

RAIMUNDO CARLOS LEMOS NETO

ESTUDO COMPARATIVO DO COMPORTAMENTO PARASITOLÓGICO E  
IMUNOLÓGICO DAS LINHAGENS MINEIRA E PAULISTA DO  
*Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907.

Tese de Mestrado  
Apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Esta-  
dual de Campinas (UNICAMP).  
Orientador: Prof.L.A. Magalhães

Campinas - São Paulo

(1975)

**UNICAMP**  
**BIBLIOTECA CENTRAL**

Trabalho realizado nos Departamentos  
de Parasitologia e de Microbiologia  
e Imunologia, do Instituto de Biolo-  
gia, da Universidade Estadual de Cam-  
pinas (S.P.)

A meu filho Alexandre,

a minha estimada esposa Gracinha,

a meus queridos pais, Dorival e Maria,

a meus irmãos Conceição, Vitória, João e Antonio,

a meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores

Luíz Augusto Magalhães e  
Humberto de Araujo Rangel

modelos de pesquisadores, pela amizade e valiosas sugestões, cujo apoio e orientação científica serviram de estímulo para execução do presente trabalho.

Ao Professor

Aquiles Eugênio Piedrabuena,

pela laboriosa contribuição prestada na análise estatística dos dados.

A Fundação Universidade do Maranhão (FUM), através do Departamento de Parasitologia e Microbiologia, pela oportunidade de especialização.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e aos seus Professores, pelos ensinamentos recebidos.

Ao Prof. Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas pelo excepcional apoio prestado no desenvolvimento da pesquisa e do ensino pós-graduado na UNICAMP.

Ao Prof. Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia, pelos incentivos aos desenvolvimentos das atividades do Departamento de Microbiologia e Imunologia e do Departamento de Parasitologia.

Aos Professores Francisco G. Alcântara e Alba Sanches Patelli (Departamento de Morfologia) pela discussão crítica dos resultados.

Ao Prof. Avelino Rodrigues de Oliveira (Departamento de Bioquímica) pelas críticas ao trabalho e ensinamentos da técnica de inoculação em gânglios poplíteos de coelhos.

A Superintendência da Campanha de Combate à Esquistossomose (CACESQ), em especial ao Dr. Antonio Carlos, e aos funcionários do Setor do Vale do Paraíba da CACESQ, pela colaboração nos trabalhos de campo.

Ao colega Othon de Carvalho Bastos, companheiro de estudos e de trabalho em todos os momentos.

Ao colega José Valfrido Santana, pelo espírito de colaboração, e aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Imunologia pelos incentivos e amizade.

A Sra. Liliane Ziti Costa Carvalho, pela colaboração prestada na manutenção das linhagens do helminto em várias etapas deste trabalho.

Ao Sr. Ismael Gióia, pela colaboração na documentação fotográfica, a Srta. Maria Isabel Agnedo pela feitura dos gráficos e as Srtas. Cleide Aparecida Gomes Barbosa e Lúcia Helena Guilherme pela ajuda na datilografia deste trabalho.

Aos colegas e funcionários do Setor de Parasitologia que colaboraram neste trabalho.

A GRATIDÃO DO AUTOR.

Agradecemos aos recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP pelas seguintes Instituições:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FUNDAÇÃO DO AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISAS

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia)

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA

Durante o desenvolvimento deste trabalho o autor foi bolsista da FAPESP. O autor e o orientador, em particular, externam seus agradecimentos a esta Instituição.



## Í N D I C E

	Página
I - INTRODUÇÃO .....	1
II - MATERIAL E MÉTODOS.....	6
1. Obtenção de cercárias de <i>S. mansoni</i> .....	6
2. Infecção de camundongos com cercárias de <i>S. mansoni</i> das linhagens de Belo Horizonte (BH) e do Vale do Rio Paraíba (SJ).....	6
3. Necropsia dos animais infectados; obtenção e contagem do número de esquistossomos.....	8
4. Contagem de granulomas hepáticos.....	9
5. Obtenção de miracídios e infecção de planorbídeos das populações de Belo Horizonte e do Vale do Rio Paraíba.....	9
6. Obtenção do liofilizado de esquistossomos adultos.....	10
7. Preparo do antígeno bruto do <i>S. mansoni</i> .....	11
8. Obtenção de imune-soros.....	11
9. Obtenção de hemoglobina e soro normal de camundongo.....	12

10.	Análise imunológica: Ring test e dupla difusão em gel de agar, dos soros de coelhos anti- <i>S. mansoni</i> .....	13
11.	Preparo de extratos salinos de <i>S. mansoni</i> .....	13
12.	Dosagem proteica dos extratos sa linos de <i>S. mansoni</i> das linha gens BH e SJ.....	13
13.	Obtenção de imune-soros de camun dongos infectados com <i>S. mansoni</i> das linhagens BH e SJ.....	14
14.	Estudo comparativo por imunofluo rescência entre cercárias de <i>S.</i> <i>mansoni</i> das linhagens mineira e paulista.....	14
15.	Análise estatística.....	17
III	- RESULTADOS.....	20
1.	Viabilidade de penetração de cer cárias de <i>S. mansoni</i> em tegumen tos de camundongos albinos.....	20
2.	Mortalidade em camundongos infec tados com <i>S. mansoni</i> das linha gens de Belo Horizonte (BH) e do Vale do Rio Paraíba(SJ).....	21
3.	Número de vermes e de granulomas hepáticos obtidos em camundongos dos lotes 1 e 2.....	21

	3.1. Estudo estatístico da relação granulomas hepáticos-vermes das linhagens BH e SJ.....	22
	3.2. Ajustamento linear.....	22
	3.3. Ajustamento hiperbólico.....	23
4.	Dosagem do teor proteico dos extratos salinos do <i>S. mansoni</i> das linhagens mineira e paulista.....	25
5.	Resultados das análises imunológicas: Ring test e dupla difusão em gel de agar dos soros de coelhos anti- <i>S. mansoni</i> .....	25
6.	Resultados dos estudos de imunofluorescência indireta.....	26
IV	- DISCUSSÃO.....	47
V	- RESUMO E CONCLUSÕES.....	53
VI	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## I- I N T R O D U Ç Ã O

A esquistossomose mansônica está incluída entre as mais importantes endemias parasitárias do Brasil. Seu estudo torna-se cada vez mais importante, devido a gradativa disseminação da enfermidade em áreas do território nacional até então não atingidas por esta verminose. Milhões de brasileiros são acometidos pela endemia, dando origem a graves problemas do ponto de vista médico, social e econômico.

A maioria dos estudiosos da esquistossomose admite que esta doença tenha sua origem na África, tendo sido introduzida no Brasil através do tráfico de escravos. A implantação e a propagação da verminose no País, foram facilitadas por condições climáticas e pela presença de transmissores potenciais (Paraense, 1959). Em 1944, MAGALHÃES & DIAS argumentaram em favor da origem americana da esquistossomose mansônica, considerando que antes da vinda dos escravos negros já existiam o caramujo e o índio que apresentava doença com sintomatologia compatível ao da esquistossomose mansônica.

De 1908 a 1912 PIRAJÁ DA SILVA constatou casos de esquistossomose na Bahia. Suas comunicações demonstraram a ocorrência da verminose e consti-

tuiram uma valiosa contribuição para o estabelecimento da especificidade do *S. mansoni*.

Em 1918, LUTZ publicou um trabalho em que estudava quase todas as espécies de planorbídeos brasileiros, assinalando ainda a ocorrência da helmintose nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Bahia.

A partir de 1950 ficou demonstrada a expansão da esquistossomose no Brasil, pela intensificação das pesquisas e pela real disseminação da verminose (CUNHA, 1970).

Notáveis foram os trabalhos estatísticos realizados por PELLON & TEIXEIRA, na década de 1950, sobre a esquistossomose mansônica no Nordeste e Leste (1950), Sul e Centro-Oeste (1953) do país, evidenciando a extensa distribuição geográfica da verminose e sua elevada incidência.

No estado de Minas Gerais, a esquistossomose era quase desconhecida até 1920. Mais tarde, Minas Gerais foi considerada uma das mais importantes regiões endêmicas do Brasil. Neste Estado as regiões mais atingidas são as do alto e médio São Francisco e a zona da mata.

O principal agente transmissor da doença no estado de Minas Gerais é a *Biomphalaria glabra*ta.

Fato de grande repercussão em Belo Ho

rizonte, ocorreu em 1938, quando a incidência de doentes de esquistossomose naquela capital alcançou o índice de 11,7% (ANDRADE, 1959). MARTINS E VERSIANI (1939) atribuem, parte dessa prevalência à utilização do Lago da Pampulha para várias modalidades esportivas.

Campanhas contra a esquistossomose em Minas Gerais foram empreendidas pelo serviço da malária no Vale do Rio Doce, de 1953 a 1955 (ANDRADE, 1956).

Nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná, admite-se que o aparecimento da esquistossomose tenha sido consequência da migração de colonos nordestinos e de Minas Gerais.

Em São Paulo, as primeiras observações de esquistossomose foram feitas em Santos, por ARANTES (1923 e 1924), tendo sido constatado treze casos autóctones. Mais tarde, GONZALES TORRES (1940), MOURA (1945 e 1952), MAGALHÃES (1949) e ANTUNES (1952) encontraram novos casos em Santos. Outros focos de esquistossomose e doentes autóctones foram encontrados no litoral paulista por PINTO & MACIEL (1945) e COUTINHO (1949).

Por ser de grande valor histórico ressaltam-se os trabalhos realizados por CODA & cols. (1959) e posteriormente por PIZA e cols. (1960) no Vale do Rio Paraíba. Comprovada a extensão e gravidade da doença em São Paulo, PIZA & cols. realizaram estudos para conhecimento da distribuição do planorbídeo transmissor no Estado, publicando a CARTA PLANORBÍDICA DO ESTADO DE SÃO PAULO em 1972.

Outros importantes focos foram assinalados por vários autores no planalto de São Paulo: Ourinhos (FERREIRA & MEIRA, 1952); Campinas (PIZA & RAMOS, 1960 e MAGALHÃES e cols., 1967) e Americana (MAGALHÃES & cols., 1973).

RUIZ (1957), PIZA (1959, 1960, 1967) e RAMOS & cols. (1961) demonstraram que o principal transmissor da endemia nas regiões sudeste e sul do País, excetuando-se Minas Gerais, é a *Biomphalaria tenagophila*.

