

VARIAÇÃO DOS NÍVEIS DO COMPONENTE C₃
DO COMPLEMENTO EM *HOLOCHILUS BRASILIENSIS NANUS*
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *SCHISTOSOMA*
MANSONI *

Othon de Carvalho Bastos **
Maria Helena Seabra Soares de Brito **
Maria Salete Sipaubá Schiavotelo ***
Eliane Pires de Souza ***

BASTOS, O. de C. et al. Variação dos níveis do componente C₃ do complemento em *Holochilus brasiliensis nanus* experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni*. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 18:41-6, 1984.

RESUMO: As variações dos níveis do componente C₃ do complemento foram verificadas em soros de exemplares do roedor silvestre *Holochilus brasiliensis nanus* infectados experimentalmente com *Schistosoma mansoni*, aplicando-se a técnica de imunoeletroforese bidimensional quantitativa. Foram utilizados soros de animais normais, da mesma espécie e idade, como controle da experiência. A quantificação foi feita durante oito semanas, contadas a partir da data da infecção. O perfil sérico mostrou que o nível inicial do C₃ foi duas vezes menor que o observado no grupo controle. Este nível permaneceu até a 6ª semana de observação. A partir desta semana até a oitava foram registrados níveis aproximadamente 3 a 4 vezes menores que os observados no grupo controle.

UNITERMOS: *Holochilus brasiliensis nanus*, *Schistosoma mansoni*. Infecção experimental Roedores Silvestres.

INTRODUÇÃO

Estudos realizados em linhagens de camundongos que apresentavam deficiência congênita de componentes do complemento, assim como em animais nos quais foi obtida a decomplicação, utilizando-se veneno de cobra, demonstraram que a resistência imunológica à infecção parasitária, de algum modo, depende da presença do sistema complemento^{12,13}.

Na esquistossomose, vem sendo verificado o mecanismo de ação deste sistema, tanto pela via clássica de fixação^{1,11}, como pela

via alternativa⁷, envolvendo, algumas vezes, células como macrófagos e eosinófilos^{6,9,10}. Estes experimentos evidenciam os efeitos danosos do complemento sobre o hospedeiro e o modo pelo qual o verme escapa deste mecanismo de defesa imunológica. Entretanto, faltam maiores esclarecimentos quanto a variação dos níveis dos componentes do complemento, durante a evolução da parasitose. Procuramos, então, determinar o nível do componente C₃ em roedores silvestres esquistossomóticos, durante oito

* Financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq — Proc. nº 40.3815/82).

** Da Universidade Federal do Maranhão — Programa de Imunologia — Campus Universitário do Bacanga — Bloco 3 — Sala 3A — 65000 — São Luís, MA — Brasil.

*** Bolsista do CNPq, na Universidade Federal do Maranhão.

semanas de infecção, por ser hospedeiro natural do *S. mansoni* e, ao mesmo tempo, por sabermos da possibilidade destes pequenos mamíferos participarem da cadeia epidemiológica da verminose, em paralelo ao homem ⁴.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedência dos roedores silvestres

Mamíferos de pequeno porte foram capturados na cidade de São Bento, situada na região da Baixada Maranhense. A captura foi feita por meio de tarrifa (malha confeccionada com fio de algodão pelos pescadores da região) ou por laço feito na extremidade da linha de anzóis. As armadilhas foram utilizadas em região alagada, onde estes animais costumemente fazem seus ninhos, utilizando vegetação aquática. Os animais capturados foram transportados para o laboratório, onde a infecção esquistossomótica foi investigada por exame de fezes. Os animais não infectados por *S. mansoni* foram acasalados, após a determinação da espécie. No experimento, utilizamos somente animais nascidos em cativeiro, com 30 dias de vida, da espécie *Holochilus brasiliensis nanus* Thomas, 1897.

