

ANA CRISTINA FIGUEIREDO

ESTUDO DE CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS E MORFOLÓGICAS DE
CEPA PAULISTA DE *Schistosoma mansoni* DO VALE DO RIBEIRA

*Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida
pela candidata Ana Cristina Figueiredo e aprovada pela
Comissão Julgadora.*

J. Candido de S. D.

27/III/91

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Candido de Souza Dias

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Departamento de Parasitologia

1991

F469e

13594/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao meu velho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Candido de Souza Dias, meu querido "Doctor", pela orientação deste trabalho, pela amizade, dedicação e infinita paciência nos momentos mais difíceis.

A Profa. Dra. Eliana Heiser de Freitas Marques, pela amizade, orientação e valiosa colaboração realizando a análise estatística dos dados obtidos neste trabalho.

As Profas. Dra. Marlene Tiduko Ueta, Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo e Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães pela atenção, pertinentes críticas e sugestões, além da grande amizade.

Ao Serviço Regional-2 da Superintendência de Controle de Endemias, especialmente ao PqC Ricardo Ciaravolo, pela atenção e valiosa colaboração indispensáveis para a execução deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Parasitologia que contribuíram para a minha formação e cumprimento desta etapa.

A todos os funcionários do Departamento de Parasitologia, pela convivência e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Sra. Cleuza dos Santos "Negrinha", pela paciência e atenção dedicadas na elaboração do material histológico.

À Inês Angela Buso Adani "Barrozinho" e Verônica Sierpe "Chilenita", pela colaboração, amizade e participação em todos os momentos.

Aos colegas do curso de Pós-graduação pela amizade e convivência.

Ao meu marido Cláudio, pela paciência, compreensão, amor e presença em todos os momentos.

À minha família, pelo amor, dedicação e apoio constantes.

À FAPESP e CNPq pelos recursos financeiros fornecidos durante o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	pág
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	10
2.1 Isolamento da cepa de <i>S. mansoni</i>	10
2.2 Manutenção de <i>B. tenagophila</i> em laboratório	10
2.3 Estudo da cepa em <i>B. tenagophila</i> simpátrica	11
2.4 Estudo da cepa em camundongo "Swiss" fêmea	14
2.5 Estudo morfológico da cepa de <i>S. mansoni</i>	22
2.6 Análise estatística	24
3. RESULTADOS	25
3.1 Estudo da cepa em <i>B. tenagophila</i> simpátrica	25
3.2 Estudo da cepa em camundongo "Swiss" fêmea	25
3.3 Estudo morfológico da cepa de <i>S. mansoni</i>	29
TABELAS	31
FIGURAS	42
4. DISCUSSÃO	44
4.1 Estudo da cepa em <i>B. tenagophila</i> simpátrica	44
4.2 Estudo da cepa em camundongo "Swiss" fêmea	47
4.3 Estudo morfológico da cepa de <i>S. mansoni</i>	60
5. RESUMO E CONCLUSÕES	64
6. SUMMARY	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

A transmissão humana da esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo ocorre no: Vale do rio Paraíba do Sul, Grande São Paulo, Baixada Santista, Vale do rio Ribeira do Iguape, Região de Campinas e Vale do rio Paranapanema (Sucen, 1982). O principal hospedeiro intermediário é a *Biomphalaria tenagophila*. A *B. glabrata* é espécie hospedeira apenas no Vale do Paranapanema (Vaz et alii, 1983; 1986; 1987; Vaz, Teles & Takaku, 1985; Teles & Vaz, 1987). A *B. straminea* ocorre em 27 municípios, mas ainda não contribui na transmissão da esquistossomose no Estado (Teles & Vaz, 1988). Entretanto existe o relato de um exemplar naturalmente infectado por *Schistosoma mansoni* no município de Cruzeiro, Vale do Paraíba (Santos et alii, 1980).

Dentre estas regiões, onde a *B. tenagophila* é hospedeira, as que merecem destaque, no que diz respeito à importância epidemiológica são: Vale do Paraíba, Baixada Santista e Vale do Ribeira (Sucen, 1982).

A cepa de *S. mansoni* SJ (isolada do Município de São José dos Campos) Vale do Paraíba, tem sido estudada sob vários aspectos, tais como: suscetibilidade do molusco hospedeiro intermediário, infectividade, patogenicidade, morfologia do verme e suscetibilidade a drogas esquistossomicidas.

Torna-se necessário estudar o comportamento de outras cepas de *S. mansoni* e seu hospedeiro intermediário simpátrico de áreas do Estado onde a ocorrência de transmissão vem sendo

observada constantemente.

Dados recentes da Baixada Santista mostram que: a grande maioria dos casos detectados (89,0%) são importados de outros Estados; a distribuição dos casos autóctones por faixa etária revela que, os casos recentes são esporádicos e que a maioria dos portadores autóctones detectados são resíduos de uma antiga transmissão (Sucen, 1989).

Principalmente a área dos Municípios de Pedro de Toledo e Itariri, no Vale do Ribeira, foi uma das mais intensamente controlada nos últimos dez anos (Dias et alii, 1988; 1989; Marçal Jr, 1989). No entanto, esta região apresenta ainda número crescente de focos de transmissão com predominância de casos autóctones (47,9%) sobre os importados (41,5%) (Sucen, 1989). Estudo recente sobre epidemiologia e controle da esquistossomose no Município de Pedro de Toledo mostra que houve uma queda acentuada no coeficiente de prevalência humana após intensificação do programa de controle a partir de 1981. A prevalência de 22,8% observada em 1980, decresceu para 6% até o ano de 1987. A maioria dos casos são assintomáticos e apresentam baixa intensidade de infecção (Dias et alii, 1988). Ressalta-se que a descrição dos primeiros casos de esquistossomose do Vale do Ribeira, foi em 1953, com 43 casos autóctones do Distrito de Ana Dias, Município de Itariri (apud Piza & Ramos, 1960).

Na área endêmica do Vale do Ribeira, o município de Itariri apresentou nos últimos dois anos grande número de coleções hídricas com moluscos positivos para *S. mansoni* e alta

prevalência autóctone. Isto se deve às condições ambiente com elevado número de focos, aliados a um padrão de contato humano com coleções hídricas mais intenso, proporcionando maior risco de transmissão (Sucen, 1988 e 1989). Sabe-se que os criadouros são constantemente investigados, aplicando-se moluscocida a partir de detecção de focos. É feito o tratamento dos portadores e são adotadas outras medidas profiláticas. Entretanto, o comportamento da cepa de *S. mansoni* presente nestes focos não é conhecido.

No presente trabalho, dentre outros aspectos foi estudada a suscetibilidade de *B. tenagophila* à cepa de *S. mansoni* simpátrica de Itariri no Vale do Ribeira.

São numerosos os trabalhos sobre suscetibilidade de moluscos. Desde 1949, Files & Cram já admitiam a existência de diferenças fisiológicas intra e interespecíficas entre os parasitas de áreas endêmicas diferentes. Newton, (1953) considerou que a suscetibilidade estaria ligada a fatores genéticos e também à idade do molusco. Paraense & Corrêa (1963 b), não conseguiram infectar experimentalmente a *B. tenagophila* de São José dos Campos, SP (cepa SJ) com *S. mansoni* de Belo Horizonte, MG (cepa BH) e verificaram que *S. mansoni* (SJ) também não foi infectante para *B. glabrata* de Belo Horizonte. Os autores sugeriram haver uma necessidade, pelo menos em certas áreas, de uma adaptação fisiológica entre o molusco e a cepa do parasita pois, observaram que os moluscos se infectavam facilmente com as cepas simpátricas do verme.

Trabalhos com seleção por autofecundação demonstraram que a suscetibilidade de moluscos jovens seria controlada por

um complexo de quatro ou mais fatores genéticos e que a resistência adquirida na maturidade estaria condicionada a um único gene dominante (Richards & Merrit, 1972; Richards, 1973). Por meio de seleção de populações de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, Santana, Magalhães & Rangel (1978), obtiveram em 4 gerações de moluscos, exemplares altamente suscetíveis a cepas simpátricas de *S. mansoni*. Guaraldo et alii (1981), demonstraram que os moluscos geneticamente selecionados não são capazes de reconhecer a linhagem alopátrica do parasita como estranha pois, a linhagem BH infectou a SJ e vice-versa.

Resultados interessantes foram observados, em populações de moluscos selecionados geneticamente. Minchella & Loverde (1983), verificaram que moluscos não suscetíveis tem sua capacidade reprodutiva reduzida na presença de moluscos suscetíveis e do parasita. Estes autores concluíram que moluscos não suscetíveis não são predominantes em populações naturais que transmitem a doença, por serem colocados em desvantagem seletiva.

Em estudo recente, sobre moluscos do gênero *Biomphalaria* de Minas Gerais com relação à adaptação parasita hospedeiro, Souza (1986), mostrou crescente interesse sobre a importância da *B. tenagophila* e *B. straminea*, em áreas onde anteriormente a *B. glabrata* era considerada o molusco responsável pela transmissão. A autora fez uma revisão de estudos experimentais sobre suscetibilidade destas espécies do Estado de Minas Gerais à diferentes cepas de *S. mansoni* e destaca a importância epidemiológica da adaptação parasito-

hospedeiro.

No presente estudo foi avaliada a suscetibilidade da *B. tenagophila* do Distrito de Ana Dias, Município de Itariri, SP, à cepa simpátrica de *S. mansoni* isolada de um foco ativo de transmissão. Os índices de infecção natural observados nos moluscos coletados e examinados pelos serviços de rotina da SUCEN no Município de Itariri foram de: 21,2% em 2455 moluscos examinados em 1988 e 18,2% em 1253 no ano de 1989 (Sucen, 1988, 1989). É interessante salientar que, Paraense & Corrêa (1978), estudando a suscetibilidade de *B. tenagophila* de 20 localidades da América do Sul à infecção por *S. mansoni* de São José dos Campos (cepa SJ), obtiveram resultados variando entre 0-91,5%. O índice de 91,5% foi verificado em *B. tenagophila* do Distrito de Ana Dias.

Outro parâmetro importante considerado neste estudo, visando a caracterização da cepa de *S. mansoni* autóctone do Vale do Ribeira, SP, foi a suscetibilidade a drogas.

A quimioterapia da esquistossomose iniciou-se com o uso do tártaro emético, em pacientes portadores de *Schistosoma haematobium* no Sudão (Marshall, 1987). Entretanto, este e outros compostos descritos e utilizados posteriormente, como lucanthone, hycanthone e niridazole, devido a efeitos colaterais tóxicos e outros problemas, não preencheram os requisitos para se tornarem drogas seguras para o uso em grande escala. Atualmente, a Organização Mundial de Saúde, indica o metrifonato, oxamniquine e praziquantel, para o tratamento das esquistossomoses humanas (Marshall, 1987).

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que

existe uma grande variação nas respostas terapêuticas de cepas de *S. mansoni*, não só de áreas geográficas diferentes, como também dentro de uma mesma área.

Araújo et alii (1980), utilizando niridazole, hycanthone e oxamniquine, observaram diferenças significativas nas respostas terapêuticas de sete cepas de *S. mansoni* isoladas de pacientes que se infectaram no Estado de Minas Gerais.

Coles et alii (1986), alertaram sobre o problema potencial de desenvolvimento de resistência à droga na esquistossomose, devido a utilização de quimioterápicos, administrados por via oral e bem tolerados, em larga escala em áreas endêmicas.

No Brasil, os primeiros casos de resistência de cepas de *S. mansoni* à esquistossomicidas foram registrados por Katz et alii (1973); Campos et alii (1976) e Dias et alii (1978).

Estudando o significado da variação da suscetibilidade de *S. mansoni* ao oxamniquine, Kinotti (1987), concluiu que: a suscetibilidade é controlada geneticamente; a grande variação na suscetibilidade demonstrada pelo parasita, indica que o *S. mansoni* possui uma grande capacidade de desenvolver resistência as doses terapêuticas de oxamniquine; a resistência pode ser esperada quando e onde o parasita sofrer pressão contínua da droga.

Coles et alii (1987), reforçaram as conclusões acima, quando consideraram que o desenvolvimento da resistência em uma população de vermes, depende de vários fatores, tais como: a porcentagem de pessoas tratadas; a dosagem da droga usada e

sua eficácia; a frequência com que a população é tratada e o movimento da população humana.

O enfoque da suscetibilidade a drogas no presente estudo justifica-se pois, os portadores de esquistossomose mansônica da área (Vale do Ribeira, SP), vêm sendo tratados com oxamniquine desde 1974 (Sucen, 1982).