Em 1963, PARAENSE assinalou a existência de duas linhagens de *S. mansoni*: uma de São Paulo (Vale do Rio Paraíba) e outra de Minas Gerais (Belo Horizonte). Verificou que a linhagem paulista, mantida na natureza por *Biomphalaria tenagophila*, praticamente não infecta a *Biomphalaria glabrata*, hospedeira intermediária da linhagem mineira. Verificou, ainda, que esta resistência à infecção é recíproca. MAGALHÃES & CARVALHO (1969) estudando o poder de penetração de cercárias das duas linhagens (Belo Horizonte e Vale do Rio Paraíba), em camundongos albinos, evidenciaram maior viabilidade de penetração por parte da linhagem mineira. Estes mesmos autores, em 1973, assinalaram diferenças significativas entre estas linhagens quando estudaram comparativamente a morfologia de exemplares adultos de *S. mansoni*. Verificaram, ainda, em 1975, que animais de laboratório infectados por *S. mansoni* das linhagens de

Belo Horizonte e do Vale do Rio Paraíba, apresentaram maior patogenicidade quando parasitados pela cepa mineira.

Tendo em vista a importante contribuição dos trabalhos citados, podemos admitir a ocorrência de comportamento diferente em etapas do ciclo evolutivo do *S. mansoni* pertencentes às linhagens mineira e paulista.

Levando-se em consideração estes fatos, propusemos estudar alguns aspectos do comportamento das linhagens mineira (BH) e paulista (SJ) do *S. mansoni*. Para isso, mantivemos o ciclo biológico do *S. mansoni* em laboratório utilizando como hospedeiro definitivo *Mus musculus* albinos.

Avaliamos a patogenicidade causada pelo *S. mansoni* nos animais infectados, considerando a mortalidade apresentada pelos camundongos, a relação entre granulomas hepáticos e vermes adultos e a análise de imune-soros anti *S. mansoni* contra os antígenos específicos.



## II- M A T E R I A L E M É T O D O S

### 1- Obtenção de cercárias de *S. mansoni*.

Utilizamos, em nossas pesquisas, cercárias procedentes de *Biomphalaria glabrata* de Minas Gerais (linhagem mineira de *S. mansoni*) e de *Biomphalaria tenagophila* de São Paulo. Para a obtenção destas cercárias, foi adotada a técnica preconizada por PELLEGRINO & MACEDO (1955).

### 2- Infecção de camundongos com cercárias de *S. mansoni* das linhagens de Belo Horizonte (BH) e do Vale do Rio Paraíba (SJ).

Sessenta camundongos normais do sexo feminino, pesando aproximadamente 16 gramas, foram divididos em lotes de trinta camundongos e infectados com cercárias de *S. mansoni* da linhagem de Belo Horizonte (lote 1) e do Vale do Rio Paraíba (lote 2).

Os lotes foram subdivididos adotando-se por critério o número de cercárias infectantes, conforme abaixo transcrito.

Lote 1:- 30 camundongos infectados com cercárias da linhagem mineira (BH) do *S. mansoni*.

Sub lote 1A:- 15 camundongos infectados com 100 cercárias.

Sub lote 1B:- 15 camundongos infectados com 200 cercárias.

Lote 2:- 30 camundongos infectados com cercárias da linhagem paulista (SJ) do *S. mansoni*.

Sub lote 2A:- 15 camundongos infectados com 100 cercárias.

Sub lote 2B:- 15 camundongos infectados com 200 cercárias.

Dois outros grupos de 15 camundongos normais foram infectados com 200 cercárias de BH e SJ, para realização dos seguintes estudos:

-) Determinação do número de cercárias que penetram pelo tegumento da cauda do roedor;

-) Obtenção de imune-soros para estudos de imunofluorescência;

Estes grupos de 15 camundongos receberam as denominações: lote A e lote B.

A infecção dos camundongos foi feita por imersão da cauda do roedor em suspensão cercariana e a determinação do número de cercárias infectantes segundo técnica descrita por MAGALHÃES (1969), inspirada nos métodos de OLIVIER & STIREWALT (1952), STIREWALT & BRONSON (1955) e BARRIOS-DURAN (1955).

Com a finalidade de obtermos maior número de esquistossomos adultos para o preparo do antígeno, utilizamos, também, a infecção de camundongos pela técnica de imersão dos roedores em suspensão cercariana (STANDEN, 1949).

As suspensões cercarianas continham, em média, cem cercárias por camundongo.

### 3- Necropsia dos animais infectados; obtenção e contagem do número de esquistossomos.

Sessenta dias após a infecção, os camundongos dos lotes 1 e 2 e os infectados por imersão em suspensão cercariana, foram necropsiados e seu sistema porta perfundido, de acordo com YOLLES (1947).

Realizamos, também, a contagem de vermes localizados no fígado dos camundongos, por esmagamento do órgão entre lâminas de vidro, segundo a técnica de STANDEN (1953) e HILL (1956).

#### 4- Contagem de granulomas hepáticos.

Durante os trabalhos de perfusão, os fígados dos camundongos infectados eram isolados, após o seccionamento das veias porta e supra hepáticas. Os fígados eram liquidificados e os granulomas contados em lupa estereoscópica, segundo técnica de PELLEGRINO & BRENER (1956); BRENER, PELLEGRINO & OLIVEIRA (1956).

#### 5- Obtenção de miracídios e infecção de planorbídeos das populações de Belo Horizonte e do Vale do Rio Paraíba.

Miracídios foram obtidos a partir de granulomas procedentes de fígados de camundongos infectados com *S. mansoni* das linhagens estudadas.

Para obtenção de miracídios, os granulomas foram suspensos em um determinado volume de água. Em seguida, eram submetidos ao calor fornecido por lâmpadas elétricas de 60 W, mantidas à distância de 40 cm, durante duas horas, de modo que a temperatura alcance 28°C (STANDEN, 1951 e 1952).

Planorbídeos dos gêneros *Biomphalaria glabrata* (MG) e *Biomphalaria tenagophila* (SP) eram introduzidos em frascos contendo os miracídios recém-eclodidos. O conjunto era exposto ao calor e luminosidade

emanada por lâmpadas elétricas (STANDEN, 1952), durante três horas consecutivas. Terminado o período de exposição, os caramujos eram mantidos no moluscário, para futura obtenção de cercárias.

#### 6- Obtenção do liofilizado de esquistossomos adultos.

Os esquistossomos coletados nas perfusões do fígado e veias mesentéricas, foram submetidos ao seguinte tratamento:

A- Deposição em pequenos frascos; separação por sexo e contagem do número de esquistossomos à lupa estereoscópica;

B- Lavagem dos vermes duas a três vezes em salina fisiológica, durante uma hora a 37° C, visando limpeza do tubo digestivo;

C- Armazenamento dos vermes em congelador a -10°C;

D- Liofilização e trituração dos vermes em gral;

E- Manutenção do liofilizado de vermes em refrigerador a 4°C.

Uma parte do liofilizado foi utilizada para o preparo de extratos salinos. A outra parte foi aplicada no preparo de antígenos brutos.

#### 7- Preparo do antígeno bruto do *S. mansoni*.

Os antígenos brutos do *S. mansoni* foram preparados do seguinte modo:

Foi suspenso 5 mg do liofilizado em 1 ml de solução salina tamponada (0.9g de NaCl em q.s.p. 100 ml de tampão fosfato 0.02M pH 7.0), segundo DAMIAN (1966) emulsionado em adjuvante incompleto de FREUND (1951) na proporção de 1:1.

#### 8- Obtenção de imune-soros.

Para obtenção do soro de coelho anti-*S.mansoni*, empregamos o esquema apresentado por BASTOS (1975), transcrito abaixo:

Inoculamos 2 ml do "antígeno bruto" (10mg) na região dos gânglios poplíteos de coelhos normais, sendo 1 ml em cada gânglio, com intervalo de 30 dias entre as duas primeiras inoculações. Quinze dias depois efetuamos três inoculações no dorso dos animais com 5mg do mesmo antígeno, observando-se intervalos de uma semana. Sete dias após a última inoculação, obtivemos reação de ARTHUS (1903) positiva.

Nessa ocasião os animais foram sangrados a branco e o soro obtido foi armazenado em congelador a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Utilizamos quatro coelhos em nossas ex  
periências:

- ) Coelho A:- inoculado com antígeno bruto de esquis  
tossomos adultos machos da linhagem de  
Belo Horizonte (BHM)
- ) Coelho B:- Inoculado com antígeno bruto de esquis  
tossomos adultos fêmeas da linhagem de  
Belo Horizonte (BHF)
- ) Coelho C:- Inoculado com antígeno bruto de esquis  
tossomos adultos machos da linhagem do  
Vale do Rio Paraíba (SJM)
- ) Coelho D:- Inoculado com antígeno bruto de esquis  
tossomos adultos fêmeas da linhagem do  
Vale do Rio Paraíba (SJF).

Os coelhos utilizados eram oriundos do  
Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia  
da UNICAMP.

#### 9- Obtenção de hemoglobina e soro normal de camundongo.

Dez camundongos normais foram sangra-  
rados pelo plexo vascular braquial. Parte do sangue  
obtido foi hemolisado, sendo o restante distribuído em  
frascos separados para extração do soro normal.

Os conjuntos de soro e de sangue hemo-  
lisado de camundongos, foram conservados em congelador  
a  $-10^{\circ}\text{C}$ , para estudos posteriores.

10- Análise imunológica: Ring test e dupla difusão em gel de agar, dos soros de coelhos anti-*S. mansoni*.

Os imune-soros foram analisados frente ao sangue hemolisado de camundongos normais utilizando-se as técnicas de "ring test" e de gel de agar, segundo OUCHTERLONY (1958).

Tomamos para controle das reações o sangue normal de camundongo.

11- Preparo de extratos salinos de *S. mansoni*.

Extratos salinos eram preparados pela suspensão de 5mg do liofilizado de esquistossomos em 1 ml de salina fisiológica. A mistura era mantida com agitação periódica em refrigerador a 4°C, durante 24 horas. Em seguida, eram centrifugados a 18.000G, durante 30 minutos a 0°C e o sobrenadante era retirado e mantido em refrigerador.

12- Dosagem proteica dos extratos salinos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ.

