

EDUARDO GOMES



# CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MORFOLÓGICA DA LINHAGEM PAULISTA DE *SCHISTOSOMA MANSONI* (Ouh) DO VALE DO PARANAPANEMA (OURINHOS), SP.

Dissertação apresentada ao Curso  
de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas, área de concentração em  
Parasitologia, do Instituto de  
Biologia, da Universidade Estadual  
de Campinas, para obtenção do  
título de Mestrado.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CANDIDO DE SOUZA DIAS

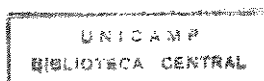
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA.

1996

9613464

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese de doutorado do candidato a:  
*Eduardo Gomes*  
*L. C. de S.*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

13/8/96



UNIDADE	BC
CHAMADA:	TIUNICAMP
G585C	
Ex.	28415
REC.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
REC.	R\$ 11,00
DATA	03/09/96
Nº CPD	

CM-000 9 163 2-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

G585c Gomes, Eduardo  
Caracterização biológica e morfológica da linhagem paulista de *Schistosoma mansoni* (Ouh) do Vale do Paranapanema (Ourinhos), SP / Eduardo Gomes.  
-- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Luiz Candido de Souza Dias.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

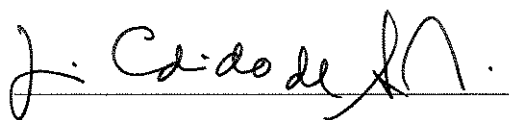
1. Esquistossomose mansônica - Ourinhos (SP).  
I. Dias, Luiz Candido de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia . III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 13 de Agosto de 1996

## BANCA EXAMINADORA:

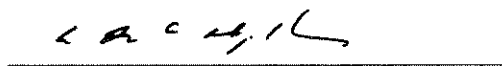
### TITULARES:

Prof. (a) Dr. (a)



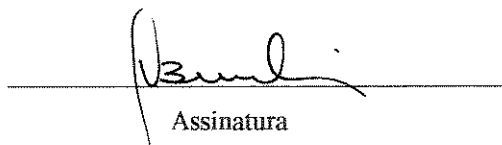
Assinatura

Prof. (a) Dr. (a)



Assinatura

Prof. (a) Dr. (a)



Assinatura

### SUPLENTE

Prof. (a) Dr. (a)



Assinatura

## ***Homenagem***

ao meu pai (*in memoriam*)

Selma e Victor

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Rubens Campos, quem guiou os primeiros passos para a pesquisa

Ao Prof. Dr. Luiz Candido de Souza Dias, orientador, quem proporcionou o aprimoramento nos trabalhos de pesquisa

À profa. Gabriela Stangenhau e ao amigo Damião pelo trabalho estatístico na tese

Ao Luis Takaku, (SUCEN) pelo fornecimento do material para isolamento da linhagem

Aos professores, colegas e funcionários do Depto. de Parasitologia, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho

À Universidade São Francisco, que contribuiu para a realização deste trabalho

Ao Prof. Dr. Fernando de Oliveira pela ajuda na redação final

# ÍNDICE

<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 - OBJETIVO</b>	10
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>	11
3.1 - ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE <i>Biomphalaria glabrata</i> EM LABORATÓRIO	11
3.2 - ISOLAMENTO DA LINHAGEM DE <i>Schistosoma mansoni</i>	12
3.3 - FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS DE MOLUSCOS	12
3.4 - OBTENÇÃO DOS MIRACÍDIOS	12
3.5 - INFECÇÃO DOS MOLUSCOS	13
3.6 - AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DOS MOLUSCOS	13
3.6.1 - Exame dos moluscos e determinação do período pré e patente	13
3.6.2 - Mortalidade dos moluscos	14
3.7 - FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS DE CAMUNDONGOS	14
3.7.1 - Identificação dos camundongos	15
3.7.2 - Sorteio dos camundongos	15
3.8 - INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS	16
3.9 - CAPACIDADE DE PENETRAÇÃO DE CERCÁRIAS	17
3.10 - MORTALIDADE DOS CAMUNDONGOS	17
3.11 - TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS COM DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS	18
3.12 - PERFUSÃO DOS CAMUNDONGOS	18
3.13 - COLETA DE VERMES	19
3.14 - ESTUDO MORFOLÓGICO DOS VERMES	19
3.14.1 - Fixação, coloração e montagem dos vermes	19
3.14.2 - Morfometria dos vermes	19
3.15 - AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS ESQUISTOSSOMICIDAS	20
3.15.1 - Percentagem de vermes nas veias intra-hepáticas, porta e mesentéricas	20
3.15.2 - Percentagem de vermes mortos	20
3.15.3 - Percentagem de vermes sobreviventes	21
3.15.4 - Percentagem de recuperação de vermes	21
3.15.5 - Percentagem de redução de vermes	21
3.15.6 - Percentagem de eficácia da droga	21
3.16 - OOGRAMA	22
3.17 - PESO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS	22
3.18 - PESO DO FÍGADO E DO BAÇO	23
3.19 - CORTES HISTOLÓGICOS	23
3.20 - MEDIDAS DOS DIÂMETROS DAS REAÇÕES GRANULOMATOSAS	23

3.21 - MORFOMETRIA DOS OVOS	24
3.21.1 - Preparação do material	24
3.22 - ANÁLISE DOS RESULTADOS	24
<b>4 - RESULTADOS</b>	26
4.1 - ESTUDO DA LINHAGEM NO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO	26
4.1.1 - Período pré-patente, patente e positividade	26
4.1.2 - Mortalidade	26
4.2 - ESTUDO DA LINHAGEM NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO	27
4.2.1 - Cercárias penetrantes e vermes recuperados	27
4.2.2 - Pesos corporais	28
4.2.3 - Pesos do fígado e do baço	29
4.2.4 - Medidas das reações granulomatosas	30
4.3 - ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE DE <i>Schistosoma mansoni</i> À DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS	30
4.3.1 - Mortalidade dos camundongos	30
4.3.2 - Vermes coletados	31
4.3.3 - Vermes mortos e vivos	31
4.3.4 - Distribuição de vermes	32
4.3.5 - Percentagem de vermes coletados	32
4.3.6 - Redução de vermes	33
4.3.7 - Percentagens de vermes sobreviventes e de eficácia	34
4.3.8 - Oograma	34
4.4 - ESTUDO MORFOLÓGICO DA LINHAGEM DE <i>Schistosoma mansoni</i>	34
4.4.1 - Ovos	34
4.4.2 - Vermes	35
TABELAS E FIGURAS	36
<b>5 - DISCUSSÃO</b>	60
5.1 - AÇÃO DAS DROGAS	71
<b>6 - CONCLUSÃO</b>	75
<b>7 - RESUMO</b>	77
<b>8 - SUMMARY</b>	78
<b>9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	79
<b>ANEXO</b>	99

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I</b> - Suscetibilidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectados com 1 e 10 miracídeos da geração parental de <i>Schistosoma mansoni</i> isolado do município de Ourinhos, SP.	37
<b>Tabela II</b> - Média dos pesos corporais de camundongos infectados com 70 cercárias, da geração F1 de <i>Schistosoma mansoni</i> isolada do município de Ourinhos, SP.	38
<b>Tabela III</b> - Número médio de vermes coletados em camundongos dos grupos controle, praziquantel e oxamniquine infectados com 70 cercárias da geração F1 de <i>Schistosoma mansoni</i> isolado do município de Ourinhos, SP.	39
<b>Tabela IV</b> - Distribuição média de vermes coletados nos grupos (controle, praziquantel e oxamniquine) de camundongos infectados com 70 cercárias da geração F1 de <i>Schistosoma mansoni</i> isolado no município de Ourinhos, SP.	40
<b>Tabela V</b> - Percentagens de vermes coletados no fígado, de vermes acasalados, de redução de vermes e de vermes mortos no fígado nos grupos de camundongos (controle, praziquantel e oxamniquine) infectados com 70 cercárias da geração F1 de <i>Schistosoma mansoni</i> , isolado no município de Ourinhos - SP.	41
<b>Tabela VI</b> - Suscetibilidade à drogas esquistossomicidas de camundongos infectados com 70 cercárias da geração F1 de <i>Schistosoma mansoni</i> isolado do município de Ourinhos, SP.	42



# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Modelo experimental para obtenção e estudo da cepa de <i>Schistosoma mansonii</i>	43
<b>Figura 2</b> - Cinética da eliminação de cercárias de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectadas com 1 e 10 miracídeos da geração parental de <i>Schistosoma mansonii</i> , isolado do município de Ourinhos, SP.	44
<b>Figura 3</b> - Mortalidade de <i>Biomphalaria glabrata</i> não-infectada (controle) e infectadas com 1 a 10 miracídeos, da geração parental de <i>Schistosoma mansonii</i> , isolado do município de Ourinhos, SP.	45
<b>Figura 4</b> - Diagramas de caixas ("Box-plots") para as distribuições das percentagens de cercárias penetrantes (CP) e vermes recuperados (VR), dos camundongos infectados (grupos C, O, P), com 70 cercárias da geração F1 de <i>Schistosoma mansonii</i> , isolado do município de Ourinhos, SP.	46
<b>Figura 5</b> - Diagramas de Caixas ("Box-plots") para a distribuição dos pesos corporais (g), nas datas da infecção e perfusão, de camundongos sadios (S) e infectados (C - Controle, O - Oxamniquine e P - Praziquantel), com 70 cercárias da geração F1 de <i>Schistosoma mansonii</i> , isolado do município de Ourinhos, SP.	47
<b>Figura 6</b> - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição do ganho de peso corporal (g), entre as datas da infecção e perfusão, de camundongos sadios (S) e infectados (C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel), com 70 cercárias da geração F1 de <i>Schistosoma mansonii</i> , isolado do município de Ourinhos, SP.	48
<b>Figura 7</b> - Diagrama de caixas ("Box-plots") para a distribuição do peso do fígado (g) de camundongos sadios (S) e infectados (grupo C) com 70 cercárias da geração F1 de <i>Schistosoma mansonii</i> , isolado do município de Ourinhos, SP.	49
<b>Figura 8</b> - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição do peso do baço (g) de camundongos sadios (S) e infectados (grupo C) com 70 cercárias da geração F1 de <i>Schistosoma mansonii</i> , isolado do município de Ourinhos, SP.	50
<b>Figura 9</b> - Distribuição amostral do produto das medidas (em $\mu\text{m}^2$ ) de comprimento e largura dos granulomas de <i>Schistosoma mansonii</i> , isolado do município de Ourinhos, SP.	51

- Figura 10** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição por sexo, dos vermes coletados nos camundongos dos grupos (C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.
- Figura 11** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição vitalidade, dos vermes coletados nos camundongos dos grupos (C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP. 53
- Figura 12** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição por localização, dos vermes coletados nos camundongos dos grupos (C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP. 54
- Figura 13** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição das percentagens de vermes coletados no fígado, de camundongos dos grupos (C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP. 55
- Figura 14** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição das percentagens de vermes mortos no fígado, dos camundongos dos grupos (C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP. 56
- Figura 15** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição das percentagens de redução de vermes dos camundongos dos grupos (C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP. 57
- Figura 16** - Distribuição amostral do produto das medidas (em  $\mu\text{m}^2$ ) de comprimento e largura dos ovos de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP. 58
- Figura 17** - Diagrama de caixas ("Box-plots") para a distribuição dos comprimentos (mm) dos vermes machos e fêmeas da linhagem de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP. 59

## 1. INTRODUÇÃO

As esquistossomoses do homem são endêmicas em 74 países e a estimativa global é que existam 200 milhões de pessoas infectadas e 500 a 600 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção. Esta situação ocorre principalmente em zonas rurais e agrícolas e é causada por condições deficientes de moradia, educação e serviços sanitários (WHO, 1991).

São três as principais espécies de *Schistosoma* que causam patogenicidade ao homem: *S. haematobium* (Bilharz 1852), observado na África, Oriente Médio e Madagascar; *S. japonicum* (Katsurada 1904) no Japão, China, Filipinas, Indonésia e Tailândia e *S. mansoni* (Sambon 1907) encontrado na África, Oriente Médio, América Central e do Sul (Doumenge et alii, 1987).

A distribuição destas espécies parasitas do homem é explicada hoje à luz da especiação geográfica, não permitindo definitivamente, a possibilidade de ter havido um centro de evolução separado para cada espécie (Doumenge et alii, 1987).

A espécie que ocorre no Brasil é *S. mansoni*. Admite-se que a introdução, em nosso país deste parasito tenha se dado com a chegada de negros africanos durante o período da colonização do país. Seria esta a razão da doença ser mais comum na região nordeste e também no Estado de Minas Gerais, acompanhando assim, a migração dos escravos no país (Paraense, 1959).

No Brasil o número de pessoas infectadas por *S. mansoni*, é de aproximadamente 5 a 6 milhões, ocorrendo variação de prevalência nos diversos Estados, chegando a atingir 11% da área nacional (Silveira, 1989).

Hoje no Brasil, entre as doenças tropicais, a esquistossomose mansônica se mostra como um problema sócio-econômico. Trata-se de doença de fácil transmissão e de grande potencial de disseminação, devido a ampla distribuição geográfica dos moluscos transmissores potenciais da infecção.

Coube a Arantes (1924) a verificação da doença pela primeira vez no Estado de São Paulo, quando descobriu 11 casos autóctones na cidade de Santos.

Até 1952 os focos de esquistossomose conhecidos em São Paulo estavam localizados no litoral. Ferreira & Correa (1953) descreveram casos autóctones em Ourinhos (foco de Ipauçu e Palmital), no vale do Paranapanema. Foi de Ourinhos que isolamos a linhagem do trematódeo estudado neste trabalho.

A região do Norte do Estado do Paraná que compreende a Bacia do Paranapanema, é considerada pelo Ministério da Saúde como área endêmica de esquistossomose (Silveira, 1989). A colonização desta área se deu recentemente, muito depois da escravidão, sendo sua população constituída basicamente por agricultores paulistas, mineiros e nordestinos (Magnanini & Mayor, 1977). A cafeicultura foi o fator determinante da colonização que se deu através de Ourinhos, principalmente, depois da construção da Estrada de Ferro Sorocabana em 1908 (Magnanini & Mayor, 1977). Nesta região, a esquistossomose foi introduzida por migrantes (Paraense, 1959). Devido à recente colonização, acredita-se que a esquistossomose, foi introduzida em algum momento nas décadas de 1930 a 1940 ou mesmo mais tarde (Silva, 1992).

A colonização da região mencionada se deu no sentido São Paulo - Paraná. Parece mais sensato aceitar que a doença possa ter sido

introduzida em algum ponto da Bacia do Paranapanema, por agricultores nordestinos ou mineiros e, a partir daí, se disseminou para outros municípios. Sendo a Região Norte do Paraná e não a Região de Ourinhos, a que recebeu maior contingente de migrantes, em sua área rural, podemos sugerir a origem paranaense dos criadouros paulistas (Silva, 1983).

Esses fatos nos mostram que *B. glabrata* encontrou na Bacia do Paranapanema, um habitat favorável . Esta espécie é assinalada, somente de maneira ocasional, em São Paulo, Curitiba , Campinas e Ribeirão Preto. Todos os municípios onde *B. glabrata* foi encontrada com razoável grau de densidade pertencem à Bacia do alto e médio Paranapanema ( Vaz et alii,1986).

Embora *B. glabrata* seja considerada como o hospedeiro intermediário mais eficiente para *S. mansoni*, nem por isso, o alto e o médio Paranapanema se transformaram numa região hiperendêmica. A disponibilidade de um excelente hospedeiro intermediário não foi suficiente para ampliar a transmissão, que se mantém em níveis semelhantes, às das outras áreas de São Paulo, aonde o hospedeiro intermediário é *B. tenagophila*. Isto mostra que a presença de um hospedeiro intermediário adequado, não é condição suficiente, para altas taxas de transmissão. Este fato sugere que outras condições devem estar presentes para que isso ocorra (Rodrigues, 1975).

As bionfalárias, hospedeiras intermediárias de *S. mansoni* , tem ampla distribuição geográfica, sendo encontrada no Brasil e em outros países da América Latina . As espécies de bionfalárias infectadas naturalmente no Brasil são as seguintes: *Biomphalaria glabrata* (Say 1818), *B. tenagophila* (D'Orbigny 1835) e *B. straminea* (Dunker 1848) (Doumenge et alli, 1987).

O hospedeiro intermediário na Bacia do Paranapanema foi identificado como sendo *B. glabrata*. Esta é a única área com este planorbídeo em São Paulo, podendo ser ele encontrado em vários municípios do norte do Paraná (Paraense & Correa, 1963a).

Rey (1953) encontrou pela primeira vez *B. glabrata* naturalmente infectada no vale do Paranapanema. Dentre 62 exemplares desta espécie examinados, 2 se mostraram parasitados por cercárias de *S. mansoni*. O encontro de exemplares positivos também foi relatado por Piza & Ramos (1960), em 13 municípios da região da bacia do rio Paranapanema. Em 5 municípios desta região foram constatados a transmissão da doença. Os focos mais importantes e todos os casos autóctones estavam localizados no município de Ourinhos.

A transmissão no município de Ourinhos assume caráter periurbano, com grande contingente de casos. Estes casos podem ser atribuídos as atividades de trabalho, já que alguns focos se localizam em canais de irrigação de áreas destinadas à horticultura. Os casos autóctones restantes estão relacionados com atividades de lazer, quando a infecção ocorreu em coleções hídricas naturais, como córregos (SUCEN, 1982).

Magalhães & Dias (1973) estudaram a suscetibilidade de *B. glabrata* de Ourinhos à infecção por miracídios das linhagens de Belo Horizonte (MG) e de São José dos Campos, (SP). Esses autores concluíram que o fato deste molusco ser altamente suscetível à infecção pelas duas linhagens ocorreu, provavelmente, devido ao intercâmbio genético entre as linhagens mineira e paulista do trematódeo.

Chieffi (1975) trabalhando com *B. glabrata* de Ourinhos e cepa de Londrina do parasito alcançou índice de 75% de positividade para cercárias.

Em condições experimentais, foi estudada a suscetibilidade de *B. glabrata* mineira e paulista à cepa de *S. mansoni* de Ourinhos, obtendo a linhagem paulista altas taxas de infecção (60%) e também alta mortalidade (74%) (Dias et alii, 1987).

Files & Craw (1949) em trabalhos referentes a suscetibilidade de moluscos, admitiram a existência de fatores fisiológicos intra e interespecíficos entre os parasitos de áreas endêmicas diferentes. Newton (1952) considerou que a suscetibilidade estaria ligada a fatores genéticos e que, também, havia relação com a idade dos moluscos. Paraense & Corrêa (1963a) sugeriram que deveria haver uma adaptação fisiológica entre a cepa do parasito e o molusco hospedeiro, pois observaram que os moluscos se infectavam, facilmente, com cepas simpátricas do verme. Richards & Merrit (1972) e Richards (1977), em trabalhos com seleção por autofecundação, demonstraram que a suscetibilidade de moluscos estaria ligada a um complexo de quatro ou mais fatores genéticos e que a sua resistência estaria condicionada a um único gene dominante.

Em estudos por meio de seleção de populações de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, foram obtidos em diversas gerações de moluscos, exemplares altamente suscetíveis à cepas simpátricas de *S. mansoni*. Guaraldo (1987) demonstrou que moluscos geneticamente selecionados para suscetibilidade não reconheceram linhagens alopátricas do parasito, infectando-se facilmente. Outros resultados interessantes foram observados por Minchella & LoVerde (1983). Estes autores verificaram que moluscos não suscetíveis tem a capacidade reprodutiva diminuída, na presença de moluscos suscetíveis. Os autores concluíram que moluscos não suscetíveis, não são dominantes em populações naturais .

Um aspecto de importância considerado neste estudo, visando a caracterização da cepa de Ourinhos, foi a sua suscetibilidade à drogas esquistossomicidas.

A quimioterapia da esquistossomose começou com uso do tártaro emético no Sudão em paciente com *S. haematobium* (Marshall, 1987). Outras drogas como glucanthine, hycanthone e niridazole, foram utilizadas também, mas devido a seus problemas de toxicidade e efeitos colaterais, foram abandonadas no tratamento em larga escala, por não serem seguras. Atualmente, as preconizadas pela Organização Mundial de Saúde, são metrifonato, oxamniquine e praziquantel (WHO, 1993). Hoje já se conhece uma grande variação nas respostas terapêuticas nas diversas cepas de *S. mansoni* de áreas geográficas diferentes e também de uma mesma área geográfica (Marshall, 1987).

Diferentes respostas já foram observadas por Araújo et alii (1980) em sete cepas de *S. mansoni* isoladas de pacientes que se infectaram no Estado de Minas Gerais, utilizando niridazole, hycanthone e oxamniquine.

Katz et alii (1973), Campos et alii (1976) e Dias et alii (1978), registraram os primeiros casos resistência de cepas à drogas esquistossomicidas.

Coles et alii (1986) destacaram o problema da resistência ao oxamniquine usado no tratamento da esquistossomose no Quênia.

Resistência e tolerância à droga é definida da seguinte maneira por Coles et alii (1987) e Davis (1993): resistência é quando uma população de vermes previamente suscetível não responde a dose terapêutica usual de uma droga. A tolerância é encontrada em uma população de verme que nunca respondeu adequadamente ao tratamento.



Kinotti (1987) estudando suscetibilidade de *S. mansoni* a oxamniquine concluiu que esta é controlada por genes, indicando uma grande capacidade de desenvolver resistência às doses terapêuticas usadas quando o parasito sofre pressão contínua da droga, esperando-se, neste caso, resistência.

Vários estudos já demonstraram a existência de diferenças na infectividade, patogenicidade e morfologia, entre as cepas de *S. mansoni*, de diferentes áreas geográficas e de hospedeiros definitivos (Saoud, 1966; Warren, 1967; Anderson & Cheever, 1972; Magalhães & Carvalho, 1969, 1973a, 1973b, 1976; Magalhães et alii, 1975; Paraense & Corrêa, 1981; Zanotti et alii, 1983; Carvalho et alii, 1986; Zanotti, 1987; Coelho et alii, 1989).