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

Saoud em 1966, mostrou não haver relação entre a virulência e a carga parasitária e que, a distribuição dos ovos nos tecidos era influenciada tanto pela linhagem do parasita 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 e SJ, 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 diferiram 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 relacionada à suscetibilidade do molusco, foi estudada detalhadamente por Zanotti (1987), por meio dos seguintes parâmetros: taxa de infecção dos moluscos; taxa de mortalidade de camundongos infectados; capacidade de penetração de cercárias e seu desenvolvimento em vermes adultos; pesos corporal, do fígado e do baço; número, diâmetro e distribuição de reações granulomatosas nos tecidos; e número de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes. A autora verificou: menor capacidade de penetração de cercárias da linhagem BH; na linhagem SJ o maior número de vermes desenvolvidos eram provenientes de moluscos mais suscetíveis. Observou ainda que, a maior suscetibilidade dos moluscos corresponde, em camundongos, a um maior número 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 o número de

ovos eliminados nas fezes do hospedeiro, salientando a importância epidemiológica.

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

Paraense & Corrêa (1981), concluíram que BH e SJ são duas raças biológicas distintas de *S. mansoni*, após estudos de cruzamentos, morfologia dos vermes e tamanho de ovos destas duas linhagens.

O presente trabalho foi elaborado com o objetivo de determinar algumas características do *S. mansoni* recém-isolado (geração F2) do Vale do Ribeira (Distrito de Ana Dias, Município de Itariri), SP, por meio dos seguintes critérios:

- Suscetibilidade do molusco (*B. tenagophila*)
- Suscetibilidade do *S. mansoni* a drogas esquistossomicidas
- Capacidade de penetração de cercárias e recuperação de vermes
- Peso corporal, do fígado e do baço de camundongos infectados
- Mortalidade de camundongos infectados
- Diâmetro das reações granulomatosas do fígado
- Morfometria dos vermes e de ovos

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento da cepa de Schistosoma mansoni

A cepa de *S. mansoni*, foi isolada a partir de cercárias eliminadas por *B. tenagophila* naturalmente infectadas. Os moluscos foram coletados de um foco ativo de transmissão de esquistossomose na localidade de Ana Dias, Município de Itariri, SP, (Vale do Ribeira) em julho de 1988.

Os moluscos coletados no campo foram examinados e constatou-se que de 200 moluscos, 5 apresentaram eliminação de cercárias. Todos os moluscos foram examinados semanalmente durante 40 dias. Durante este período apenas os 5 moluscos iniciais continuaram eliminando cercárias. As larvas obtidas foram utilizadas para infectar camundongos "Swiss" fêmeas, para obtenção da geração parental do verme.

2.2 Manutenção de Biomphalaria tenagophila em laboratório

A partir de moluscos do campo, foram coletadas desovas para criação de seus descendentes em laboratório. Para facilitar a obtenção e coleta das desovas, usou-se o artifício de colocar pedaços de isopor para servirem de substrato para os moluscos desovarem.

Os isopores com as desovas foram inicialmente transferidos para pequenos aquários de vidro (cristalizadores ou pirex), para eclosão. Os moluscos foram alimentados com

pequenos pedaços de folha de alface fresca e aqueles aderidos às folhas de alface foram transferidos para tanques de Eternit (50 l). Deste modo, foram preparados 6 tanques para criação e manutenção de moluscos em laboratório. A alimentação nos tanques constituiu-se de: folhas de alface fresca e ração triturada para rato suplementada com 10% de carbonato de cálcio (Souza et alii, 1987). A criação foi mantida à temperatura ambiente.

2.3 Estudo da cepa de S. mansoni em B. tenagophila simpátrica

2.3.1 Grupos experimentais

Para o estudo da suscetibilidade de moluscos, com geração F2 do verme, foram formados 3 grupos de 60 moluscos, com diâmetro de 5 a 8 mm, da seguinte maneira:

Grupo M1 - 60 moluscos expostos à 10 miracídeos

Grupo M2 - 60 moluscos expostos à 1 miracídeo

Grupo M3 - 60 moluscos não expostos à infecção (Controle)

2.3.2 Infecção dos moluscos

As fezes de camundongos foram diluídas em salina 0,85% a 10 graus C e filtradas em gaze. Em seguida o filtrado foi passado por uma seqüência de quatro peneiras de malhas metálicas de 125, 105, 88 e 37 μ m. Durante esta operação o material foi lavado com salina 0,85% na temperatura aproximada

de 10 graus C. O sedimento obtido na peneira de malha mais fina foi transferido para uma placa de Petri acrescido de salina gelada. O material foi observado em microscópio estereoscópico e com movimentos circulares, os ovos foram deslocados para o centro da placa e então, pipetados e transferidos para uma seqüência de duas peneiras menores com tela de nylon monofilamento de 74 e 20 μ m montadas em tubos de PVC (Liang, Boyd & Bruce, não publicado). Os ovos retidos na última peneira, foram ressuspensos em água declorada e colocados em placas de Petri que foram então, expostas à luz e temperatura de 28 graus C, proveniente de lâmpadas elétricas (Standen, 1952) controlada por meio de termômetro colocado ao lado em outra placa contendo igual quantidade de água.

Os miracídios eclodidos foram observados e contados em microscópio estereoscópico. Com auxílio de pipeta Pasteur, foram transferidos para frascos de vidro (capacidade 8 ml), sendo apenas pipetados os miracídios que apresentavam movimento ativo (Paraense & Corrêa, 1963 a).

Exemplares da população de *B. tenagophila*, criados em laboratório, medindo de 5 a 8 mm de diâmetro, foram colocados individualmente em frascos contendo 1 e/ou 10 miracídios recém-eclodidos. Os moluscos foram expostos ao calor de 28 graus C e iluminação emanadas por lâmpadas elétricas, durante 2 horas (Pellegrino & Macedo, 1955). Terminado o período de exposição, os moluscos foram transferidos para pequenos aquários de vidro para posteriormente serem examinados e obtidas cercárias para infecções subsequentes. Os moluscos do grupo M3 (controle),

foram submetidos às mesmas condições de manipulação e exposição à luz e calor.

2.3.3 Mortalidade dos moluscos

A mortalidade dos moluscos expostos à infecção e os do grupo controle foi registrada diariamente, durante 78 dias após a infecção.

2.3.4 Exame dos moluscos

Os moluscos foram examinados semanalmente a partir de 21 dias após a infecção durante 78 dias. O grupo controle (M3) foi sempre submetido às mesmas condições que os infectados (M1 e M2).

Os moluscos foram examinados individualmente, para observar a presença de cercárias, usando-se pequenos frascos de vidro (capacidade de 10 ml) com 5 ml de água dechlorada; após a exposição dos frascos com os moluscos à luz e calor (28 graus C) durante 2 horas, a presença de cercárias foi detectada com microscópio estereoscópico (Olivier & Stirewalt, 1952).

2.3.5 Acompanhamento do período de eliminação de cercárias

Após 78 dias de infecção aqueles moluscos que eliminavam cercárias, foram mantidos em observação, sendo examinados semanalmente, com finalidade de se detectar o término de liberação das larvas.

2.4 Estudo da cepa de S. mansoni em camundongo "Swiss" fêmea

2.4.1 Grupos experimentais

Para os estudos referentes à suscetibilidade a drogas esquistossomicidas; infectividade; patogenicidade e morfometria de vermes e de ovos, foram formados grupos de camundongos, com idade variando entre 33 e 40 dias e peso corporal médio de 24 g, da seguinte maneira:

Grupos C1, C2 e C3: cada grupo composto de 20 camundongos infectados com 70 cercárias.

Grupo C4: composto de 20 camundongos sadios (Controle)

2.4.2 Identificação dos camundongos

Os camundongos foram marcados com pintura de ácido pícrico na pelagem, de maneira a serem individualizados de 1 a 10 em cada gaiola.

2.4.3 Infecção dos camundongos

As cercárias foram obtidas no laboratório a partir da exposição individual de moluscos, usando-se pequenos frascos de vidro (capacidade 10 ml) com 5 ml de água declorada; após a exposição dos frascos com os moluscos à luz e calor (28 graus C) durante 2 horas (Olivier & Stirewalt, 1952), detectou-se a presença de cercárias em microscópio estereoscópico. Em

seguida preparou-se um "pool" de cercárias e estas com auxílio de pipeta Pasteur, foram contadas e transferidas para tubos de ensaio (10 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro). As cercárias foram obtidas a partir de no mínimo 30 moluscos.

Para infecção dos camundongos utilizou-se a técnica de imersão da cauda do animal em tubos de ensaio, contendo suspensão de 70 cercárias e expondo-se à luz e calor (27 graus C) durante 2 horas (Magalhães, 1969).

Os animais foram imobilizados para infecção em pequenos dispositivos, segundo técnica descrita por Broome & Radke (1971). Na referida técnica os autores usavam imobilizadores de acrílico, os quais foram por nós adaptados em material de PVC.

2.4.4 Sorteio dos tratamentos para os camundongos

Os camundongos dos grupos C1, C2 e C3, foram submetidos a um sorteio e deste modo foram formados os seguintes grupos experimentais:

Grupo Praziquantel - 20 camundongos infectados que receberam tratamento com praziquantel

Grupo Oxamniquine - 20 camundongos infectados que receberam tratamento com oxamniquine

Grupo Controle - 20 camundongos infectados que não receberam tratamento

Grupo Controle sadio - 20 camundongos sadios

O método de aleatorização usado para aplicação dos 3 tratamentos, teve como objetivos: evitar o uso de julgamento pré-concebido ou arranjos sistemáticos, garantir um número de camundongos para cada tratamento, e prover uma base para posteriores análises estatísticas. Este método, de blocos permutados aleatoriamente, é descrito abaixo:

Para 3 tratamentos (blocos de 3 camundongos), selecionaram-se as combinações:

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

ignorar os dígitos 0, 7, 8 e 9

Números foram então obtidos, usando-se a tabela de números aleatórios e assinalados cada um a combinação de letras correspondente.

Por exemplo: os três primeiros números sorteados foram 8, 6, 5 então:

8: foi ignorado

6: correspondente a combinação C B A

5: correspondente a combinação C A B

Desta maneira, uma lista aleatória de tratamentos foi

gerada usando-se os dígitos de 1 a 6, um dígito para cada 3 tratamentos (Pocock, 1986).

Este foi o critério usado para aplicar os tratamentos de interesse nos camundongos dos Grupos C1, C2 e C3.

2.4.5 Suscetibilidade do S. mansoni a drogas esquistossomicidas

2.4.5.1 Tratamento dos camundongos

Os camundongos receberam o tratamento aos 55 dias de infecção. Após a pesagem do animal as drogas foram administradas obedecendo as seguintes dosagens:

Oxamniquine (Mansil xarope), na dose única de 100 mg/Kg
(via oral). Diluído em água destilada.

Praziquantel puro, na dose de 100 mg/Kg por 5 dias (via oral).
Diluído em 25% glicerina e 1% cremophor (Coles et alii, 1986).

O grupo controle recebeu, oralmente, uma dose de 0,3 ml de água destilada.

A administração oral foi feita por tubagem gástrica.

2.4.5.2 Perfusão dos camundongos

Os camundongos foram sacrificados por meio de fratura da coluna cervical e tiveram os seus sistemas porta-hepático perfundidos (Yolles et al, 1947). O sacrificio ocorreu após 14

dias do término do tratamento, por ocasião da décima semana de infecção.

2.4.5.3 Coleta de vermes

Após a perfusão, o fígado de cada animal foi retirado e esmagado entre duas placas de vidro, para verificação da existência de vermes não recolhidos pela perfusão (Hill, 1956).

Todos os vermes foram examinados, separados, contados e classificados conforme: número, localização, sexo e vitalidade (vivo ou morto), em cada camundongo perfundido.

2.4.5.4 Oograma

Foi realizado oograma qualitativo de todos os camundongos infectados, que tiveram seu sistema porta-hepático perfundido, sendo observado cerca de 300 ovos por animal. O estudo do oograma foi feito em fragmento do intestino delgado (Pellegrino & Katz, 1968).

2.4.5.5 Critérios utilizados na avaliação da suscetibilidade a drogas esquistosomocidas

Avaliou-se a suscetibilidade às drogas esquistosomicidas por meio dos seguintes critérios:

- percentagem de vermes nas veias intra-hepáticas, porta e mesentéricas.

- percentagem de vermes mortos.
- percentagem de animais com alteração de oograma (ausência de um ou mais estadios de desenvolvimento dos ovos) (Pellegrino & Katz, 1968).
- percentagem de vermes sobreviventes (Jansma et alii, 1977):

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

onde: T = número médio de vermes vivos encontrados no grupo
Teste

C = número médio de vermes vivos encontrados no grupo
Controle

- percentagem de redução de vermes (Gönnert & Andrews, 1977):

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

2.4.6 Infectividade e patogenicidade do S. mansoni

2.4.6.1 Capacidade de penetração de cercárias

Após a exposição dos camundongos à suspensão de cercárias por 2 horas, o animal foi retirado e sua cauda lavada com jato de água em uma placa de Petri quadriculada. Em

seguida, o conteúdo do tubo de ensaio foi vertido na placa de Petri e lavado com jato de água, com finalidade de recuperar possíveis cercárias aderidas no tubo. Acrescentou-se então, cerca de 1 ml de álcool 70% e deixou-se decantar para facilitar a contagem das larvas. O material foi observado em microscópio estereoscópico.