As dosagens do teor proteico de extratos salinos de vermes machos e de vermes fêmeas das



duas procedências, foram realizadas pelo método de Folin-Ciocalteu, modificado por LOWRY (1951). As leituras espectrofotométricas foram efetuadas em 660 m $\mu$ , cubetas 10 x 1 cm. Tomamos como padrão 5, 10, 15 e 20  $\mu$ g de soro albumina equina (SAE), previamente dosado pelo Micro Kjeldahl, segundo método de KABAT & MAYER (1964).

13- Obtenção de imune-soros de camundongos infectados com *S. mansoni* das linhagens BH e SJ.

Transcorridos sessenta dias após a infecção, os camundongos pertencentes aos lotes A e B (vide página 7), foram sangrados pelo plexo vascular braquial. O sangue obtido, foi distribuído em frascos separados. Os imune-soros dos camundongos dos lotes A e B foram reunidos em frascos distintos e conservados em congelador a -10°C.

14- Estudo comparativo por imunofluorescência entre cercárias de *S. mansoni* das linhagens mineira e paulista.

Estudos comparativos semi-quantitativos de imunofluorescência indireta entre as linhagens

mineira e paulista do *Schistosoma mansoni*, foram realizados de acordo com o método SADUN e cols. (1960) e CAMARGO (1968).

Utilizamos nas reações de imunofluorescência indireta:

- a) Cercárias das linhagens mineira (BH) e paulista (SJ).  
A fim de manter íntegra sua estrutura, as cercárias eram conservadas em formol a 0,5% e guardadas em refrigerador a 8°C. No momento do uso, eram lavadas com salina tamponada a 0,01M pH 7.2. Foram utilizadas cinquenta cercárias em cada reação.
- b) Imune-soros de camundongos infectados com *S. mansoni* (lotes A e B), inativados a 56°C, durante 30 minutos e conservados a -10°C.
- c) Conjugado "Hyland" (soro de cabra anti-globulina de camundongo).

As condições utilizadas para o processamento das reações homólogas e heterólogas de imunofluorescência indireta com os soros não absorvidos foram as seguintes:

- Reações em tubos, seguindo-se fixação de cercárias em lâminas quadriculadas
- Diluição dos soros anti-BH e anti-SJ = 1:8
- Diluição do conjugado = 1:50

- Volume dos soros e do conjugado = 0.1 ml
- Tempo de reação dos imune-soros e do conjugado = 40 minutos
- Temperatura da reação: 37°C em câmara úmida.

A determinação da especificidade das reações antígeno-anticorpo foi efetuada por absorção, segundo BIGUET (1965). Inicialmente, diluimos os anti-soros com salina tamponada, na proporção de 1:64. Adicionamos ao diluído, 1000 cercárias heterólogas, centrifugamos e verificamos a presença de anticorpos no sobrenadante. Este sobrenadante, foi diluído de forma a nos fornecer uma diluição de 1:128. Novamente, verificamos a presença de anticorpos. Fizemos, então, uma nova diluição deste sobrenadante, ficando esta diluição na proporção de 1:256. Esta diluição foi utilizada para análise de imunofluorescência do soro absorvido, por não apresentar anticorpos.

As condições que melhor se ajustaram em nossas reações de absorção foram as seguintes:

- As reações foram feitas em tubos de 7.5 cm x 1.2 cm
- O volume de soros anti-BH e anti-SJ foi de 0,4 ml
- O número de cercárias BH e SJ em cada reação foi de 1000 cercárias
- O tempo e a temperatura utilizados na reação foi de 1 hora a 37°C em câmara úmida, com agitações de 10

em 10 minutos e 18 horas em refrigerador, a 8° C.

Foram utilizados como controles das reações de imunofluorescência indireta:

- Cercárias em salina tamponada
- Cercárias + anti-soros
- Cercárias + soro normal de camundongo + anti-globulina fluorescente
- Cercárias + soro normal
- Cercárias + soro imune + imune-globulina não fluorescente
- Cercárias + tampão + anti-globulina fluorescente

#### 15- Análise estatística.

Viabilidade de penetração de cercárias BH e SJ.

Utilizamos para estudos estatísticos os valores obtidos da recontagem de cercárias usadas para infecção de camundongos dos lotes A e B. Os estudos comparativos foram realizados considerando-se o número de cercárias que não penetraram no tegumento da cauda de *Mus musculus* (Tabela I). A análise destes valores foi efetuada através do teste de significância de Qui Quadrado (BRANDT-SNEDECOR, 1948) e da análise de variância, considerando-se como causas de variação, linhagens e resíduos.

Cálculo da mortalidade em dois lotes de trinta camundongos infectados com cercárias das linhagens mineira (BH) e paulista (SJ).

Durante o período de sessenta dias estabelecidos para evolução da infecção esquistossomótica em camundongos dos lotes 1 e 2, foi anotado o número de camundongos que não sobreviveram à infecção. Estes camundongos foram necropsiados, tendo sido verificada a existência de vermes adultos de *S. mansoni* no seu sistema porta. Os valores correspondentes ao número de camundongos não sobreviventes e ao número dos que sobreviveram à infecção foram distribuídos na tabela III. Com estes valores avaliamos, comparativamente, a mortalidade dos animais em função da patologia causada pela infecção.

Relação entre granulomas hepáticos e helmintos encontrada em camundongos dos lotes 1 e 2.

Realizamos estudos comparativos de correlação entre os valores encontrados para granulomas hepáticos e total de vermes adultos de BH e SJ (Tabela IV). A significância entre os coeficientes de correlação foi determinada pelo teste de significância B (PIEDRABUENA & BARACHO, 1975). Com os mesmos valores (granulomas - helmintos) determinamos as funções que expri

mem a correlação estudada  $GH = f(HM)$  e estabelecemos as equações representativas para os ajustamentos linear e hiperbólico destas funções.

Estudos estatísticos foram, também, realizados, considerando-se os valores correspondentes ao total de vermes por camundongo relacionados com o número de granulomas hepáticos por verme de BH e SJ (Tabelas VI e VII). Utilizando-se estes valores foram feitos ajustamentos hiperbólicos, calculando-se as equações representativas das funções.

Nos cálculos estatísticos consideramos os seguintes valores representativos:

- NS Não significativo
- \* Valor significativo ao nível de 5%
- \*\* Valor altamente significativo ao nível de 1%
- \*\*\* Valor altamente significativo ao nível de 0,1%

III- R E S U L T A D O S

1- Viabilidade de penetração de cercárias de *S.mansonii*, em tegumentos de camundongos albinos.

Os resultados referentes aos números de cercárias que penetram no tegumento da cauda de *Mus musculus* albinos, pertencentes aos lotes A (linhagem BH) e B (linhagem SJ), encontram-se dispostos na Tabela I. Distribuimos nesta tabela, também, o número correspondente às cercárias que deixaram de penetrar. Estes dados foram analisados estatisticamente, utilizando-se somente o número de cercárias que não penetraram. Devido a heterogeneidade dos dados (os  $\chi^2$  obtidos foram 232,263\* e 28,049\*\* com 13 graus de liberdade para as linhagens BH e SJ, respectivamente), achamos mais conveniente exprimi-los em percentagens. Estes valores foram transformados em ângulos, utilizando-se, para isso, a fórmula  $\alpha^0 = \text{arco seno } \sqrt{P}$  FISHER E YATES, 1971 (Tabela II). Estudadas as duas linhagens por análise de variância, elas representaram um valor de F igual a 112,879, altamente significativo com 1 e 28 graus de liberdade. Encontramos um coeficiente de variabilidade igual a 13,46%.

2- Mortalidade em camundongos infectados com *S. mansoni* das linhagens de Belo Horizonte (BH) e do Vale do Rio Paraíba (SJ).

No decorrer dos sessenta dias estabelecidos para evolução do *S. mansoni* em camundongos infectados, ocorreu a morte de 5 camundongos: 3 roedores da linhagem de Belo Horizonte (lote 1), sendo um deles exposto a 100 cercárias e os outros dois a 200. Morreram, igualmente, 2 roedores da linhagem do Vale do Rio Paraíba (lote 2), sendo um exposto a 100 cercárias e o outro a 200 (Tabela III).

Em alguns camundongos expostos às linhagens em estudo, não foram encontrados vermes adultos. Estes camundongos foram excluídos dos cálculos estatísticos.

3- Número de vermes e de granulomas hepáticos obtidos em camundongos dos lotes 1 e 2.

Aos sessenta dias, após a exposição cercariana, contamos os vermes e os granulomas hepáticos pertencentes aos lotes 1 e 2 (Tabela IV). Assinalamos que a média do número de vermes por camundongo apresentada pela linhagem BH, foi inferior à média equivalente apresentada pelos camundongos expostos à



linhagem SJ. Esta média de BH apresentou-se inferior, tanto nos camundongos expostos a 100 cercárias, como nos camundongos expostos a 200. Observamos que o número de granulomas por verme nas duas linhagens, variou inversamente com o número de vermes por camundongo. A linhagem mineira apresentou maior média de granulomas por verme. Estas relações foram estudadas estatisticamente (Tabela V).

### 3.1- Estudo estatístico da relação granulomas hepáticos-vermes das linhagens BH e SJ.

Com os valores correspondentes ao total de granulomas hepáticos e vermes por camundongo (Tabela IV), realizamos estudos estatísticos comparativos entre as duas linhagens de *S. mansoni*. O número de vermes adultos e de granulomas hepáticos obtidos em cada camundongo perfundido, foi ordenado em ordem decrescente de granulomas (Tabelas VI e VII).

A correlação encontrada entre as linhagens BH e SJ está exposta na Tabela VIII.