Saoud (1966) mostrou não haver relação entre virulência e carga parasitária e que a distribuição dos ovos nos tecidos, era influenciada tanto pela linhagem do parasito quanto pela espécie hospedeira. Estas observações foram feitas em estudos sobre infectividade e patogenicidade de linhagens de *S. mansoni* do Egito, Porto Rico, Tanzânia e do laboratório Wellcome. O autor comentou que a cepa do laboratório Wellcome, isolada originalmente do Egito, mantida em laboratório por 19 anos em *B. glabrata*, mostrou-se bem distinta da linhagem do Egito isolada mais recentemente (5 anos) e mantida na espécie hospedeira original (*B. alexandrina*). O referido autor sugeriu que este grau de seleção produzido em laboratório poderia ocorrer na natureza, quando o parasita encontrar um novo hospedeiro intermediário. As linhagens BH (Belo Horizonte) e SJ (São José dos Campos, Vale do Paraíba, SP) foram avaliadas por Magalhães & Carvalho (1969, 1973a), pela capacidade de penetração de cercárias e recuperação de vermes adultos. Os autores verificaram que em média, a linhagem BH apresentou maior poder de

penetração pela cauda de camundongos do que as provenientes da linhagem SJ e que não diferiu no índice de recuperação de vermes adultos.

Estudos parasitológico e anatomopatológico desenvolvidos por Magalhães et alii (1975) demonstraram maior capacidade patogênica da linhagem BH em relação a SJ.

A patogenicidade das cepas BH e SJ, mantidas, respectivamente, em *B. glabrata* e *B. tenogophila*, relacionada à suscetibilidade do molusco foi estudada, detalhadamente, por Zanotti & Magalhães (1987). A autora verificou: menor capacidade de penetração de cercárias da linhagem BH. Na linhagem SJ o maior número de vermes desenvolvido era proveniente de moluscos mais suscetíveis. Observou ainda que a maior suscetibilidade destes moluscos corresponde, em camundongos, a maior números de reações granulomatosas nos tecidos e a uma diminuição nos valores dos pesos corporal, dos órgãos e dos diâmetros dos granulomas. A autora evidenciou que na linhagem paulista (SJ) quanto maior a suscetibilidade do molusco, maior é o número de ovos eliminados nas fezes do hospedeiro, salientando desta forma a importância epidemiológica do evento.

Diferenças morfológicas entre as linhagens BH e SJ foram demonstradas por Magalhães & Carvalho, (1973b) e Paraense & Corrêa, (1981).

Paraense & Corrêa (1981) concluíram que as linhagens BH e SJ correspondem a duas raças biológicas distintas de *S. mansoni*. Esta conclusão foi obtida após estudos de cruzamentos, de morfologia dos vermes e do tamanho dos ovos destas duas linhagens.

Pelo exposto, nota-se que não há trabalhos cujos autores focalizam aspectos morfológicos e biológicos de linhagem paulista de *S. mansoni*, onde *B. glabrata* é hospedeiro intermediário.

## 2 - OBJETIVO

Suscetibilidade do hospedeiro intermediário *B. glabrata* à linhagem (Ouh)  
(Vale do Paranapanema)

Índice de infecção

Período pré-patente

Mortalidade

Suscetibilidade do hospedeiro definitivo (camundongo Swiss):

Capacidade de penetração de cercárias e recuperação de vermes

Peso corporal, do fígado e do baço de camundongos infectados

Diâmetro das reações granulomatosas de *S. mansoni* no fígado

Oograma

Morfometria de ovos e vermes adultos

Suscetibilidade da linhagem de *S. mansoni* às drogas esquistossomicidas:

Oxamniquine e Praziquantel

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* EM LABORATÓRIO

O material utilizado na elaboração desta tese foi proveniente da região do Vale do Paranapanema (São Paulo). Iniciamos os trabalhos com a formação da colônia de *B. glabrata*. Recebemos da SUCEN os moluscos de vários locais da região (Ourinhos e municípios vizinhos), no início do 1990. Após a dissecação de alguns dos animais para a constatação de espécie, os moluscos restantes foram mantidos em cristalizadores e suas desovas foram separadas para a formação de colônias para o experimento em laboratório. A partir dos moluscos do campo, foram coletadas as desovas em retângulos de isopor que serviram de substrato para estes animais desovarem. Os isopores com desovas, foram inicialmente transferidos para pequenos aquários de vidro (cristalizadores) para a eclosão. Os moluscos foram alimentados com pequenos pedaços de folhas de alface fresca. A seguir os moluscos aderidos às folhas, foram transferidos para tanques de Eternit (50 litros). Deste modo, foram preparados 5 tanques para a criação e manutenção dos moluscos no laboratório. A alimentação nos tanques constituiu-se de folhas de alface fresca e ração triturada para rato, suplementada com carbonato de cálcio 10% (Souza *et alii*, 1987). A criação foi mantida à temperatura ambiente, sem controle de fotoperiodismo.

### **3.2 - ISOLAMENTO DA LINHAGEM DE *Schistosoma mansoni***

O isolamento da linhagem foi realizado a partir de fezes humanas com ovos de *S. mansoni* de 3 pacientes autóctones de Ourinhos que não haviam sido tratados anteriormente (figura 1). A linhagem do parasito foi isolada no início de 1991.

### **3.3 - FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS DE MOLUSCOS**

Para o estudo da suscetibilidade de moluscos *B. glabrata*, da geração parental do verme, foram formados 3 grupos de 60 moluscos cada, com diâmetro medindo de 5 a 8mm, distribuídos da seguinte forma:

- 60 moluscos expostos a 1 miracídio
- 60 moluscos expostos a 10 miracídios
- 60 moluscos não expostos à infecção (controle)

### **3.4 - OBTENÇÃO DOS MIRACÍDIOS**

As fezes humanas foram diluídas em solução de cloreto de sódio em água 0,85%, a uma temperatura de 10°C. A seguir a mistura foi filtrada através de gaze recolhendo-se o material num cálice de sedimentação. Este material foi então submetido a passagem por um conjunto de peneiras metálicas de malhas iguais a 125, 105, 88 e 37µm. O sedimento obtido na

peneira de malha 37 $\mu$ m foi transferido para uma placa de petri e esta foi exposta à luz e temperatura de 28°C, provenientes de uma lâmpada elétrica, visando a eclosão dos miracídios (Standen, 1952).

### **3.5 - INFEÇÃO DOS MOLUSCOS**

Os miracídios que apresentavam movimento ativo (Paraense & Corrêa, 1963a) foram contados e transferidos com pipeta de Pasteur, para frascos tipo drágeas de 4cm de altura com 2,5cm de diâmetro. Espécimes de *B. glabrata*, criados em laboratório, medindo de 5 a 8mm de diâmetro, foram expostos , individualmente, a 1 e 10 miracídios recém-eclodidos. Os moluscos, foram expostos ao calor de 28°C, durante duas horas (Pellegrino & Macedo, 1955). Terminado o período de exposição, estes foram transferidos para pequenos aquários de vidro. Os moluscos do grupo controle, foram submetidos às mesmas condições de manipulação e exposição ao calor, sem entretanto serem expostos aos miracídios.

### **3.6 - AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE DOS MOLUSCOS**

#### **3.6.1 - EXAME DOS MOLUSCOS E DETERMINAÇÃO DOS PERÍODOS PRÉ- PATENTE E PATENTE**

A partir do 21<sup>o</sup> dia após a infecção, a cada 7 dias os moluscos de todos os grupos foram examinados de forma semelhante. Estes foram expostos individualmente, em frascos com 5ml de água decolorada, à luz e a calor de 28°C, durante duas horas (Oliver & Stirewalt, 1952). Após 77 dias

de observação, os moluscos sobreviventes negativos foram esmagados entre placas de vidro, para detectar a presença ou não de esporocistos. Para os moluscos que ainda liberavam cercárias após 77 dias, acompanhamos de forma semelhante para determinarmos o término da liberação de larvas.

### 3.6.2 - MORTALIDADE DOS MOLUSCOS

A mortalidade dos grupos expostos e do grupo controle, foi registrada diariamente, durante 77 dias após a infecção.

## 3.7 - FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS DE CAMUNDONGOS

Para os estudos referentes a suscetibilidade a drogas esquistossomicidas, infectividade, patogenicidade, morfometria de vermes e ovos, foram usados camundongos da raça Swiss do sexo feminino, com idade de 30 a 40 dias e peso corporal médio de 24g. Os camundongos em número de 66 foram provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp, tendo sido divididos em 4 grupos assim constituídos:

Grupo O : 15 camundongos infectados pela cauda com 70 cercárias e tratados com oxamniquine.

Grupo C : 15 camundongos infectados pela cauda com 70 cercárias e não receberam tratamento. Esse grupo constituiu-se no grupo controle infectado.

Grupo P : 16 camundongos infectados pela cauda com 70 cercárias e tratados com praziquantel.



Grupo S : 20 camundongos não infectados que constituíram o grupo controle sadio.

Usou-se a técnica de aleatorização de amostras para distribuir os camundongos do experimento nos referidos grupos. Cada grupo de animal foi mantido em caixas plásticas com tampa metálica e alimentados com ração para roedores de laboratório e água “*ad libitum*”.

### 3.7.1 - IDENTIFICAÇÃO DOS CAMUNDONGOS

Os camundongos foram marcados com pintura de ácido pícrico na pelagem, de maneira a serem individualizados em até 10 animais por gaiola.

### 3.7.2 - SORTEIO DOS CAMUNDONGOS

Os camundongos dos grupos oxamniquine, praziquantel e controle foram submetidos a sorteio. O método usado para aplicação deste tratamento teve como objetivos: evitar o uso de julgamento pré-conhecido ou arranjos sistemáticos; garantir um número de camundongos para cada tratamento e prover uma base para posterior análise estatística. Este método, de blocos permutados aleatoriamente, é descrito abaixo:

Para os 3 tratamentos com drogas aos quais os camundongos foram submetidos empregou-se as seguintes combinações (blocos de 3 camundongos).

A B C para dígito 1

A C B para dígito 2

B A C para dígito 3

B C A para dígito 4

C A B para dígito 5

C B A para dígito 6

Foram ignorados os dígitos 0, 7, 8 e 9

Para isto as caixas com os grupos oxamniquine , praziquantel e controle, foram denominadas de A, B e C respectivamente.

Os camundongos integrantes de cada bloco eram provenientes de caixas diferentes. Assim o bloco ABC foi constituído por um camundongo da caixa A, um da caixa B e outro da C. Para o ensaio com cada uma das drogas foram utilizados cinco blocos de três camundongos. A caixa C recebeu a mais um camundongo passando a ser constituída por dezesseis indivíduos.

Os dígitos foram obtidos, usando-se a tabela de números aleatórios e associando-se a seguir cada dígito a uma combinação de letras correspondentes.

Desta maneira, foi gerada uma lista aleatória de tratamentos(Pocock, 1986).

### **3.8 - INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS**

As cercárias foram obtidas no laboratório a partir da exposição individual de moluscos positivos à luz e calor de 28°C, durante período de duas horas. Os moluscos, para isto, eram colocados em 5ml de água dechlorada em frascos boca larga (Olivier & Stirewalt, 1952).

Em seguida, preparou-se um “pool” de cercárias. Foram usados, no mínimo 40 moluscos positivos, a fim de se conseguir uma infecção com equilíbrio no sexo dos vermes (Pellegrino & Katz, 1970). Para infectar os camundongos utilizou-se a técnica de imersão da cauda do animal nos tubos de ensaio contendo suspensão de cercárias (70 cercárias por animal). O conjunto foi exposto à luz e calor de 28°C, durante duas horas (Magalhães, 1969 b). Os animais foram imobilizados segundo a técnica descrita por Broome & Radke (1971) e adaptada por Figueiredo (1991).

### **3.9 - CAPACIDADE DE PENETRAÇÃO DE CERCÁRIAS**

Após a exposição dos camundongos à suspensão de cercárias por duas horas, o animal foi retirado e sua cauda foi lavada com jato de água a qual foi recolhida em placa de Petri. Em seguida, o conteúdo do tubo de ensaio, usado na exposição da cauda do camundongo, foi vertido na mesma placa. Acrescentou-se então ao conjunto 1 ml de álcool 70% e deixou-se decantar por 10 minutos para facilitar a contagem das larvas. O número de cercárias penetrantes foi obtido pela diferença entre o número de cercárias a que cada camundongos foi exposto e o número de cercárias inteiras e/ou porções cefálicas encontradas posteriormente na placa (Magalhães, 1969 b).

### **3.10 - MORTALIDADE DE CAMUNDONGOS**

A mortalidade de camundongos foi registrada diariamente, durante 10 semanas após a infecção, quando os animais foram então sacrificados.

### **3.11 - TRATAMENTOS DE CAMUNDONGOS COM DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS**

Os camundongos receberam o tratamento depois dos 55 dias de infecção. Após as pesagens dos animais, as drogas foram administradas nas seguintes dosagens:

Grupo O - Oxamniquine (mansil, xarope) - dose única 100mg/kg, via oral, diluído em água destilada.

Grupo P - Praziquantel (sal puro) - 5 dias, 100mg/kg, via oral, diluído em cremophor 1% em solução aquosa contendo 25% de glicerina (Coles *et alii*, 1986).

Grupo C - recebeu 0,3 ml de salina, via oral, dose única.

A droga foi administrada por tubagem gástrica. O grupo O recebeu oxamniquine, o grupo P recebeu praziquantel e o grupo C recebeu salina.

O intervalo entre o término do tratamento e perfusão foi de 14 dias.

### **3.12 - PERFUSÃO DOS CAMUNDONGOS**

Os camundongos foram sacrificados aos 69 dias após a infecção, por deslocamento da coluna cervical e seu sistema porta-hepático foi perfundido (Yolles *et alii*, 1947), com o intuito de recolher vermes. Os vermes da veia porta foram somados àqueles do sistema das veias mesentéricas.

### **3.13 - COLETA DE VERMES**

Após a perfusão, o fígado de cada animal foi esmagado entre duas placas de vidro para a verificação da existência de vermes não recolhidos pela perfusão (Hill, 1959). Todos os vermes foram examinados, separados e classificados, conforme a localização, sexo e vitalidade.

### **3.14 - ESTUDO MORFOLÓGICO DOS VERMES**

#### **3.14.1 - FIXAÇÃO, COLORAÇÃO E MONTAGEM DOS VERMES**

Os vermes coletados na perfusões dos camundongos do grupo controle (infectado e não tratados), foram primeiramente fixados em álcool 70%, para posterior coloração (Schell, 1969).

A coloração utilizada foi pelo carmim clorídrico e os vermes foram montados em bálsamo do Canadá em lâminas de vidro. Foi montado um verme por lâmina e ao todo 101 machos e 96 fêmeas, para a realização das medidas.

#### **3.14.2 - MORFOMETRIA DOS VERMES**

As medições foram feitas em mesa digitalizadora (Digigraf - Itaotec). Aqueles vermes que não se encontravam em posição adequada não foram medidos.

Para as medições, usou-se microscópio óptico com câmara clara, mesa digitalizadora acoplada a um microcomputador e programação idealizada pelo Prof. Dr. Eduardo Buzatto, do Departamento de Computação do Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação da UNICAMP.

Os vermes foram observados em microscópio com aumento de 32X e a imagem projetada sobre a mesa digitalizadora. Em seguida, mediu-se o comprimento do verme, cujo valor foi inserido diretamente no computador.

### **3.15 - AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS ESQUISTOSSOMICIDAS**

A avaliação da suscetibilidade do verme a drogas esquistossomicidas obedeceu os seguintes critérios:

#### **3.15.1 - PERCENTAGEM DE VERMES NAS VEIAS INTRA-HEPÁTICAS, E PORTA E MESENTÉRICAS**

Esta percentagem foi obtida do total de vermes coletados na perfusão

#### **3.15.2 - PERCENTAGEM DE VERMES MORTOS**

### 3.15.3 - PERCENTAGEM DE VERMES SOBREVIVENTES (Jansma *et alii*, 1977)

$$\% \text{ de vermes sobreviventes} = \frac{T \times 100}{C}, \text{ onde:}$$

T = número médio de vermes vivos no grupo teste

C = número médio de vermes vivos no grupo controle

### 3.15.4 - PERCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DE VERMES

Após feita a contagem de vermes, depois da perfusão do sistema porta-hepático dos camundongos, foi calculado a percentagem de recuperação dos vermes a partir do número de cercárias penetrantes por camundongo.

### 3.15.5 - PERCENTAGEM DE REDUÇÃO DE VERMES (Gonnert & Andrews, 1977)

$$\% \text{ de redução de vermes} = \frac{100 \times \text{número de verme mortos}}{\text{número de vermes mortos e vivos}}$$

### 3.15.6 - PERCENTAGEM DE EFICÁCIA DA DROGA (Kemp *et alii*, 1956)

$$\% \text{ de eficácia} = \frac{X - Y}{X} \times 100$$

X = número médio de vermes vivos no grupo controle

Y = número médio de vermes vivos no grupo teste

### **3.16 - OOGRAMA**

De cada animal que teve o seu sistema porta-hepático perfundido, foi realizado o oograma de fragmento do intestino delgado, para a verificação dos diversos estágios dos ovos.

A classificação dos estágios de desenvolvimento dos ovos imaturos seguem os seguintes critérios (Prata, 1957; Pellegrino *et alii*, 1962): no primeiro estágio, o embrião ocupa um terço do diâmetro transversal do ovo; no segundo estágio, o embrião tem o seu tamanho aproximadamente igual ao diâmetro transversal do ovo; no terceiro estágio, o embrião ocupa dois terços do diâmetro longitudinal do ovo; no quarto estágio, o embrião ocupa praticamente a casca do ovo inteira. Os ovos maduros, contém um miracídio completamente desenvolvido. Os ovos mortos e as cascas também foram classificados. Foram observados cerca de 300 ovos por animal (Pellegino & Katz, 1968). Consideramos oograma alterado quando havia ausência de um ou mais estágios do desenvolvimento do embrião.

### **3.17 - PESO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS**

Todos os camundongos foram pesados em balança semi-analítica, nas datas da infecção, do tratamento e do sacrifício.



### **3.18 - PESO DO FÍGADO E DO BAÇO**

O fígado e o baço dos camundongos dos grupos C e S (Controle infectado e Sadio) foram retirados após a perfusão, para pesagem em balança semi analítica.

Os animais foram sacrificados em idades equivalentes para padronização metodológica.

### **3.19 - CORTES HISTOLÓGICOS**

Para o estudo das dimensões dos granulomas hepáticos, retirou-se um pequeno fragmento do lobo maior do fígado de cada camundongo do grupo Controle (infectado e não tratado).

O material foi fixado em Bouin aquoso 5%, incluído em parafina e, posteriormente, processado visando obtenção de cortes histológicos de 5µm de espessura em micrótomo rotativo, a seguir os cortes foram corados pela hematoxilina e eosina (HE). Para cada fragmento de fígado foram montadas 6 lâminas, com 5 a 10 cortes seriados em cada . O intervalo de corte obedecido foi de 400µm para duas lâminas seriadas (Guaraldo, 1987).

### **3.20 - MEDIDAS DOS DIÂMETROS DAS REAÇÕES GRANULOMATOSAS**

A verificação do tamanho da reação granulomatosa foi obtida através da média de 2 diâmetros intercruzados em ângulo reto (Carvalho *et alii*, 1986; Zanotti & Magalhães, 1987; Guaraldo, 1987; Coelho *et alii*, 1989).

Com a finalidade de se obter maior precisão no ângulo entre as medidas, utilizou-se ocular micrométrica Zeiss 8X. Optou-se também, em fornecer a área do granuloma, utilizando-se o produto de dois diâmetros maior e menor. Para cada camundongos foram medidos apenas as reações que apresentavam com nitidez um ovo na sua porção central, presentes nos cortes das 6 lâminas examinadas (Zanotti & Magalhães, 1987; Guaraldo, 1987).

### **3.21 - MORFOMETRIA DOS OVOS**

#### **3.21.1 - PREPARAÇÃO DO MATERIAL**

Para a realização das medidas dos ovos, foram coletadas fezes de camundongos de todos os grupos infectados e controle, por ocasião de 45 a 50 dias de infecção (antes do tratamento). Mediu-se 120 ovos oriundos dos três grupos .

O material foi lavado segundo a técnica descrita anteriormente, (item 3.4) mantendo-se em solução salina (0,85%) gelada.

O material foi observado entre lâmina e lamínula, sempre no mesmo microscópio óptico, com objetiva de 10X e os ovos medidos com ocular micrométrica Zeiss 8X. Foram medidos os maiores comprimentos e larguras dos ovos, cujo espículo estivesse claramente visível no plano horizontal (Paraense & Corrêa, 1981).

### **3.22 - ANÁLISE DOS RESULTADOS**

O sistema SAS<sup>®</sup> versão 6.04 (1986) foi utilizado para leitura e processamento dos dados. Utilizamos o procedimento UNIVARIATE para o cálculo das estatísticas sumárias contidas nas tabelas do ANEXO. Para gráficos e “box-plots”, foram utilizados os procedimentos GPLOT, SHEWHART e CAPABILITY. Todas as análises de variância foram realizadas ao nível de significância de 0,0001 e os testes de comparações múltiplas de Duncan a 0,05.

O diagrama de caixa (“box-plot”) é um gráfico simples que fornece uma grande quantidade de informação sobre características de um conjunto de dados.

Diagramas de caixas descrevem a massa dos dados por um retângulo (caixa) cujos limites inferior e superior são, respectivamente, o primeiro (Q1) e o terceiro (Q3) quartis. A mediana (Q2) ou segundo quartil é designada por uma linha horizontal traçada dentro do retângulo. A média é denotada por um símbolo “+”. Linhas verticais são extraídas dos finais das caixas para um valor adjacente inferior e superior. O valor adjacente superior é a maior observação que é menor ou igual a  $Q3 + 1,5 (Q3 - Q1)$ . O valor adjacente inferior é a menor observação que é maior ou igual a  $Q1 - 1,5 (Q3 - Q1)$ . Quaisquer valores que caiam fora dos valores adjacentes são destacados separadamente sobre o gráfico (com um símbolo  $\square$ ), pois eles identificam observações discrepantes (“outliers”). As posições relativas dos quartis Q1, Q2 e Q3, bem como as observações discrepantes, dão uma idéia da assimetria da distribuição.