A capacidade de penetração de cercárias foi avaliada pela contagem de cercárias inteiras e porções cefálicas presentes na placa. O número de cercárias penetrantes é dado pela diferença entre o número de cercárias a que cada camundongo foi exposto (70) e o número obtido na contagem, segundo Magalhães (1969), com modificações comunicadas pelo autor.

2.4.6.2 Percentagem de recuperação de vermes

A recuperação de vermes foi verificada, mediante a contagem de vermes recolhidos nas perfusões dos sistemas porta-hepático dos camundongos infectados (Controle).

A percentagem de recuperação foi calculada a partir do número de cercárias penetrantes por camundongo.

2.4.6.3 Mortalidade de camundongos

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

2.4.6.4 Peso corporal dos camundongos

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

2.4.6.5 Peso do fígado e do baço

O fígado e o baço dos camundongos Controles (infectados e sadios) foram retirados após a perfusão, para pesagem em balança analítica.

Os animais do grupo (Controle sadios), foram sacrificados em idade equivalente aos camundongos infectados. Tiveram o sistema porta-hepático perfundido, antes da pesagem dos órgãos, para padronização metodológica.

2.4.6.6 Dimensões das reações granulomatosas do fígado

Preparação dos 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).

O material foi fixado em Bouin aquoso 5%, incluído em parafina e posteriormente processado cortes de 5 μ m de espessura, corados pela Hematoxilina e Eosina (HE).

Para cada fragmento de fígado, foram montadas 6 lâminas, com 4 a 10 cortes seriados em cada lâmina. O intervalo

de corte obedecido foi de 400 μ m para cada duas lâminas seriadas (Guaraldo, 1987).

Medidas dos diâmetros das reações granulomatosas

A verificação do tamanho da reação granulomatosa, foi dada pela média de 2 diâmetros intercruzados em ângulo reto (Carvalho et alii, 1986; Zanotti, 1987; Guaraldo, 1987; Coelho, 1989). Com finalidade de se obter maior precisão no ângulo entre as medições, utilizou-se ocular micrométrica Zeiss (8 X).

Para cada camundongo, foram medidos apenas as reações que apresentavam com nitidez um ovo na sua porção central, presentes nos cortes das 6 lâminas examinadas (Zanotti, 1987, Guaraldo, 1987).

2.5 Estudo Morfológico da cepa de S. mansoni

2.5.1 Vermes

2.5.1.1 Fixação, coloração e montagem

Os vermes coletados nas perfusões dos animais infectados (Grupo Controle), foram primeiramente fixados em álcool 70%, para posterior coloração (Schell, 1969). A coloração utilizada foi o Carmim clorídrico e os vermes foram montados em lâmina com Bálsamo do Canadá. Foi possível montar 134 machos e 87 fêmeas para realização das medidas.

2.5.1.2 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 a realização das medições, usou-se: um microscópio com câmara clara, mesa digitalizadora acoplada ao microcomputador e programação especialmente idealizada pelo Prof. 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 (32 X) e a imagem projetada sobre a mesa digitalizadora. Em seguida mediu-se o comprimento do verme, cujo valor foi inserido diretamente no microcomputador.

2.5.2 Ovos

2.5.2.1 Preparação do material

Para realização das medidas dos ovos, foram coletadas fezes de camundongos dos Grupos C1, C2 e C3, por ocasião de 45-50 dias de infecção. Mediu-se 40 ovos por grupo de camundongo.

O material foi lavado segundo técnica descrita no item 2.3.2, mantendo-o em solução salina (0,85%) gelada.

2.5.2.2 Morfometria dos ovos

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

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através de estudo descritivo, com uso de tabelas e gráficos e de testes estatísticos tais como: teste de médias, comparação múltipla para avaliação da significância estatística das médias, qui-quadrado para três proporções e outros. A significância considerada foi de 95% ($\alpha = 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Estudo da cepa de S. mansoni em B. tenagophila simpátrica

3.1.1 Suscetibilidade de moluscos

Os moluscos infectados com 1 e 10 miracídeos apresentaram o mesmo período pré-patente (55 dias) embora, os índices de positividade tenham sido bastante diferentes 8,3% e 60,0% respectivamente (tab. 1 e fig. 1)

O período de eliminação de cercárias foi bastante longo nos dois grupos infectados. Os moluscos infectados com 1 miracídeo eliminaram cercárias durante 82 dias após o período pré-patente e aqueles infectados com 10 miracídeos eliminaram cercárias durante 104 dias (fig. 1)

Verificou-se que os índices de mortalidade dos moluscos expostos à infecção e dos moluscos controles (não infectados), observados durante o período de 78 dias, não revelaram diferenças significativas (tab. 1 e fig. 2). O teste de qui-quadrado para proporções múltiplas ($\chi^2_{(2)} = 5,99$), resultou não significativo ($\alpha = 0,05$).

3.2 Estudo da cepa de S. mansoni em camundongo "Swiss" fêmea

3.2.1 Suscetibilidade de S. mansoni a drogas esquistossomicidas - oxamniquine e praziquantel

Para o estudo da suscetibilidade a drogas, foram

tratados 20 animais dos grupos Controle e Oxamniquine, 19 animais do grupo Praziquantel. Devido a morte de 16 camundongos, o número de animais examinados nos respectivos grupos foi: 14, 13 e 16.

O número de vermes vivos e mortos coletados nas perfusões e as respectivas distribuições, encontram-se dispostos nas tabelas 2, 3 e 4. Assinala-se que todos os vermes mortos foram encontrados no fígado. Dentre os vermes vivos recuperados, observamos no grupo praziquantel que 95,5% eram fêmeas e, no grupo oxamniquine as fêmeas corresponderam a 93,6% .

Constatou-se que as duas drogas utilizadas apresentaram resultados semelhantes quanto as percentagens de distribuição dos vermes e alteração de oograma (tab. 5). Entretanto, existem diferenças entre as percentagens de redução de vermes e de vermes sobreviventes. Analisando-se estatisticamente, as respectivas percentagens, pelo teste para duas proporções e teste de Wilcoxon, verificou-se diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) entre as duas drogas. O praziquantel mostrou-se mais eficaz que o oxamniquine.

3.2.2 Capacidade de penetração de cercárias

A capacidade de penetração de cercárias pela cauda de camundongos, apresentada pela cepa de *S. mansoni* em estudo, mostrou-se bastante elevada. Analisando-se os resultados observados em 56 camundongos expostos à infecção com 70

cercárias, obteve-se uma percentagem média de $87,9 \pm 8,24\%$ de penetração de cercárias, correspondendo ao número médio de $61,6 \pm 5,76$ cercárias penetrantes. Não foi possível realizar a contagem em 4 camundongos, devido a problemas técnicos.

3.2.3 Recuperação de vermes

O número de vermes recuperados foi verificado por ocasião da perfusão do sistema porta-hepático dos camundongos infectados (Controle), na décima semana de infecção.

Nota-se que ocorreu equilíbrio entre vermes machos e fêmeas nas infecções (tab. 6). Em um dos camundongos em que não foi possível a contagem de cercárias penetrantes, recuperou-se apenas 1 verme fêmea.

A percentagem média de recuperação de vermes adultos, foi de 53,8% calculado a partir do número de cercárias penetrantes (tab. 7).

3.2.4 Mortalidade de camundongos

Constatou-se que o início da mortalidade dos animais infectados (Controle) aconteceu a partir da nona semana (67 dias). O índice de mortalidade observado até a perfusão dos animais na décima semana (72 dias), foi de 30,0% (tab. 8).

Os camundongos do grupo controle (sadio), com idades equivalentes aos infectados, não apresentaram mortalidade dentro do mesmo período.

3.2.5 Peso corporal dos camundongos

Os pesos corporais (iniciais e finais) dos camundongos controles (infectados e sadios) e dos camundongos infectados tratados com oxamniquine e praziquantel, foram analisados utilizando-se o método de análise de variância (ANOVA). A análise resultou que, as médias dos pesos não diferem estatisticamente ($\alpha=0,05$) (tab. 9). Todavia quando se analisou o ganho de peso dos animais nos diferentes grupos, observou-se que o ganho médio de peso dos camundongos do grupo (Controle infectado) diferiu significativamente dos demais grupos. Este resultado mostra que dentro do mesmo período de observação os camundongos infectados apresentaram menor desenvolvimento quando comparados com os animais sadios e os tratados com esquistossomicidas. Ressalta-se que esses últimos, apresentaram acentuada ganho de peso no período entre o tratamento e o sacrifício (tab.9).

Foram feitos testes de correlação com a finalidade de verificar se existiu correlação entre a carga parasitária e ganho de peso dos animais do grupo controle (infectado). Os testes foram aplicados para $n=14$ e $n=13$ ou seja, incluindo e excluindo os dados correspondentes ao camundongo infectado com apenas 1 verme (tab. 10). Os dados apresentaram correlação negativa não significativa ($r = 0,35$, $(P=0,22)$ e $r = -0,24$, $(P = 0,35)$).

3.2.6 Peso do fígado e do baço de camundongos

Os pesos médios dos órgãos dos camundongos controle (sadios e infectados), foram analisados pelo teste t de Student. A análise demonstrou que houve diferença significativa entre as médias dos pesos do fígado e do baço de camundongos controles sadios e infectados ($\alpha = 0,05$). Entretanto, a análise correspondente ao peso de fígado de camundongos infectados, deve ser vista com cautela, devido ao pequeno número de observações (10) (tab. 11). Não foram pesados 4 fígados deste grupo, devido a problemas técnicos com a balança analítica.

Com finalidade de verificar se existiu associação entre a carga parasitária e o aumento do peso dos órgãos, foram feitos testes de correlação. A análise evidenciou que existe correlação positiva significativa entre a carga parasitária e o peso do baço ($r = 0,81$, $P < 0,001$) (tab. 12).

3.2.7 Dimensões das reações granulomatosas

Foram medidas 93 reações granulomatosas presentes nos cortes histológicos dos fígados de camundongos do Grupo (Controle infectados).

O diâmetro médio obtido, foi de $340,70 \pm 68,89 \mu\text{m}$, com valor máximo de $520,70 \mu\text{m}$ e mínimo de $228,22 \mu\text{m}$.

3.3 Estudo morfológico

3.3.1 Morfometria dos vermes

Foi possível medir o comprimento (mm) de 99 vermes machos e 61 fêmeas, pois estes se encontravam em posição adequada (tab. 13).

Os comprimentos médios observados em vermes machos e fêmeas, embora sejam bastante próximos, foram analisados pelo teste t de Student e a análise evidenciou serem estatisticamente diferentes.

3.3.2 Morfometria dos ovos

Foram medidos o comprimento e a largura de 120 ovos cujos espículos eram visíveis no plano horizontal.

Os valores médios de comprimento e largura verificados, encontram-se na tabela 14.