Infecção esquistossomótica

Foram formados dois grupos com 5 *Holochilus* cada um. Aleatoriamente, um dos grupos foi tomado para que seus roedores fossem submetidos a infecção esquistossomótica. Cada roedor foi exposto a 150 cercárias (Grupo I), na presença de luz e na temperatura de 28°C. Os animais do outro grupo foram tomados como controle da experiência (Grupo C).

As cercárias foram obtidas de *Biomphalaria glabrata* nascidas em moluscário, descendentes de moluscos coletados na Região da Baixada Maranhense, e infectadas por população simpátrica de *S. mansoni*.

Obtenção de soros anti-*S. mansoni*

Semanalmente, a partir da data da infecção, os roedores eram anestesiados com éter e sangrados pelo plexo venoso oftálmico. As amostras sanguíneas eram deixadas em temperatura ambiente para retração do coágulo e os soros eram juntados por grupos, rotulados e estocados em congeladores.

As siglas utilizadas nos rótulos serviram para identificar os soros por grupos: Controle (Cn) e Infectado (In), sendo que *n* correspondia ao número de semanas decorridas após a data da infecção.

Produção de soro Anti- C_3 de roedor

Quinhentos miligramas (500 mg) de Zimosan (Fleishman Tipo A) foram fervidos por meia hora, em 50 ml de solução salina (0,15 M). Em seguida, o Zimosan foi recuperado por centrifugação (1.200g/min, a 0°C) e deixado reagir com 11 ml de soro de roedor, a 37°C, por uma hora, com agitação constante. O complexo Zimosan- C_3 foi separado por centrifugação, desprezando-se o sobrenadante. O complexo foi lavado seis vezes com Tampão Veronal Isotônico, pH 7,6, e estocado em congelador até o momento do uso ⁸.

Coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 1,5 kg de peso corporal, nascidos no Biotério da UFMA, foram imunizados com o complexo Zimosan- C_3 de roedor e adjuvante incompleto de Freund. A sensibilização foi feita com inoculações do antígeno em regiões próximas à dos gânglios poplíteos (1,0 ml) e no dorso do animal (1,0 ml). Decorridos 15 dias da data da imunização, outras inoculações antigênicas foram feitas, obedecendo o mesmo critério. O soro anti- C_3 foi obtido sete dias após a aplicação da última dose do antígeno.

Identificação do Componente C_3

O componente C_3 foi identificado pela imunoeletroforese bidimensional, utilizando

a técnica de absorção "in situ"³. A técnica consistiu em depositar o soro padrão "Bionetics" anti- C_3 de camudongo, em uma canaleta aberta no trajeto da segunda eletroforese. Este soro reage cruzadamente com soro de *Holochilus*. A banda correspondente do C_3 foi determinada tendo em vista a redução da área de precipitação.

Imunoeletroforese bidimensional quantitativa (IBQ)

Para estudos de imunoeletroforese bidimensional quantitativa de Laurell (de acordo com as orientações de Weeke, descritas em Axelsen e col.²), placas de vidro foram cobertas com Agarose (Bio-Rad Lab) a 1% em tampão veronal — HCl (0,05 M; pH = 8,6 e $\mu = 0,02$).

Foram utilizadas amostras de 1 μ l de soros dos dois grupos (I e C), conforme esquema expresso nas lâminas em estudo (Figs. 1 e 2). A primeira eletroforese foi realizada a 6V/cm, durante uma hora e 20 min. Em seguida, foram retiradas porções de Agarose das regiões escolhidas para a

realização das reações antígeno-anticorpo, conforme técnica de Weeke, e substituídas por uma mistura de agarose e anti- C_3 , na diluição de 1/20. O passo seguinte foi a realização da eletroforese no segundo sentido (1,0V/cm, durante 15 h). A quantificação do C_3 foi feita pela medida da área do precipitado, com auxílio de papel milimetrado.