### 3.2- Ajustamento linear.

Utilizando os valores apresentados pelas relações granulomas hepáticos/vermes contidos nas Tabelas VI e VII avaliamos a função  $GH = f(HM)$  para BH

e SJ, onde GH corresponde ao número de granulomas hepáticos por camundongo e HM ao número total de vermes por camundongo. As equações estabelecidas para o ajustamento linear estão transcritas abaixo e representadas na figura 1.

$$\text{BH} \quad Y = 118,49329.X + 902,95202$$

$$\text{SJ} \quad Y' = 136,12317.X + 94,60562$$

Aplicamos o teste de significância B (PIEDRABUENA & BARACHO, 1975), entre os coeficientes de correlação encontrados para BH e SJ, de acordo com a seguinte fórmula:

$$B = \frac{(1 + r_1)(1 - r_2)}{(1 + r_2)(1 - r_1)} \quad \text{sendo}$$

$$r_1 = 0,84994$$

$$r_2 = 0,82343$$

$$B = 1,194 < 3,35 \quad (\text{Valor de B da tabela, ao nível de 5\%}) \text{ N.S.}$$

$$\text{Sendo } n_1 = n_2 \quad (\text{Número de casos}) = 24$$

### 3.3- Ajustamento hiperbólico.

Para o ajustamento hiperbólico, consideramos os dados das tabelas VI e VII, destituídas dos valores 615 e 11 de BH e 154 e 14 de SJ por estarem muito afastados da média dos valores encontrados. Os valores ajustados, tomados para a função hiperbólica, estão contidos na tabela IX e obedecem as equações:

$$\text{BH} \quad Y = 798,52 \cdot X^{0,44415}$$

$$\text{SJ} \quad Y' = 85,96 \cdot X^{1,15879}$$

Estes valores encontram-se nas figuras 2 e 3, representativos das funções  $\text{GH} = f(\text{HM})$ .

Nos estudos comparativos entre BH e SJ, consideramos, ainda, o relacionamento entre o total de vermes por camundongo e o número de granulomas hepáticos produzidos por cada verme (Tabelas VI e VII). Não incluímos nos cálculos estatísticos os valores constantes da última linha da tabela VI por considerá-los muito afastados dos outros valores assinalados. Os dados da Tabela VII apresentam dois grupos distintos de distribuição.

Avaliamos a função  $\text{GH} = f(\text{HM})$  em separado, para estes dois tipos de valores, que correspondem a SJ1 e SJ2, abaixo especificados.

Os valores ajustados para as linhagens mineira (BH) e paulista (SJ) acham-se na Tabela X e obedecem as equações abaixo:

$$\text{BH} \quad Y = 376,28 \cdot X^{-0,51835}$$

$$\text{SJ1} \quad Y' = 458,610 \cdot X^{-0,34445}$$

$$\text{SJ2} \quad Y'' = 206,076 \cdot X^{-0,59498}$$

Estas funções encontram-se representadas na figura 4.

4- Dosagem do teor proteico dos extratos salinos do *S. mansoni* das linhagens mineira e paulista.

As concentrações proteicas de cada extrato salino de *S. mansoni* foram calculadas em relação a proteína padrão e encontram-se apresentadas na Tabela XI. Os resultados das dosagens da Tabela XI correspondem ao teor proteico em microgramas encontrados em alíquotas de 0.25 ml dos extratos salinos dosados.

O teor de proteínas contido em 1 ml do extrato salino é de aproximadamente 120 $\mu$ g para os vermes machos de BH e SJ, e de 150 $\mu$ g para os vermes fêmeas das duas procedências.

5- Resultados das análises imunológicas: ring test e dupla difusão em gel de agar dos soros de coelho anti-*S. mansoni*.

Não evidenciamos a presença de linhas de precipitação nas análises imunológicas realizadas utilizando os anti-soros de coelho frente ao sangue hemolisado de camundongo.

6- Resultados dos estudos de imunofluorescência indireta.

Não foram observadas diferenças de títulos quando os imune-soros foram testados com cercárias homólogas ou heterólogas, sugerindo que a maioria dos anticorpos presentes nestes soros eram dirigidos a determinantes comuns às cercárias homólogas e heterólogas. (Figuras 5, 6, 7, 8).

A absorção dos soros com cercárias heterólogas eliminou as reações positivas para as cercárias homólogas. (Vide figuras 9, 10, 11 e 12).

Todos os controles das reações apresentaram-se negativos. Exemplificamos os referentes às reações entre cercárias BH + tampão + conjugado (figura 13) e cercárias SJ + tampão + conjugado (figura 14). Como controle das reações de absorção foram realizadas reações de imunofluorescência com as cercárias utilizadas para absorção dos soros. As reações foram positivas.

Nas análises efetuadas, não nos foi possível encontrar distinção entre as duas linhagens. Este fato foi, também, verificado com os anti-soros absorvidos ou não, frente às cercárias BH e SJ.

TABELA I

Viabilidade de penetração de cercárias de *S. mansoni*, das linhagens de BH e SJ, pelo tegumento de camundongos albinos.

LINHAGENS				
Mineira (BH)		Paulista (SJ)		
Cercárias que penetraram	Cercárias que não penetraram	Cercárias que penetraram	Cercárias que não penetraram	
180	20	160	40	
182	18	166	34	
181	19	160	40	
184	16	168	32	
180	20	164	36	
192	8	166	34	
186	14	162	38	
184	16	168	32	
184	16	156	44	
194	6	168	32	
189	11	155	45	
190	10	152	48	
184	16	146	54	
190	10	158	42	
176	24	142	58	
Total	2776	224	2391	609
Média	185,06	14,93	159,4	40,6

TABELA II

Dados transformados pela fórmula  $\alpha^{\circ} = \text{arco seno } \sqrt{P}$  referentes às cercárias que não penetraram pelo tegumento da cauda de *Mus musculus*.

Cercárias BH que não penetraram (%)	Cercárias SJ que não penetraram (%)	Transformação das percentagens em ângulos $\alpha^{\circ} = \text{arco seno } \sqrt{P}$	
		BH	SJ
10,0	20,0	18,43	26,57
9,0	17,0	17,47	24,35
9,5	20,0	17,95	26,57
8,0	16,0	16,43	23,58
10,0	18,0	18,43	25,10
4,0	17,0	11,54	24,35
7,0	19,0	15,34	25,84
8,0	16,0	16,43	23,58
8,0	22,0	16,43	27,97
3,0	16,0	9,97	23,58
5,5	22,5	13,56	28,32
5,0	24,0	12,92	29,33
8,0	27,0	16,43	31,31
5,0	21,0	12,92	27,27
12,0	29,0	20,27	32,58
112,5	304,5	334,52	400,30

TABELA III

Mortalidade observada em dois lotes de camundongos infectados com cercárias das linhagens BH e SJ. Dados obtidos após 60 dias de infecção.

Linhagens	Cercárias por roedor	Camundongos infectados		
		sobrevi- ventes	mortos	total
BH	100	12	1	13
	200	12	2	14
	Totais	24	3	27
SJ	100	12	1	13
	200	12	1	13
	Totais	24	2	26
	Totais Gerais	48	5	53



TABELA IV

Vermes e granulomas obtidos da perfusão de 24 camundongos infectados pela linhagem BH e SJ.

Dados obtidos após 60 dias de infecção.

Linhagem	Cercárias por camundongo	Vermes		Granulomas hepáticos
		Machos e Fêmeas	Fêmeas	
BH	100	88	34	19.706
	200	113	46	25.794
	Totais	201	80	45.500
SJ	100	144	41	20.201
	200	217	59	31.210
	Totais	361	100	51.411
	Totais Gerais	562	180	96.911

TABELA V

Média de vermes por camundongo e de granulomas hepáticos por verme das linhagens BH e SJ.

Linhagem	Cercárias por camundongo	Vermes por camundongo	Granulomas hepáticos por verme	
			Machos e Fêmeas	Fêmeas
BH	100	7.3	224	580
	200	9.4	228	561
	Médias	8.4	226	570
SJ	100	12.0	140	493
	200	18.1	144	529
	Médias	15.0	142	511
Médias Gerais		11.7	184	540

TABELA VI

Relação dos granulomas hepáticos por camundongo e dos vermes da linhagem de Belo Horizonte (MG).

Número de granulomas por camundongo	Vermes Machos	Vermes Fêmeas	Total de vermes por camundongo	Número de granulomas por verme
3077	10	7	17	181
3000	10	6	16	187
2923	9	6	15	195
2659	8	6	14	190
2505	8	6	14	179
2319	7	5	12	193
2319	6	5	11	211
2242	6	5	11	204
2154	8	2	10	215
2142	2	4	6	357
2077	7	5	12	173
1955	3	3	6	326
1911	3	3	6	319
1857	5	3	8	232
1857	4	2	6	309
1714	3	2	5	343
1549	2	2	4	387
1385	3	1	4	346
1252	1	2	3	417
1049	2	1	3	350
1049	2	1	3	350
1011	2	1	3	337
879	-	1	1	879
615	10	1	11	56
<b>Total 45.500</b>	<b>121</b>	<b>80</b>	<b>201</b>	<b>6936</b>

TABELA VII

Relação dos granulomas hepáticos por camundongo e dos vermes da linhagem do Vale do Rio Paraíba (SJ).

Número de granulomas por camundongo	Vermes Machos	Vermes Fêmeas	Total de vermes por camundongo	Número de granulomas por verme
6209	38	6	44	141
4813	19	15	34	141
4434	17	13	30	147
3616	13	9	22	164
3626	15	7	22	165
3253	14	6	20	163
3186	13	6	19	168
3186	8	2	10	319
3109	16	4	20	155
2746	5	6	11	250
2163	12	3	15	144
1760	5	4	9	195
1714	8	2	10	171
1659	8	2	10	166
1494	5	2	7	213
1428	4	2	6	238
875	16	3	19	46
615	17	2	19	32
417	4	1	5	83
406	3	1	4	101
340	2	1	3	113
154	2	3	5	31
154	3	-	3	51
154	14	-	14	11
<b>Total 51.411</b>	<b>261</b>	<b>100</b>	<b>361</b>	<b>3408</b>

TABELA VIII

Relação granulomas hepáticos/vermes: coeficientes de correlação, regressão e termo independente.

	(BH)	(SJ)
Coef. de correlação (r)	0,82343***	0,84994***
Coef. de regressão (b)	118,49329	136,12317
Termo independente (a)	902,95202	94,60562

TABELA IX

Valores referentes ao ajustamento hiperbólico da relação granulomas hepáticos por camundongo/vermes por camundongo das linhagens de Belo Horizonte e do Vale do Rio Paraíba.