TABELA 1 : Suscetibilidade de *B. tenagophila* infectados com 10 e 1 miracídeos, da geração F2 de *S. mansoni* isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

DIAS DE OBSERVAÇÃO APÓS INFEÇÃO	MOLUSCOS INFECTADOS								CONTROLE	
	COM 10 MIRACÍDIOS				COM 1 MIRACÍDIO				NÃO INFECTADOS	
	VIVOS		MORTOS		ELIMINARAM CERCÁRIAS		VIVOS		MORTOS	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
21	60	0,0	0	0,0	58	3,3	0	0,0	60	0,0
28	60	0,0	0	0,0	56	6,7	0	0,0	59	1,7
35	58	3,3	0	0,0	55	8,3	0	0,0	57	5,0
42	58	3,3	0	0,0	53	11,7	0	0,0	56	6,7
48	53	11,7	0	0,0	53	11,7	0	0,0	56	6,7
55	52	13,3	17	28,3	51	15,0	4	6,7	53	11,7
64	47	21,7	33	55,0	48	20,0	5	8,3	51	15,0
71	46	23,3	36	60,0	46	23,3	3	5,0	49	18,3
78	41	31,7	31	51,7	46	23,3	3	5,0	47	21,7

TABELA 2 : Número e distribuição de vermes coletados nos grupos (Praziquantel, Oxamniquine e Controle) de camundongos infectados com 70 cercárias da geração F2 de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

GRUPO	NÚM DE CAMUNDONGOS		NÚM. DE VERMES COLETADOS			DIST. DOS VERMES	
	TRATADOS	EXAMINADOS	VIVOS	MORTOS	TOTAL	FÍGADO E VEIA PORTA	MESENTÉRIO
PRAZIQUANTEL	19	16	22	178	200	193	7
OXAMNIQUINE	20	13	47	144	191	183	8
CONTROLE	20	14	415	0	415	98	317

Dosagem : praziquantel 100 mg/kg, 5 dias (via oral)
 oxamniquine 100 mg/kg, dose única (via oral)
 controle 0,3 ml de água destilada (via oral)

TABELA 3 : Número médio de vermes coletados nos grupos (Praziquantel, Oxamniquine e Controle) de camundongos infectados com 70 cercárias da geração F2 de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

GRUPO	NÚMERO MÉDIO DE VERMES COLETADOS				
	VIVOS		MORTOS		TOTAL
	n	%	n	%	n
PRAZIQUANTEL	1,4 ± 1,74	9,7	11,1 ± 4,24	90,3	12,5 ± 5,11
OXAMNIQUINE	3,6 ± 2,81	22,4	11,1 ± 4,76	77,7	14,7 ± 6,35
CONTROLE	29,6 ± 12,62	100,0	0,0 ± 0,0	0,0	29,6 ± 12,62

Dosagem : praziquantel 100 mg/kg, 5 dias (via oral)
 oxamniquine 100 mg/kg, dose única (via oral)
 controle 0,3 ml de água destilada (via oral)

TABELA 4 : Distribuição média de vermes coletados nos grupos (Praziquantel, Oxamniquine e Controle) de camundongos infectados com 70 cercárias da geração F2 de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

GRUPO	DISTRIBUIÇÃO MÉDIA DOS VERMES			
	FÍGADO E VEIA PORTA		MESENTÉRIO	
	n	%	n	%
PRAZIQUANTEL	12,1 ± 4,72	97,4	0,4 ± 0,81	2,6
OXAMNIQUINE	14,1 ± 6,02	96,5	0,6 ± 0,96	3,5
CONTROLE	7,0 ± 6,53	29,0	22,6 ± 11,89	71,0

Dosagem : praziquantel 100 mg/kg, 5 dias (via oral)
 oxamniquine 100 mg/kg, dose única (via oral)
 controle 0,3 ml de água destilada (via oral)

TABELA 5 : Atividade esquistossomícida de Praziquantel e Oxamniquine em camundongos infectados com 70 cercárias da geração F2 de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

GRUPO	NÚMERO MÉDIO DE VERMES COLETADOS	% DE VERMES COLETADOS		% DE VERMES MORTOS NO FÍGADO	% DE ALTERAÇÃO DE OOGRAMA	% DE REDUÇÃO DE VERMES	% DE VERMES SOBREVIVENTES
		FÍGADO	MESENTERIO				
PRAZIQUANTEL	12,5	97,4	2,6	90,3	100,0	89,0	4,6
OXAMNIQUINE	14,7	96,5	3,5	77,7	100,0	75,4	12,2
CONTROLE	29,6	29,0	71,0	0,0	0,0	—	—

Dosagem: praziquantel 100 mg/Kg, 5 dias (via oral)
 oxamniquine 100 mg/Kg, dose única (via oral)
 controle 0,3 ml de água destilada (via oral)

Tabela 6 : Número médio de vermes coletados em camundongos do grupo controle, infectados com 70 cercárias, da geração F2 de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

NÚMERO DE CAMUNDONGOS (n)	NÚMERO MÉDIO DE VERMES COLETADOS		
	MACHO	FÊMEA	TOTAL
14	14,50 ± 6,38	15,14 ± 6,80	29,64 ± 12,62
13 *	15,61 ± 5,02	16,23 ± 5,67	31,84 ± 9,94

* excluindo um camundongo infectado com apenas 1 verme fêmea

TABELA 7 : Recuperação de vermes, em camundongos (controle) infectados com 70 cercárias, da geração F2 de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (n)	NÚMERO MÉDIO DE CERCÁRIAS PENETRANTES (n)	NÚMERO MÉDIO DE VERMES RECUPERADOS (n)	PERCENTAGEM MÉDIA DE RECUPERAÇÃO DE VERMES (%)
13	59,3 ± 6,84	31,8 ± 9,94	53,8 ± 16,82

TABELA 8 : Mortalidade de camundongos do grupo (Controle) infectados com 70 cercárias, da geração F2 de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

DIAS DE INFECCÃO	CAMUNDONGOS	
	VIVOS (n)	MORTOS (%)
55	20	0,0
67	17	15,0
71	16	20,0
72	14	30,0

TABELA 9 : Pesos corporais de camundongos infectados com 70 cercárias, da geração F2 de *S. mansoni* isolado do Município de Itariri, SP, em 1988. Grupos Controles (infectados e sadios), Praziquantel e Oxamniquine.

GRUPO	NÚMERO DE CAMUNDONGOS	PESO MÉDIO (g)			
		INICIAL	TRATAMENTO *	FINAL **	VARIAÇÃO
CONTROLE (SADIO)	20	23,74 ± 2,51	—	34,78 ± 3,79	11,04 ± 2,63
INFECTADOS TRATADOS COM PRAZIQUANTEL	16	23,88 ± 1,40	28,29 ± 3,76	33,97 ± 2,59	10,09 ± 2,32
INFECTADOS TRATADOS COM OXAMNIQUINE	13	24,97 ± 2,27	29,19 ± 3,29	33,75 ± 3,01	8,78 ± 2,42
CONTROLE (INFECTADO)	14	24,89 ± 2,36	29,10 ± 4,16	30,43 ± 4,84	5,54 ± 4,51

F = 9,69 (P < 0,001)
0,05 (3,59)

* 55 dias de infecção

** 72 dias de infecção

TABELA 10 : Pesos corporais de 14 camundongos do grupo (Controle) infectados com 70 cercárias, da geração F2 de *S. mansoni* isolado do Município de Itariri, SP, em 1988, relacionados com a carga parasitária.

CAMUNDONGO	PESO (g)			CARGA PARASITÁRIA (n)
	INICIAL	FINAL	VARIAÇÃO	
1	21,23	29,40	8,17	38
2	24,89	27,41	2,52	31
3	23,87	34,68	10,81	1
4	27,83	38,22	10,39	33
5	25,81	36,00	10,19	11
6	29,59	36,26	6,67	21
7	22,68	35,73	13,05	38
8	25,89	26,18	0,29	33
9	24,67	27,65	2,98	47
10	28,36	28,57	0,21	36
11	23,56	27,27	3,71	26
12	23,34	21,76	-1,58	41
13	23,25	27,85	4,60	20
14	23,53	29,12	5,59	39
MEDIA	24,89	30,44	5,54	29,64
DESVIO PADRAO	2,36	4,84	4,51	12,62

TABELA 11 : Peso médio do fígado e baço de camundongos (controle) infectados com 70 cercárias, da geração F2 de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988 e de camundongos (controle) sadios.

GRUPO	FÍGADO		BAÇO	
	NÚM. DE OBSERVAÇÕES (n)	PESO MÉDIO * (g)	NÚM. DE OBSERVAÇÕES (n)	PESO MÉDIO ** (g)
CONTROLE SADIO	20	1,318 ± 0,197	20	0,110 ± 0,021
CONTROLE INFECTADO	10	2,059 ± 0,374	14	0,509 ± 0,254

* t = 7,16 , P<0,001
(28)

** t = 7,01 , P<0,001
(32)

TABELA 12 : Pesos do fígado e baço de camundongos do grupo (Controle) infectados com 70 cercárias, da geração F2 de *S. mansoni* isolado do Município de Itariri, SP, em 1988, relacionados com a carga parasitária.

CAMUNDONGO	PESO (g)		CARGA PARASITÁRIA (n)
	FÍGADO	BAÇO	
* 1	...	0,657	38
* 2	...	0,262	31
* 3	...	0,220	1
* 4	...	0,394	33
5	1,870	0,278	11
6	1,658	0,317	21
7	2,750	1,170	38
8	1,880	0,620	33
9	2,350	0,826	47
10	2,399	0,487	36
11	1,955	0,391	26
12	1,487	0,529	41
13	2,061	0,415	20
14	2,184	0,553	39

* não foram coletados os dados referentes ao peso do fígado, devido a problemas técnicos.

TABELA 13 : Medidas do comprimento dos vermes machos e fêmeas da cepa de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

S. MANSONI	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (n)	COMPRIMENTO (mm)	
		(MIN - MÁX)	MÉDIA
MACHO	99	(3,79 - 11,45)	7,35 ± 1,47
FÊMEA	61	(4,96 - 12,95)	8,22 ± 1,68

TABELA 14 : Medidas dos ovos da cepa de S. mansoni isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (n)	COMPRIMENTO (µm)		LARGURA (µm)	
	(MIN - MÁX)	MÉDIA	(MIN - MÁX)	MÉDIA
120	(132,32 - 173,74)	152,36 ± 9,13	(55,56 - 75,76)	64,41 ± 3,77

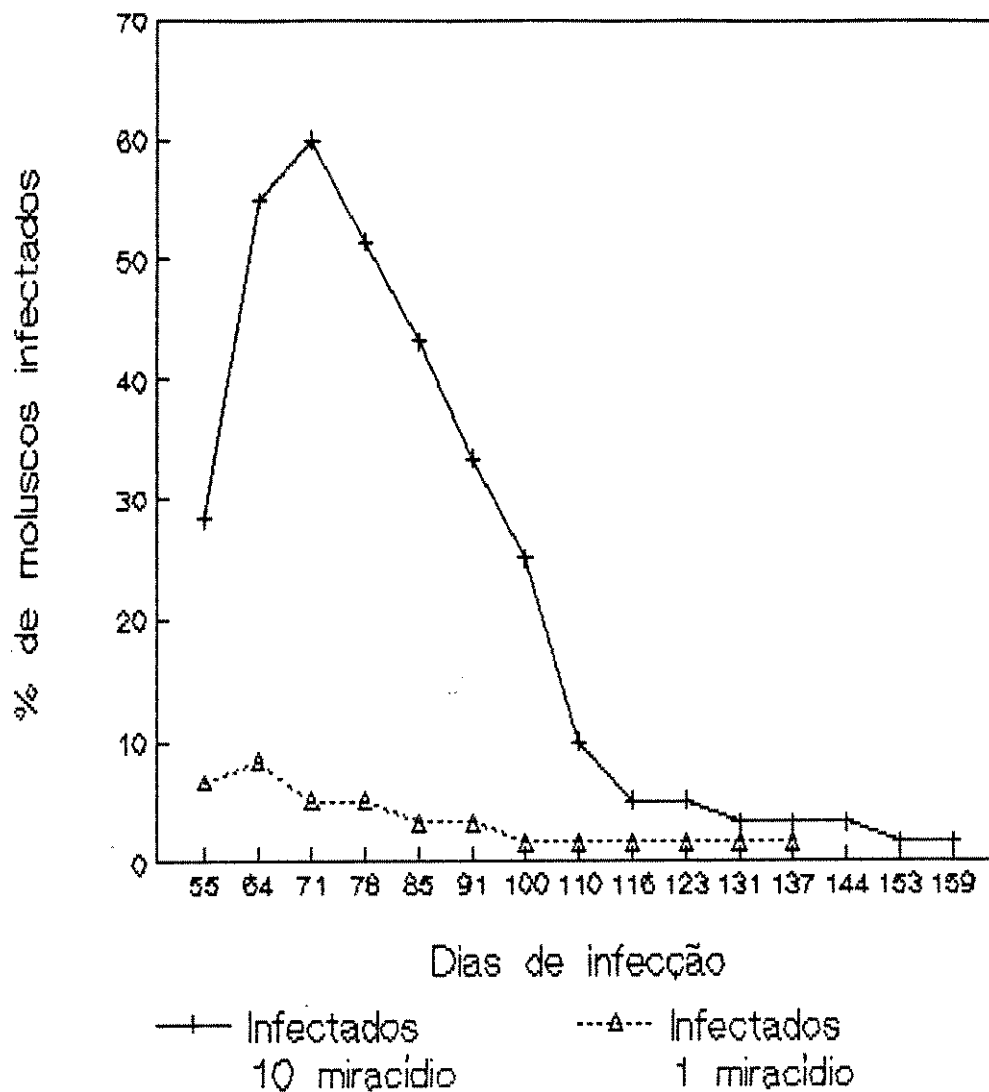


Figura 1: Cinética de eliminação de cercárias em *B. tenagophila* infectados com 1 e 10 miracidios, da geração F2 de *S. mansoni* isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