Detalhes sobre os procedimentos estatísticos estão nas tabelas do Anexo.

## **4 - RESULTADOS**

### **4.1 - ESTUDO DA LINHAGEM NO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO**

#### **4.1.1 - PERÍODO PRÉ - PATENTE, PATENTE E POSITIVIDADE**

Após análise dos dados de eliminação de cercárias dos moluscos infectados com 1 e 10 miracídios (figura 2 e tabela I) foi observado que os períodos pré-patentes destes dois grupos são iguais (35 dias). O grupo infectado com 10 miracídios chegando a obter, durante os 77 dias de observação, índices de positividade de até 40,9%. Os índices de positividade do grupo infectados com um miracídio foram de 35,4%. Do 35º até o 63º dia de infecção (28 dias), os moluscos de ambos os grupos eliminaram cercárias. Este seria o período patente.

#### **4.1.2 - MORTALIDADE**

Foi analisada a significância das diferenças entre os índices de mortalidade dos moluscos (figura 3), comparando a homogeneidade das distribuições do número de mortes em cada período de observação, para estes três grupos, através do teste qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ). Como ocorreram mortalidades iguais em certas semanas de observação (tabela I), as mortalidades foram classificadas em períodos mais longos para atender as propriedades do teste  $\chi^2$ . Assim, a mortalidade foi analisada nos períodos de 0

a 28 dias, 28 a 42 dias, 42 a 56 dias, 56 a 70 dias, obtendo-se  $\chi^2 (10) = 24,76$  o que corresponde a significância de 0,006. Isto indica que houve diferença significativa entre a mortalidade dos 3 grupos nos períodos de observação. O mesmo teste foi aplicado nos grupos expostos a 1 e 10 miracídios resultando em  $\chi^2 (5) = 2,13$  com significância de aproximadamente 0,831, o que nos leva a concluir que não há diferenças significativas entre as mortalidades dos moluscos infectados com 1 e 10 miracídios (Tabela I; figura 3). Os moluscos que não eliminaram cercárias durante o experimento, foram esmagados em placas de vidro e não foram observados esporocistos no tecido.

## **4.2 - ESTUDO DA LINHAGEM NO HOSPEDEIRO DEFINITIVO**

### **4.2.1 - CERCÁRIAS PENETRANTES E VERMES RECUPERADOS**

A percentagem de vermes recuperados foi calculada apenas para o grupo controle (infectado, não tratado). Os dados sobre as distribuições do número de cercárias penetrantes, número de vermes recuperados, percentagem de cercárias penetrantes e percentagem de vermes recuperados nos camundongos do grupo controle, encontram-se na figura 4. Os números médios de cercárias penetrantes foram de 65,3 para o grupo controle; 66,6 para o grupo oxamniquine e 65,4 para o grupo praziquantel (tabelas 1, 2 e 3 do Anexo). As percentagens médias de penetração de cercárias foram

respectivamente para os grupos controle, oxamniquine e praziquantel de 93,3%, 95,1% e 93,5%. A análise de variância desses dados, não rejeita a hipótese de igualdade entre as médias dessas percentagens  $F(2,43) = (0,93)$  a uma significância de 0,4014. A percentagem média de vermes recuperados (figura 4) para o grupo controle anteriormente citado foi de 52,1%.

#### 4.2.2 - PESOS CORPORAIS

A média dos pesos corporais em gramas dos animais de todos os grupos, nas datas de infecção, do tratamento e da perfusão, estão assinalados os resultados na tabela II, e nas tabelas 4, 5, 6 e 7 do Anexo. Na figura 5 aparecem expressas as informações destas tabelas para os pesos nas datas da infecção (iniciais) e da perfusão (finais). As análises das variâncias foram construídas para os testes de igualdade entre as médias dos pesos iniciais e os finais. Ambas as análises indicam evidências de diferenças significativas (inferiores a 0,0001 nos dois casos) nas medidas dos pesos iniciais e finais. Com a análise de comparações múltiplas, com um nível de significância de 0,05, constatou-se no caso do peso inicial, que os camundongos sadios são, em média, significativamente mais pesados que os demais. Os animais do grupo sadio, eram mais velhos do que os animais dos outros grupos. Essa diferença de idade não influenciou na comparação dos pesos corporais, uma vez que, a curva de crescimento para esses animais permanece constante após uma certa idade (Guaraldo, 1987). Além disso, foi utilizado para análise estatística o teste de covariância, para evitar algum tipo de influência sobre o peso dos animais mais velhos e dos mais novos. No caso dos pesos corporais na perfusão, observou-se que o peso final dos camundongos sadios (39,8g) é

significativamente maior que o dos animais do grupo oxamniquine (36,2g) e praziquantel (37,1g) (figura 5). O peso final médio dos camundongos do grupo controle infectado (30,9g) é significativamente inferior aos pesos finais médios dos outros grupos (tabela II e figura 5).

O diagrama de caixa na figura 6 exibe as distribuições do ganho de peso corporal para os animais de todos os grupos entre as datas da infecção e perfusão. O grupo infectado, tratado com praziquantel, obteve um ganho médio de peso de 12,9g, o grupo infectado e não tratado 6,5g e o grupo sadio 12,1g (tabela II). O teste F da análise de variância dá uma significância inferior a 0,0001, gerando evidências de diferenças entre os ganhos médios de peso corporal. Pela análise de comparações múltiplas pelo teste de Duncan, com um nível de significância de 0,05, verificou-se que o grupo controle infectado obteve ganho médio de peso significativamente inferior aos outros grupos. Para os grupos tratados e controle sadios, não houve diferenças significantes.

#### 4.2.3 - PESOS DO FÍGADO E DO BAÇO

Os dados estatísticos referentes aos pesos do fígado e do baço para os grupos sadio e controle infectado e não tratado estão nas tabelas 8 e 9 do Anexo e nas figuras 7 e 8.

Os pesos médios do fígado e baço para o grupo controle infectado (2,37g) e (0,48g) são significativamente mais pesados do que a média dos pesos do grupo sadio (1,55g) e (0,09g). A análise de variância indica diferenças significativas (significância inferior a 0,0001) para ambos os casos.

Com o objetivo de tentar correlacionar o número de cercárias penetrantes e a média dos pesos finais de fígado e baço, foi aplicada uma análise de regressão, onde foi constatada que somente o peso do fígado é significativo (significância=0,0606). O peso do fígado e do baço são linearmente correlacionados ( $r = 0,54$ ).

#### 4.2.4 - MEDIDAS DAS REAÇÕES GRANULOMATOSAS

Para o estudo das dimensões das reações granulomatosas hepáticas foram medidos 70 diâmetros intercruzados ( $\mu\text{m}$ ) maiores e menores dos granulomas. A medida média do granuloma foi de  $326\mu\text{m} \pm 68,5$ . Como medida para análise, optou-se também em fornecer a área do granuloma, utilizando-se o produto de dois diâmetros o maior e o menor. Estes dados encontram-se resumidos na tabela 10 do Anexo. A média da área foi de  $1125,75 \mu\text{m}^2$ , com um desvio padrão (420,51) com distribuição mostrada na figura 9.

### 4.3 - ESTUDO DA SUSCETIBILIDADE DE *Schistosoma mansoni* À DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS

#### 4.3.1 - MORTALIDADE DOS CAMUNDONGOS

Para o estudo da suscetibilidade às drogas esquistossomicidas, devido a mortalidade dos camundongos, foram examinados no grupo controle (infectados não tratados), 12 (80% ) animais entre 15 iniciais. Nos grupos



tratados com oxamniquine e praziquantel foram examinados, 13 (86,7%) entre 15 e 14 (87,5%) entre 16, respectivamente (tabela 14 do Anexo).

#### 4.3.2 - VERMES COLETADOS

Os dados sobre a distribuição dos vermes coletados vivos e mortos classificados por sexo e casal, encontram-se resumidos na tabela III e nas tabelas 11, 12, 13 e 14 do Anexo. A figura 10 exibe os diagramas de caixa para essas distribuições. O número de vermes machos coletados nos camundongos infectados e tratados com oxamniquine é maior do que os coletados nos grupos praziquantel e controle infectado. Nas distribuições dos vermes fêmeas, o número coletado nos camundongos do grupo oxamniquine é maior do que os do grupo praziquantel e controle infectado. Quanto aos vermes coletados como casais, observa-se que os camundongos do grupo controle têm maior quantidade destes vermes que os grupos oxamniquine e praziquantel. Não há diferença significativa entre o número de casais coletados dos grupos tratados.

#### 4.3.3 - VERMES MORTOS E VIVOS

Os dados sobre a classificação dos vermes mortos e vivos, encontram-se resumidos na tabela III e nas tabelas 14, 15, 16 e 17 do Anexo. A figura 11 exibe os diagramas de caixas destas distribuições, sendo que as quantidades de vermes coletados vivos são maiores nos animais do grupo infectado e não tratado, do que em outros grupos. Ressalta-se o encontro de vermes vivos machos, fêmeas e casais nos grupos tratados (Tabela III).

#### 4.3.4 - DISTRIBUIÇÃO DE VERMES

Os dados que se referem à distribuição dos vermes vivos e mortos coletados e classificados pela localização (fígado e mesentério), encontram-se na tabela IV e nas tabelas 18, 19 e 20 do Anexo. Esses dados também são visualizados na figura 12. A quantidade de vermes coletados no fígado dos camundongos é respectivamente crescente nos grupos oxamniquine, praziquantel e controle infectado e não tratado. Quanto aos vermes coletados no mesentério, observou-se uma maior quantidade nos camundongos do grupo controle; não existe diferença significativa nas distribuições destes vermes nos animais dos grupos oxamniquine e praziquantel.

#### 4.3.5 - PERCENTAGEM DE VERMES COLETADOS

Quanto às percentagens de vermes coletados no fígado (figura 13, tabela V e tabelas 21, 22 e 23 do Anexo), constatou-se através da análise de variância que existem diferenças significativas [ $F(2,36) = 40,46$ ] entre as suas médias, com significância inferior a 0,0001. Aplicando-se o teste de comparação múltipla de Duncan, verificou-se ao nível de significância de 0,05 e não haver diferença entre as percentagens médias obtidas nos camundongos infectados tratados com oxamniquine (77,04%) e com praziquantel (80,76%). Porém, ambas diferem significativamente da percentagem média obtida pelos animais infectados e não tratados (12,20%).

Encontramos também diferenças [ $F(2,36) = 85,95$ ] nas percentagens médias de vermes acasalados (Tabela V e tabelas 21, 22 e 23 do Anexo), com uma significância inferior a 0,0001. Pelo teste de comparações múltiplas de Duncan, com um nível de significância de 0,05, observou-se que as percentagens médias dos camundongos tratados com oxamniquine (5,28%) e com praziquantel (10,10%), não são significativamente diferentes, porém estas médias diferem das obtidas pelos camundongos infectados não tratados (79,46%), que é superior às outras duas.

Altamente significativo [ $F(2,36) = 24,89$ ] resultou o teste para diferenças entre percentagens de vermes mortos no fígado (figura 14, Tabela V, tabelas 21, 22 e 23 do Anexo) para os 3 grupos, com uma significância inferior a 0,0001. O teste de comparações múltiplas de Duncan, com nível de significância de 0,05, revelou que não há diferença significativa entre as percentagens médias de vermes mortos no fígado dos camundongos infectados e tratados com praziquantel (70,16%) e a percentagem média dos tratados com oxamniquine (52,46%). Ambas são significativamente maiores que a percentagem média dos camundongos infectados não tratados (0%).

#### 4.3.6 - REDUÇÃO DE VERMES

O teste para diferenças entre as percentagens de redução de vermes (figura 15, tabela V e tabelas 21, 22, e 23 do Anexo) para 3 grupos, também resultou altamente significativo [ $F(2,36)=22,21$ ], com uma significância inferior a 0,0001. O teste de comparações múltiplas de Duncan, de nível de significância de 0,05, revelou que não há diferença significativa entre a percentagem média de vermes mortos no fígado, dos camundongos

infectados e tratados com praziquantel (70,16%), e a percentagem média dos tratados com oxamniquine (52,46%). Porém, ambas são significativamente mais altas que a percentagem média camundongos infectados não tratados (0%).

#### 4.3.7 - PERCENTAGEM DE VERMES SOBREVIVENTES E EFICÁCIA

Nos grupos oxamniquine e praziquantel, as percentagens de vermes sobreviventes foram 30,2% e 12,4% e a eficácia 69,7% e 87,5% respectivamente (Tabela VI).

#### 4.3.8 - OOGRAMA

As percentagens de camundongos com alteração de oograma são iguais (100%) para os grupos tratados com oxamniquine e praziquantel e que diferem do grupo infectado não tratado, onde não houve alteração de oograma (Tabela VI).

### 4.4 - ESTUDO MORFOLÓGICO DA LINHAGEM DE *Schistosoma mansoni*

#### 4.4.1 - OVOS

No estudo morfológico dos ovos de *S. mansoni*, foram obtidas 120 medidas ( $\mu\text{m}$ ) de comprimento e largura destes ovos. Suas medidas são:  $146,27 \mu\text{m} \pm 7,87$  de comprimento e  $62,33\mu\text{m} \pm 2,88$  de largura. Como parâmetro para análise, tomamos o produto destas medidas por representar proporcionalmente a área dos ovos. A média destes produtos foi de  $9.122,36\mu\text{m}^2$  com desvio padrão (693,37) de sua distribuição mostrada na figura 16 e tabela 24 do Anexo.

#### 4.4.2 - VERMES

Para o estudo do tamanho dos vermes foram medidos 101 comprimentos (mm) de vermes machos e 96 comprimentos (mm) de fêmeas (Figura 17, tabela 25 do Anexo). O comprimento médio das fêmeas mediam  $15,52\text{mm} \pm 4,30$  e os machos mediam  $13,39\text{mm} \pm 2,17$ . De acordo com a análise de variância, observou-se uma forte evidência (inferior a 0,0001) de diferença significativa entre os comprimentos médios  $13,39\text{mm} \pm 2,17$  para os machos, e de  $15,52\text{mm} \pm 4,30$  para as fêmeas.

## FIGURAS E TABELAS

**Tabela I** - Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata* infectados com 1 e 10 miracídeos da geração parental de *Schistosoma mansoni* isolado do município de Ourinhos, SP.

Dias de observação  após a infecção	MOLUSCOS INFECTADOS								Controle	
	com 10 miracídeos				com 1 miracídio				não infectado	
	vivos	mortos	positivos		vivos	mortos	positivos		vivos	mortos
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0	60	0,0	0	0,0	60	0,0	0	0,0	60	0,0
7	58	3,3	0	0,0	56	6,67	0	0,0	48	20,0
14	49	18,3	0	0,0	52	13,3	0	0,0	43	26,7
21	46	23,3	0	0,0	50	16,7	0	0,0	40	33,3
28	40	33,3	0	0,0	39	35,0	0	0,0	38	36,6
35	38	36,6	5	13,1	37	38,3	2	5,4	38	36,6
42	29	51,6	11	37,8	31	48,3	11	35,4	37	38,3
49	22	63,3	9	40,9	22	63,3	3	13,6	30	50,0
56	15	75,0	3	20,0	11	81,6	3	27,2	29	51,6
63	12	80,0	2	16,6	10	83,3	3	30,0	25	58,3
70	8	86,7	0	0,0	8	86,7	0	0,0	21	65,0
77	6	90,0	0	0,0	6	90,0	0	0,0	19	68,3

Obs: em cada grupo foram infectados 60 moluscos

**Tabela II.-** Média dos pesos corporais(g) de camundongos infectados com 70 cercárias, da geração F1 de *Schistosoma mansoni* isolado do município de Ourinhos, SP

GRUPOS	NÚMERO DE CAMUNDONGOS	PESO CORPORAL			
		INICIAL	TRATAMENTO	FINAL	VARIAÇÃO
			55 DIAS	69 DIAS	
SADIO	20	$27,75 \pm 1,63$	--	$39,85 \pm 3,40$	$12,10 \pm 1,77$
PRAZIQUANTEL	16	$24,19 \pm 1,57$	$33,04 \pm 2,94$	$37,09 \pm 3,92$	$12,90 \pm 2,35$
OXAMNIQUINE	15	$24,64 \pm 1,80$	$34,46 \pm 2,91$	$36,24 \pm 4,17$	$11,60 \pm 2,37$
CONTROLE	15	$24,43 \pm 2,37$	$32,44 \pm 3,46$	$30,94 \pm 3,73$	$6,51 \pm 1,36$



**Tabela III** - Número médio de vermes coletados em camundongos dos grupos controle, praziquantel e oxamniquine infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP

NÚMERO MÉDIO DE VERMES COLETADOS												
GRUPO	VIVOS						MORTOS					
	MACHO		FÊMEA		CASAL		MACHO		FÊMEA		CASAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
CONTROLE	4,25±4,1	12,5	2,42±35	7,15	13,58±4,9	40,1	0,0	0	0,0	0	0,0	0
PRAZIQUANTEL	4,71±2,6	48,5	3,86±1,9	39,7	0,57±1,3	5,8	4,00±2,0	41,1	1,28±1,0	13,1	1,28±1,0	13,1
OXAMNIQUINE	9,08±4,7	52,6	7,08±29	41,0	0,54±1,3	3,1	5,84±5,3	33,8	1,18±1,4	6,8	--	17,23±13,8

Dosagens: praziquantel - 100mg/Kg/5 dias, via oral  
oxamniquine - 100mg/Kg/dose única, via oral

**Tabela IV** - Distribuição média de vermes coletados nos grupos (controle, praziquantel e oxamniquine) de camundongos infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni* isolado no município de Ourinhos, SP

GRUPOS DOS CAMUNDONGOS	DISTRIBUIÇÃO DE VERMES			
	FÍGADO		MESENTÉRIO	
	N	%	N	%
CONTROLE	5,25 ± 13,57	15,51	28,58 ± 12,24	84,48
PRAZIQUANTEL	7,79 ± 2,08	80,14	1,93 ± 1,68	19,85
OXAMNIQUINE	13,31 ± 5,17	77,23	3,92 ± 3,33	22,76

Dosagens: praziquantel - 100 mg/Kg/5 dias, via oral  
oxamniquine - 100 mg/Kg/dose única, via oral

**Tabela V** - Percentagens de vermes coletados no fígado, de vermes acasalados, de redução de vermes e de vermes mortos no fígado nos grupos de camundongos (controle, praziquantel e oxamniquine) infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado no município de Ourinhos - SP.

GRUPO	(n)	% DE VERMES COLETADOS NO FÍGADO	% DE VERMES ACASALADOS	% DE REDUÇÃO DE VERMES	% DE VERMES MORTOS NO FÍGADO
CONTROLE	12	12,20 ± 28,16	79,46 ± 13,40	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PRAZIQUANTEL	14	80,76 ± 14,50	10,10 ± 20,24	58,48 ± 24,43	70,16 ± 24,72
OXAMNIQUINE	13	77,04 ± 20,41	5,28 ± 11,81	42,85 ± 30,35	52,46 ± 36,98

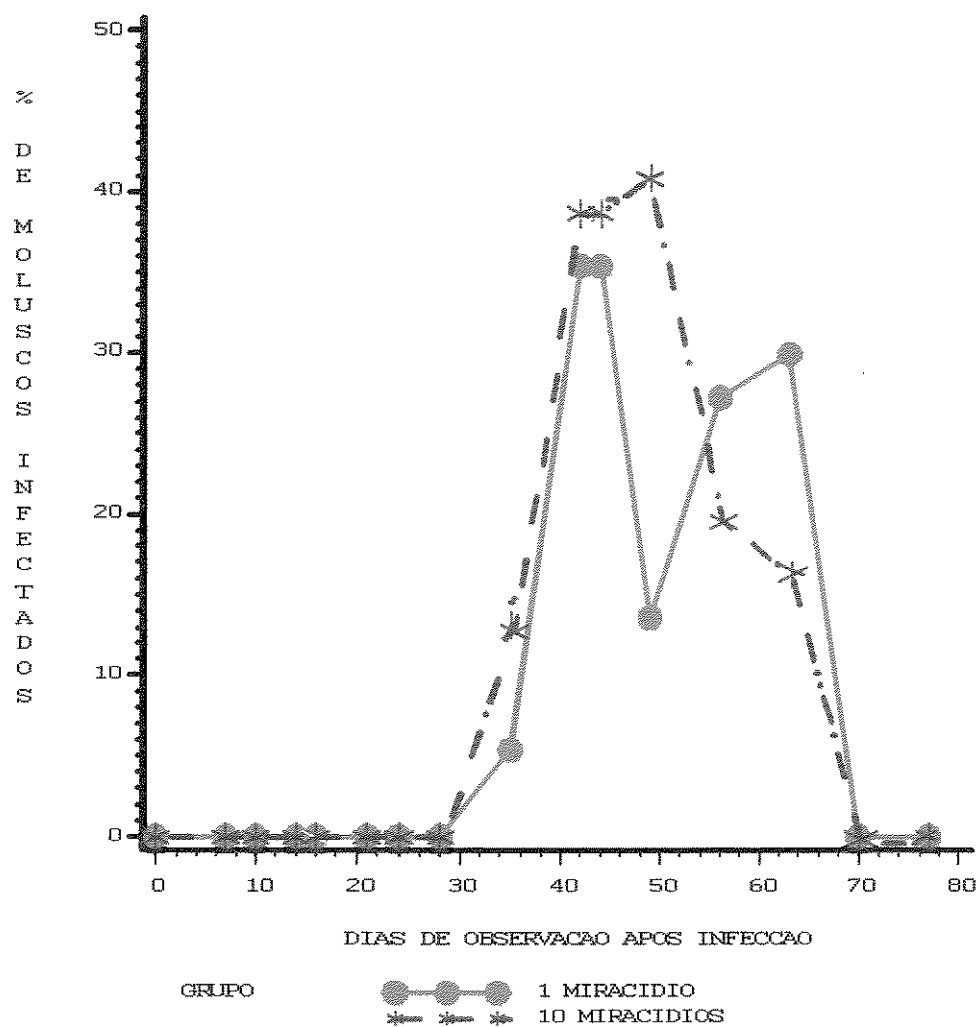
Dosagens: praziquantel - 100 mg/Kg/5 dias, via oral  
oxamniquine - 100 mg/Kg/dose única, via oral

**Tabela VI** - Suscetibilidade à drogas esquistossomicidas de camundongos infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni* isolado do município de Ourinhos, SP.