Linhagem BH			Linhagem SJ		
Total de vermes por camundongo	Nº de granulomas por camundongo	Valores ajustados para Y	Total de vermes por camundongo	Nº de granulomas por camundongo	Valores ajustados para Y
(X)	(Y)	(Yc)	(X)	(Y)	(Yc)
17	3077	2811	44	6209	6888
16	3000	2734	34	4813	5116
15	2923	2659	30	4434	4426
14	2659	2578	22	3616	3089
14	2505	2578	22	3526	3089
12	2319	2408	20	3253	2767
11	2319	2316	19	3186	2606
11	2242	2316	10	3186	1239
10	2154	2220	20	3109	2767
6	2142	1770	11	2746	1384
12	2077	2408	15	2163	1982
6	1955	1770	9	1760	1096
6	1911	1770	10	1714	1239
8	1857	2011	10	1659	1239
6	1857	1770	7	1494	820
5	1714	1632	6	1428	685
4	1549	1478	19	875	2606
4	1385	1478	19	615	2606
3	1252	1301	5	417	555
3	1049	1301	4	406	429
3	1049	1301	3	340	307
3	1011	1301	5	154	192
1	879	798	3	154	86

TABELA X

Valores referentes ao ajustamento hiperbólico da relação vermes por camundongo/número de granulomas por verme das linhagens de Belo Horizonte e do Vale do Rio Paraíba.

Linhagem BH			Linhagem SJ		
Total de vermes por camundongo (X)	Nº de granulomas por verme (Y)	Valores ajustados para Y ( $Y_T$ )	Total de vermes por camundongo (X)	Nº de granulomas por verme (Y)	Valores ajustados para Y ( $Y_T$ )
1	879	736	14	11	11
3	337	417	3	51	51
3	350	417	5	31	31
3	350	417	3	113	107
3	417	417	4	101	90
4	346	359	5	83	79
4	387	359	19	32	36
5	343	320	19	46	36
6	309	210	6	238	247
8	232	251	7	213	235
6	319	210	10	166	207
6	326	210	10	171	207
12	173	203	9	195	215
6	357	210	15	144	180
10	215	223	11	250	201
11	204	212	20	155	163
11	211	212	10	319	207
12	193	203	19	168	166
14	179	187	20	163	163
14	190	187	22	165	158
15	195	181	22	164	158
16	187	148	30	147	142
17	181	169	34	141	136
-	-	-	44	141	124

TABELA XI

Concentrações proteicas dos extratos salinos de *S.mansoni* das linhagens BH e SJ.

Antígenos	Amostras	Não Diluída 1:1	Diluições			
			1 <sup>a</sup> determinação		2 <sup>a</sup> determinação	
			1:2	1:4	1:2	1:4
BHM	1	30,00	31,10	28,00	34,60	34,20
	2	27,85	29,00	27,00	25,00	30,00
SJM	1	28,50	29,00	28,00	30,00	30,00
	2	31,10	32,00	31,00	28,12	27,00
BHF	1	37,60	36,66	40,00	34,00	34,00
	2	38,82	38,82	44,00	38,82	40,00
SJF	1	38,16	38,82	40,00	38,82	38,00
	2	37,60	38,00	38,00	38,00	42,00



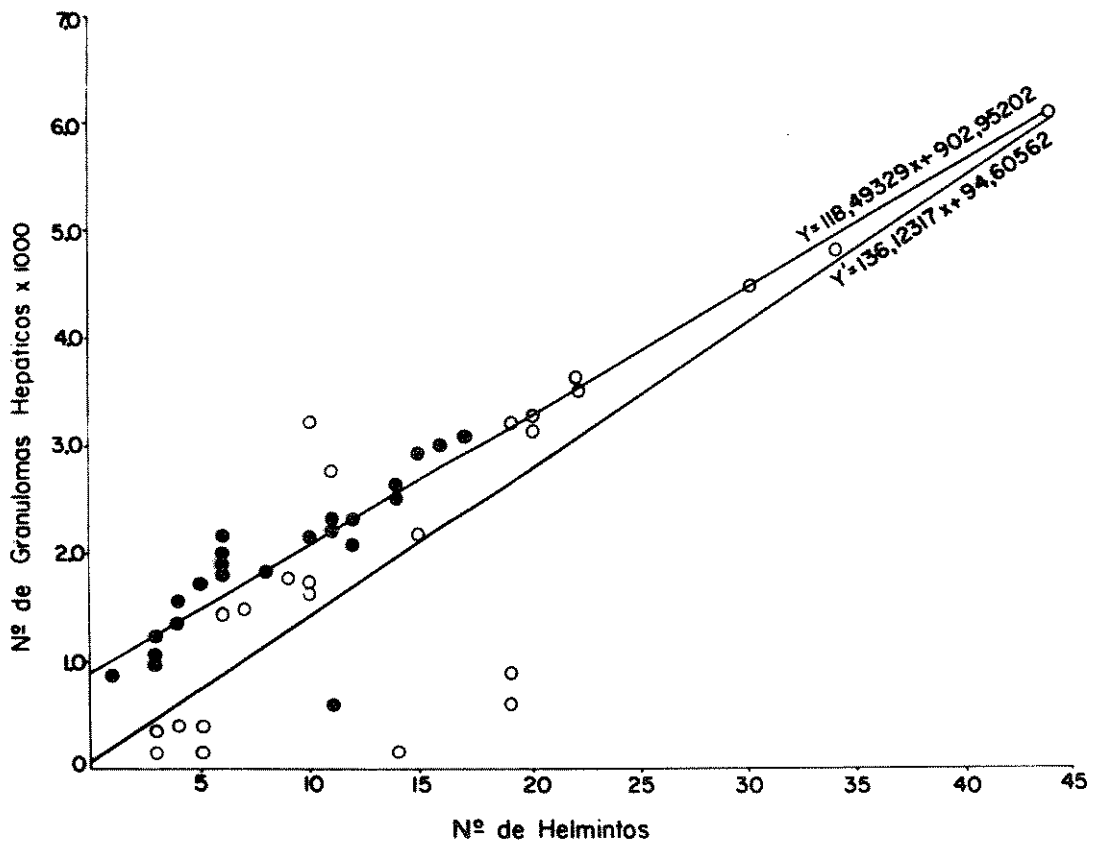


Fig.1- Relação entre Granulomas Hepáticos e Número de Vermes adultos das Linhagens BH e SJ encontrados em Mus musculus.

- Linhagem Mineira
- Linhagem Paulista

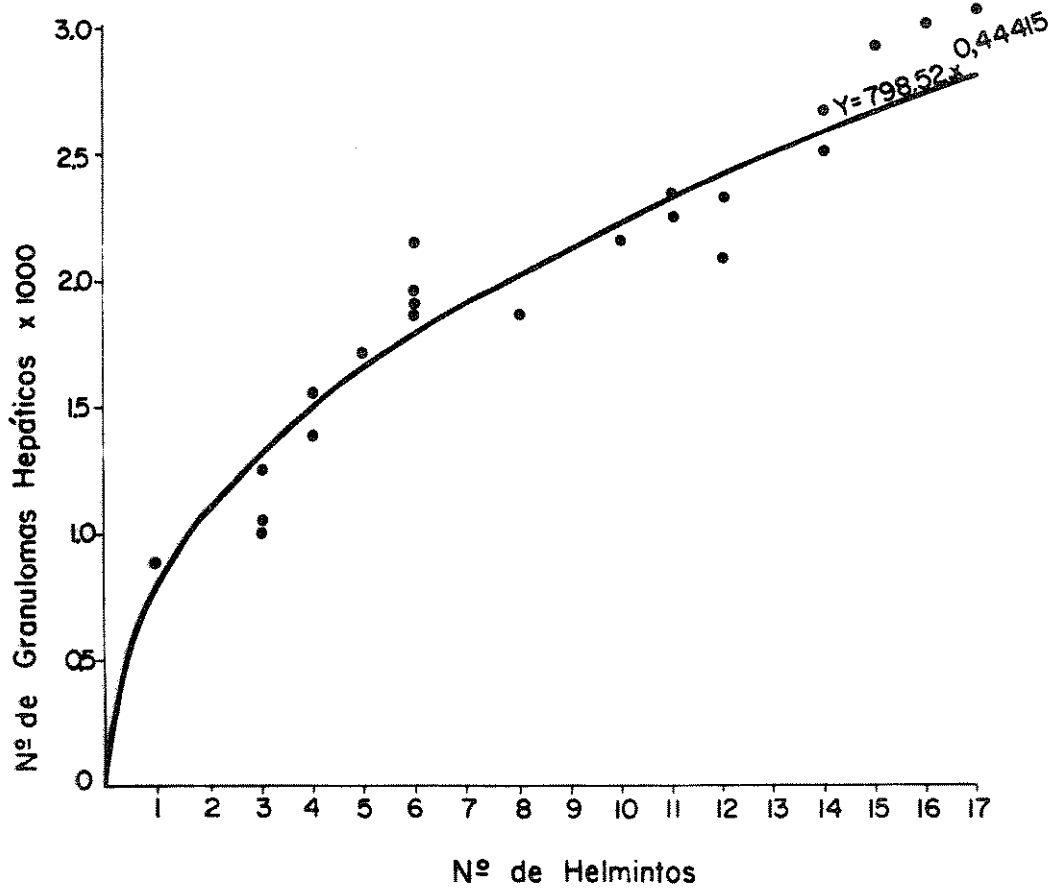


Fig.2- Relação entre Granulomas Hepáticos e Número de Vermes adultos da Linhagem BH encontrados em Mus musculus.