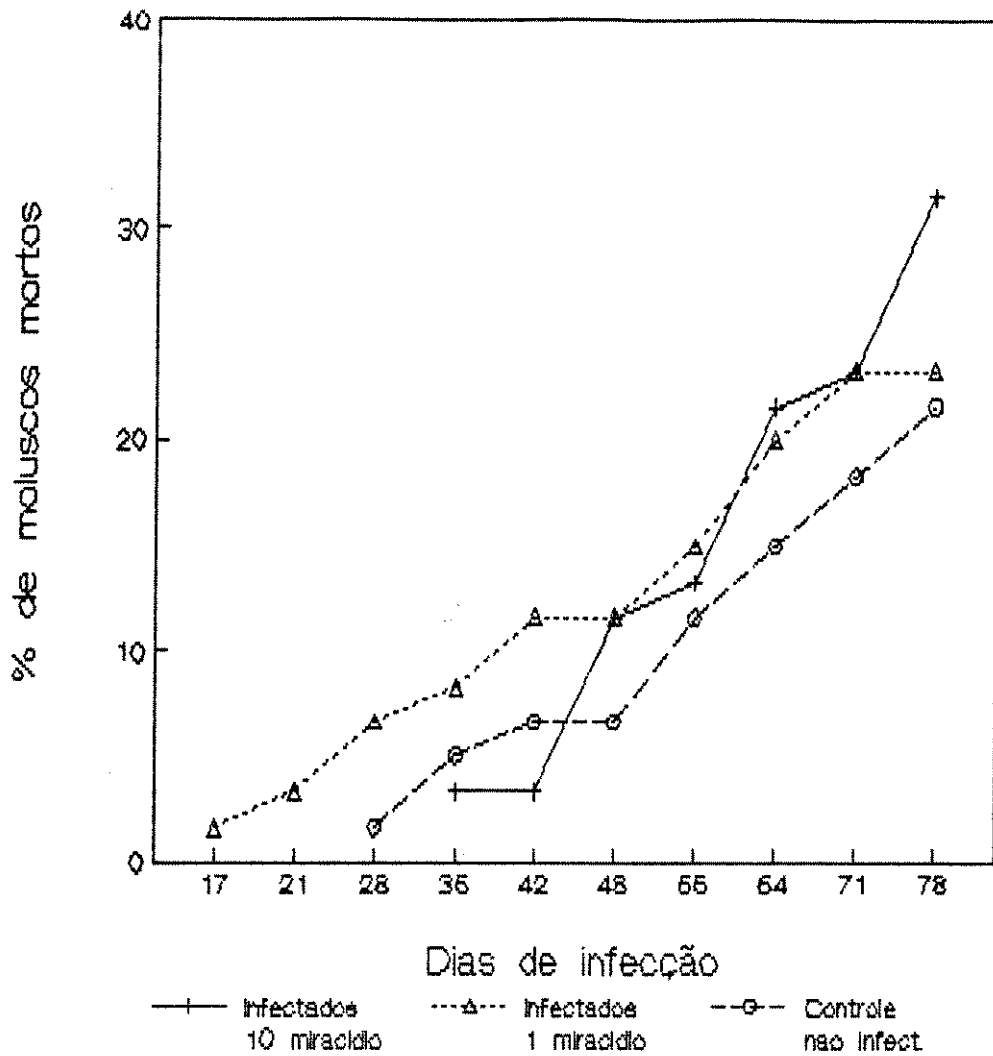


Figura 2: Mortalidade de *B. tenagophila* não infectados (Controle) e infectados com 1 e 10 miracídios, da geração F2 de *S. mansoni* isolado do Município de Itariri, SP, em 1988.

4. DISCUSSÃO

4.1 Estudo da cepa de S. mansoni em B. tenagophila simpátrica

4.1.1 Suscetibilidade de moluscos

Diferentes índices de positividade têm sido observados por vários pesquisadores, quando estudaram experimentalmente a suscetibilidade de B. glabrata e B. tenagophila à infecção por diferentes cepas de S. mansoni (Paraense & Corrêa, 1963a, 1963b, 1978, 1981; Magalhães & Dias, 1973; Chieffi, 1975; Santana, Magalhães & Rangel, 1978; Freitas, Boschi & Santos, 1985; Dias, Ueta & Guaraldo, 1987; Zanotti, 1987; Dias, Bruce & Coles, 1988). No entanto, as infecções em B. glabrata mostraram índices de positividade geralmente superiores àqueles observados em B. tenagophila.

Considerando-se que o molusco estudado é B. tenagophila, verificou-se que o índice de infecção apresentado pelo grupo de moluscos expostos à 10 miracídeos, é bastante elevado (60% dos moluscos expostos à infecção eliminaram cercárias). Em nossos estudos preliminares, na geração F1, foi observado em grupos de moluscos expostos à 15 miracídeos, índice de positividade superior (85% aos 50 dias de infecção), no entanto a mortalidade registrada aos 70 dias foi de 100%. É interessante salientar que, Paraense & Corrêa em 1978, verificaram que 91,5% de B. tenagophila de Ana Dias, Itariri, SP, se infectaram com a cepa SJ de S. mansoni. Já, Dias et alii (1987), avaliando a suscetibilidade de moluscos e trabalhando

com cepas humana e de roedor silvestre de Pedro de Toledo (Município vizinho de Itariri) observaram em *B. tenagophila* (SJ) índices de infecção muito baixos. Com exposições à 10 miracídios, apenas 4% e 2% dos moluscos se infectaram com as respectivas cepas. Santana et alii (1978), selecionando linhagens de *B. tenagophila* e *B. glabrata*, visando maior suscetibilidade ao *S. mansoni* (BH e SJ), notaram em *B. tenagophila* (SJ) selecionada, expostas à 10 miracídios de linhagem simpátrica de *S. mansoni*, índice de infecção superior à 60%, somente a partir da geração F2. Zanotti (1987), também trabalhando com seleção de populações de *B. tenagophila* (SJ) suscetíveis à infecção pelo *S. mansoni* simpátrico, verificou na geração F3 que 67% dos moluscos selecionados, expostos à 10 miracídios, eliminaram cercárias. Este foi o maior índice observado pela autora, em 6 gerações de *B. tenagophila* selecionadas. É interessante mencionar que Santana et alii (1978) e Zanotti (1987) utilizaram linhagens de moluscos e de *S. mansoni* (SJ), mantidos em laboratório há vários anos.

O índice de infecção observado nos moluscos infectados com 1 miracídio (8,3%) (tab. 1), é superior ao observado por Paraense & Corrêa (1981), ao expor *B. tenagophila* (SJ) à 1 miracídio de *S. mansoni* de linhagem simpátrica, e inferior ao verificado em *B. glabrata* (BH). Esses autores observaram índices de 3,98% e 33,20%, para as respectivas linhagens, considerando também como suscetíveis, aqueles moluscos que apenas apresentaram desenvolvimento de esporocistos.

A cinética de eliminação de cercárias revelou que 42% dos moluscos positivos sobreviveram durante 100 dias após a infecção. Após este período a mortalidade foi bastante acentuada. O tempo máximo de sobrevivência de moluscos eliminando cercárias foi respectivamente de 137 dias e 159 dias para moluscos expostos à 1 e 10 miracídeos (fig. 1). Zanotti-Magalhães et alii (1988), verificaram maior sobrevivência em moluscos *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* simpátrico: 198 dias para moluscos infectados com 10 miracídeos obtidos de fezes de camundongos e 293 dias, para moluscos infectados com 10 miracídeos obtidos de granulomas hepáticos.

Outro aspecto importante a ser considerado é o baixo índice de mortalidade verificado nos grupos de moluscos infectados. A comparação dos dados de mortalidade dos moluscos expostos à 1 e 10 miracídeos e dos sadios, revelou que estas proporções não diferem significativamente. Isto é, a infecção não foi capaz de causar mortalidade significativa dentre os moluscos expostos quando comparada àquela verificada dentro do mesmo período em moluscos sadios (tab. 1 e fig. 2). Dias et alii (1987) acompanhando *B. tenagophila* (SJ) durante 70 dias após a infecção por cepas de *S. mansoni* de Pedro de Toledo (humana e de roedor silvestre) notaram 56% e 52% de mortalidade para os respectivos grupos. Durante este mesmo período os autores observaram mortalidade de 28% em moluscos controle (não infectados).

Nossos resultados observados durante o estudo da suscetibilidade dos moluscos, demonstraram que a *B. tenagophila* de Itariri, SP, é bastante suscetível ao *S. mansoni* simpátrico

recém-isolado. O alto índice de positividade aliado a baixa mortalidade e longo período de eliminação de cercárias, verificado em moluscos expostos à infecção, revelaram uma boa adaptação entre o hospedeiro intermediário e a cepa de *S. mansoni* simpátrica. Essa boa adaptação hospedeiro-parasito aliada ao fato de que a área endêmica do Vale do Ribeira apresenta elevado número de focos e intenso padrão de contato com coleções hídricas (Sucen, 1989; Marçal Jr, 1989), representam fator de grande importância a ser considerado em estudos epidemiológicos da região.

4.2 Estudo da cepa de *S. mansoni* em camundongo "Swiss" fêmea

4.2.1 Suscetibilidade de *S. mansoni* a drogas esquistossomicidas - oxamniquine e praziquantel

Estudos clínicos e experimentais demonstram que existe uma grande variação nas respostas terapêuticas de cepas de *S. mansoni*, não só de áreas geográficas diferentes, como também dentro de uma mesma área (Araujo et alii, 1980; Costa & Katz, 1982; Olivier et alii, 1983; Dias et alii, 1983; Dias & Olivier, 1985; Bruce et alii, 1987).

Araujo et alii (1980), observaram diferenças significativas nas respostas terapêuticas de sete cepas de *S. mansoni* isoladas de pacientes que se infectaram no Estado de Minas Gerais. Estes autores verificaram, em camundongos tratados com oxamniquine na dosagem de 100 mg/Kg, que a

percentagem de vermes mortos variou para as diferentes cepas de 1,1 a 67,5 e a alteração de oograma de 10% a 100%.

Dias *et alii* (1983), avaliaram a suscetibilidade de linhagens humana e de roedor silvestre de Pedro de Toledo, SP (Vale do Ribeira), humanas de Pindamonhangaba, SP (Vale do Paraíba) e de Belo Horizonte, MG a quatro drogas esquistossomicidas (hycanthone, niridazole, oxamniquine e praziquantel). Estes autores verificaram que as linhagens paulistas do Vale do Ribeira e a mineira foram sensíveis as quatro drogas e que a linhagem paulista do Vale do Paraíba mostrou-se resistente ao niridazole e sensível as outras três drogas testadas. Dias *et alii* (1983), salientaram a importância clínica e epidemiológica considerando-se que a resistência pode ser transmitida as progênie de *S. mansoni* da mesma linhagem.

Kinotti (1987), estudando o significado da variação da suscetibilidade de *S. mansoni* ao oxamniquine concluiu que a variação na suscetibilidade demonstrada pelo parasita indica que o *S. mansoni* possui uma grande capacidade de desenvolver resistência as doses terapêuticas de oxamniquine e que a resistência pode ser esperada, quando e onde o parasita sofrer pressão contínua da droga.

A avaliação da suscetibilidade do *S. mansoni* de Itariri, SP, ao oxamniquine e praziquantel revelou que a cepa mostrou-se sensível à ambas as drogas nas dosagens adotadas. Todavia, o praziquantel apresentou maior eficácia que o oxamniquine. Isto foi evidenciado no experimento, principalmente pelas percentagens de redução de vermes e de vermes sobreviventes, observadas nos grupos de camundongos

tratados (tab. 5). É interessante salientar que o oxamniquine é empregado no tratamento de portadores de esquistossomose da área desde 1974 e o praziquantel ainda não foi utilizado (Sucen, 1982).

Sabe-se que a resistência à droga surge quando um pequeno número de vermes tolerantes que está presente em uma população de vermes, são selecionados pelo uso de esquistossomicidas. Possivelmente, isso ocorre quando esquistossomicidas são intensamente usados em determinadas áreas e os ovos provenientes de pacientes tratados e não curados, contaminam o ambiente (Coles et alii, 1987).

Pelo motivo citado acima, seria interessante uma complementação no estudo de suscetibilidade à droga, utilizando-se ovos de vermes sobreviventes de camundongos tratados (Rogers & Bueding, 1971; Yeang, Marshall & Huggins, 1987). Este tipo de enfoque é necessário para determinar alterações na suscetibilidade à droga (tolerância e resistência) (Marshall, 1987). A percentagem de vermes sobreviventes (12,2%) verificada em camundongos tratados com oxamniquine, foi significativamente diferente daquela observada no grupo praziquantel (4,6%) (tab. 5). É interessante mencionar que a grande maioria (90%) dos vermes vivos recuperados em ambos os grupos eram vermes fêmeas. Este dado vem confirmar outros descritos em quimioterapia experimental, mostrando que os machos são mais sensíveis a ambas as drogas (Marshall, 1987). Em virtude da presença de vermes sobreviventes, torna-se necessário estudar com maiores detalhes a suscetibilidade desta

cepa de *S. mansoni* ao oxamniquine e praziquantel.

4.2.2 Capacidade de penetração de cercárias e recuperação de vermes

A cepa de *S. mansoni* de Itariri, SP, apresentou elevada capacidade de penetração de cercárias e recuperação de vermes. Infecções pela cauda com 70 cercárias produziram número médio de 29,64 vermes com equilíbrio entre vermes machos (49%) e fêmeas (51%). A única exceção foi o camundongo que abrigava no fígado apenas uma fêmea de *S. mansoni* (tab. 6).