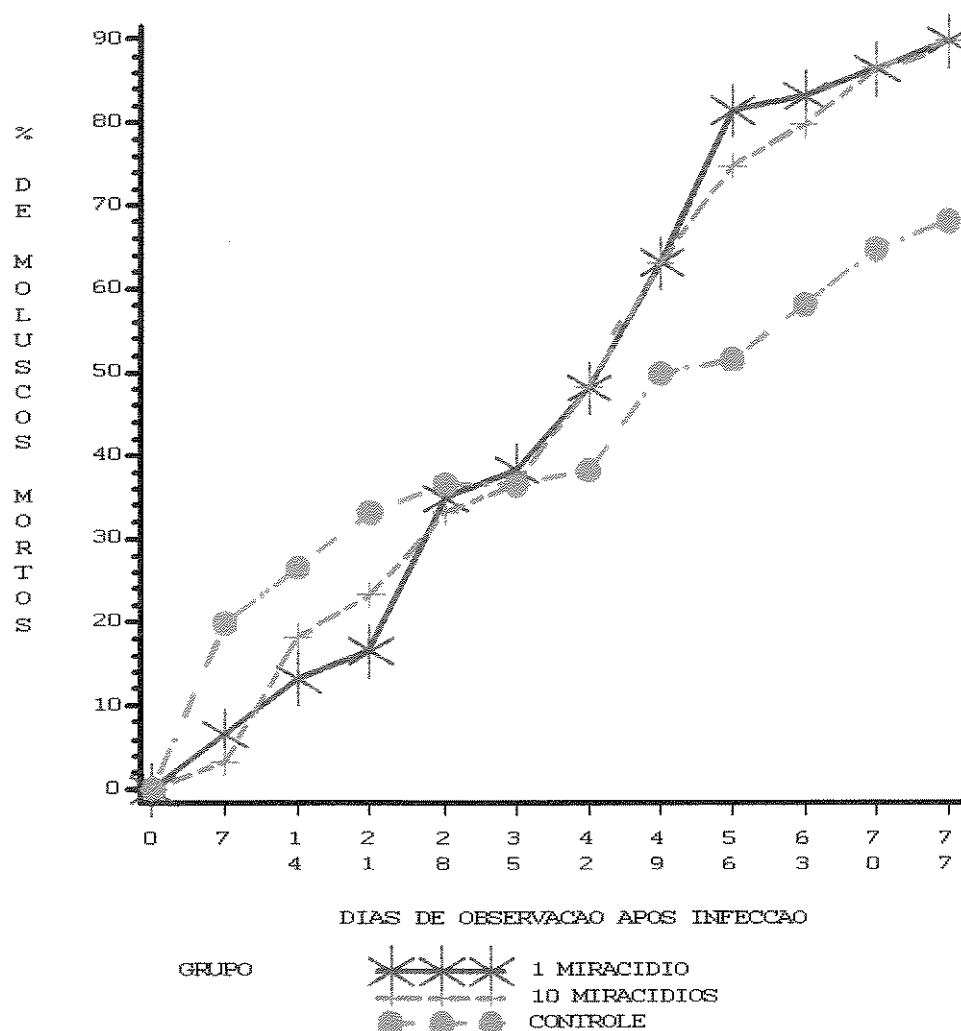
<b>Grupo de Tratamento</b>	<b>% de animais com alteração de oograma</b>	<b>% de vermes sobreviventes</b>	<b>% de eficácia</b>
Controle	0	-	-
Oxamniquine	100	30,24	69,76
Praziquantel	100	12,46	87,54

Dosagens: praziquantel - 100 mg/kg/5 dias, via oral  
 oxamniquine - 100 mg/kg/dose única, via oral

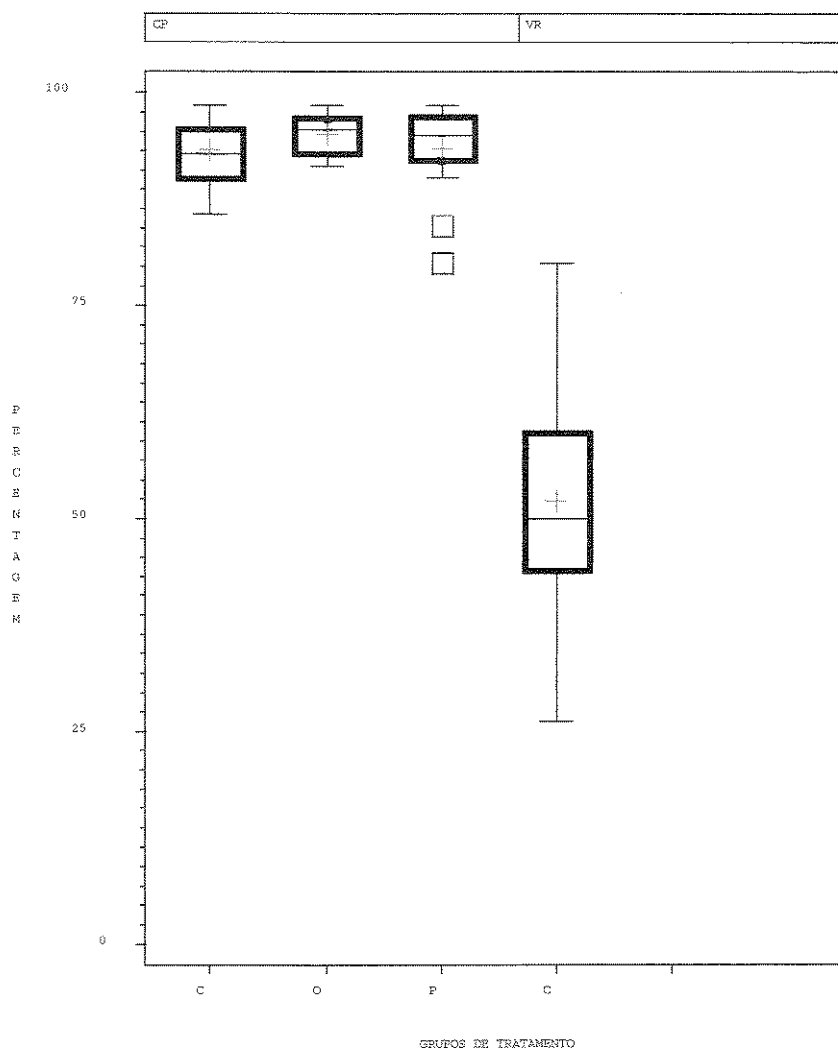




**Figura 2** - Cinética da eliminação de cercárias de *Biomphalaria glabrata* infectadas com 1 e 10 miracídeos da geração parental de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

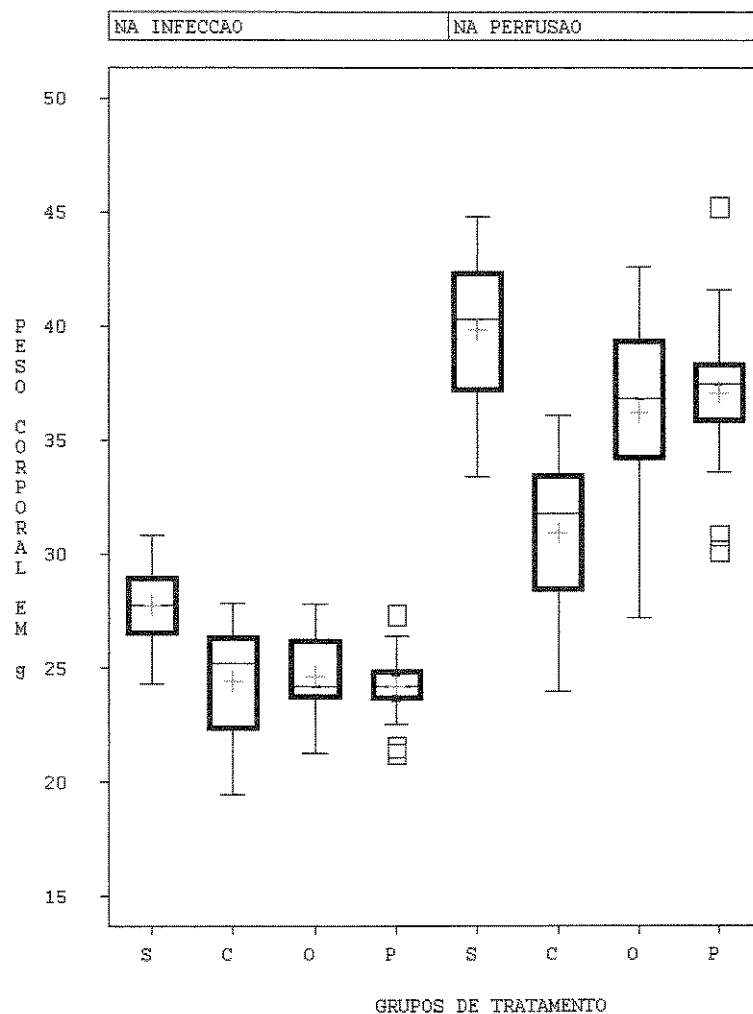


**Figura 3** - Mortalidade de *Biomphalaria glabrata* não-infectada (controle) e infectadas com 1 e 10 miracídeos, da geração parental de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

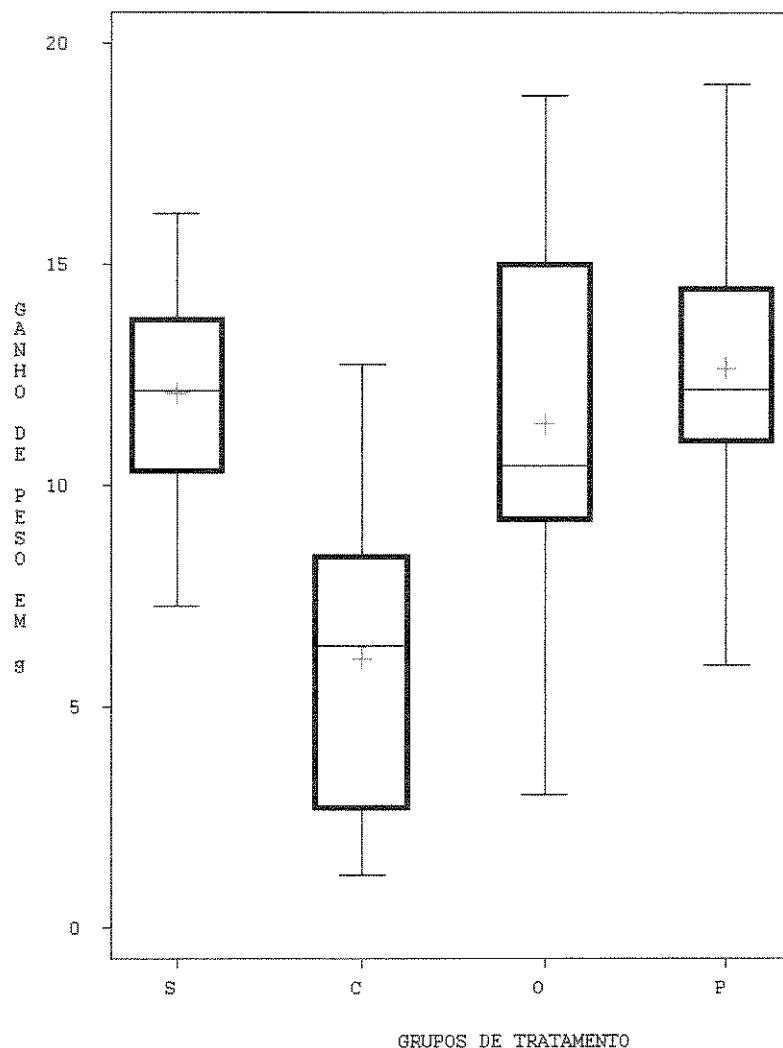


**Figura 4** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para as distribuições das percentagens de cercárias penetrantes ( CP ) dos camundongos infectados ( C- controle, O- oxamniquine e P- praziquantel ) e de vermes recuperados do grupo( C- controle) com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

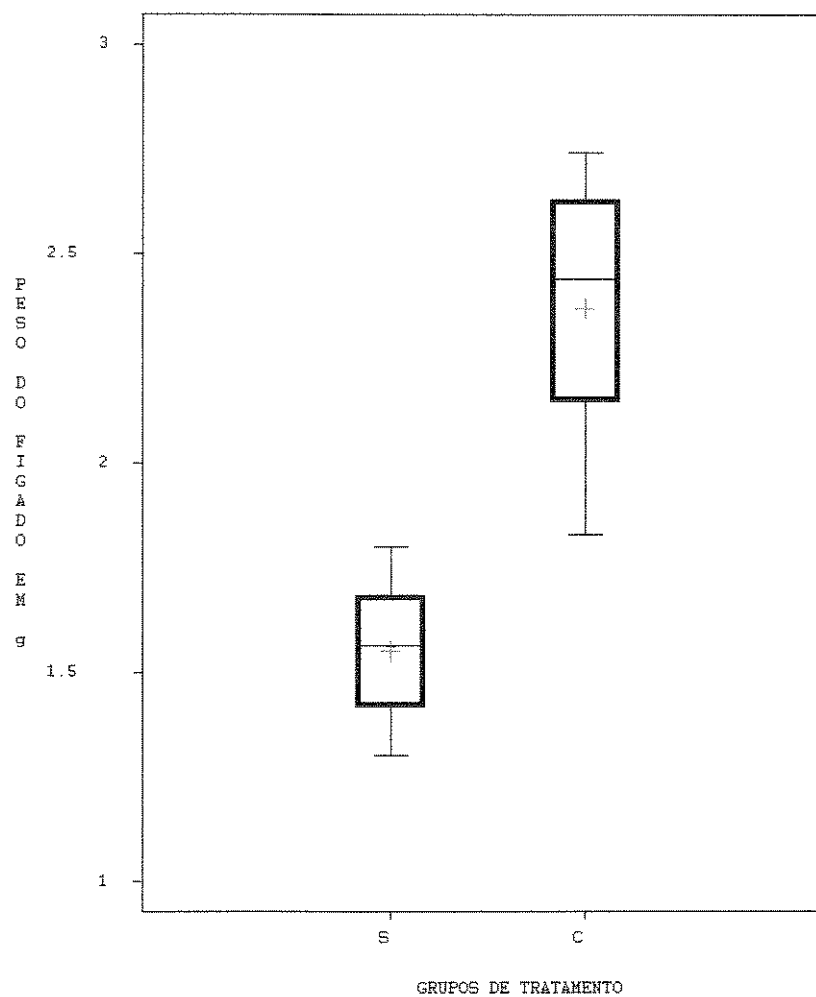




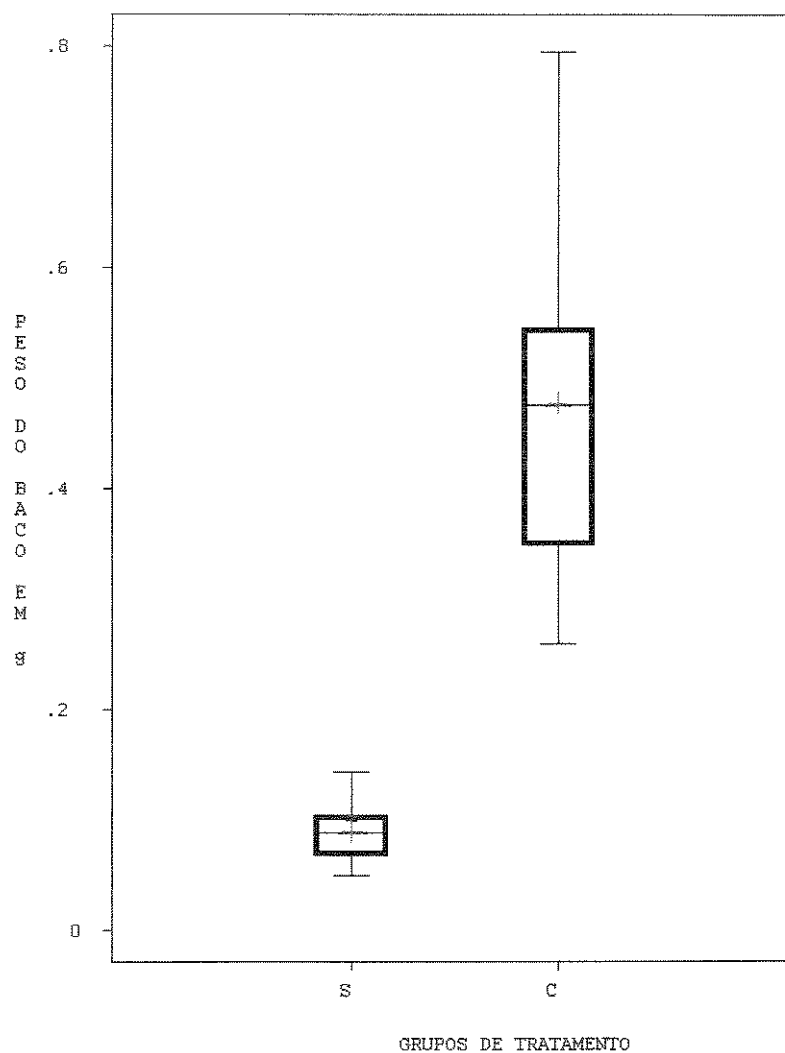
**Figura 5** - Diagramas de Caixas ("Box-plots") para a distribuição dos pesos corporais (g), nas datas da infecção e perfusão, de camundongos sadios (S) e infectados (C - Controle, O - Oxamniquine e P - Praziquantel), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.



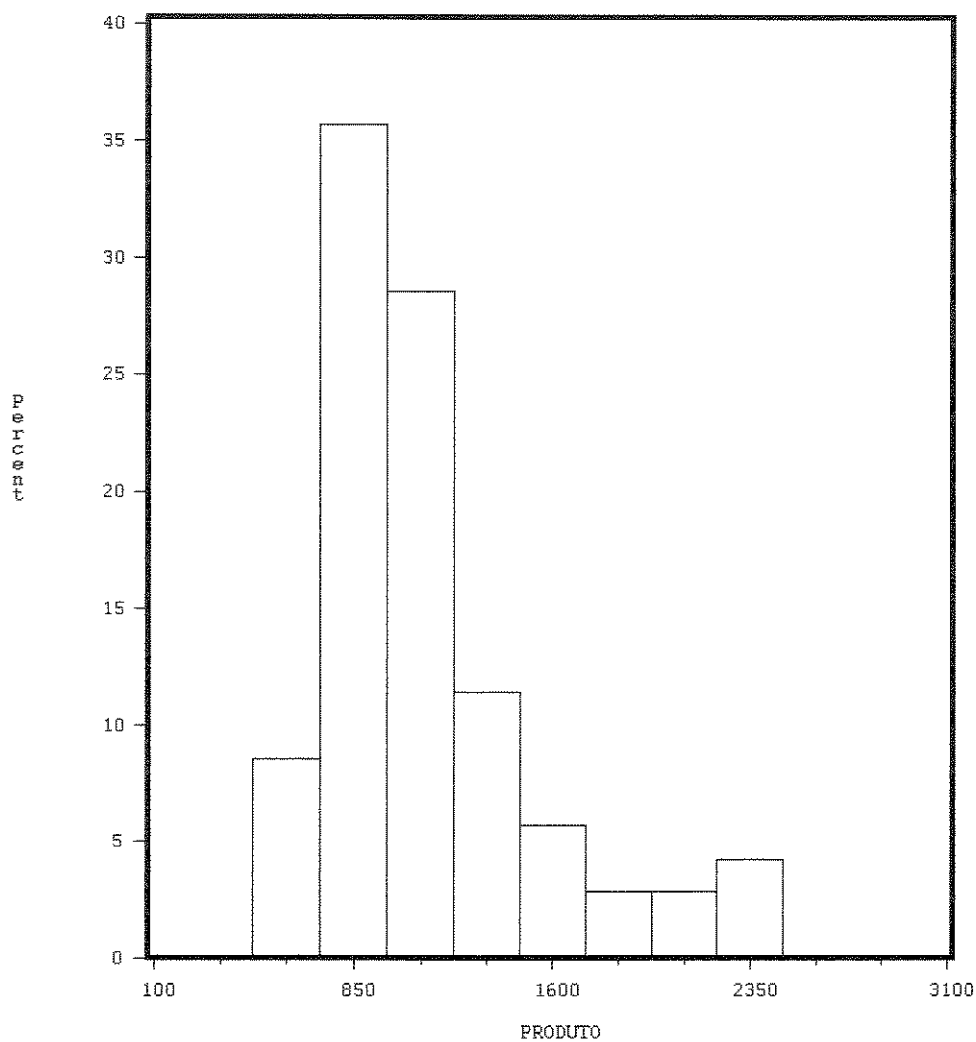
**Figura 6** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição do ganho de peso corporal (g), entre as datas da infecção e perfusão, de camundongos sadios ( S ) e infectados (C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.