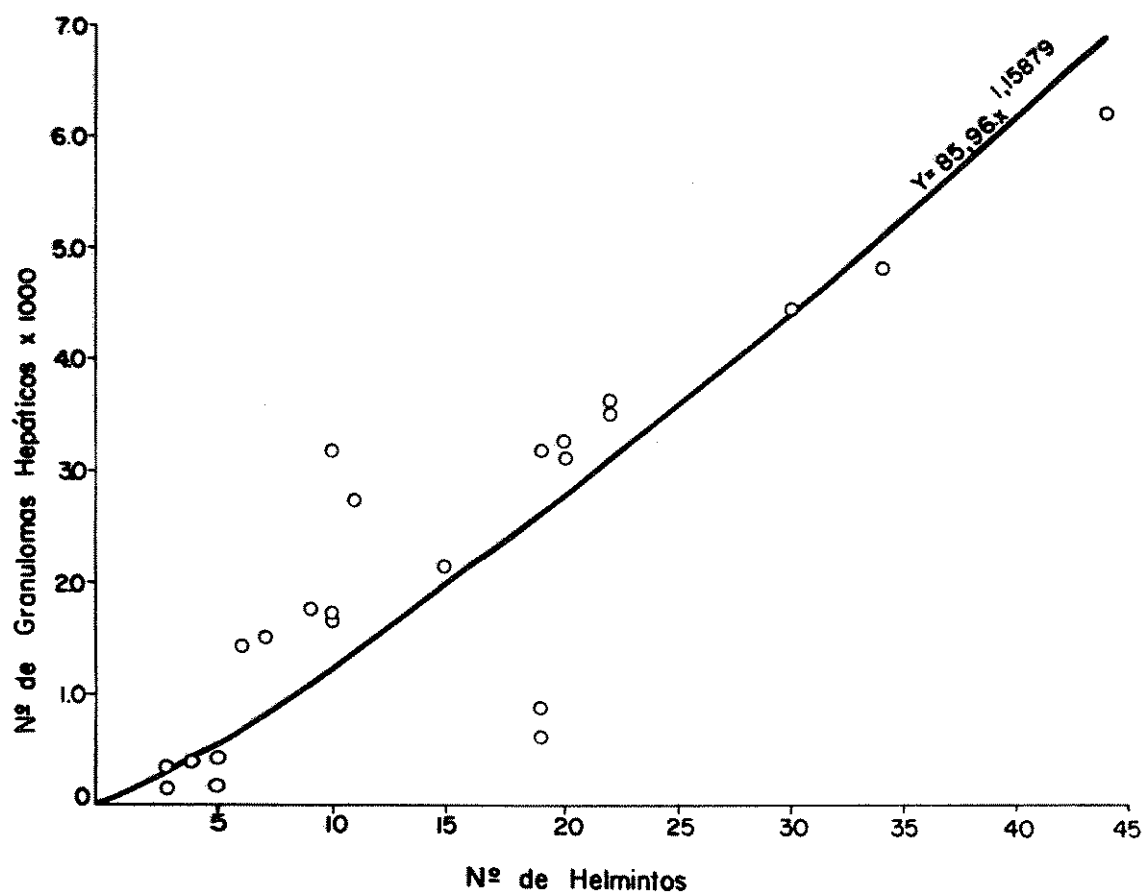


Fig.3- Relação entre Granulomas Hepáticos e Número de Vermes adultos da Linhagem SJ encontrados em Mus musculus.

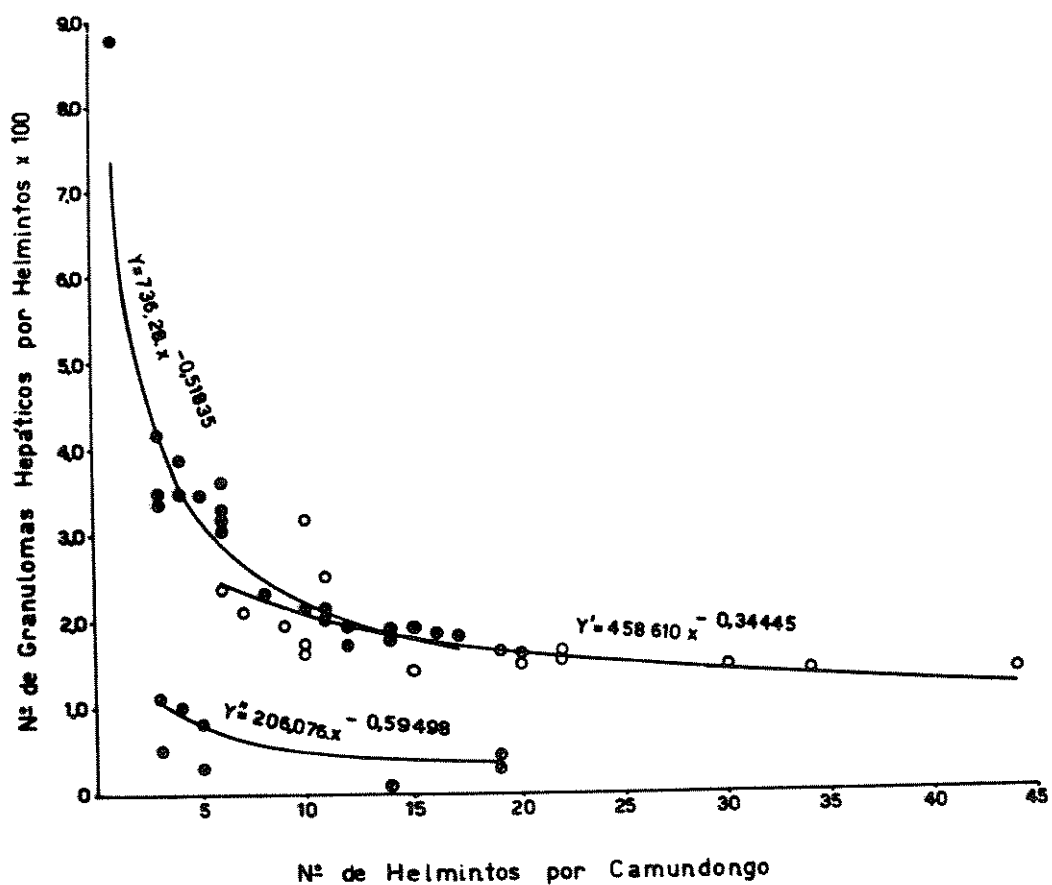


Fig. 4 - Relação entre o Número de Granulomas Hepáticos por Vermes adultos e o Número de Vermes adultos das Linhagens BH e SJ encontrados em Mus musculus.

- Linhagem Mineira
- Linhagem Paulista SJ1
- Linhagem Paulista SJ2

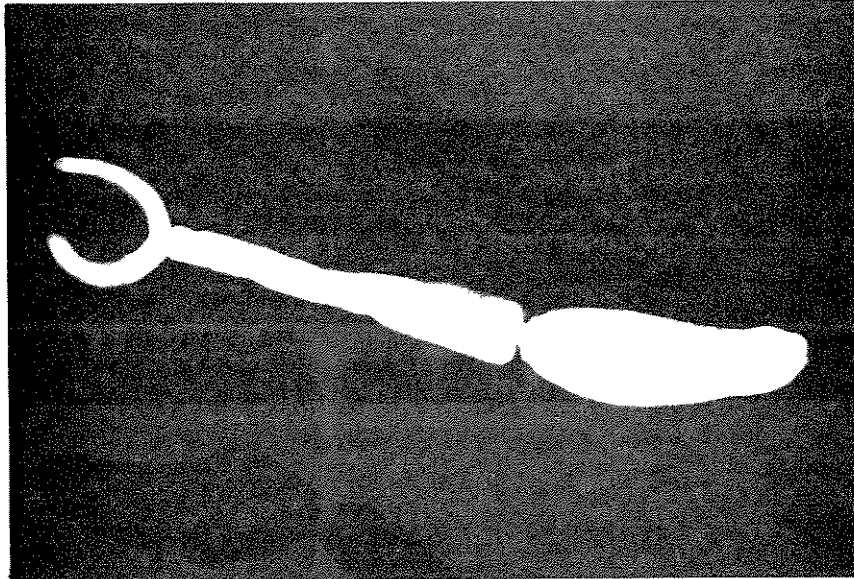
Reações de imunofluorescência do *S. mansoni*

Fig. 5 - Reação de imunofluorescência indireta entre o soro anti-BH dil. 1:8 e cercárias BH.

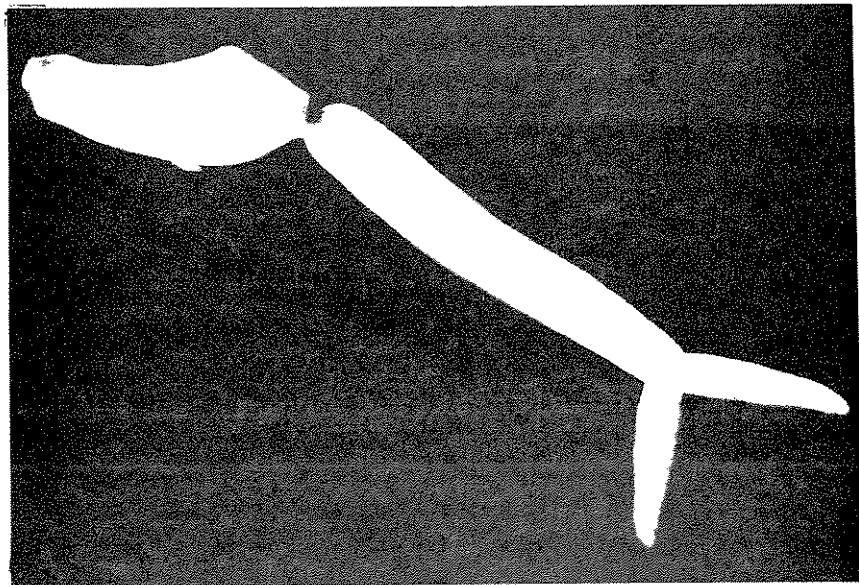


Fig. 6 - Reação de imunofluorescência indireta entre o soro anti-BH dil. 1:8 e cercárias SJ.

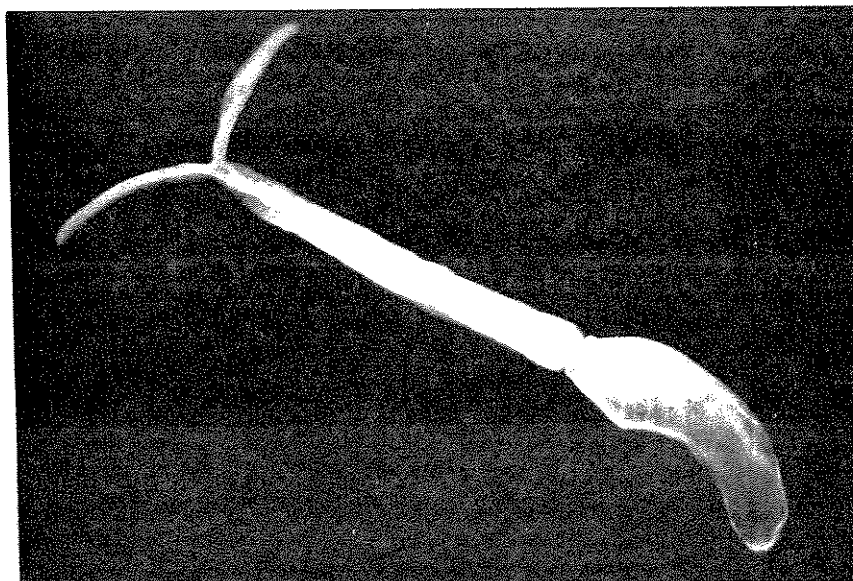


Fig. 7 - Reação de imunofluorescência indireta entre o soro anti-SJ dil. 1:8 e cercárias SJ.