A percentagem média de penetração de cercárias, mostrou-se semelhante àquelas verificadas por outros autores. No entanto, o índice de recuperação de vermes (53,8%) (tab. 7), é mais elevado se comparado aos obtidos por outros pesquisadores. Saoud (1966), ressalta que fatores tais como: hospedeiro definitivo, temperatura ambiente e número de cercárias utilizadas devem ser consideradas quando se comparam resultados de vários autores. Este autor, trabalhando com linhagens de *S. mansoni* do Egito, Porto Rico, Tanzânia e do laboratório Wellcome do Egito, utilizando 100 cercárias por camundongo, verificou índices de recuperação de vermes de 39,9%, 38,7%, 28,25% e 33,0% para as respectivas linhagens.

Warren (1967), realizando estudos com as cepas de Porto Rico, Brasil, Egito e Tanzânia, utilizando 40 cercárias por camundongo, constatou nas respectivas cepas percentagens de penetração de cercárias de 87,0%, 89,7%, 91,5% e 89,4% e recuperação de vermes de 36,6%, 27,2%, 32,5% e 29,9%. A

linhagem brasileira estudada pelo autor era mantida em *B. glabrata albina simpátrica*.

Magalhães & Carvalho (1973a), estudando as linhagens BH e SJ, com exposições de camundongos a 100 cercárias, observaram índices de penetração de cercárias de 97,0% e 79,0% respectivamente. Entretanto, os mesmos autores, constataram baixas percentagens de recuperação de vermes de 17,0% para a linhagem mineira BH e 15,6% para a paulista SJ. Magalhães & Carvalho (1976), por meio de estudos com diferentes números de cercárias das linhagens BH e SJ, verificaram que quanto maior o número de cercárias utilizadas, menor o índice de desenvolvimento, ou seja, de se tornarem adultos.

Zanotti (1987), embora tenha usado critérios idênticos aos de Magalhães & Carvalho (1973a) para avaliar a penetração de cercárias de cepas BH e SJ, obteve resultados diferentes. As cercárias da linhagem BH apresentaram menor capacidade de penetração. A autora justificou essa diferença devido ao espaço de tempo de dez anos entre os experimentos. Zanotti (1987) evidenciou também em moluscos da linhagem BH, selecionados para o caráter suscetibilidade que a maior suscetibilidade da *B. glabrata* determinou maior capacidade de penetração de cercárias.

A cepa de *S. mansoni* de Itariri, SP mostrou infectividade elevada em camundongos expostos à 70 cercárias. O comportamento desta cepa isolada em 1988, proporcionou grande facilidade de manutenção em laboratório, encontrando-se atualmente na geração F6. Estas características de

desenvolvimento do *S. mansoni* recém-isolado, mostraram que a população de *B. tenagophila* de Itariri, após um período de ajustamento parasita-hospedeiro, encontra-se bem adaptada ao parasitismo. É interessante mencionar que os primeiros casos humanos de Ana Dias, Itariri, foram descritos em 1953 (apud Piza & Ramos, 1960), no entanto existe a possibilidade de que os focos de esquistossomose da área tenham origem mais antiga. Silva (1983), mostra a dependência da distribuição dos focos desta região com os focos de Santos, correlacionando-os ao trajeto da antiga Estrada de Ferro Sorocabana (Santos - Juquiá). O autor citou o trabalho de Moura (1945), onde foi descrito que a procedência de alguns casos detectados em Santos era da região de Pedro de Toledo - Itariri. Cabe lembrar que, a transmissão da esquistossomose em Santos foi descrita em 1923.

4.2.3 Mortalidade de camundongos

A mortalidade verificada em camundongos expostos à infecção com 70 cercárias, durante 10 semanas de infecção, não foi alta (30,0%) (tab. 8). Entretanto nossos resultados de estudos preliminares (geração F1 do verme), revelaram que as exposições à 100 cercárias provocaram a mortalidade de 58% dos camundongos durante este mesmo período. Por este motivo foram utilizadas 70 cercárias por animal para a realização da pesquisa.

Zanotti (1987), realizou experimentos em cinco gerações de *B. glabrata* (BH) e seis gerações de *B. tenagophila* (SJ), selecionadas para o caráter suscetibilidade ao *S. mansoni*

simpátrico, com finalidade de verificar a relação entre a suscetibilidade do molusco e a patogenicidade desenvolvida no hospedeiro definitivo. A autora concluiu que a maior suscetibilidade dos moluscos implicou em maior nocividade do parasita no hospedeiro definitivo, ou seja, um aumento na mortalidade de camundongos. É interessante mencionar que a autora observou em infecções com 100 cercárias da linhagem BH, taxas de mortalidade variando entre 15,0 e 60,0% nas diferentes gerações e em infecções com linhagem SJ a mortalidade oscilou entre 14,3 e 50,0% . Nota-se que nosso resultado observado na geração F1 (58%) foi semelhante as mais altas taxas verificadas por Zanotti (1987).

Em razão dos diferentes índices de mortalidade (30% e 58%) observados em camundongos expostos a cargas infectantes de 70 e 100 cercárias respectivamente, seria interessante desenvolver experimentos comparativos com outras cepas recém-isoladas, utilizando-se diferentes números de cercárias e prolongando-se o período de observação dos camundongos após a infecção. Este enfoque justifica-se pois a alta taxa de mortalidade verificada em infecções com 100 cercárias, pode ser uma característica de cepas recém isoladas, ou seja, não adaptadas ao hospedeiro definitivo (camundongo).

4.2.4 Peso corporal dos camundongos

Os pesos corporais (iniciais e finais) dos camundongos "Swiss" fêmeas infectados, tratados com drogas

esquistossomicidas e não tratados (controle), quando comparados com os pesos corporais dos animais sadios, não apresentaram diferenças significativas. Entretanto, o ganho de peso dos animais infectados (grupo controle) foi significativamente diferente aos demais grupos. Este grupo apresentou menor ganho de peso (tab. 9).

É interessante salientar que os camundongos que foram submetidos ao tratamento com drogas esquistossomicidas, em apenas 14 dias (período entre o tratamento e o sacrifício), apresentaram acentuada recuperação no peso corporal (aproximadamente 5 g). Durante este mesmo período, os camundongos do grupo controle (infectados) ganharam apenas 1 g (tab. 9).

Estas observações revelam que a infecção por *S. mansoni*, provocou alteração no ganho de peso dos animais.

Zanotti et alii (1983) avaliaram a patogenicidade da linhagem BH de *S. mansoni* em camundongos albinos submetidos a infecções unissexuais e bissexuais, sacrificando animais semanalmente da primeira a oitava semana após a infecção; verificaram diferenças significativas no peso corporal dos animais com infecção bissexual em função das semanas após a infecção. Os autores observaram que na oitava semana, o peso corporal, do fígado e a diferença entre o peso final e inicial dos camundongos, foram significativamente diferentes entre o grupo controle (sadio) e o grupo de animais com infecção bissexual.

Zanotti (1987) mostrou que a maior suscetibilidade do molusco ao *S. mansoni* acarretou menor crescimento ponderal do

hospedeiro definitivo (camundongo) durante a evolução do parasita em seu organismo.

Nossos resultados mostram que a infecção provocou menor ganho de peso nos animais, no entanto não existiu correlação entre a carga parasitária e o ganho de peso (tab. 10). Evidenciou-se nos grupos tratados com drogas esquistossomicidas, que o processo de cura, ou seja, interrupção na oviposição e morte dos vermes provocou ganho acentuado de peso, em curto espaço de tempo. Estas observações indicam que a constante deposição de ovos nos tecidos entre outras razões, é um fator limitante do crescimento ponderal dos animais.

4.2.5 Peso do fígado e do baço de camundongos

Sabe-se que a hepatomegalia característica na infecção por *S. mansoni*, está relacionada com a resposta imune mediada por células T, que é observada em forma de granuloma ao redor do ovo de *S. mansoni* depositado no fígado. Estas lesões caracterizam uma fibrose periportal com vários graus de obstrução dos ramos intra-hepáticos da veia porta, e tardiamente as lesões obstrutivas levam a hipertensão portal com circulação colateral.

A esplenomegalia em camundongos infectados por *S. mansoni* é consequência da hiperplasia das células do sistema monocítico fagocitário e, nos períodos mais tardios da infecção devido à hipertensão portal, ocorre a congestão venosa que se

manifesta pela dilatação dos seios venosos, hiperplasia e hipertrofia da trama reticular.

A comparação dos pesos do fígado e baço de camundongos infectados e sadios, é importante para a avaliação do desenvolvimento da hepatosplenomegalia, observada normalmente em pacientes esquistossomóticos.

Pela análise dos dados obtidos, demonstramos haver diferença significativa entre os órgãos de animais dos grupos controles (infectados e sadios). Os órgãos dos animais infectados apresentaram maior peso (tab. 11).

Estes resultados, vieram confirmar os achados de outros autores (Warren, 1967; Kloetzel, 1969; Anderson & Cheever, 1972; Magalhães et alii, 1975; Phillips et alii, 1977; Zanotti et alii, 1983; Carvalho et alii, 1986; Zanotti, 1987 e Guaraldo, 1987), ou seja, pronunciada hepatosplenomegalia nos animais portadores de *S. mansoni*.

A hepatomegalia, bem como a esplenomegalia dos animais com infecção por *S. mansoni*, estão relacionadas com mecanismos imunológicos com participação de células T. Visto que em animais atímicos e infectados, o peso destes órgãos são menores em relação a animais normais ou reconstituídos por enxerto de timo (Phillips et alii, 1977).

Os experimentos de Warren (1967), evidenciaram que a hepato e esplenomegalias independem da carga de vermes. Este autor observou após 10 semanas de infecção, com apenas um par de vermes, acentuada esplenomegalia em camundongos infectados com cepas de Porto Rico, Brasil, Egito e Tanzânia. A hepatomegalia também foi acentuada, com exceção nas infecções

com a cepa do Egito.

Zanotti et alii (1983), observaram em infecções unissexuais (ausência de ovos), apenas discreto aumento do fígado e baço.

Ressalta-se que a hepatomegalia observada em animais infectados por *S. mansoni* é mais acentuada entre a sétima e oitava semana, regredindo à medida que a infecção se cronifica (Guaraldo, 1987; Telles, 1990). O aumento do peso do baço inicia-se a partir da primeira semana de infecção e a esplenomegalia máxima ocorre por ocasião da décima primeira semana, com processo involutivo muito lento (Guaraldo, 1987).

Nossos resultados, observados na décima semana após a infecção, mostram hepatomegalia e acentuada esplenomegalia. Evidenciou-se por meio de análise estatística que apenas o peso do baço apresentou correlação positiva com a carga parasitária. Isto pode estar relacionado com o tempo de infecção (10 semanas), ou seja, período em que já iniciou a regressão da hepatomegalia e está ocorrendo a máxima esplenomegalia.

4.2.6 Dimensões das reações granulomatosas do fígado

A reação granulomatosa induzida pelos ovos de *S. mansoni* nos tecidos do hospedeiro é a grande responsável pelo quadro clínico apresentado na esquistossomose.

A resposta granulomatosa ao *S. mansoni* representa uma reação, mediada por linfócitos T, aos antígenos solúveis dos ovos, com reação máxima ocorrendo normalmente por ocasião da

oitava semana de infecção. Após este período, outros granulomas recém-formados tornam-se menores, representando o fenômeno da modulação (Boros & Warren, 1970; Chensue & Boros, 1979 apud Guaraldo, 1987).

Coelho et alii (1989), concordaram com outros autores que, as dimensões dos granulomas hepáticos causados pelos ovos de *S. mansoni* na fase aguda da doença, variam em consequência do tempo de sua evolução e estado imunológico do organismo. No entanto, estes autores destacaram que fatores relacionados ao parasita também devem ser considerados, tais como: intensidade de infecção; número de exposições à mesma cepa ou cepas diferentes; número de vermes que escapam à defesa do organismo e, número de ovos que se depositam nos tecidos. Coelho et alii (1989) ressaltam ainda que embora seja bem conhecido que " o antígeno solúvel do ovo representa o elemento mais importante no determinismo das lesões, muito pouco ou quase nada se sabe sobre possíveis diferenças qualitativas e/ou quantitativas relacionadas a este tipo de antígeno, quando se consideram cepas geográficas do *S. mansoni* ".

A utilização de metodologias diferentes nos experimentos, dificultam a comparação de resultados verificados por vários autores em diferentes cepas. Destacando-se por exemplo a espécie do hospedeiro definitivo, número de cercárias utilizadas na infecção e tempo de infecção.

Warren (1967), fez um estudo comparativo entre 4 cepas geográficas diferentes: Porto Rico, Brasil, Egito e Tanzânia, quanto à capacidade de penetração de cercárias, desenvolvimento dos vermes e produção de doença hepática. O

autor utilizou para a avaliação de produção de doença hepática, camundongos infectados com apenas um par de vermes. Verificou após 10 semanas de infecção que a cepa do Egito apresentou dimensões de granulomas hepáticos e peso do fígado significativamente menor em relação as outras três cepas, produzindo assim, reação hepática menos severa.