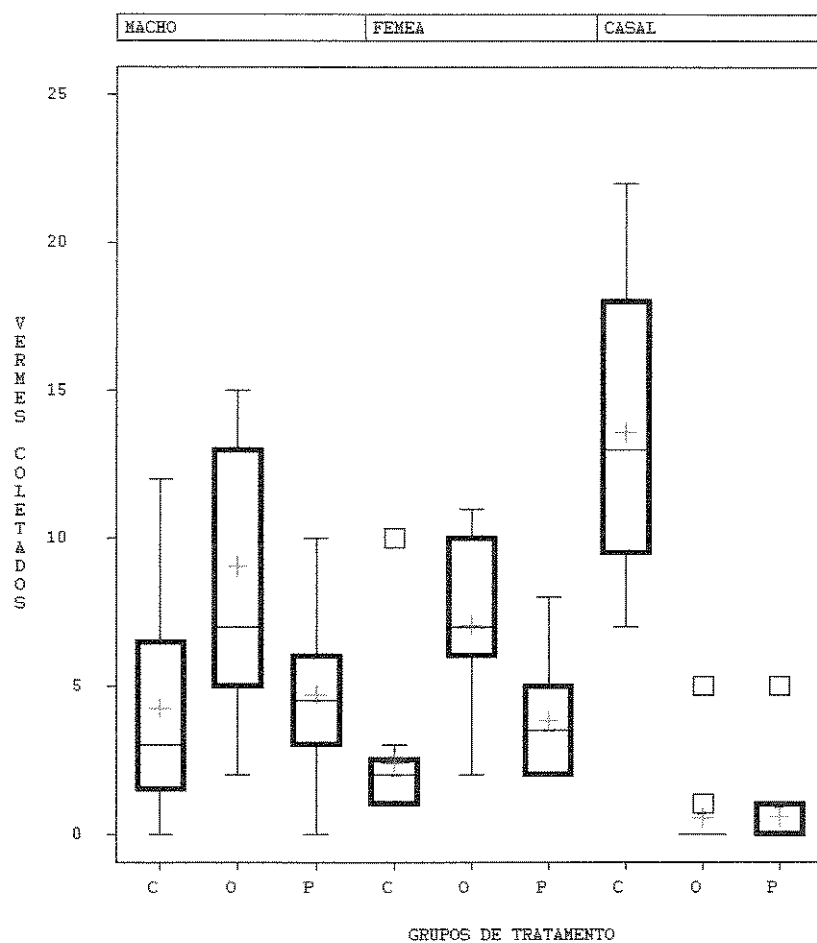
**Figura 7** - Diagrama de caixas ("Box-plots") para a distribuição do peso do fígado ( g ) de camundongos sadios ( S ) e infectados (grupo C) com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.



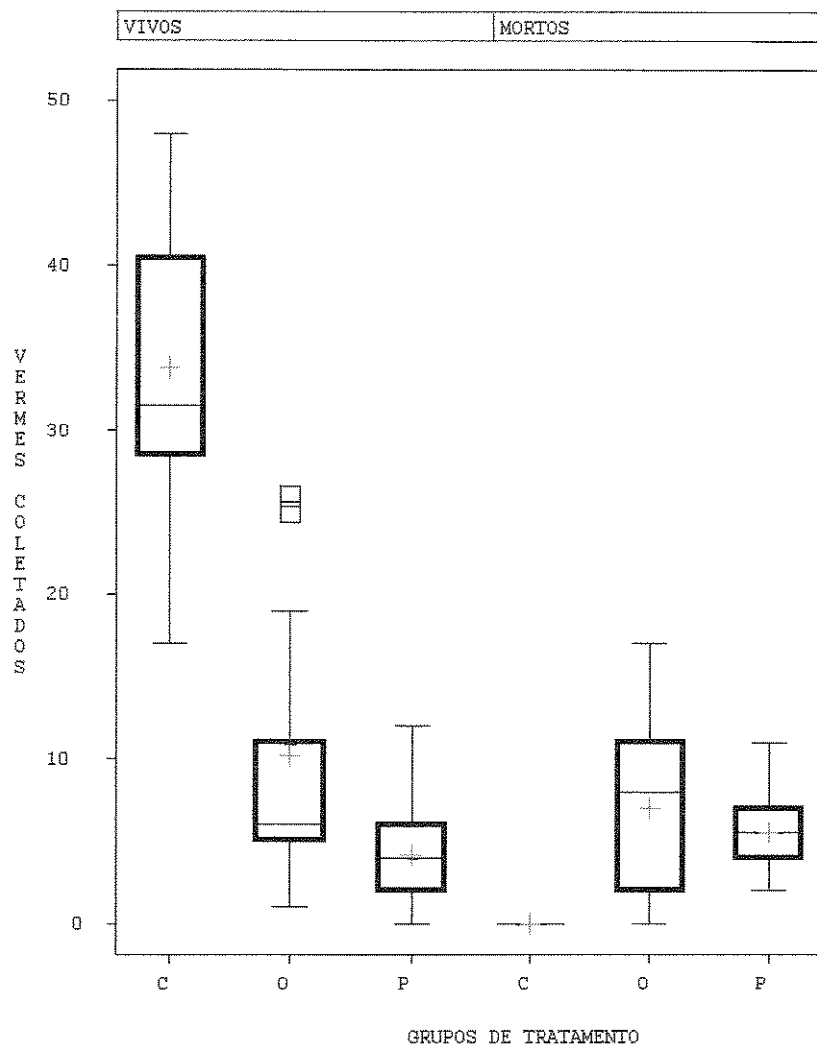
**Figura 8** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição do peso do baço ( g ) de camundongos saudáveis ( S ) e infectados (grupo C) com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.



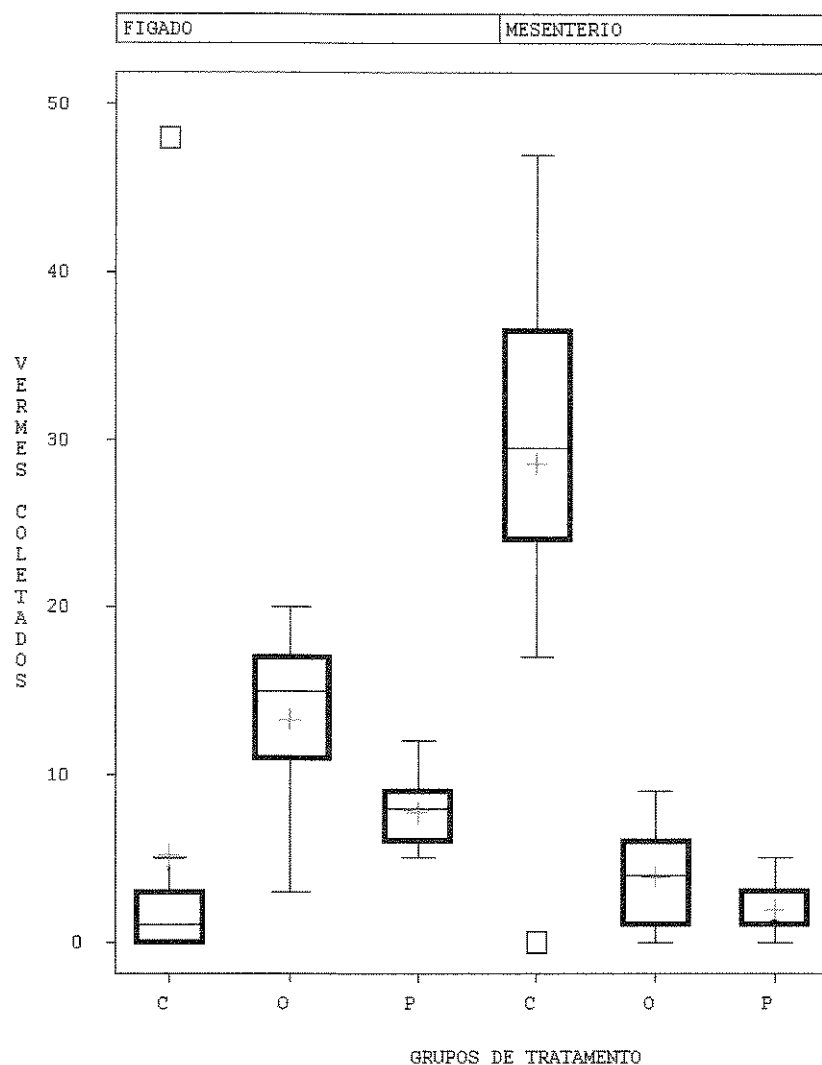
**Figura 9** - Distribuição amostral do produto das medidas ( em  $\mu\text{m}^2$ - área ) de comprimento e largura dos granulomas de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.



**Figura 10** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição por sexo, dos vermes coletados nos camundongos dos grupos ( C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

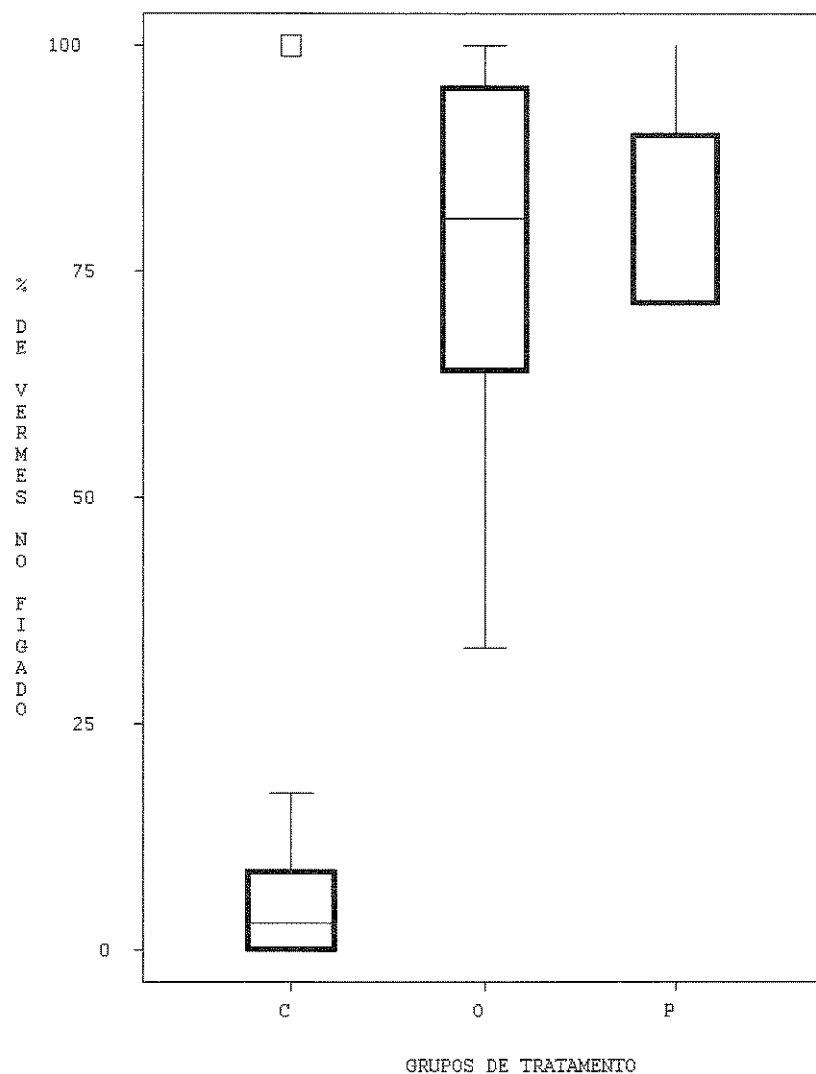


**Figura 11** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição vitalidade, dos vermes coletados nos camundongos dos grupos ( C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel ), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

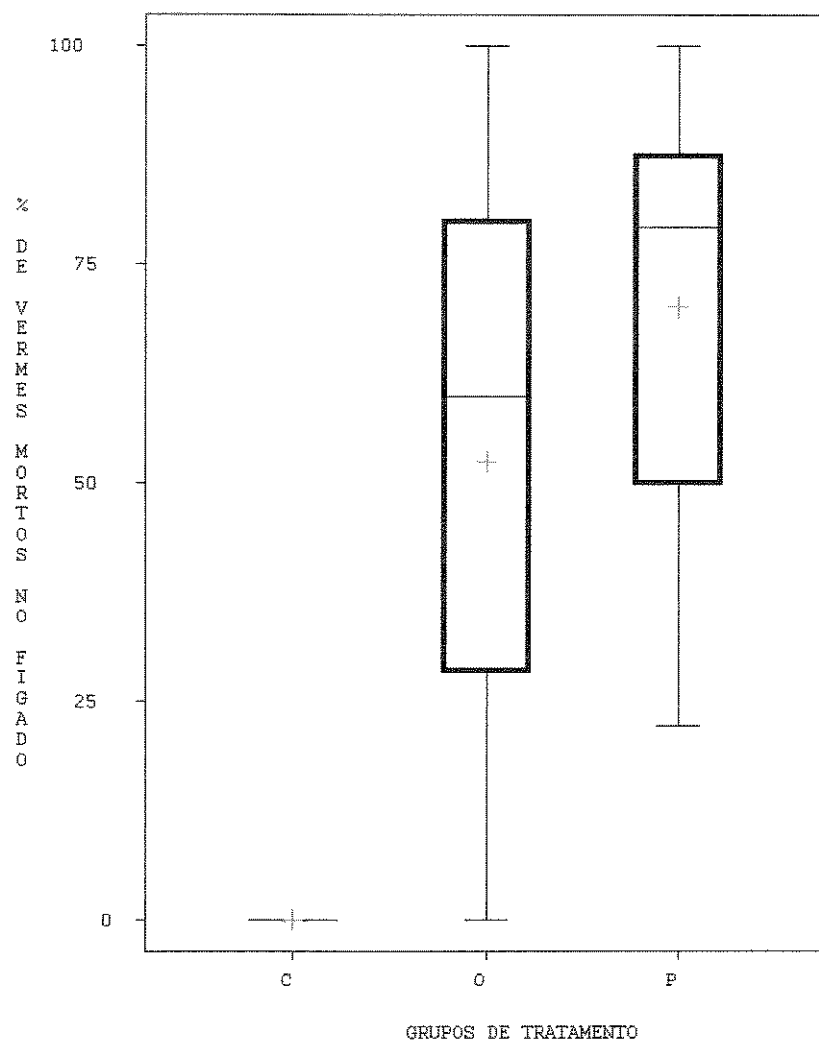


**Figura 12** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição por localização, dos vermes coletados nos camundongos dos grupos ( C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel ), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

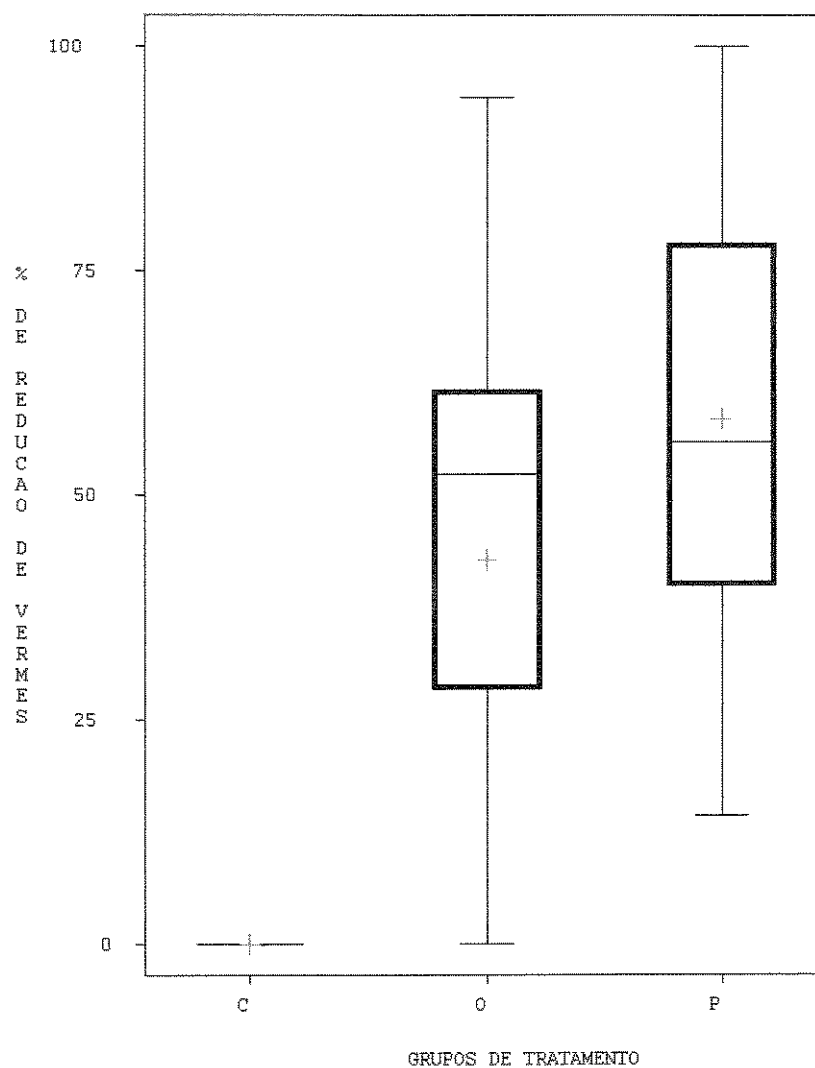




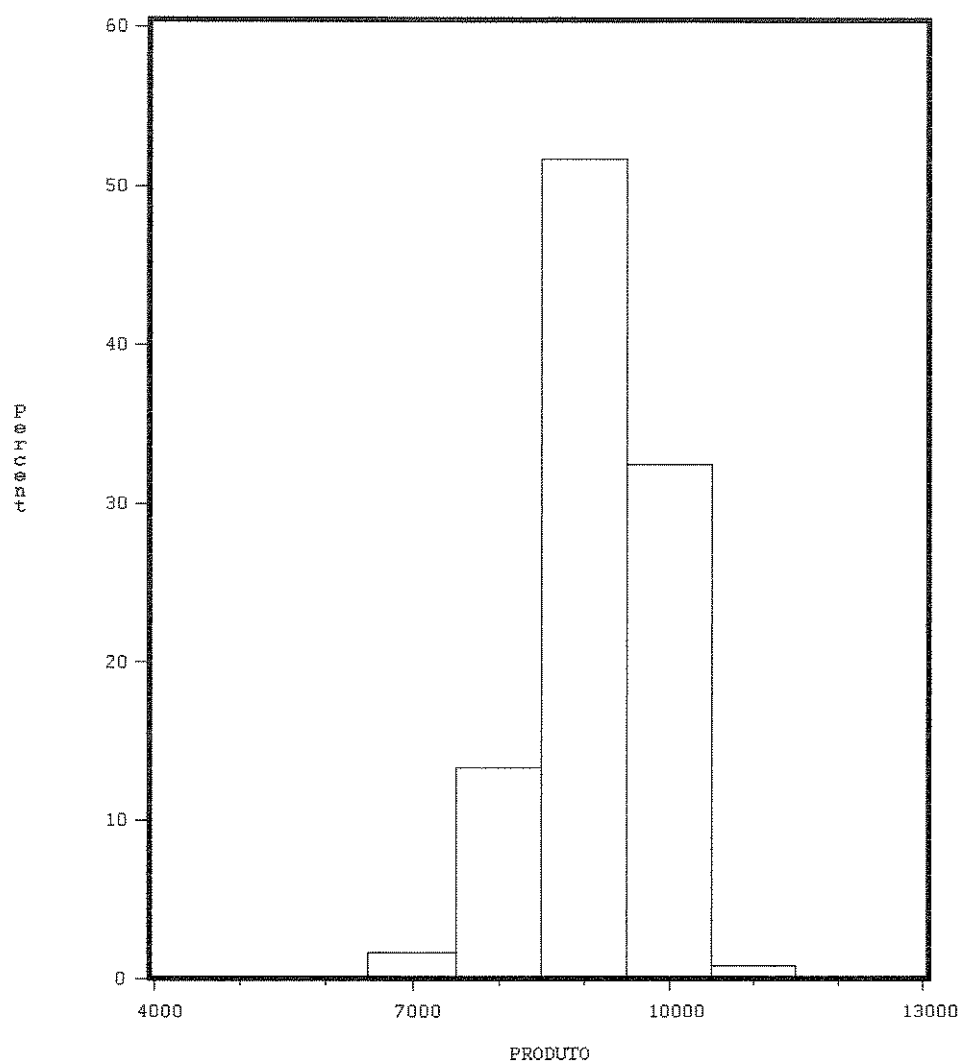
**Figura 13** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição das percentagens de vermes coletados no fígado, de camundongos dos grupos ( C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel ), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.



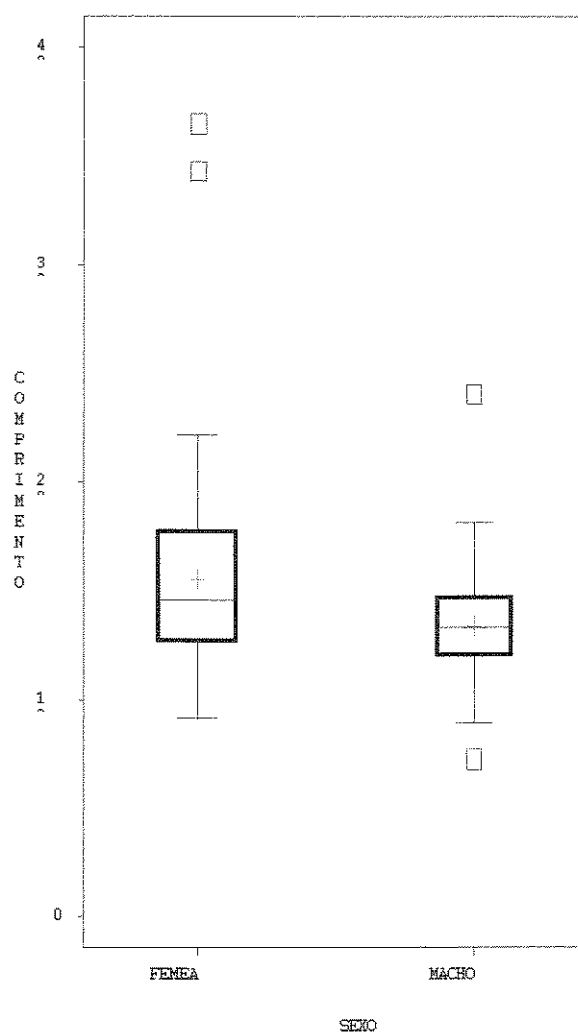
**Figura 14** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição das percentagens de vermes mortos no fígado, dos camundongos dos grupos ( C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel ), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.



**Figura 15** - Diagramas de caixas ("Box-plots") para a distribuição das percentagens de redução de vermes dos camundongos dos grupos ( C - controle, O - oxamniquine e P - praziquantel ), infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.



**Figura 16** - Distribuição amostral do produto das medidas ( em  $\mu\text{m}^2$  - área ) de comprimento e largura dos ovos de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.



**Figura 17** - Diagrama de caixas ("Box-plots") para a distribuição dos comprimentos ( mm ) dos vermes machos e fêmeas da linhagem de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

## 5 - DISCUSSÃO

Estudos de várias linhagens de *S. mansoni* demonstram que estes parasitos possuem variação nos diferentes estágios de adaptação (Saoud, 1966). A variação intra-específica das espécies humanas de *Schistosoma* tem, como consequência: diferentes períodos de liberação de cercárias; grande infectividade dos moluscos; resposta às drogas; variação nos períodos de oviposição; a patogenia causada e relacionada com a imunogenicidade (Rollison *et alii*, 1986; Bryant & Flockhart, 1986).