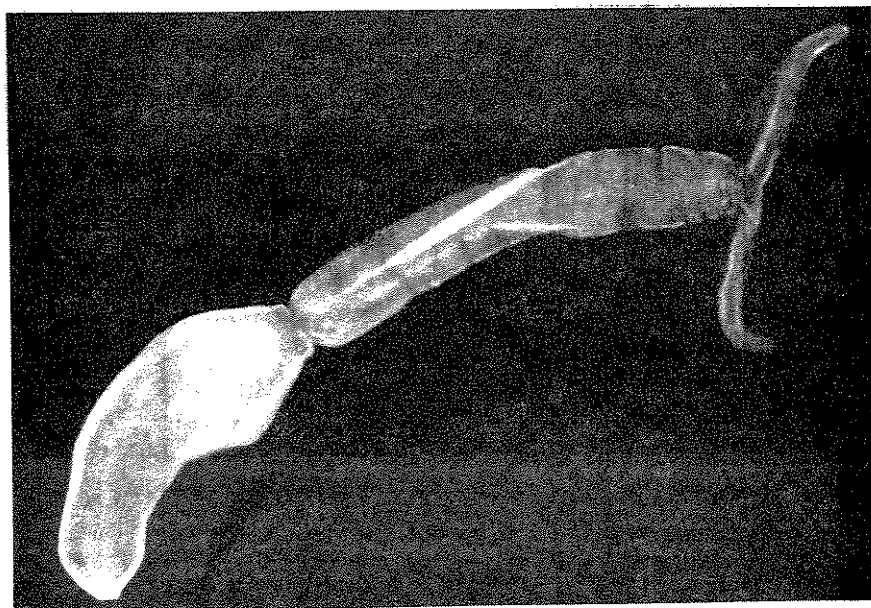


Fig. 8 - Reação de imunofluorescência indireta entre o soro anti-SJ dil. 1:8 e cercárias BH.

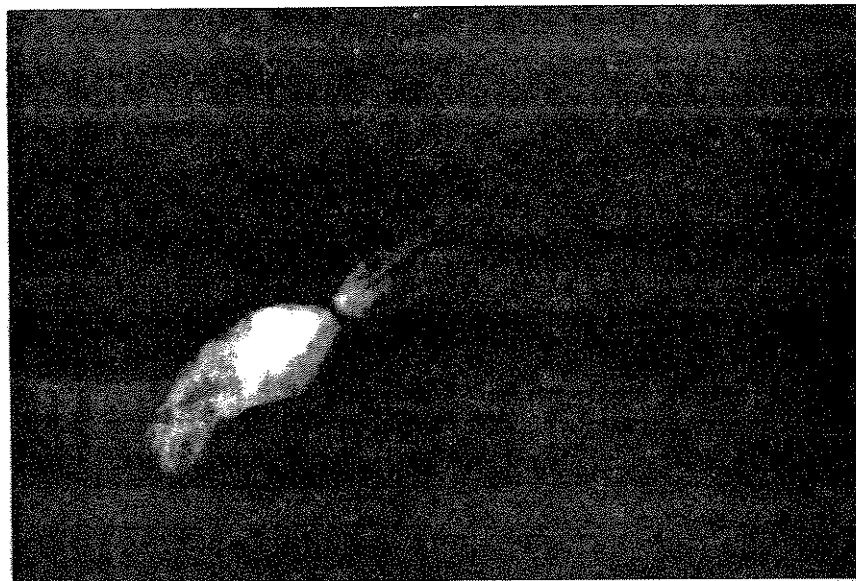


Fig. 9 - Reação de imunofluorescência indireta com cercária SJ, soro anti-BH previamente absorvido com cercárias SJ.



Fig. 10 - Reação de imunofluorescência indireta com cercária BH, soro anti-SJ previamente absorvido com cercária BH.



Fig. 11 - Reação de imunofluorescência indireta com cercária BH, soro anti-BH previamente absorvido com cercárias SJ.

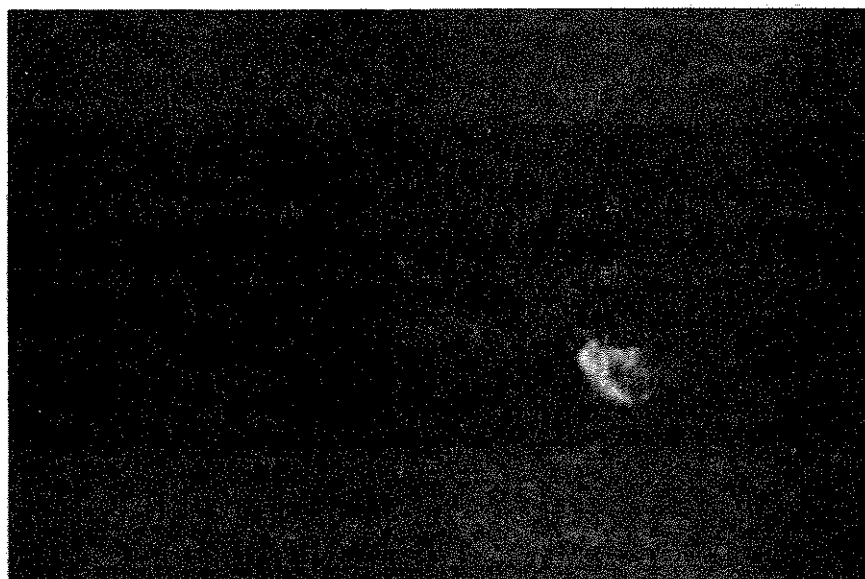


Fig. 12 - Reação de imunofluorescência indireta com cercárias SJ, soro anti-SJ previamente absorvido com cercárias BH.



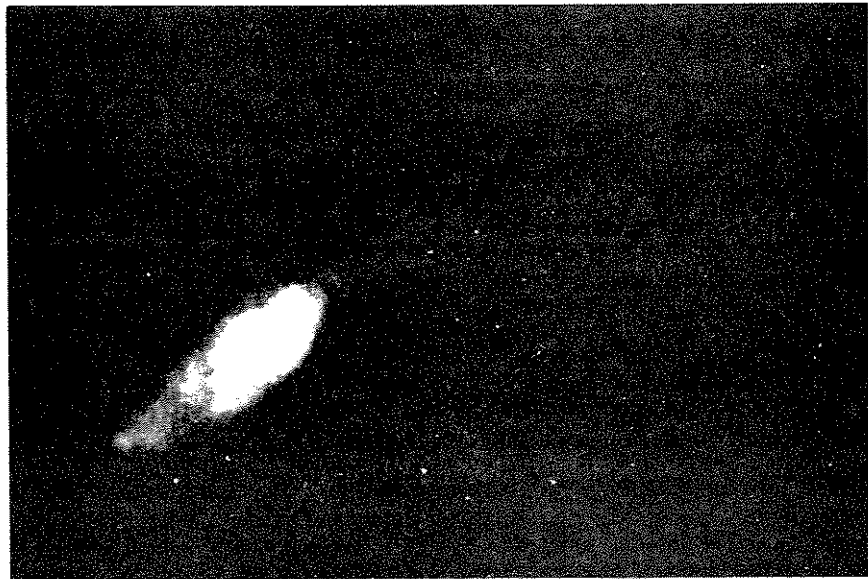


Fig. 13 - Controle: Reação entre cercárias BH tratada com tampão e conjugado.



Fig. 14 - Controle: Reação entre cercárias SJ tratadas com tampão e conjugado.

IV- D I S C U S S Ã O

Utilizamos *Mus musculus* albinos como hospedeiros definitivos de *S. mansoni* das linhagens mineira e paulista, por ser este roedor de fácil manejo em laboratório e por apresentar um curso de infecção semelhante ao observado no homem (STIREWALT, KUNTZ & EVANS (1951), MOORE, YOLLES & MELENEY (1952) e BRENER (1956)).

Na determinação do poder de penetração das cercárias ( Tabela I ), verificamos maior capacidade por parte da linhagem mineira. Estes resultados estão de acordo com o trabalho realizado por MAGALHÃES & CARVALHO (1969), embora estes autores não encontrassem diferenças significativas quanto ao número de vermes adultos que se desenvolvem nos hospedeiros definitivos ( MAGALHÃES & CARVALHO, 1973 ).

A mortalidade encontrada nas duas populações de camundongos infectados pelas linhagens assinaladas, foram praticamente as mesmas ( Tabela III ). Como será descrito adiante, a linhagem mineira mostrou-se mais patogênica. Em vista deste fato, era de se esperar uma maior letalidade nos grupos de animais infectados por esta cepa. Entretanto, como também será dito logo após, o número de vermes encontrados nos

camundongos infectados pela linhagem mineira foi muito menor do que os obtidos nos animais infectados pela linhagem paulista. Parece ter havido desta forma, uma compensação nos resultados finais, traduzidos em índices de mortalidade semelhantes.

Encontramos nos camundongos infectados com a linhagem paulista, aproximadamente o dobro de vermes desenvolvidos em camundongos infectados com a linhagem mineira ( Tabela V ). Acreditamos que, a menor destruição dos esquistossômulos paulistas resulte de uma menor mobilização da defesa orgânica, por parte do hospedeiro, possivelmente relacionada com a menor patogenicidade da linhagem paulista.

Obtivemos números semelhantes de granulomas hepáticos nos vários lotes de camundongos perfundidos, embora a relação granuloma/verme, referente a linhagem mineira tenha sido muito superior a verificada na linhagem paulista ( Tabelas IV,V,VI,VII ). Esta diferença de patogenicidade foi atenuada se considerarmos somente os vermes fêmeas, no correlacionamento granuloma/verme. Acreditamos que, a semelhança dos números de granulomas observados nas duas linhagens, tenha sido a causa de termos obtido índices de mortalidade também semelhantes nos dois grupos de camundongos.

Segundo BOGLIOLO (1959) os ovos fecundados parecem ser mais patogênicos. Desta forma a quantidade de vermes machos teria importância na patogeni-

cidade da infecção.

