worm extracts or live cercariae: role of cytotoxic antibody in mice and guinea pigs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 24 :955-962.
- NASH, T. E. (1974). The location of the circulating antigen in *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 23 :1085-1087.
- NASH, T. E., PRESCOTT, B. & NEVA, F. A. (1974) The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. *Journal of Immunology* 122 :1500-1507.
- PEREZ, H., CLEGG, J. A. & SMITHERS, S. R. (1974). Acquired immunity to *Schistosoma mansoni* in the rat: measurement of immunity by the lung recovery technique. *Parasitology* 69 :349-359.
- SAINTE-MARIE, G. (1961). A paraffin-embedding technique for studies employing immuno-fluorescence. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 10 :250-256.
- SHER, A., KUSEL, J. R., PEREZ, H. & CLEGG, J. A. (1974). Partial isolation of a membrane antigen which induces the formation of antibodies lethal to schistosomes cultured *in vitro*. *Clinical and Experimental Immunology* 18 :357-369.
- SMITHERS, S. R. & TERRY, R. J. (1967). Resistance to experimental infection with *Schistosoma mansoni* in rhesus monkey induce by transfer of adult worms. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 61 :517-533.
- VAN MARCK, E. (1975). Presence of the circulating polyssacharide antigen in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Annales de la Societé Belge Médecine Tropical* 55 :373-377.