RESULTADOS

Posicionamento do componente C_3 de *Holochilus* na imunoeletroforese bidimensional (IBQ)

A lâmina da imunoeletroforese, preparada para identificação do C_3 de *Holochilus*, apresentou um arco de precipitação que se reduziu proporcionalmente à variação do volume de amostra aplicada. Quando as alíquotas tinham volumes iguais, constatou-se diferenças entre as áreas dos arcos em evidência, sendo que, a menor área, relacionou-se com a região em que foi realizada

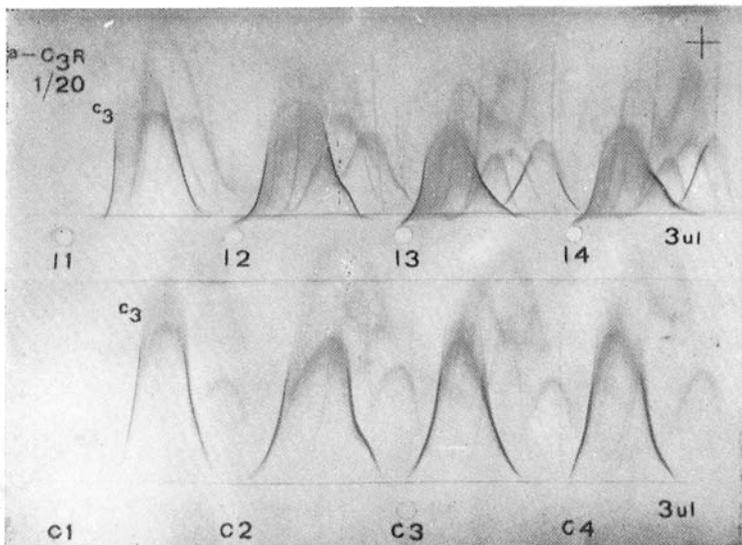


Fig. 1 — Imunoeletroforese bidimensional quantitativa dos soros de *Holochilus* infectados com *S. mansoni* (In) e não infectados (CN) frente ao soro anti- C_3 de roedor diluído (a- C_3 -R), durante oito semanas de infecção (n de 1 a 8).

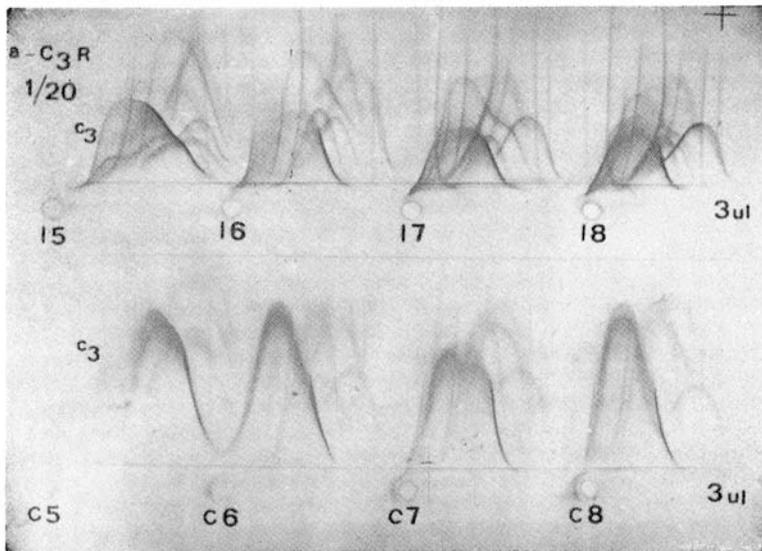


Fig. 2 — Imunoeletroforese bidimensional quantitativa dos soros de *Holochilus* infectados com *S. mansoni* (In) e não infectados (CN) frente ao soro anti- C_3 de roedor diluído (a- C_3 -R), durante oito semanas de infecção (n de 1 a 8).