O conhecimento do mecanismo da suscetibilidade dos moluscos às linhagens de *S. mansoni* (Basch, 1975), bem como os padrões de liberação de cercárias (Melhorn, 1988), foram estudados e observados com grande interesse visando o controle da esquistossomose. Um dos fatores responsáveis pela suscetibilidade é a constituição genética do miracídio (Basch, 1975). O genótipo das populações de moluscos também relaciona-se com a suscetibilidade dessas populações (Paraense & Corrêa, 1963a). Essa variação do genótipo, qualitativa e quantitativa, ocasiona diferenças nas relações parasito-hospedeiro (Richards, 1977). Outros fatores como as reações teciduais provocadas por células amebocitárias, impedem o desenvolvimento larval em moluscos pouco suscetíveis (Newton, 1952 ; Kassin & Richards, 1979; Guaraldo 1987; Sullivan & Richards, 1981).

A fecundidade e a sobrevivência de linhagens resistentes e suscetíveis de *B. glabrata* são afetadas pela infecção por *S. mansoni* (Minchela & LoVerde, 1983).

Observamos em nossos resultados que a linhagem de *B. glabrata* teve um índice de positividade de 40,9% (figura 2) quando expostos a 10

miracídios. Esses resultados são inferiores àqueles obtidos por Dias *et alii* (1987), a saber 60% em relação a linhagem do verme de Ourinhos com *B. glabrata* simpátrica. O índice de mortalidade (figura 3) por nós observados foi de 90% durante 77 dias de observação; portanto mais elevado do que o observado por aqueles autores que foi de 74%.

*B. glabrata* de Ourinhos foi igualmente suscetível à infecção pelo *S. mansoni* de São José dos Campos (SJ) e de Belo Horizonte (BH) (Magalhães & Dias, 1973). O fato da *B. glabrata* de Ourinhos ser altamente suscetível à infecção pelas duas linhagens, pode ser explicado pelo intercâmbio genético entre as linhagens mineira e paulista do trematódeo.

Chieffi (1975) em estudos com *B. glabrata* de Ourinhos e *B. tenagophila* concluíram que a primeira, geralmente possui índices de infecção maiores do que a segunda.

Paraense & Corrêa (1981) obtiveram índices de 33,2 % de infecção com linhagem (BH) simpátrica do verme e do molusco *B. glabrata*.

Foram estudados por Dias *et alii* (1987) os índices de eliminação de cercárias em *B. glabrata* da região de Ourinhos referentes à infecção por diferentes linhagens de *S. mansoni*. A percentagem de moluscos que eliminaram cercárias foram respectivamente de 90% para a linhagem MAP (linhagem mineira humana), 38% para VPR (linhagens paulistas de roedores) e 60% para Ouh (Ourinhos).

Notamos que *B. glabrata* de Ourinhos é suscetível à linhagem simpátrica, porém com alta taxa de mortalidade e curtos períodos pré-patente (35 dias) e patente (28 dias), sugerindo relações parasito-hospedeiro não equilibrada (tabela I). Ressalta-se que todos os moluscos que eliminaram cercárias, morreram no final de 28 dias. Possivelmente essa relação deve ser recente na história natural do verme na região. A sobrevida observada em

nosso trabalho foi no mínimo de 77 dias. Destaca-se que 77 dias após a infecção, os moluscos que não liberavam larvas foram sacrificados. O fator de sobrevivência do hospedeiro intermediário, significa maiores chances do parasito completar o seu ciclo biológico no hospedeiro definitivo (Anderson & May, 1979).

Trabalhando com a linhagem campineira de *S. mansoni* e com *B. tenagophila* simpátrica, Melo (1994) encontrou índices de apenas 25% de moluscos infectados, notando ainda alta taxa de mortalidade a qual situou-se em até 90% em 91 dias de observação. O período de eliminação de cercárias foi de 35 dias, sugerindo uma relação de pouca adaptação desta linhagem ao hospedeiro intermediário. Figueiredo *et alii* (1992), com a linhagem de *S. mansoni* de Itariri e com *B. tenagophila*, obtiveram resultados de 60% de positividade e 42% desses moluscos, sobreviveram durante 100 dias. O período de eliminação de cercárias foi de até 159 dias, mostrando com isto que existe no caso desta linhagem, uma melhor adaptação em relação ao molusco hospedeiro intermediário.

A patogenicidade da esquistossomose mansônica pode estar relacionada com a infectividade da linhagem de *S. mansoni* aos hospedeiros definitivos e intermediários, com a produção e distribuição dos ovos nos tecidos, com o tamanho das reações granulomatosas e consequente aumento do tamanho do fígado e do baço (Rollinson *et alii*, 1987).

As diferenças de infectividade entre as linhagens de *S. mansoni* em camundongos podem ocorrer devido a vários fatores: estado fisiológico da cercária, quantidade de cercárias infectantes, tempo de duração da infecção, método de infecção do hospedeiro definitivo, linhagem, sexo e idade dos camundongos (Saoud, 1966).



A especificidade dos processos de penetração de *S. mansoni* é uma boa adaptação para o hospedeiro definitivo e parece ser estável por diversas linhagens (Rollinson *et alii*, 1987).

Shiff *et alii* (1972) estudaram a penetração das cercárias no hospedeiro definitivo sob o ângulo da química de lipídios da pele e concluíram que a transformação que as cercárias sofrem, com as adaptações aos diferentes graus de infectividade, são indispensáveis para a sobrevivência do parasito no hospedeiro no sentido de prosseguir seu ciclo até o verme adulto (Hass & Schmitt, 1982a).

Saoud (1966) afirma que o número de cercárias utilizadas, o hospedeiro definitivo e a temperatura ambiente, alteram o comportamento da linhagem em relação a mudanças desses critérios utilizados. O modelo estudado em camundongos foi o escolhido para o nosso trabalho porque o seu manejo é simples e a manutenção em laboratório é fácil (Brenner *et alii*, 1956). Além disso, são animais suscetíveis à infecção por *S. mansoni*, sendo, este modelo experimental o mais utilizado em estudos sobre infectividade de linhagens, o que se torna bom parâmetro comparativo entre as linhagens estudadas.

A linhagem de Ourinhos (SP) obteve percentagem de 93,3% de penetração de cercárias e índices de recuperação de vermes de 52,1% ( figura 4 tabela 1 do Anexo). Deve-se considerar que essas taxas desta linhagem demonstram uma relação satisfatória. Este fato decorre que mais da metade das cercárias penetrantes, conseguiram atingir o fígado, chegando a maturidade. Como consequência deve ocorrer maior número de fêmeas ovipondo e aumentando assim a patogenia no hospedeiro (Rey, 1991).

Magalhães & Carvalho (1973a) trabalhando com a linhagem BH e com moluscos *B. glabrata*, alcançaram índices de 97,1% de penetração e de

17% de recuperação de vermes, valores estes que se assemelham, quanto à penetração, com os nossos resultados, que também foram obtidos com *B. glabrata*.

Há nítida diferença quando comparamos os índices de penetração e recuperação de *B. glabrata* com os obtidos por *B. tenagophila*. Figueiredo *et alii* (1992) com a linhagem de Itariri em *B. tenagophila* encontrou índices de 87% de penetração e 53% de recuperação. Magalhães & Carvalho (1973 a ) com a linhagem SJ em *B. tenagophila* os índices foram de 79% e 15,6% de penetração e recuperação, respectivamente.

Essa diferença de resultados se explica no fato de existirem moluscos com diferentes graus de suscetibilidade nas populações. Nosso trabalho foi realizado com a geração F1 da linhagem o que mostra que provavelmente é o que melhor ocorre em relação ao campo. Sabe-se que quanto maior o número de passagens em hospedeiros através de diversas gerações, ocorre um maior grau de adaptação ao hospedeiro, podendo haver variação de resultados em relação à linhagem recém-isolada (Zanotti & Magalhães 1987).

A mortalidade encontrada em camundongos expostos à infecção com 70 cercárias, durante 10 semanas, não foi elevada (20%) (tabela 14 do anexo).

Zanotti & Magalhães (1987) realizaram experimentos com cinco gerações de *B. glabrata* com a linhagem BH e com seis gerações de *B. tenagophila* com linhagem SJ, selecionados para o caráter suscetibilidade ao *S. mansoni* simpátrico, para tentar correlacionar a suscetibilidade do molusco à patogenicidade no hospedeiro definitivo. A autora concluiu que a mortalidade dos camundongos era maior para aqueles que foram infectados com cercárias provenientes de moluscos suscetíveis. Em comparação com a

linhagem BH em *B. glabrata*, cujas taxas de mortalidade em infecção com 100 cercárias, oscilam entre 15% e 60% em diferentes gerações. Já na linhagem de Ourinhos se verifica uma percentagem ligeiramente abaixo 20% (tabela 14 do anexo) em relação à linhagem BH.

Os pesos corporais (iniciais e finais) dos camundongos “Swiss” fêmeas infectadas tratadas quando comparados com os pesos corporais dos animais sadios, não apresentaram diferenças significativas (tabela II). Entretanto, o ganho de peso dos animais infectados e não tratados (grupo controle) foi significativamente diferente dos demais grupos, apresentando uma diminuição do peso final, em relação aos grupos dos animais sadios (figura 6).

É interessante observar que os camundongos que foram submetidos ao tratamento com drogas esquistossomicidas, no período de 14 dias entre o tratamento e a perfusão, apresentam acentuada recuperação no peso corporal e durante o mesmo período.

Estas observações permite-nos dizer que esta linhagem de Ourinhos, provoca alteração no ganho de peso dos animais . Sabe-se que nos grupos tratados com drogas esquistossomicidas, a interrupção na oviposição e a morte dos vermes, provoca um acentuado ganho de peso nos animais em curto espaço de tempo. Estas observações indicam que a constante deposição de ovos nos tecidos entre outras razões, é um fator limitante no crescimento ponderal dos animais (Guaraldo, 1987).

A média de peso do fígado observada em nosso trabalho foi de  $2,37g \pm 0,3$  e  $0,48g \pm 0,15$  para o baço, (figuras 7 e 8 e tabelas 8 e 9 do Anexo) alcançando um aumento de 152% e 533% respectivamente, em relação às médias de peso do grupo sadio.

Sabe-se que a hepatomegalia na infecção por *S. mansoni* está relacionada com as respostas imunes mediada por células T que formam um granuloma ao redor do ovo, no fígado. Devido a estas lesões, formam-se fibroses peritoniais com obstruções nos ramos intra-hepáticos da veia porta, levando a uma hipertensão portal. (Rollinson & Simpson, 1987)

A esplenomegalia em camundongos infectados por *S. mansoni*, é consequência da hiperplasia das células do Sistema Monocítico Fagocitário e também devido à hipertensão portal, ocorre congestão venosa que se manifesta pela dilatação dos seios venosos, hiperplasia e hipertrofia da trama reticular. (Rollinson & Sowthgate, 1987)

A comparação entre os pesos do fígado e baço de camundongos infectados e sadios é importante para avaliarmos o desenvolvimento da hepatoesplenomegalia.

Pela análise dos dados obtidos (figura 7 e 8 e tabelas 8 e 9 do anexo), demonstramos haver diferença significativa entre os pesos dos órgãos dos animais do grupo sadio e infectado não tratado. Os animais infectados apresentaram um peso superior.

Outros autores também já confirmaram os resultados de pronunciada hepatoesplenomegalia

Warren (1967) mostrou que a hepatoesplenomegalia independem da carga de vermes. Este autor observou em 10 semanas que apenas com um par de vermes, levou a um acentuado aumento dos referidos órgãos em camundongos infectados com linhagens de Porto Rico, Brasil, Egito e Tanzânia.

Zanotti *et alii* (1983) observaram que na infecção unissexuada e com ausência de ovo, apenas se percebe um discreto aumento de fígado e baço.

Guaraldo (1987) e Telles (1990) ressaltam que a hepatomegalia é mais acentuada entre a quinta e a oitava semana de infecção, havendo regressão após este período. O aumento do baço tem início a partir de primeira semana de infecção e seu ponto máximo ocorre por volta da décima semana.

Nossos resultados na décima semana após a infecção mostram uma acentuada hepatoesplenomegalia (tabela 8 do Anexo). Esses resultados se mostram semelhantes aos de Figueiredo (1991): 2,05g para o fígado e 0,48g para o baço. Mello (1994) encontrou 3,02g e 0,82g para o fígado e baço respectivamente. As linhagens utilizadas foram Itariri e Camp-h ambas com *B. tenagophila*.

Na infecção por *S. mansoni* as reações inflamatórias granulomatosas são as principais responsáveis pela patogenia em camundongos (Warren, 1978).

No estudo ora apresentado, as medidas foram feitas aos 70 dias, ou seja, na décima semana de infecção, o que significa que os granulomas já se encontravam em fase de modulação.

Estudos de Boras & Warren (1970) determinaram que o índice máximo de reações granulomatosas se formam normalmente, na oitava semana de infecção e que após este tempo, ocorre um fenômeno denominado de modulação, que se caracteriza pelo não crescimento em demasia dos granulomas recém-formados (Chensue & Boras, 1979).

A conclusão deste estudo revela que a linhagem de Ourinhos com medidas médias de 326,0µm, não teve diferença significativa entre as outras linhagens estudadas com a mesma metodologia, conseguindo assim, um baixo índice de mortalidade nos camundongos (13%). Também a quantidade de

granulomas no fígado, que parece ser uma das principais causas da patogenia e mortalidade dos animais (Warren, 1978).

Coelho *et alii* (1989) constataram que fatores como o tempo de evolução dos granulomas, o estado imunológico do hospedeiro, a intensidade da carga parasitária, as diferentes linhagens do parasito, o número de vermes acasalados e o número de ovos que chegam ao fígado, interferem na intensidade da patogenia da doença.

Zanotti & Magalhães (1987) compararam as dimensões granulomatosas em diferentes órgãos nas linhagens BH e SJ. Os autores verificaram que praticamente não houve diferença entre o tamanho dos granulomas das referidas linhagens, porém o tamanho dos granulomas nos animais infectados com cercárias provenientes de moluscos suscetíveis, eram menores.

Carvalho *et alii* (1986) observaram diâmetros de 313,0µm para amostras isoladas de pacientes de Belo Horizonte (MG) e *B. glabrata*.

Em trabalhos realizados com a mesma metodologia, Figueiredo (1991) com a linhagem de Itariri encontrou medidas de 340,71µm das reações granulomatosas do fígado e Mello (1994) com medidas de 296,08 µm.

Os nossos resultados revelam que os vermes são os maiores já registrados no Brasil. Os machos mediram 13,39mm  $\pm$  2,17 e as fêmeas 15,52mm.  $\pm$  4,30.

As fêmeas (5,02 $\pm$  1,24 mm) e machos (6,15 $\pm$  0,91 mm) da linhagem CAMP- H (Mello1994), são relativamente menores que as BH ( machos 9,04 $\pm$  1,16 mm; fêmeas 11,85 $\pm$  1,29 mm) (Paraense & Corrêa, 1981), SJ (machos 8,44 $\pm$  0,95 mm; fêmeas 9,76 $\pm$  1,15 mm) (Paraense &Corrêa, 1981), ITARIRI ( machos 7,35 $\pm$  1,47 mm; fêmeas 8,22 $\pm$  1,67 mm) ( Figueiredo *et alii*, 1992) Magalhães & Carvalho (1973b) realizaram medidas

com as linhagens BH e SJ encontrando respectivamente ( machos 6,9mm ; fêmeas 7,6mm) e (machos 5,6mm; fêmeas 5,8mm)

A metodologia utilizada em nosso trabalho foi semelhante a usada por Paraense & Corrêa (1981), realizamos medidas de 101 machos e 96 fêmeas de vermes e medidas de 120 ovos.

A média das medidas de fêmea de *S. mansoni* apresentadas por Rollinson & Sowthgate (1987) são de 7,2 a 13mm ficam ligeiramente abaixo das encontradas por nós na linhagem de Ourinhos.

Na morfometria de ovos na linhagem de Ourinhos notamos valores próximos aos das outras linhagens do verme 146,27 $\mu$ m X 62,33 $\mu$ m (figura 16). Paraense & Corrêa (1981) com a linhagem BH, obtiveram valores de 151,74 $\mu$ m X 70 $\mu$ m e 150,75 $\mu$ m X 69,55 $\mu$ m para a linhagem SJ. Figueiredo (1991) estudando a linhagem de Itariri obteve valores iguais a 152,36 $\mu$ m X 64,41 $\mu$ m Dias & Piedrabuena (1980) em estudos com roedores silvestres acharam valores de 148,82 $\mu$ m X 66,33 $\mu$ m e Mello (1994) com a linhagem Camp- H os valores médios de 133,69 $\mu$ m X 56,37 $\mu$ m.

A distinção de raças biológicas é um fator de grande importância a ser considerado. Paraense & Corrêa (1981) estudaram as linhagens BH e SJ realizando infecções obtendo híbridos provenientes do cruzamento entre as duas linhagens. Com os híbridos procederam as infecções simpátricas com 1 e 10 miracídeos e a morfometria de vermes e ovos, concluindo que BH e SJ são duas raças biológicas distintas de *S. mansoni*. Consideramos o cruzamento entre as cepas, um critério muito importante para a discussão de raças biológicas. Embora não tenhamos feito cruzamentos em nossos experimentos, observamos que o comportamento da linhagem de Ourinhos em hospedeiros intermediários e definitivos e que as suas características

morfométricas foram diferentes daquelas verificadas nas linhagens BH, SJ, Itariri, Camp-h, e MAP.

As diferenças entre as diversas linhagens, estão sendo estudadas por autores como McCutchan *et alii* (1984) onde demonstraram pela técnica de “Southern blotting”, utilizando gene ribossomal como sonda. Esses autores concluem que existem variações não só entre linhagens de áreas geográficas distintas, como também dentro de uma mesma região. Outras técnicas já são utilizadas como a eletroforese (“starch gel” ou “isoelectric focusing”), para a caracterização de linhagens provenientes de áreas diferentes .

Dias Neto *et alii* (1993) utilizando técnicas de amplificação de DNA polimórfico (RADP) demonstram que é possível identificar diferentes espécies de *Schistosoma* e também diferentes linhagens. Os referidos autores já distinguiram linhagens brasileiras do trematódeo de São Paulo, Minas Gerais e Alagoas.

Barral *et alii* (1993) utilizando a mesma técnica conseguiram identificar diferenças entre linhagens de *S. mansoni* e também entre o sexo dos vermes de uma mesma linhagem.



## 5.1 - AÇÃO DAS DROGAS

Podemos observar no presente trabalho que a linhagem de Ourinhos, representada pela geração F1 (primeira geração) pode ser considerada tolerante ao oxamniquine e praziquantel à dosagem de 100 mg/Kg (por 5 dias no caso da última droga) por não corresponder adequadamente ao tratamento. O vale do Paranapanema, é uma região endêmica, controlada pela SUCEN e seus portadores vem sendo submetidos ao tratamento pelo oxamniquine desde 1973, tornando-se evidente que nesta área, existe uma pressão de droga há cerca de 20 anos.

A linhagem de Ourinhos foi a primeira a ser isolada do campo que apresentou tolerância ao praziquantel na dosagem de 100 mg/kg/5 dias.

A percentagem de vermes sobreviventes no presente trabalho foi de 30,2% a 12,4% entre machos, fêmeas e casais para o oxamniquine e praziquantel respectivamente (tabela V).

Bonesso *et alii* (1994) trabalhando com a linhagem de Ourinhos F4, na dosagem de 100 mg/kg de oxamniquine e praziquantel encontrou um número razoável de casais vivos. Estes animais do grupo de seguimento apresentaram recuperação de oviposição após um período de dois meses e meio para o oxamniquine e dois meses para o praziquantel. Esses dados dos parasitos acasalados, são muito importantes quando vistos em conjunto com os dados das doses efetivas, pois constata-se que com a dosagem utilizada de 100 mg/kg pode-se matar apenas 80% dos vermes machos. Parte destes vermes que sobreviveram, continuaram acasalados recuperando em alguns casos a oviposição.

Richards & Foster (1969) estudando a medicação oxamniquine, verificou que esta provoca um deslocamento dos vermes das veias mesentéricas para as veias intra-hepáticas. Os machos foram mais suscetíveis à droga quando comparados com as fêmeas, porém o restabelecimento das mesmas aconteceram nas veias mesentéricas (Kohn *et alii*, 1979), apesar de terem o seu sistema reprodutivo atrofiado, devido a regressão da glândula vitelínica (Popiel & Erasmus, 1982; Popiel & Erasmus, 1984), provavelmente, por causa da ausência do macho. Com isso ocorreram a interrupção da oviposição.

Thomas *et alii* (1975) descreveram o praziquantel como uma pirazinoisoquinoleína com função anti-helmíntica de largo espectro e que inicialmente foi usado como cestocida em veterinária. O primeiro efeito sobre *Schistosoma* sp após o tratamento, foi a rápida contração muscular e subsequente paralisia do verme (Coles, 1970; Melhorn *et alii*, 1981). Seguiram-se uma rápida vacuolização do tegumento sincicial (Melhorn *et alii*, 1981 ).

Os primeiros casos de linhagens resistentes por indução experimental aos esquistossomicidas foram relatados por Rogers & Buiding (1971), com hycanthone em camundongos e hamsters infectados. Observou-se que alguns vermes sobreviveram e retornaram a oviposição após um período de 6 a 12 meses. Jansma *et alii* (1977) induziram a resistência de *S. mansoni* ao hycanthone após o tratamento da geração parental e relataram que esta resistência era transferida geneticamente, testando a resposta da linhagem por aproximadamente 20 gerações consecutivas.

Fallon & Doenhoff (1994) induziram resistências ao praziquantel e ao oxamniquine a partir de tratamentos em seis gerações consecutivas de um

“pool” de linhagens sabidamente suscetíveis a esses medicamentos. Os autores não constatarem resistência cruzada entre as duas drogas.