Zanotti (1987), estudou e comparou as dimensões de granulomas presentes no baço, fígado, intestino, pâncreas e pulmão de camundongos infectados com linhagens BH e SJ. A autora realizou as medições por ocasião da oitava semana de infecção e não observou diferença significativa entre o tamanho dos granulomas das duas linhagens. Entretanto, verificou que os granulomas hepáticos de camundongos infectados com cercárias de moluscos mais suscetíveis, eram menores. A autora aventou a possibilidade de que as cercárias originárias de moluscos mais suscetíveis poderiam implicar em uma apresentação mais rápida dos antígenos do ovo, responsáveis pela reação granulomatosa e por sua rápida modulação.

Carvalho et alii (1986), utilizando metodologia semelhante à nossa, ou seja, cepas recém-isoladas; camundongos albinos fêmeas expostos à infecção pela cauda com 70 cercárias; granulomas medidos por ocasião da décima semana de infecção, encontraram resultados próximos àquele verificado em nosso experimento ($340,70 \pm 68,89 \mu\text{m}$). Os autores observaram diâmetros de: $313,0 \pm 82,6 \mu\text{m}$ e $348,0 \pm 82,8 \mu\text{m}$ para amostras isoladas de pacientes de Belo Horizonte MG, na fase aguda e fase crônica da doença respectivamente.

4.3 Estudo morfológico

4.3.1 Morfometria de vermes e ovos de S. mansoni

A morfometria de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ foram realizadas por Magalhães & Carvalho, 1973; Paraense & Corrêa, 1981. Guaraldo (1987), estudou características morfológicas da linhagem BH. Dias & Piedrabuena (1980), estudaram em roedores silvestres naturalmente infectados por *S. mansoni* do Vale do Paraíba, características morfológicas de vermes e ovos.

A metodologia utilizada por Paraense & Corrêa (1981) na morfometria de vermes e ovos, ou seja, medida do comprimento de 100 casais de vermes e medida do comprimento e largura de 100 ovos, é semelhante àquela utilizada em nosso experimento.

As médias dos comprimentos de machos e fêmeas, revelam que a cepa isolada do Município de Itariri, SP, é relativamente menor que as cepas do trematodeo BH e SJ, verificados por Paraense & Corrêa (1981).

O comprimento médio dos machos ($7,35 \pm 1,47$ mm) (tab.13) é inferior aos observados por Paraense e Corrêa (1981). Os autores após realizar medições de 100 machos, obtiveram um comprimento médio de $9,04 \pm 1,16$ mm para a cepa BH e de $8,44 \pm 0,95$ mm para a SJ.

Nas fêmeas da cepa de Itariri, o comprimento médio verificado foi de $8,22 \pm 1,68$ mm (tab. 13). Este valor também mostrou-se inferior aos observados por Paraense e Corrêa (1981)

em fêmeas das linhagens BH e SJ. Os autores verificaram o comprimento de $11,85 \pm 1,29$ mm e $9,76 \pm 1,15$ mm para as fêmeas da linhagem BH e SJ respectivamente.

Na morfometria de ovos da cepa *S. mansoni* de Itariri, os valores médios de comprimento ($152,36 \pm 9,13$ μ m) e largura ($64,41 \pm 3,77$ μ m) (tab. 14), mostraram-se mais próximos aos observados por Paraense & Corrêa (1981) em 100 ovos da cepa SJ. Estes autores mediram ovos das cepas BH e SJ, obtendo valores médios de $159,74 \pm 8,61$ μ m, $70,01 \pm 2,75$ μ m e $150,75 \pm 7,28$ μ m, $69,55 \pm 2,66$ μ m, para o comprimento e largura nas cepas BH e SJ respectivamente.

Com base nos resultados obtidos nas medidas dos ovos e comprimento dos vermes, pode-se concluir que a cepa isolada do Município de Itariri, SP, apresenta características morfométricas distintas das cepas paulista (SJ) e mineira (BH), estudadas por Paraense & Corrêa (1981).

Considerações finais

Como foi visto, durante a discussão de nossos resultados, ressaltamos por várias vezes a influência da cepa recém-isolada, em algumas características observadas.

Esta preocupação justifica-se pois, sabe-se que características como patogenicidade, infectividade e resistência do parasita a drogas, podem ser fortemente

influenciadas pela pressão seletiva do hospedeiro (Loverde et alii, 1985). Outro aspecto que deve ser considerado é a deriva genética, uma vez que, é particularmente importante em pequenas populações (Harth, 1980).

Não podemos ficar alheios as implicações da diminuição da variabilidade genética ocasionada pela manutenção rotineira de cepas em laboratório durante vários anos. As cepas mantidas em laboratório, originam-se frequentemente a partir de pequenas amostras de moluscos coletados no campo e ou a partir de um hospedeiro definitivo infectado. As constantes reduções no tamanho das populações durante a manutenção da cepa, ocasionam diminuição na variabilidade genética, conduzindo a fixação de um ou outro alelo envolvido na manifestação de um caráter.

Por estes motivos, os resultados observados durante o desenvolvimento da pesquisa, foram comparados criteriosamente com os descritos em outras cepas.

A distinção de raças biológicas é outro fator importante que deve ser mencionado. Paraense & Corrêa (1981), após estudos das linhagens BH e SJ, em que realizaram infecções com híbridos oriundos do cruzamento entre as duas linhagens, infecções simpátricas com 1 e 10 miracidios e morfometria de vermes e ovos, concluíram 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 observou-se que o comportamento da cepa paulista de Itariri em hospedeiros intermediário e definitivo e que suas

características morfométricas, foram diferentes daquelas verificadas nas cepas SJ e BH.

A cepa recém-isolada de Itariri, SP, apresentou características na suscetibilidade de moluscos, infectividade e suscetibilidade a drogas, que devem ser consideradas no controle da endemia no Vale do Ribeira.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A esquistossomose mansônica, no Vale do Rio Ribeira do Iguape, no Estado de São Paulo, vem sendo intensamente controlada nos últimos dez anos, principalmente na área dos Municípios de Pedro de Toledo e Itariri. Sabe-se que Itariri apresenta ainda novos focos de esquistossomose e que a prevalência humana autóctone em 1988 foi de 4,8% na zona rural e de 1,8 % na cidade. Entretanto, o comportamento biológico da cepa de *S. mansoni* presente nestes focos não havia sido investigado.

O presente trabalho, foi elaborado com o objetivo de determinar algumas características biológicas de *S. mansoni* recém-isolado do Distrito de Ana Dias, Município de Itariri, Vale do Ribeira, SP.

O parasito foi isolado em 1988, a partir de cercárias eliminadas por moluscos naturalmente infectados. O estudo foi desenvolvido em modelo experimental (camundongo "Swiss" - *Biomphalaria tenagophila simpátrica*) avaliando-se os seguintes parâmetros: suscetibilidade do molusco; suscetibilidade do *S. mansoni* a drogas esquistossomicidas; capacidade de penetração de cercárias e recuperação de vermes; pesos corporal, do fígado e do baço de camundongos infectados; mortalidade de camundongos infectados; diâmetro das reações granulomatosas do fígado e; morfometria de vermes e de ovos.

Em experimentos com hospedeiro intermediário, foram feitas infecções com 1 e 10 miracídeos, observando-se a mortalidade e suscetibilidade, acompanhando-se o término de

eliminação de cercárias.

Os hospedeiros definitivos (camundongo "Swiss" fêmea), foram expostos à infecção com 70 cercárias e sacrificados na décima semana de infecção. Os grupos de camundongos utilizados na avaliação da suscetibilidade a drogas, foram tratados com oxamniquine e praziquantel nas respectivas dosagens: 100 mg/Kg dose única, via oral e 100 mg/Kg 5 dias, via oral.

Com base nos resultados e análises realizadas durante o desenvolvimento do presente trabalho, pode-se concluir que a cepa de *S. mansoni* isolada (geração F2):

- Desenvolveu-se adequadamente em seu hospedeiro intermediário simpátrico ocasionando baixo índice de mortalidade (31% e 23%) nos moluscos infectados respectivamente com 1 e 10 miracidios. A *B. tenagophila* mostrou-se bastante suscetível ao *S. mansoni* simpátrico, apresentando 60% de positividade em moluscos expostos a 10 miracidios e 8,3% em moluscos expostos a 1 miracidio.

- Mostrou-se, suscetível ao oxamniquine e praziquantel. Entretanto, o praziquantel revelou-se mais eficaz que o oxamniquine.

- Apresentou infectividade elevada ao hospedeiro definitivo (camundongo), com altos índices de penetração de cercárias (87,9%) e recuperação de vermes (53,8%).

- Não acarretou mortalidade elevada no hospedeiro definitivo (30,0%) entretanto, a infecção ocasionou alteração no crescimento ponderal dos animais. O tratamento com drogas esquistossomicidas proporcionou acentuado ganho de peso nos animais, no período entre o tratamento e o sacrifício.
- Provocou hepatomegalia (aumento de 1,5 vezes) e acentuada esplenomegalia (aumento de 4,6 vezes) em camundongos infectados.
- Demonstrou características morfológicas distintas, verificadas em morfometria de vermes e ovos.

De acordo com os dados obtidos, a cepa de *S. mansoni* recém-isolada do Município de Itariri, SP, revelou em hospedeiros intermediário e definitivo, características distintas das linhagens paulista SJ e mineira BH.

6. SUMMARY

STUDY OF BIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF *Schistosoma mansoni* STRAIN FROM THE RIBEIRA VALLEY

During the last ten years in the valley of Ribeira river, in the State of São Paulo (Brazil), there has been intense control of the schistosomiasis mansoni, mainly in the municipalities of Pedro de Toledo and Itariri. This work was carried out to determine the biological features of *S. mansoni* recently isolated from Ana Dias locality in Itariri. In 1988 this strain was isolated from naturally infected snails (*Bimphalaria tenagophila*). The experimental model Swiss mice - sympatric *B. tenagophila* was used to this study. The *B. tenagophila* susceptibility to 1 and 10 miracidia was evaluated. The mice were infected by tail immersion with 70 cercariae. After 10 weeks of observation the animals were killed and the following aspects were studied: susceptibility of *S. mansoni* to oxamniquine (100 mg/Kg/day, single dose, by oral route) and to praziquantel (100 mg/Kg/day, 5 days, by oral route); cercariae penetration and worm recovery; body weight; weight of liver and spleen; mortality rate; morphometry of the worms and eggs. The mollusks showed satisfactory susceptibility to *S. mansoni* with mortality rates of 23% and 31% when they were exposed to 1 and 10 miracidia respectively. The infection rates were 8% and 60% when the snails were infected with 1 and 10 miracidia respectively. The experimental chemotherapy revealed that praziquantel was more effective than oxamniquine. It was observed a high penetration index of cercariae (87%) in the mice and the worms recovery was 53%; the mortality rate was 30%; the infected mice decreased in weight when compared with those from the control group; there was liver enlargement (2,059 g) and spleen enlargement (0,509 g); the hepatic granulomas had 340,70 μ m; the male and female adult worms measured 7.35 mm and 8.22 mm respectively; the mature eggs from faeces had 152 μ m of length and 64 μ m of width. The *S. mansoni* strain from Itariri, São Paulo, Brazil, having *B. tenagophila* like intermediate host, showed different characteristics from the strains SJ (from valley of Paraíba river, São Paulo) and BH (from Belo Horizonte, Minas Gerais).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L.A. & CHEEVER, A.W. - Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 46:233-41, 1972.
- 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.*, 29:890-4, 1980.
- BOROS, 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.*, 132:488, 1970. apud Guaraldo, 1987.
- BROOME, P.B & RADKE, M.G. - An improved mouse retraining chamber. *Jap. J. Parasit.*, 20:81-2, 1971.
- BRUCE, J.I.; DIAS, L.C. de S.; LIANG, Y.S & COLES, G.C. - Drug resistance in schistosomiasis: A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 82:143-50, 1987.
- 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. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 70:261-2, 1976.
- CARVALHO, A.D.V.; 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.*, 19:84-94, 1986.
- CHENSUE, S.W. & BOROS, D.L. - Modulation of granulomatous hypersensitivity I - Characterisation of T- lymphocytes involved in the adoptive suppression of granuloma formation in *Schistosoma mansoni* infected mice. *J. Immunol.*, 123: 1409-14, 1979. apud Guaraldo, 1987.
- CHIEFFI, P.P. - Resistência de cepa de *Biomphalaria tenagophila*, originária de Londrina (Paraná, Brasil) à infecção por duas cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. bras. Med. Trop.*, 4:209-12, 1975.