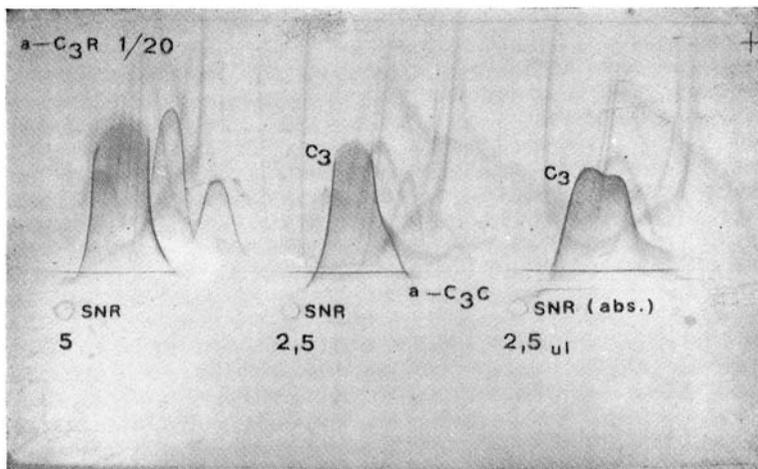


Fig. 3 — Imunoeletroforese bidimensional de soro normal de *Holochilus* (SNR), com absorção em "in situ" pelo soro anti- C_3 de camundongo (a- C_3 -C), frente ao soro anti- C_3 de roedor diluído (a- C_3 -R).

a absorção "in situ" (Fig. 3). Resultados semelhantes foram obtidos em replicatas.

Variações do nível do componente C_3 durante a evolução da parasitose.

As reações correspondentes ao C_3 precipitado no grupo de animais infectados (In) apresentaram bandas com áreas menores do que as correspondentes ao sistema precipitante do grupo de animais normais (Cn), desde a primeira semana de trabalho até a oitava (Figs. 1 e 2). As relações entre as reações dos soros Cn e In, no decurso do período de observação mostraram que o nível do C_3 foi duas vezes menor que o nível detectado no grupo controle. Esta proporção permaneceu até a 6ª semana de infecção. Após a 6ª semana chegou a ser registrado um nível aproximadamente 3 a 4 vezes menor do que o verificado no grupo controle.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As áreas formadas pelo precipitado oriundo da reação antígeno-anticorpo no decurso da imunoelectroforese bidimensional, variam linearmente com as concentrações antigênicas, conforme demonstrado por Axelsen e col.², 1973, permitindo uma análise quantitativa de razoável precisão. No presente trabalho, utilizamos este método quantitativo e, apesar de termos trabalhado com um reativo pluri-específico (anti- C_3), determi-

namos oscilações nos níveis séricos, tanto em animais normais, como nos parasitados com *S. mansoni*. Observamos que as oscilações ocorridas nos soros controles não apresentaram diferenças significativas entre si, fato que permitiu avaliar o crescente aumento de consumo de C_3 durante a evolução da infecção.

Estudando o perfil dos níveis de C_3 durante a evolução da parasitose, podemos imaginar que a queda do nível deste componente sérico, na fase inicial da infecção, está relacionado com o consumo de C_3 devido as intensas reações imunológicas no hospedeiro, desencadeadas para neutralizar tanto antígenos somáticos como os de excreção e secreção do helminto. Admite-se que, quando a parasitose atinge sua fase máxima de agressão, ou seja, época em que os vermes alcançam sua maturidade e começam a ovipor, o consumo do C_3 é ampliado, havendo relação direta entre carga antigênica parasitária e a participação do C_3 nos processos imunes.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores L.A. Magalhães e L.C. de S. Dias, pelas sugestões científicas; ao Professor Fernando de Ávila Pires, pela taxionomia dos roedores; à Diretoria Regional da Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), pela viabilização do trabalho.

BASTOS, O. de C. et al. [Variation in the levels of the C_3 component of the complement in *Holochilus brasiliensis nanus* infected with *Schistosoma mansoni*]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 18:41-6, 1984.