Raros são os casos de falha clínica no tratamento com praziquantel. Katz *et alii* (1991) encontraram pessoas que não se curaram com a dose terapêutica da droga porém eram suscetíveis ao oxamniquine. Outra falha terapêutica foi observada em uma comunidade no Senegal, onde foi presenciado um surto de esquistossomose mansônica (TDR NEWS, 1992). Nesse trabalho é defendida a alternância de drogas no tratamento, ao invés de repeti-lo com a mesma droga, para se evitar a seleção de linhagens resistentes.

Yeang *et alii* (1987) obtiveram valores de (DE50) e (DE90) para o oxamniquine nas linhagens de Porto Rico, Kenia, Liverpool (provenientes do Egito), Libéria (LIB) e Brasil (Olinda MAP), considerando- de apenas para os machos. Todas as (DE50) foram inferiores as calculadas para a linhagem de Ourinhos na F4, 71,3 mg/kg (Bonesso *et alii*, 1994). As (DE90) das linhagens estudadas por Yeang *et alii* (1987), somente a linhagem de Liverpool mostrou valor superior à de Ourinhos 159 mg/kg.

Drescher *et alii* (1993) trabalhando com praziquantel em 4 linhagens distintas, BH, K, MAP, MPR - 1 encontraram valores menores para a (DE50) em relação à linhagem de Ourinhos que foi significativamente maior 66,8 mg/kg/5 dias (Bonesso- *et alii*, 1994).

Com isso, podemos comprovar que a linhagem de Ourinhos, apresenta uma variação de suscetibilidade tanto para oxamniquine, que já era conhecida por outras linhagens, quanto para praziquantel (Dias & Oliver, 1986; Yeang *et alii*, 1987; Cioli *et alii*, 1989).

A linhagem de Ourinhos apresentou alteração de sensibilidade ao oxamniquine e praziquantel, possibilitando o isolamento de sub-linhagens por

não cessar irreversivelmente sua oviposição após o tratamento (Bonesso *et alii*, 1994).

É importante que se estude essas duas sub-linhagens com novas dosagens para avaliar o seu comportamento em relação à linhagem parental. É interessante um estudo a nível genômico, das possíveis alterações de tolerância desta linhagem ao praziquantel em relação a outra sensível, como já é bem estudada as diferenças entre linhagens sensíveis e resistentes ao hycanthone/oxamniquine (Brindley & Sher, 1987; Brindley *et alii*, 1989; Pica-Mattoccia *et alii*, 1993).

A quimioterapia é o método mais efetivo de controle da esquistossomose humana (WHO, 1993), já que o controle dos hospedeiros intermediários e o meio ambiente, requerem maior custo, o que torna inviável para a maioria dos países acometidos.

Frente a estes problemas, alguns grupos de pesquisadores tem se preocupado na obtenção de novas drogas que sejam efetivas contra o trematódeo (Penido, 1994 ; Penido *et alii*, 1995). Drogas como 9-Acridanone-hydrazone ainda se encontram em fase laboratorial, em testes com macacos (Coelho & Pereira, 1991). Ainda nada se sabe sobre a eficácia e tolerância no homem. Em áreas onde a linhagem apresenta tolerância/resistência é necessário rever as posologias utilizadas. Hoje já se abre uma perspectiva de uso de uma vacina para a esquistossomose (Capron *et alii*, 1992).

## 6 - CONCLUSÃO

- \* A infectividade da linhagem de *S. mansoni* de Ourinhos ao hospedeiro definitivo (camundongos SWISS) foi elevada com índice de infecção de até 95,1%, e a recuperação de vermes de até 52,1%.
- \* O grupo tratado com o praziquantel não alterou a sua proporção de ganhos peso em relação do grupo controle. A média dos ganhos dos pesos dos grupos tratados são significantes quando comparados com os do grupo infectado e não tratado, no período entre o tratamento e a perfusão.
- \* Os pesos de fígado e baço do grupo infectado e não tratado é significantemente maior quando comparados com o grupo controle não infectado.
- \* A linhagem de Ourinhos se comportou de maneira tolerante às drogas oxamniquine e praziquantel, com percentagens de vermes sobreviventes de 30,2% para o oxamniquine e 12,4% para o praziquantel. Não houve significância na percentagem de redução de vermes entre os grupos tratados.
- \* A medida do granuloma provocado pela linhagem Ourinhos de *S. mansoni* foi de  $326 \pm 68,5\mu\text{m}$ . A área foi de  $1125,75 \pm 420,51 \mu\text{m}^2$
- \* A morfometria dos vermes adultos revelou que estes são os maiores já relatados no Brasil.
- \* Concluimos de acordo com os nossos dados, que a linhagem Ourinhos, recém isolada do campo, revelou em hospedeiro simpátrico (*B. glabrata*) e definitivo (camundongos Swiss) características bem definidas e distintas de outras linhagens já caracterizadas como: SJ

(Vale do Paraíba), Itariri (Vale da Ribeira) Camp-h (Campinas) e a mineira BH (Belo Horizonte).

## 7 - RESUMO

A esquistossomose mansônica autóctone, no Estado de São Paulo é encontrada em diversas regiões, dentre estas, a do Rio Paranapanema, em Ourinhos onde existe foco de doença pouco estudado em nosso Estado. O presente trabalho teve como objetivo a determinação de características morfológicas de *Schistosoma mansoni* recém isolado da região de Ourinhos (SP). O isolamento foi feito em 1992, a partir de miracídios eclodidos de ovos das fezes de três pacientes autóctones e não tratados para esquistossomose. O estudo foi desenvolvido em modelo experimental camundongos SWISS - *Biomphalaria glabrata* simpátrica. Avaliou-se a suscetibilidade de 120 moluscos expostos a 1 e 10 miracídios. Os índices da infecção dos caramujos foi de 40,9% (10 miracídios) e de 35,4 % em (1 miracídio). A mortalidade dos moluscos até os 77 dias de observação foi de 90% (1 miracídio) e 90% (10 miracídios). Em 46 camundongos infectados pela cauda com 70 cercárias e sacrificados na décima semana, avaliou-se: suscetibilidade de *S. mansoni* ao oxamniquine (100 mg/Kg, dose unica, via oral) e ao praziquantel (100mg/Kg, 5 dias, via oral); capacidade de penetração de cercárias e recuperação de vermes; peso corporal, do fígado e do baço; mortalidade; diâmetros das granulomas hepáticos e morfometria de vermes adultos e ovos. Estes dados revelaram que a cepa de Ourinhos está em fase de adaptação ao hospedeiro intermediário, pois possui alta mortalidade e curto período de eliminação de cercárias. A quimioterapia experimental revelou que praziquantel (87,5%) foi mais eficaz de que oxamniquine (69,7%), sendo que a percentagem de vermes sobreviventes foi de 12,4% para praziquantel e 30,2% para oxamniquine. Em camundongos, verificou-se uma tolerância inédita as drogas utilizadas. Altos índices de penetração de cercárias (95,1%) e de recuperação de vermes (52,1%). Houve um baixo índice de mortalidade dos camundongos (20%), constatando-se também um ganho de peso nos animais infectados e tratados, quando comparados aos do grupo controle. Registrou-se acentuada hepatomegalia ( $2,37 \pm 0,30$ g) (152%) e esplenomegalia ( $0,48 \pm 0,15$  g) (533%) em comparação ao grupo controle não infectado. As reações granulomatosas hepáticas mediram  $326 \pm 68,5$   $\mu$ m; na morfometria de 101 vermes machos ( $13,39 \pm 2,17$  mm) a de 96 fêmeas ( $15,52 \pm 4,30$  mm). As medidas de 120 ovos revelam largura media de ( $62,33 \pm 2,88$   $\mu$ m) e comprimento médio de ( $146,27 \pm 7,87$   $\mu$ m). A cepa de Ourinhos apresentou características distintas de outras cepas paulistas com destaque para a sua tolerância inédita ao praziquantel.

## 8 - SUMMARY

The autochthonous schistosomiasis *mansoni* is found in many different regions in São Paulo state, Brazil. Among them, the one by Paranapanema River in Ourinhos, is a place where there is a hardly explored focus of the disease in our State. This work has as its principal aim to determine the morphological characteristics of the *Schistosoma mansoni*, recently isolated at region of Ourinhos (SP). The isolation was done in 1992, having as a starting point the miracidium hatched from the eggs found in the faeces of three autochthonal patients who had not been under treatment of schistosomiasis. The research was developed with experimental model: SWISS mice sympatric - *Biomphalaria glabrata* sympatric. It was tested the susceptibility of 180 mollusks exposed to 1 and 10 miracidia. The mollusks infection registers were 40.9% (10 miracidia) and 35.4% in (1 miracidium). The mollusks mortality up to 77 days of observation was 90% (1 miracidium) and 90% (10 miracidia). In 46 mice infected through the tail with 70 cercariae and sacrificed in the tenth week it was tested: *S. mansoni* susceptibility to the oxamniquine (100 mg/kg, single oral dose), and to the praziquantel (100 mg/kg, 5 days, oral dose); cercariae penetration capacity and worms recuperation; liver and spleen body weight; death rate; hepatic granuloma. These figures showed that the Ourinhos strain was in a fase of adaptation to the intermediate host, due their high mortality and the short period of elimination of cercariae. The experimental chemotherapy showed that praziquantel (87.5%) was more efficient than oxamniquine (69.7%) and the surviving worms percentage was 12.4% to praziquantel and 30.2% to the oxamniquine. In mice we noticed an unseen tolerance to the used drugs, high registers of cercariae penetration (95.1%) and worm recovery (52.1%). There was a low death rate (20%) of mice and we also noticed a gain of weight in the infected and treated animals, compared to the control group; a very strong hepatomegaly ( $2.37 \pm 0.30$ g) (152%) and splenomegaly ( $0.48 \pm 0.15$ g) (533%) compared to the non-infected control group. The hepatic granuloma reactions measured  $326 \pm 68.5$ um ; The measurements of worms was  $13.39 \pm 2.17$  mm for 101 males and  $15.52 \pm 4.30$ mm for 96 females; and the 120 eggs showed  $62.33 \pm 2.88$  um of wider and  $146.27 \pm 7.87$ um of length. The Ourinhos strain presented different characteristics from other strain from São Paulo, especially for its unseen tolerance the praziquantel.



## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L. A. & CHEEVER, A. W. - Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the mouse. **Bull. WHO**, v. 46, p. 233-241, 1972.
- ANDERSON, R. M. & MAY, R. M. - Prevalence of schistosome infections within molluscan populations: observed pattern and theoretical predictions. **Parasitology**, v. 79, p. 63-94, 1979.
- ARANTES, A. - Onze casos autóctones de esquistossomose em Santos. **Bol. soc. med. cir. São Paulo.**, v. 7, p. 64- 65, 1924.
- ARAÚJO, N.; KATZ, N.; DIAS, E. P. & SOUZA, C. P. - Susceptibility to chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, p. 890-894, 1980.
- BARRAL, V.; THIS, P.; IMBERT-ESTABLET, D.; COMBES, C. & DELSENY, M. - Genetic variability and evolution of the *Schistosoma mansoni* genome analysed by using random amplified polymorphic DNA marks. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 59, p. 221-222, 1993.

- BASCH, P. F. - An interpretation of snail-trematode infection rates: specificity based on concordance of compatible phenotypes. **Int. J. Parasitol.**, v. 5. p. 449-452, 1975.
- BONESSO-SABADINI, P. I. P.; DIAS L. C. S. & CARVALHO, J. F. - *Schistosoma mansoni*: Suscetibilidade da linhagem Ouh (Ourinhos, Vale do Paranapanema- SP) ao oxamniquine e praziquantel. **Rev. Ciências Farm.**, v. 15, p. 33, 1994.
- BORAS, D. L. & WARREN, K. S. - Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **J. Exp. Med.**, v. 132, p. 488, 1970.
- BRENER, Z.; PELLEGRINO, J. & OLIVEIRA, F. D. - Terapêutica experimental da Esquistossomose mansoni. Aplicação do método de isolamento de granulomas do fígado de camundongos. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, v. 8, n. 4, p. 583-587, 1956.
- BRINDLEY, P.J. & SHER, A. - Anti-schistosomal drugs: observation on the mechanism of drug resistance to hycanthone, and on the involvement of host antibodies in the mode of action of praziquantel. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.82 (suppl. IV), p. 157-161, 1987.
- BRINDLEY, P.J.; LEWIS, F. A.; McCUTCHAM, T. F.; BUEDING, E. & SHER, A. - A genomic change associated with the development of

resistance to hycanthone in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 36, p. 243-252, 1989.

BROME, P. B. & RADKE, M. G. - An improved mouse retraining chamber. **Jpn J. Parasitol.**, v. 20, p. 81-82, 1971.

BRYANT, C. & FLOCKHART, H. A. Biochemical strain variation in parasitic helminths. **Adv. Parasitol.**, v. 25, p. 276-311, 1986.

CAMPOS, R; MOREIRA, A. A. B.; SETTE JR, H.; CHAMONE, D. A. F. & SILVA, L. C. - Hycanthone resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 261-262, 1976.

CAPRON, A.; DESSAINT, J.P.; CAPRON, M. & PIERCE, R.J. - Vaccine strategies against schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 87 (suppl. V), p. 1 - 19, 1992.

CARVALHO, A. D. ALVARENGA, R.J. & MELLO, A. L. - Histopatologia da esquistossomose mansoni em fígado de *Mus musculus* infectado por amostras humanas de fase aguda e crônica da periferia de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 19, n.2, p. 84-94, abr./jun., 1986.

CHENSUE, S. W. & BOROS, D. L. - Population Dynamics of T and B lymphocytes in the lymphoid organs, circulation, and granulomas of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, v. 28, n.2 p.291-299, 1979.

CHIEFFI, P. P. - Suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni*, de cepas de *Biomphalaria tenagophila* originárias dos estados de São Paulo e Paraná. **rev. inst. med. trop. São Paulo.**, v.17, n.2 , p.92- 96, 1975.

CIOLI, D.; MATTOCCIA, L. & ARCHER, S. - Resistance of schistosomes to hycanthone and oxamniquine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, suppl. I, p. 38-45, oct., 1989.

COELHO , P. M. Z.; RASO, P. MELHO, R. T. & TOPPA, N. H. - Dimensões do granuloma hepático produzido por ovos de duas linhagens geográficas do *Schistosoma mansoni*, no camundongo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 84, p. 213-217, 1989.

COELHO, P. M. Z. & PEREIRA, L. H. - *Schistosoma mansoni* : preclinical studies with 9- acridanone- hydrazones in cebus monkeys experimentally infected. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo. v. 33, p. 50- 57, 1991.

COLES, G. C. - The effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **J. Helminthol.**, v. 53, p. 31-33, 1970.

COLES, G C.; BRUCE, J. I.; KINOTTI, G. K.; MUTAHL, W. T.; DIAS, E . P . & KATZ, N - Drug resistance in schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, p.347, 1986.

COLES, GC.; MUTAHI, W.T.; KINOTTI, G. K.; BRUCE. J.I.; KATZ, N. - Tolerance of Kenyan *Schistosoma mansoni* to oxamniquine . **Trans. of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene** . Vol 81, p. 782-785, 1987.

DAVIS, A. - Antischistosomal drugs and clinical practice. In: "Human Schistosomiasis" (P. Jordan; G. Webbe & R F. Sturrock, Eds. ) , **CAB International**, wallingford, p. 367 - 404, 1993.

DIAS, L. C. S. & PIEDRABUENA, A. E. - Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* in naturally infected *Holochislus brasiliensis leucogaster*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 5, p. 690, 1980.

DIAS, L. C. S.; ÁVILA- PIRES, F. D. & PINTO, A. C. M. - Parasitological and ecological aspects of schistosomiasis mansoni in the Valley of the Paraíba do Sul River (São Paulo State, Brazil) I - Natural infection of small mammals with *Schistosoma mansoni*. **Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, p. 496-500, 1978.

DIAS, L. C. DE S.; UETA, M.T. & GUARALDO, A. M. A. - Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 29, p. 205-212, jul./ag., 1987.

DIAS, L. C DE S. & OLIVER, C. E. - Failure at inducing resistance to schistosomicidal drugs in a Brazilian human strain of *Schistosoma*

*mansoni*. **Rev. Med. Inst. Med. Trop.** São Paulo. v.28, p 352- 357, 1986.

DIAS NETO, E.; SOUZA,C,P.; KATZ,N.; PENA,S.D.J. & SIMPSON,A.J.G.  
- The random amplification of polymorphia DNA allows the identification of strains and species of Schistosome. **Mol. Biochem. Parasitol.** v.57, p83-88, 1993.

DOUMENGE, J. P.; MOTT, K. E.; C.; VILLENAVE, D.; CHAPUIS, O.; PERRIN, M . F. & REAUD-THOMAS, G. - Atlas of the global distribution of schistosomiasis. University of Bordeaux III, França, 1987.

DRESCHER, K. M.; ROGERS, E.J. BRUCE, J. I.; KATZ, N; DIAS, L . C. de S.; COLES, G. C - Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni* to antischistosomal agents. **Mem. Inst. Oswald Cruz**, v. 88, n. 1 p. 89-95, 1993.

FALLON, P. G. & DOEHNHOFF, M. S. - Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice in drug specific. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 51, p. 83-88, 1994.

- FERREIRA, J. M. & CORREA, M.O. A. - Helminthíases entre escolares de cidade de São Paulo, com especial referência à esquistossomíase. **Arq. Fac. Hig. Saúde Publ.**, v.7, p. 257- 269, 1953.
- FIGUEIREDO, A. C. - Estudo de características biológicas e morfológicas de cepa paulista de *Schistosoma mansoni* do Vale do Ribeira. Campinas, SP, 1991. [ Tese de Mestrado - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].
- FIGUEIREDO, A. C. ; DIAS, L. C. S. & MARQUES, E. H. F. - Biological and morphological characteristics of *Schistosoma mansoni* from Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. I- Susceptibility of *Biomphalaria tenagophia* snail to sympatric *S. mansoni* strain. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 34, n. 3, p. 199-203, mai/jun., 1992.
- FILES, V. S. & CRAW, E. B. - A study on comparative susceptibility of snails vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 35., p. 555-560, 1949.
- GONNERT, R. & ANDREWS, P. - Praziquantel, a new broads spectrum antischistosomal agent. **Z. Parasitenkd.**, v. 52, n. 2, p. 129-150, 1977.
- GUARALDO, A. M. A. - Avaliação da resposta imune à infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos C3H/ H e J submetidos à dieta hipoprotéica e normoprotéica Campinas, SP, 1987. [Tese de Doutorado- Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].

- HAAS, W. & SCHMITT, R - Characterization of chemical stimuli for the penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Z. Parasitenkd.**, v. 66, p. 293-307, 1982a.
- HILL, J. - Chemotherapeutic studies with laboratory infections of *Schistosoma mansoni*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 56, p. 39-48, 1959.
- JANSMA, W. B.; ROGERS, S. H.; LIU, C. L. & BUEDING, E. - Experimentally produced resistance of *Schistosoma mansoni* to hycanthone. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, v. 26, p. 926-936, 1977.
- KASSIN, O. O. & RICHARDS, C. S. - Host reactions in *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* miracidia involving variations in parasite strains numbers and sequence of exposures. **J. Parasitol.**, v. 9, p. 565, 1979.
- KATZ, N.; DIAS, E. P.; ARAÚJO, N. & SOUZA, C. P. - Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 7, p. 381-387, 1973.
- KATZ, N.; ROCHA, R.S.; SOUZA, C.; COURA F<sup>O</sup>, P.; BRUCE, J.I.; COLES, G.C. & KINOTI, G.K. - Efficacy of alternating therapy with oxamniquine and praziquantel to treat *Schistosoma mansoni* in children following failure of first treatment. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 44, p. 509-512, 1991.



KEMP, H. A.; HUNTER, G. W.; WILKINS, O. P.; SMALLEY, H. & DASHIEL, M. A. - Some aintments examined for protection against *Schistosoma mansoni* cercariae in preliminary tests. **Milit. Med.**, v. 119, p. 1-10, 1956.

KINOTTI, G. K. - The significance of variation in the susceptibility of *Schistosoma mansoni* to the antischistosomal drug oxamniquine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 151-156, 1987.

KOHN, A.; SERAPIÃO, C.J.; KATZ, N. & DIAS, E.P. - Ação do oxamniquine sobre o *Schistosoma mansoni* em camundongos experimentalmente infectados. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 21, p. 217-227, 1979.

MAGALHÃES, L. A. Estudo dos dados obtidos de uma população de *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte infectado por *Schistosoma mansoni* da mesma cidade, e de uma população de *B. tenagophila* de Campinas, infectada por *S. mansoni* de São José dos Campos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 3, n. 4, p. 195-196, 1969a.

MAGALHÃES, L. A. - Técnicas para avaliação da viabilidade de penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **O Hospital**, v. 75, p. 137-140, 1969b.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. - Determinação do número de cercárias provenientes de cepas diferentes de *Schistosoma mansoni* que conseguem penetrar, sob determinadas condições de laboratório, em *Mus*

*musculus*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 3, n. 5, p. 249-251, set/out., 1969.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. - Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* das linhagens de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP) em *Mus musculus*. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 7, p. 285-287, 1973a.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. - Estudo morfológico de *Schistosoma mansoni* pertencentes a linhagens de Belo Horizonte (MG) e de São José dos Campos (SJ). **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 7, p. 289-294, 1973b.

MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. -Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* em estudo quantitativo. **Rev. Soc. bras.Med. Trop.**, v.10, p. 169-194, 1976.

MAGALHÃES, L. A. & DIAS, L. C. de S. - Estudo da suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP). **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 7p. 295-297, 1973.

MAGALHÃES, L. A.; ALCÂNTARA, F. G. & CARVALHO, J. F. - Alguns dados referentes ao estudo parasitológico e anatomopatológico de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 9, p. 1-5, 1975.

MAGNANINI, R. C. & MAYOR, A.S.S - População in Brasil , Fundação IBGE - Geografia do Brasil - Rio de Janeiro, SERGRAF - IBGE, Vol 5, pag 143- 258, 1977.

MARSHALL, I. - Experimental Chemoterapy. *In: "The biology of schistosomes"* (D. Rollinson & A. J. G. Simpson, Eds.) Academic Press, New York / London, p. 399-430, 1987.