- COELHO, P.M.Z.; RASO, P.; MELLO, R.T. & TOPPA, H.H. - Dimensões do granuloma hepático produzido por ovos de duas linhagens geográficas do *Schistosoma mansoni*, no camundongo. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 84:213-7, 1989.
- COLES, G.C.; BRUCE, J.I.; KINOTTI, G.K.; MUTAHI, W.T.; DIAS, E.P. & KATZ, N. - Drug resistance in schistosomiasis. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 80:347, 1986.
- COLES, G.C.; BRUCE, J.I.; KINOTTI, G. K.; MUTAHI, W. T.; DIAS, L.C. S.; ROCHA, R. S. & KATZ, N. - The potential for drug resistance in schistosomes. Parasit. Today, 3:349, 1987.
- COSTA, M.F. de L. & KATZ, N. - Comparative study of *Schistosoma mansoni* strains isolated from patients with toxemic or intestinal forms of schistosomiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 31:499-504, 1982.
- DIAS, L.C. de S.; PEDRO, R. de J.; RIGO, E.; GOTO, M.M.F. & MAFRA, G.L. - Linhagem humana de *Schistosoma mansoni* resistente a esquistossomicidas. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 12:110, 1978.
- DIAS, L.C. de S.; GUARALDO, A.M.A.; ZANOTTI, E. & MAGALHÃES, L.A. - Suscetibilidade a esquistossomicidas de linhagens de *Schistosoma mansoni*. In: CONGRESSOS INTEGRADOS DE PARASITOLOGIA, São Paulo, 1983. Resumos. p. 205.
- DIAS, L.C. de S. & OLIVIER, C.E. - Stability of *Schistosoma mansoni* progeny to antischistosomal drugs. Rev. Inst. Trop. S. Paulo, 27:186-9, 1985.
- DIAS, L.C. de S. & PIEDRABUENA, A.E. - Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* in naturally infected *Holochilus brasiliensis leucogaster*. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 74:690, 1980.
- 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., S. Paulo, 29:205-12, 1987.
- DIAS, L.C.S.; BRUCE, J.I. & COLES, G.C. - Strain variation in the infectivity of *Schistosoma mansoni* for *Biomphalaria*

glabrata. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 30:86-90, 1988.

DIAS, L.C. de S.; GLASSER, C.M.; ETZEL, A.; KAWAZOE, U.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; KANAMURA, H.Y.; CORDEIRO, J.A.; MARÇAL JR, O.; CARVALHO, J.F.; GONÇALES JR, F.L. & PATUCCI, R. - The epidemiology and control of schistosomiasis mansoni where *Biomphalaria tenagophila* is the snail host. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 22:462-3, 1988.

DIAS, L.C. de S.; KAWAZOE, U.; GLASSER, C.M.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; KANAMURA, H.Y.; CORDEIRO, J.A.; GUARITA, O.F. & ISHIHATA, G.J. - Schistosomiasis mansoni in the Municipality of Pedro de Toledo (São Paulo, Brazil) where the *Biomphalaria tenagophila* is the snail host. I - Prevalence in human population. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 31: 110-8, 1989.

FILES, V.S. & CRAM, E.B. - A study on comparative susceptibility of snails vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. J. Parasit., 35:555-60, 1949.

FREITAS, J.R. de; BOSCHI, M.B. & SANTOS, M.B.L. dos - Suscetibility de "híbridos" de *Biomphalaria tenagophila* à cepa LE (BH) do *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 27:6-12, 1985.

GÖNNERT, R. & ANDREWS, P. - Praziquantel, a New Broad Spectrum Antischistosomal Agent. Zeitschrift für Parasitenkunde, 52:129-50, 1977.

GUARALDO, A.M.A.; MAGALHÃES, L.A.; RANGEL, H. de A. & PAREJA, G. - Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria tenagophila* (D'Orgigny, 1835). Rev. Saúde públ., S. Paulo, 15:436-48, 1981.

GUARALDO, A.M.A. - Avaliação da resposta imune à infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos C3H/ H e J submetidos à dieta hipoproteica e normoproteica. Campinas, SP, 1987. [Tese de doutoramento - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].

HARTH, D.L. - The causes of evolution. In "Principles of population genetics", pp. 142-57. Sinawer, Massachusetts, 1980.

HILL, J. - Chemotherapeutic studies with laboratory infections

- of *Schistosoma mansoni*. Ann. Trop. Med. Parasit., 56:39-48, 1956.
- JANSMA, W.B.; ROGERS, S.H.; LIU, C.L. & BUEDING, E. - Experimentally produced resistance of *Schistosoma mansoni* to hycanthone. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26:926-36, 1977.
- KATZ, N.; DIAS, E.P.; ARAUJO, N. & SOUZA, C.P. - Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. Rev. Soc. bras. Med. Trop., 7:381-87, 1973.
- 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, 82:151-6, 1987.
- KLOETZEL, K. - Tissue reactions to *Schistosoma mansoni* eggs: I. Serological and histological reactions at various intervals after infection. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 63:459-9, 1969.
- LIANG, Y.S.; BOYD, D.A. & BRUCE, J.I. - Maintenance of Schistosome cycle (*Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* and *S. japonicum*). 38 pp. [Apostila]
- LOVERDE, P.T.; DEWALD, J.; MINCHELLA, D.J.; BOSSHARDT, S.C. & DAMIAN, R.T. - Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni*. J. Parasit., 71:297-301, 1985.
- MAGALHÃES, L.A. - Técnica para a avaliação da viabilidade de penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. O Hospital, 75:137-40, 1969.
- MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. - Determinação do número de cercárias provenientes de cepas diferentes de *Schistosoma mansoni* que conseguem penetrar sob condições de laboratório em *Mus musculus*. Rev. Soc. bras. Med. Trop., 3:249-51, 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 públ., S. Paulo, 7:285-7, 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 públ., S. Paulo, 7:289-94, 1973b.
- MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. - Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Proposição para método de estudo quantitativo. Rev. Soc. bras. Med. Trop., 10:169-94, 1976.
- MAGALHÃES, L.A. & DIAS, L.C. de S. - Estudo da suscetibilidade da *Biomphalaria glabrata* de Ourinhos (SP), à infecção pelo *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG), e de São José dos Campos (SP). Rev. Saúde públ., S. Paulo, 7:295-7, 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 públ., S. Paulo, 9:1-5, 1975.
- MARÇAL JR, O. - Fatores ligados ao homem na transmissão da esquistossomose mansônica no Município de Pedro de Toledo, São Paulo, 1987. Campinas, SP, 1989. [Tese de mestrado - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].
- MARSHALL, I. - Experimental chemotherapy. In "The Biology of schistosomes" (D. Rollinson and A.J.G. Simpson, Eds), pp. 399-430. Academic Press, New York/ London, 1987.
- MINCHELLA, D.J. & LOVERDE, P.T. - Laboratory comparison of the relative success of *Biomphalaria glabrata* stocks which are susceptible and insusceptible to infection with *Schistosoma mansoni*. Parasitology, 86:335-44, 1983.
- MOURA, S.A.L. - Esquistossomose mansoni autóctone em Santos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 5:311, 1945. apud Silva, 1983.
- NEWTON, W.L. - The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. Exp. Parasit., 2:242-57, 1953.
- OLIVIER, L. & STIREWALT, M.A. - An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. J. Parasit., 38:19-23, 1952.

- OLIVIER, C.E.; DIAS, L.C. de S.; BASTOS, O.C. & GOMES, R. de J. - Suscetibilidade de linhagem humana maranhense de *Schistosoma mansoni* a drogas esquistossomicidas. In: CONGRESSOS INTEGRADOS DE PARASITOLOGIA, São Paulo, 1983. Resumos. p.204
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. - Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop., S. Paulo, 5:15-22, 1963a.
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. - Suscetibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop., S. Paulo, 5:23-9, 1963b.
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. - Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. J. Parasit., 64:822-6, 1978.
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. - Observations on two biological races of *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 76:287-91, 1981.
- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D.G. - A simplified method for the concentration of cercariae. J. Parasit., 41:329-30, 1955.
- PELLEGRINO, J. & KATZ, N. - Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. In "Advances in Parasitology" (Ed. Ben Daves) 6: 233-290. Academic Press London and New York, 1968.
- PHILLIPS, S.M.; DI CONZA, J.J.; GOLD, J.A. & RIED, W.A. - Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I- Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation and host morbidity. J. Immunol., 118:594-9, 1977.
- PIZA, J.T. & RAMOS, A. S. - Os focos autóctones de esquistossomose no Estado de São Paulo. Arq. Hyg. Saúde públ., 25:261-71, 1960.
- POCOCK, S.J. - Clinical Trials, 4 ed., Great Britain, John Wiley & Sans, 1986.

- RICHARDS, C.S. - Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22:748-56, 1973.
- RICHARDS, C.S. & MERRITT JR., J.W. - Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21:425-34, 1972.
- ROGERS, S.H. & BUEDING, E. - Hycanthone resistance: Development in *Schistosoma mansoni*. *Science*, 172:1057-8, 1971.
- SANTANA, J.V. de; MAGALHÃES, L.A. & RANGEL, H. de A. - Seleção de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:67-77, 1978.
- SADUD, M.F.A. - The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 60:585-600, 1966.
- SANTOS, L. dos; COSTA, I.B.; FIGUEIREDO, C.C.S.B. & ALTOMANI, M.A.G. - Primeiro encontro de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) no Município de Cruzeiro, Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, naturalmente infectada por cercárias de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, S. Paulo, 40:165-6, 1980.
- SCHELL, S.C. - Manual de laboratório em Parasitologia. Espanã, Editorial Academia, León, 1969.
- SILVA, L.J. da - Sobre a antigüidade de alguns focos de esquistossomose do Estado de São Paulo. *Rev. bras. Malar. D. Trop.*, 35:73-8, 1983.
- 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. *Rev. Inst. Med. Trop.*, S. Paulo, 28:287-92, 1986.
- SOUZA, C.P. de; ARAÚJO, N.; JANNOTTI, L.K. & GAZZINELLI, G. - Fatores que podem afetar a criação e manutenção de caramujos infectados e a produção de cercárias de *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82:73-9, 1987.

- STANDEN, O.D. - Experimental infection of *Austrolorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni*. I. Individual and mass infection of snails, and the relationship of infection to temperature and season. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 46:48-53, 1952.
- SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias) - Situação da esquistossomose no Estado de São Paulo. II Encontro sobre Esquistossomose. São Paulo, Imprensa Oficial do Estado, 1982. [Relatório]
- SUCEN - Avaliação do Programa de Controle de Esquistossomose - Serviço Regional 2 da Superintendência de Controle de Endemias, 1988. [Relatório Interno]
- SUCEN - Avaliação do Programa de Controle de Esquistossomose - Serviço Regional 2 da Superintendência de Controle de Endemias, 1989. [Relatório Interno]
- TELES, H.M.S. & VAZ, J.F. - Distribuição de *Biomphalaria glabrata* (Say 1818) (Pulmonata, Planorbidae), no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 21:508-12, 1987.
- TELES, H.M.S. & VAZ, J.F. - Distribuição de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Pulmonata, Planorbidae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência e Cultura*, 40:173-6, 1988.
- TELLES, E.S. - Aspectos imunológicos e parasitológicos na infecção múltipla por *Trypanosoma cruzi* e *Schistosoma mansoni* em camundongos (CBA x C57 b1/10) F1. Campinas, SP, 1990. [Tese de mestrado - Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas].
- VAZ, J.F.; ELMOR, M.R.D.; GONÇALVES, L.M.C. & ISHIHATA, G.K. - Resultados do levantamento planorbídico da área de Presidente Prudente - Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 25:120-6, 1983.
- VAZ, J. F.; TELES, H.M.S. & TAKAKU, L. - Levantamento planorbídico do Estado de São Paulo 7 região administrativa. *Ciência e Cultura*, 37:2057-62, 1985.
- 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 públ.*, S. Paulo, 20:352-61, 1986.

VAZ, J.F.; MANTEGAZZA, E.; TELES, H.M.S.; LEITE, S.P.S. & MORAIS, L.V.C. - Levantamento planorbídico do Estado de São Paulo (Brasil): 4 região administrativa. Rev. Saúde públ., S.Paulo, 21:371-9, 1987.

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 production of liver disease. Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg., 61:795-802, 1967.

YEANG, F.S.W.; MARSHALL, I. & HUGGINS, M. - Oxamniquine resistance in *Schistosoma mansoni*: fact or fiction? Ann. Trop. Med. Parasit., 81:337-9, 1987.

YOLLES, T.K.; MOORE, P.V.; DEGINSTI, D.L.; RIPSON, C.A. & MELENEY, H.E. - A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of schistosomes. J.Parasit., 33:419-26, 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 públ., S. Paulo, 17: 394-405, 1983.

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

ZANOTTI-MAGALHÃES, E.; PAIVA, S. M. de; MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. - Viabilidade de miracídios de *Schistosoma mansoni*, obtidos de fezes e de granulomas hepáticos de camundongos experimentalmente infectados com a linhagem BH. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 22:479-83, 1988.