ABSTRACT: The quantitative immunoelectrophoretic method was used to determine the consumption of the C_3 component of the complement system in the sera of rodents (*Holochilus brasiliensis nanus*) infected with *Schistosoma mansoni*, during about eight weeks of observation. Normal animals were used as experimental controls. The results indicated that initial consumption of the C_3 component in the infected animals was twice that of the controls. This level was maintained until the 6th week of observation. After the 6th week, the consumption of C_3 was 3 to 4 times greater than that of the controls.

UNITERMS: *Holochilus brasiliensis nanus*. *Schistosoma mansoni*. Experimental infection. Wild rodents.

BASTOS, O. de C. et al. Variação dos níveis do componente C_3 do complemento em *Holochilus brasiliensis nanus* experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 18:41-6, 1984.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANWAR, A.R.E.; SMITHERS, S.R. & KAY, A.B. Killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* coated with antibody and/or complement by human leucocytes *in vitro*: requeriment for complement in preferential killing by eosinophils. *J. Immunol.*, 122:628-37, 1979.
2. AXELSEN, N.H.; KROL, J. & WEEK, B. *A manual of quantitative immunoelectrophoresis: methods and applications*. Oslo, Universitetsforlaget, 1973.
3. BASTOS, O. de C. Utilização de soros pluri-específicos no estudo da evolução das imunoglobulinas envolvidas na resposta imune de camundongos ao *Schistosoma mansoni*, Sambon, 1907. São Paulo, 1979. [Tese de Doutorado — Instituto de Biologia da UNICAMP]
4. BASTOS, O. de C.; MAGALHÃES, L.A.; RANGEL, H. de A. & PIEDRABUENA, A.E. Alguns dados sobre o comportamento parasitológico das linhagens humana e silvestre do *Schistosoma mansoni*, no Vale do Rio Paraíba do Sul. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:184-99, 1978.
5. BRENER, Z. Esquistossomose experimental. *Rev. bras. Malar.*, 11:473-506, 1959.
6. CAPRON, M.; CAPRON, A.; TORPIER, G.; BASIN, H.; BOUT, D. & JOSEPH, M. Eosinophil dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis: involvement of IgG_2 antibody and role of mast cells. *Eur. J. Immunol.*, 8:127-33, 1978.
7. MACHADO, A.J.; GAZZINELLI, G.; PELLEGRINO, J. & DIAS DA SILVA, W. *Schistosoma mansoni*: the role of the complement C_3 — Activating system in the cercaricidal action of normal serum. *Exp. Parasit.*, 38:20-9, 1975.
8. MARDINEY Jr., M.R. & MÜLLER-EBERHARD, H.J. Mouse B_2 c-globulin: production of ant.serum and characterization in the complement reaction. *J. Immunol.*, 94:877-82, 1965.
9. RAMALHO-PINTO, F.J.; McLAREN, D.J. & SMITHERS, S.R. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils *in vitro*. *J. exp. Med.*, 147:55, 1978.
10. RAMALHO-PINTO, F.J.; ROSSI, R. & SMITHERS, S.R. Murine Schistosomiasis mansoni: anti-schistosomula antibodies and the IgG subclasses involved in the complement — and eosinophil mediated killing of schistosomula *in vitro*. *Parasul. Immunol.*, 1:295-308, 1979.
11. RIBEIRO, M.A.G. & FAVA NETO, C. Determinação do complemento hemolítico total e do componente C_3 em pacientes de esquistossomose mansônica. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 23:111-3, 1981.
12. SHER, A.; KNOPF, P.M.; GIBBONS, N.; DOUGHTY, B. & LICHTENBERG, F. Von. Mechanisms of acquired immunity to *S. Mansoni* in the laboratory mouse. In: Joint Conference on Parasitic Diseases, 10th, Bethesda, Md., 1975. *Proceedings*. Bethesda, Md., US Japan Cooperative Medical Science Program, 1975. p. 132-133.
13. WAKSMAN, B.H. & COOK, J.A. A report of a conference on newer immunologic approaches to schistosomiasis. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 24:1.037-9, 1975.

Recebido para publicação em 13/06/1983

Aprovado para publicação em 28/10/1983