McCUTCHAN, T. F.; SIMPSON, A. J. G.; MULLINS J. A.; SHER., A. NASH, T. E. LEWIS, F. & RICHARDS, C. - Differentiation of schistosomes by species, strain and sex by using cloned DNA markers. **Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.**, v. 81, p. 889-893, 1984.

McMANUS, D. P. & MICHELLE, H.- Molecular variation in the human schistosomes, **Acta Tropi.**, v. 53, p.255-276, 1993.

MELHORN, H - **Parasitology in Focus**, Springer Verlag, 924 pp, 1988.

MELO, C. M. - Caracterização biológica e morfológica da linhagem paulista de *Schistosoma mansoni* da região de Campinas, SP. Campinas, SP. 1994 [Tese de Mestrado, Instituto de Biologia- Universidade Estadual de Campinas]

MINCHELLA, D. J. & LoVERDE, P. T. - Laboratory comparison of the relative sucess of *Biomphalaria glabrata* stocks which are susceptible and insusceptible to infection with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 86, p. 335-344, 1983.

NEWTON, W. L. - The comparative tissue reaction of strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 38, p. 362, 1952.

OLIVIER, L. & STIREWALT, M. A. - An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 38, p. 19-23, 1952.

PARAENSE, W L - Histórico. **Rev Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais.**, v.9, p. 105- 117, 1959.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. - Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 5, p. 15-22, 1963a.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. - Observations of two biological races of *Schistosoma mansoni*. **Mem . Inst. Oswaldo Cruz**, v. 76, p. 287-291, 1981.

PELLEGRINO, J. & KATZ, N. - Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni **In: "Advances in Parasitology"**, Academic Press, London and New York, v. 6, p. 233-290, 1968.

PELLEGRINO, J. & KATZ, N. - Terapêutica experimental **In: "Esquistossomose mansoni"** (A. S. Cunha) , Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 313-326, 1970.

- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. - A simplified method for the concentration of cercariae. **J. Parasitol.**, v. 41, p. 329 - 330, 1955.
- PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C. A.; FARIA, J. & CUNHA, A. S. - New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis manson in mice. **Am. J. Med. Trop. Hyg.**, v. 11, p. 201-215, 1962.
- PENIDO, M.L.O. - Ácidos alquilaminoalcanotiossulfúricos: metabolismo e atividade esquistossomicida. Belo Horizonte, M.G., 1994 [ Tese de Doutorado- Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais ]
- PENIDO, M.L.O.; NELSON, D.L.; VIEIRA, L.Q. & COELHO, P.M.Z. - Schistosomicidal activity of alkylaminooctanrthiosulfuric acids. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**. v.89, p. 595-602, 1994.
- PICA-MATTOCCIA, L.; DIAS, L. C. de S.; MORONI, R & CIOLI, D.- *Schistosoma mansoni*: Genetic complementation analysis shows that two independent hycanthone/ oxamniquine- resistant strains are mutated in the same gene. **Exp. Parasitol.**, v. 77, p.445-449, 1993.
- PIZA, J. T. & RAMOS, A. S. - Os focos autóctones de esquistossomose no Estado de São Paulo . **Arq. Hig. Saúde. Pública**, v. 25, p. 261-271, 1960.

POCOCK, S.J. - “**Clinical Trials**”, 4<sup>a</sup> ed, John Wiley & Sons, 1986.

POPIEL, I. & ERASMUS, D. A. - *Schistosoma mansoni*: The survival and reproductive status of mature in mice treated with oxamniquine. **J. Parasitol.**, v. 56, p. 257-261, 1982.

POPIEL, I. & ERASMUS, D.A. - *Schistosoma mansoni*: ultrastructure of adults from mice treated with oxamniquine. **Exp. Parasitol.**, v. 58, p. 254-262, 1984.

PRATA, A. - Biópsia retal na esquistossomose. Bases e aplicações no diagnóstico e tratamento **Thesis**, Serviço Nacional de Educação Sanitária, Rio de Janeiro, 1957.

REY, L. - A frequência provável da esquistossomose mansônica em São Paulo. **Hospital**, v.64, p.9-19, 1953.

REY, L. - **Parasitologia**, 2a ed, Guanabara Kogan, Rio de Janeiro, 731 pp., 1991.

RICHARDS, C. S. - *Schistosoma mansoni*: Susceptibility revesal with age in the snail host *Biomphalaria glabata*. **Exp. Parasitol.**, v. 42, p. 165-168, 1977.

RICHARDS, C. S. & MERRIT, J. W. Genetic factors in the suscetibility of juvenile *Biomphalaria grabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 21, p. 425, 1972.

- RICHARDS, H.C. & FOSTER, R. - A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and promates. **Nature**, v,222, p. 581- 582, 1969.
- RODRIGUES, D.C. - Esquistossomose mansônica no estado de São Paulo: contribuição para o estudo da sua epidemiologia e profilaxia - [Tese apresentada em Campinas, livre docente], 1975.
- ROGERS, S. H. & BUEDING,E. - Hycanthone resistance: Development in *Schistosoma mansoni*. **Science**, v. 172, p. 1057-1058, 1971.
- ROLLINSON, D. & SIMPSON, A. J. G. - “**The Biology of Schistosomes**”, Academic Press, Londres, 472 pp., 1987.
- ROLLINSON, D. & SOUTHGATE, V. R. - The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. **In: “The Biology of Schistosomes”** (D.Rollinson & A. J. G. Simpson, Eds.), Academic Press, Londres, p. 1-49, 1987.
- ROLLINSON, D. WALKER, T. K. & SIMPSON, A. J. G. - The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. **Parasitology**, v. 91, p. S53-S71, 1986.
- SAOUD, M. F. A. - The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, n. 5, p. 585-600, 1966.

SAS institut Inc. **SAS User's Guide: basics** 5<sup>a</sup> ed. Cary, NC: SAS Institut Inc, 1986.

SAS institut Inc. **SAS User's Guide: Statistics** 5<sup>a</sup> ed. Cary, NC: SAS Institut Inc, 1986.

SAS institut Inc. **SAS/GHAPH @ User's Guide**, 5<sup>a</sup> ed. Cary, NC: SAS Institut Inc, 1986.

SAS institut Inc. **SAS/QC @ User's Guide**, 5<sup>a</sup> ed. Cary, NC: SAS Institut Inc, 1986.

SCHELL, S. C. - "**Manual de Laboratório en Parasitologia**". Editorial Academia, León, 1969.

SHIFF, C. J.; CMELIK, S. H. W.; LEY, H. E. & KRIEL, R. L. - The influence of human skin lipids on the cercarial penetration responses of *Schistosoma hematobium* and *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 58, n 3, p. 476-480, 1972.

SILVA, L. J. - Sobre a antiguidade de alguns focos de esquistossomose do Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Malariol. Doen. Trop.**, v.35, p. 73-78, 1983.

SILVA, L. J. - A esquistossomose mansônica no estado de São Paulo: origens, distribuição, epidemiologia e controle. Campinas, SP, 1992. [Tese de



Livre docência - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas].

SILVEIRA, A. C. - Controle da esquistossomose no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.84, n 1, p. 91- 104, 1989.

SOUZA, C. P. DE - Estudo de moluscos do gênero *Biomphalaria* de Minas Gerais, com relação a adaptação parasito hospedeiro e importância na epidemiologia da esquistossomose. 87 v. 28, p. 287-292, 1986.

SOUZA, A. C.; ARAÚJO, N.; JANNOTI, L. K. & GAZZINELLI, G. - Fatores que podem afetar a criação e manutenção de caramujos infectados e a produção de cercárias de *Shistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro. v. 82. p. 73-79, 1987.

STANDEN, O. D. - Experimental infection of *Austrolorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni*. I. Individual and mass infection o snails, and the relationship of infection to temperature and season. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 46, p. 48-53, 1952.

SUCEN - SITUAÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA NO ESTADO DE SÃO PAULO. II ENCONTRO SOBRE ESQUISTOSSOMOSE, 1982. IMPRENSA OFICIAL DO ESTADO DE SÃO PAULO {RELATÓRIO}.

SULLIVAN, J. T. & RICHARDS, C. S. - *Schistosoma mansoni*, H1H-SM-PR-2 strain, in susceptible and nonsusceptible stocks of *Biomphalaria glabrata*: comparative histology. **J. Parasitol.**, v. 67, p. 702, 1981.

TELLES, E. S. - Aspectos imunológicos e parasitológicos na infecção múltipla por *Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni* em camundongos (CBA x C57 b1/10) 1. Campinas, SP 1990. [Tese de Mestrado - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].

TDR NEWS - Praziquantel shows unexpected failure in recent schistosomiasis outbreak. **TDR NEWS**, v.41, p.1-2, 1992.

THOMAS, H.; GONNERT, R.; POHLKE, R. & SEUBERT, J. - A new compound against adult tapeworms. **Proceedings of the 7 International Conference of the World Association for the Advancement Veterinary Parasitology**, thessaloniki, abstract 51, 1975.

VAZ, J. F.; TELES, H.M.S.; LEITE, S.P.S.; CORRÊA, M. A., FABBRO, A.L.D. & ROSA, W.S. - Levantamento planorbídico do Estado de São Paulo. **rev. saúde pública**, v.20, p. 352-361, 1986.

WARREN, K. S. - A comparison of Puerto Rican, Brazilian, Egyptian and Tanzanian strains of *Schistosoma mansoni* in mice: penetration of cercariae, maturation of schistosomes and productions of liver disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 795-802, 1967.

WARREN, K. S. - The pathology, pathogenesis of schistosomiasis. **Nature**, v. 273, p. 609-612, 1978.

WHO - **The control of schistosomiasis**, 2<sup>o</sup> report of WHO Expert Committee, Gênova, 1991.

YEANG, F. S. W.; MARSHALL, I & HUGGINS, M. - Oxamniquine resistance in *Schistosoma mansoni*: fact or fiction? **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 81, p. 337-339, 1987.

YOLLES, T. K.; MOORE, P. V.; DEGENSTI, D. L.; RIPSON, C. A. & MELENEY, H. E. - A. & MELENEY, H. E. - A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. **J. Parasitol.**, v. 33, p. 419, 1947.

ZANOTTI, E. M.; MAGALHÃES, L. A. & PIEDRABUENA, A. E. - Avaliação da patogenicidade decorrente da infecção pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, agente de infecções unissexuais em *Mus musculus*. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 17, p. 394-405, 1983.

ZANOTTI MAGALHÃES, E. M. - Observação sobre a capacidade de infecção do molusco vetor e a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 no hospedeiro vertebrado. Campinas, SP, 1987. [Tese de Doutorado Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].

Nota : As referências bibliográficas estão de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABTN) NBR- 6023- Referências Bibliográficas, 1989.

As abreviações dos Títulos dos Periódicos seguem o Serial Sources for The Biosis previews. data-base. v. 1990, Philadelphia: Biosis 1991.

**ANEXO**

**Tabela 1** - Dados referentes ao número e percentagem de cercárias penetrantes e vermes recuperados, de camundongos infectados, não-tratados (grupo C), com 70 cercárias de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Cercárias Penetrantes		Vermes Recuperados	
	#	%	#	%
n	15	15	12	12
min	60	85,71	17	26,15
Q1	63	90,00	28,50	43,85
Q2	65	92,86	31,50	50,03
Q3	67	95,71	40,50	59,96
máx	69	98,57	48,00	80,00
média	65,33	93,33	33,83	52,11
dp	2,77	3,96	9,33	15,33

**Tabela 2** - Dados referentes ao número e percentagem de cercárias penetrantes e vermes recuperados, de camundongos infectados e tratados com oxamniquine (grupo O), com 70 cercárias de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Cercárias Penetrantes		Vermes Recuperados	
	#	%	#	%
n	15	15	13	13
min	64	91,43	7	10,29
Q1	65	92,86	14	21,21
Q2	67	95,71	18	28,13
Q3	68	97,14	21	30,77
máx	69	98,57	26	38,24
média	66,60	95,14	17,15	25,78
dp	1,72	2,46	5,79	8,50

**Tabela 3** - Dados referentes ao número e percentagem de cercárias penetrantes e vermes recuperados, de camundongos infectados e tratados com praziquantel (grupo P), com 70 cercárias de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Cercárias Penetrantes		Vermes Recuperados	
	#	%	#	%
n	16	16	14	14
min	56	80,00	6	8,96
Q1	64,50	92,14	8	12,31
Q2	66,50	95,00	10	14,93
Q3	68	97,14	11	16,18
máx	69	98,57	14	20,90
média	65,44	93,48	9,64	14,70
dp	3,61	5,16	2,31	3,47



**Tabela 4** - Dados de pesos corporais nas datas: da infecção, do tratamento e da perfusão, de camundongos infectados, não-tratados (grupo C), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Pesos Corporais (g)		
	na infecção	no tratamento	na perfusão
n	15	15	12
mín	19,44	26,10	23,98
Q1	22,35	28,82	28,45
Q2	25,20	33,28	31,77
Q3	26,32	34,60	33,42
máx	27,83	39,08	36,08
média	24,43	32,44	30,94
dp	2,37	3,46	3,73

**Tabela 5** - Dados de pesos corporais nas datas: da infecção, do tratamento e da perfusão, de camundongos infectados, tratados com Oxamniquine (grupo O), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Pesos Corporais (g)		
	na infecção	no tratamento	na perfusão
n	15	15	13
mín	21,26	31,30	27,22
Q1	23,74	31,92	34,20
Q2	24,20	33,70	36,80
Q3	26,20	37,11	39,30
máx	27,77	39,85	42,60
média	24,64	34,46	36,24
dp	1,80	2,91	4,17

**Tabela 6** - Dados de pesos corporais nas datas: da infecção, do tratamento e da perfusão, de camundongos infectados, tratados com Praziquantel (grupo P), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Pesos Corporais (g)		
	na infecção	no tratamento	na perfusão
n	16	16	14
mín	21,20	27,11	30,10
Q1	23,67	30,84	35,85
Q2	24,19	32,70	37,47
Q3	24,86	34,62	38,30
máx	27,29	39,70	45,22
média	24,19	33,04	37,09
dp	1,57	2,94	3,92

**Tabela 7** - Dados de pesos corporais nas datas: da infecção, do tratamento e da perfusão, de camundongos sadios (grupo S).

Estatísticas	Pesos Corporais (g)		
	na infecção	no tratamento	na perfusão
n	20	-	20
mín	24,29	-	33,40
Q1	26,54	-	37,15
Q2	27,72	-	40,30
Q3	28,95	-	42,29
máx	30,84	-	44,80
média	27,75	-	39,85
dp	1,63	-	3,40

**Tabela 8** - Dados de pesos do fígado e do baço de camundongos infectados, não-tratados (grupo C), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Pesos (g)	
	fígado	baço
n	12	12
mín	1,83	0,26
Q1	2,15	0,35
Q2	2,44	0,48
Q3	2,62	0,54
máx	2,74	0,80
média	2,37	0,48
dp	0,30	0,15

**Tabela 9** - Dados de pesos do fígado e do baço de camundongos saudáveis (grupo S).

Estatísticas	Pesos (g)	
	fígado	baço
n	20	20
mín	1,30	0,05
Q1	1,42	0,07
Q2	1,57	0,09
Q3	1,68	0,10
máx	1,80	0,14
média	1,55	0,09
dp	0,15	0,03

**Tabela 10** - Dados dos produtos dos diâmetros (em  $\mu\text{m}$ ) maior e menor dos granulomas de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

<b>Estatísticas</b>	<b>Produto (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>
n	70
mín	618,45
Q1	843,50
Q2	1021,95
Q3	1289,56
máx	2401,98
média	1125,75
dp	420,51

**Tabela 11** - Dados de vermes coletados, distribuídos por sexo, em camundongos infectados, não-tratados (grupo C), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Vermes Coletados (#)		
	macho	fêmea	casal
n	12	12	12
mín	0	1	7
Q1	1,50	1	9,50
Q2	3,00	2,00	13,00
Q3	6,50	2,50	18,00
máx	12	10	22
média	4,25	2,42	13,58
dp	4,11	2,50	4,96



**Tabela 12** - Dados de vermes coletados, distribuídos por sexo, em camundongos infectados, tratados com Oxamniquine (grupo O), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Vermes Coletados (#)		
	macho	fêmea	casal
n	13	13	13
mín	2	2	0
Q1	5	6	7
Q2	7	7	0
Q3	13	10	0
máx	15	11	5
média	9,08	7,08	0,54
dp	4,79	2,96	1,39

**Tabela 13** - Dados de vermes coletados, distribuídos por sexo, em camundongos infectados, tratados com Praziquantel (grupo P), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Vermes Coletados (#)		
	macho	fêmea	casal
n	14	14	14
mín	0	2	0
Q1	3	2	0
Q2	4,50	3,50	0
Q3	6	5	1
máx	10	8	5
média	4,71	3,86	0,57
dp	2,67	1,99	1,34

**Tabela 14** - Número e distribuição de vermes coletados nos grupos praziquantel, oxamniquine e controle, de camundongos infectados com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni* isolado do município de Ourinhos, SP.

Grupo	Camundongos		Vermes Coletados (#)			Localização	
	n	exam.	vivos	mortos	total	fígado	mesentério
Controle	15	12	406	0	406	63	343
Praziquantel	16	14	59	77	136	109	27
Oxamniquine	15	13	133	91	224	173	51

**Tabela 15** - Dados de vermes coletados, distribuídos pela vitalidade, em camundongos infectados, não-tratados (grupo C), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Vermes Coletados (#)	
	vivos	mortos
n	12	12
mín	17	0
Q1	28,50	0
Q2	31,50	0
Q3	40,50	0
máx	48,00	0
média	33,83	0,00
dp	9,33	0,00

**Tabela 16** - Dados de vermes coletados, distribuídos pela vitalidade, em camundongos infectados, tratados com Oxamniquine (grupo O), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Vermes Coletados (#)	
	vivos	mortos
n	13	13
mín	1	0
Q1	5	2
Q2	6	8
Q3	11	11
máx	26	17
média	10,23	7
dp	8,04	5,87

**Tabela 17** - Dados de vermes coletados, distribuídos pela vitalidade, em camundongos infectados, tratados com Praziquantel (grupo P), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Vermes Coletados (#)	
	vivos	mortos
n	14	14
mín	0	2
Q1	2	4
Q2	4	5,50
Q3	6	7
máx	12	11
média	4,21	5,50
dp	3,17	2,38

**Tabela 18** - Dados de vermes coletados, distribuídos pela localização, em camundongos infectados, não-tratados (grupo C), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Vermes Coletados (#)	
	fígado	mesentério
n	12	12
mín	0	0
Q1	0	24
Q2	1	29,50
Q3	3	36,50
máx	48	47
média	5,25	28,58
dp	13,57	12,24

**Tabela 19** - Dados de vermes coletados, distribuídos pela localização, em camundongos infectados, tratados com Oxamniquine (grupo O), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Vermes Coletados (#)	
	figado	mesentério
n	13	13
mín	3	0
Q1	11	1
Q2	15	4
Q3	17	6
máx	20	9
média	13,31	3,92
dp	5,17	3,33



**Tabela 20** - Dados com Praziquantel (grupo P), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Vermes Coletados (#)	
	fígado	mesentério
n	14	14
mín	5	0
Q1	6	1
Q2	8	1
Q3	9	3
máx	12	5
média	7,79	1,93
dp	2,08	1,68

**Tabela 21** - Dados das percentagens de vermes coletados no fígado, percentagens de vermes acasalados, percentagens de redução de vermes e percentagens de vermes mortos no fígado, dos camundongos infectados, não-tratados (grupo C), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

<b>Estatísticas</b>	<b>% de vermes coletados no fígado</b>	<b>% de vermes acasalados</b>	<b>% de redução de vermes</b>	<b>% de vermes mortos no fígado</b>
n	12	12	12	12
min	0,00	55,17	0,00	0,00
Q1	0,00	71,72	0,00	0,00
Q2	2,83	82,84	0,00	0,00
Q3	8,63	88,91	0,00	0,00
máx	100,00	97,56	0,00	0,00
média	12,20	79,46	0,00	0,00
dp	28,16	13,40	0,00	0,00

**Tabela 22** - Dados das percentagens de vermes coletados no fígado, percentagens de vermes acasalados, percentagens de redução de vermes e percentagens de vermes mortos no fígado, dos camundongos infectados, tratados com Oxamniquine (grupo O), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	% de vermes coletados no fígado	% de vermes acasalados	% de redução de vermes	% de vermes mortos no fígado
n	13	13	13	13
mín	33,33	0,00	0,00	0,00
Q1	64,00	0,00	28,57	28,57
Q2	80,95	0,00	52,38	60,00
Q3	95,24	0,00	61,54	80,00
máx	100,00	38,46	94,44	100,00
média	77,04	5,28	42,85	52,46
dp	20,41	11,81	30,35	36,98

**Tabela 23** – Dados das percentagens de vermes coletados no fígado, percentagens de vermes acasalados, percentagens de redução de vermes e percentagens de vermes mortos no fígado, dos camundongos infectados, tratados com Praziquantel (grupo P), com 70 cercárias da geração F1 de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	% de vermes coletados no fígado	% de vermes acasalados	% de redução de vermes	% de vermes mortos no fígado
n	14	14	14	14
mín	54,55	0,00	14,29	22,22
Q1	71,43	0,00	40,00	50,00
Q2	85,71	0,00	55,84	79,17
Q3	90,00	20,00	77,78	87,50
máx	100,00	71,43	100,00	100,00
média	80,76	10,10	58,48	70,16
dp	14,50	20,24	24,43	24,72

**Tabela 24** - Dados dos produtos das medidas (em  $\mu\text{m}^2$ ) de comprimento e largura dos ovos de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Produto ( $\mu\text{m}$ ) <sup>2</sup>
n	120
mín	6643,38
Q1	8861,68
Q2	9078,21
Q3	9632,15
máx	11168,30
média	9122,36
dp	693,37

**Tabela 25** - Dados das medidas de comprimento (em mm) dos vermes, machos e fêmeas, de *Schistosoma mansoni*, isolado do município de Ourinhos, SP.

Estatísticas	Comprimento (mm)	
	macho	fêmea
n	101	96
mín	7,23	9,12
Q1	12,09	12,72
Q2	13,28	14,58
Q3	14,68	17,77
máx	24,02	36,51
média	13,39	15,52
dp	2,17	4,30