Ao estudarmos as funções que exprimem a correlação granulomas hepáticos - número de vermes, verificamos haver paralelismo entre as duas linhagens. Esse paralelismo, observado na figura 1, foi comparado estatisticamente. Os coeficientes de correlação ( $r$ ) encontrados para a relação granuloma/verme, significam que no comportamento, tanto da linhagem BH, como da linhagem SJ, o aumento de granulomas hepáticos é proporcional ao aumento do número de vermes.

Do ponto de vista estatístico, consideramos a representação linear apenas satisfatória para expressar os resultados das análises. Achamos ser o ajustamento hiperbólico mais coerente com o fenômeno biológico. Seus valores partem da origem, significando que em camundongos não infectados por *S. mansoni* não existem granulomas esquistossômicos (figuras 2 e 3). Estes gráficos também evidenciam uma proporcionalidade entre o número de vermes e o número de granulomas hepáticos produzidos pelas duas linhagens.

Analisando a figura 4, verificamos que os valores da função  $GH = f(HM)$ , onde GH é granuloma hepático por verme e HM número de esquistossomos por camundongo, na linhagem paulista apresentaram-se menos comportados do que os similares observados na linhagem mineira.

Os estudos estatísticos permitiram estabelecer duas equações representativas da função  $GH = f(HM)$  para a linhagem paulista ( figura 4 ). Este fato levou-nos a formular a hipótese de que a heterogeneidade verificada nos estudos da linhagem paulista, estivesse, em parte, relacionada com a possível existência de duas populações de *S. mansoni*.

Verificamos que quanto maior o número de vermes por camundongo nas duas linhagens, menor o número de granulomas hepáticos por verme, isto é, quanto maior a densidade de população do *S. mansoni*, menor a formação de granulomas hepáticos por verme ( figura 4 ).

Nota-se, ainda, na figura 4, que após um determinado limite do número de helmintos por camundongo ( aproximadamente 15 ), há uma superposição das funções  $GH = f(HM)$  das linhagens BH e SJ. Aquém deste limite, os esquistossomos da linhagem mineira produzem número muito maior de granulomas do que a mesma quantidade de vermes da linhagem paulista.

Nas amostras utilizadas para dosagem de proteínas do *S. mansoni* ( Tabela XI ) encontramos teores proteicos maiores para os vermes fêmeas. Os vermes machos de BH e SJ apresentaram aproximadamente o mesmo teor proteico, por volta de 120  $\mu\text{g/ml}$  de extrato salino do *S. mansoni*. Os vermes fê-

meas da linhagem BH e SJ, embora com teor proteico maior que os vermes machos, apresentaram, também, valores semelhantes, cerca de 152 µg/ml entre si.

Tendo em vista os resultados obtidos nas dosagens proteicas, fizemos controles com análises de OUCHTERLONY. Os resultados negativos obtidos com os soros de coelho anti-*S. mansoni* frente ao sangue hemolisado de camundongo, demonstraram que estes anti-soros não reconheceram os antígenos do hospedeiro. Este controle foi feito, levando-se em consideração o trabalho de LAWRENCE ( 1973 ) que estudando a ingestão de glóbulos vermelhos do sangue de camundongos por *S. mansoni*, verificou que os vermes fêmeas ingerem maior quantidade de hemácias ( cerca de 330.000 células por hora ). Verificou, ainda, que a total renovação das células sanguíneas no conteúdo cecal dos vermes demora aproximadamente três a quatro horas.

Os cálculos estatísticos deixaram de ser feitos porque o número de amostras foi julgado insuficiente.

Os estudos comparativos de imunofluorescência indireta entre os soros não absorvidos e absorvidos de camundongos dos lotes A e B e as cercárias de BH e SJ, demonstraram a existência de determinantes antigênicos comuns. As cercárias das duas linhagens apresentaram reações homólogas e heterólogas semelhantes ( Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 ).

O método de estudo semi-quantitativo por nós utilizado, não afasta a possibilidade de serem detectadas diferenças entre as duas linhagens estudadas, quando do emprego de outras técnicas.

PARAENSE & CORREA ( 1963 ), estudando, comparativamente, as duas linhagens ( BH e SJ), admitem ser a linhagem paulista originária de um mutante do *S. mansoni*, estando assim o *S. mansoni* do Vale do Rio Paraíba em fase de adaptação. Os dados históricos e as pesquisas anteriores referentes à linhagem mineira, levam-nos a supor que esta linhagem seja mais antiga do que a paulista.

Assim sendo, achamos que as diferenças apresentadas pela linhagem do Vale do Rio Paraíba (SJ) em nossos estudos comparativos, devam-se também a sua menor adaptação aos hospedeiros intermediário e definitivo, ou a ambos.

V- RESUMO E CONCLUSÕES

Para estudos de alguns aspectos do comportamento das linhagens mineira (BH) e paulista (SJ) do *S. mansoni*, mantivemos o ciclo biológico do trematódeo em laboratório, utilizando como hospedeiro definitivo *Mus musculus*.

Calculamos o poder de penetração das cercárias e verificamos que as cercárias da linhagem de Belo Horizonte possuem maior poder de penetração.

Sessenta dias após a infecção dos camundongos, contamos os vermes adultos e os granulomas hepáticos obtidos pela perfusão dos roedores. Verificamos que houve maior produção de granulomas por verme, na linhagem mineira.

Com os vermes adultos, preparamos quatro antígenos para posterior inoculação em coelhos:

BHM	(linhagem mineira,	vermes machos)
BHF	( " " "	fêmeas)
SJM	( " paulista "	machos)
SJF	( " " "	fêmeas)

Determinamos os índices de mortalidade dos animais infectados, não tendo sido observada diferença significativa entre os dois grupos.



Foi feita a determinação do teor proteico dos extratos dos vermes pelo método de LOWRY (1951). Evidenciamos estreita relação entre os valores de teor proteico em ambas as linhagens. Verificamos, ainda, que vermes de mesmo sexo e de linhagens distintas apresentaram teor proteico semelhantes, sendo sempre maior nos vermes fêmeas.

Efetuamos análises em "ring test" e em dupla difusão em gel de agar (técnica de OUCHTERLONY), utilizando soro de coelho anti-*S. mansoni* colocado frente ao sangue hemolisado de camundongo. Estas análises mostraram-se negativas.

Obtivemos imune-soros de camundongo para estudos de imunofluorescência.

Nos estudos semi-quantitativos de imunofluorescência indireta, não nos foi possível detectar diferenças entre as linhagens estudadas.

De acordo com os resultados obtidos concluimos que:

a) Utilizando o mesmo número de cercárias, obtivemos número maior de vermes da linhagem de São José dos Campos do que da linhagem de Belo Horizonte.

b) O número de granulomas por verme, nas duas linhagens, variou inversamente com o número de vermes por camundongo.

c) Existem determinantes antigênicos comuns às cercárias mineira e paulista.

Concluimos, também, concordando com MAGALHÃES, ALCÂNTARA & CARVALHO (1975) e MAGALHÃES & CARVALHO (1975) que:

a) O aumento de granulomas nas duas linhagens estudadas é proporcional ao número de vermes machos e fêmeas.

b) Dentro dos limites da experiência, um menor número de vermes BH deu origem a maior quantidade de granulomas, em relação ao que ocorreu na linhagem SJ.

VI- R E F E R Ê N C I A S B I B L I O G R Á F I C A S

- ANDRADE, R.M., 1956 - Nota sobre a campanha contra a esquistossomose mansoni em algumas localidades do Vale do Alto Rio Doce, Minas Gerais ( Brasil ). *Rev. bras. Malariol. Doenç. Trop.*, 8(2): 387-390.
- ANDRADE, R.M., 1959 - O problema da esquistossomose mansoni no Lago Artificial da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais ( Brasil ). *Rev. Bras. Malariol. Doenç. Trop.*, 11(4): 653-674.
- ANTUNES, P.A.A., 1952 - A esquistossomíase em São Paulo. Estudo epidemiológico da esquistossomíase na baixada de Santos. In: Congresso Brasileiro de Higiene. 10º, Belo Horizonte. Anais, Belo Horizonte. p.393-397.
- ARANTES, A., 1923 - Sobre dois casos de Schistosomose autóctone em Santos. *An. Paul. Med. Cirurg.*, 14(9): 95-96.
- ARANTES, A., 1924 - Onze casos autóctones de esquistossomose em Santos. *Bol. Soc. Med. Cirurg. S. Paulo*, 13 : 64-65.

- ARTHUS, M., 1903 - Injection repetees de serum de cheval chez le lapin. *C.R.Soc. Biol.*, 55: 817.
- BARRIOS-DURAN, L.A., 1955 - An efficient device for exposing mice to schistosome cercariae and holding small animals for post-mortem examination. *J. Parasitol.*, 41: 641-642.
- BASTOS, O.C., 1975 - Estudo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens Humana e Silvestre do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Campinas. ( Tese - Unicamp ).
- BIGUET, J.; ROSÉ, F.; CAPRON, A. & TRAN VON KY, P., 1965 - Contribution de l'analyse immunoelectrophorétique a la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoelectrophorèse. *Rev. D'Immunologie*, 29(1-2): 5-30.
- BOGLIOLO, L., 1959 - Esquistossomose. Patologia. *Rev. Bras. Malariol. Doenç. Trop.*, 11(2/3): 359-424.
- BRENER, Z., 1956 - Observações sobre a infecção do camundongo pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Bras. Malariol. Doenç. Trop.*, 8(4): 565-575.

- BRENER, Z.; PELLEGRINO, J. & OLIVEIRA, F.D., 1956 - Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. Aplicação do método de isolamento de granulomas do fígado de camundongos. *Rev. Bras. Malariol. Doenç. Trop.*, 8(4): 583-587.
- CAMARGO, M.E., 1968 - Introdução às técnicas de imunofluorescência. Inst. Med. Trop. São Paulo.
- CODA, D.; FALCI, N. & MENDES, F.A.T., 1959 - Contribuição para o estudo e a profilaxia da esquistossomose mansônica do Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 19: 25-68.
- COUTINHO, J.O., 1949 - Diagnóstico da esquistossomose pela intradermoreação com antígenos de esquistossomos adultos. *Rev. Clin. São Paulo*, 25(1/2): 7-15.
- CUNHA, A.S., 1970 - Esquistossomose Mansonii. São Paulo, EDUSP.
- DAMIAN, R.T., 1966 - An immunodiffusion analysis of some antigens of *S. mansoni* adults. *Exp. Parasitol.*, 18: 255-265.

- FERREIRA, J.M. & MEIRA, J.A., 1952 - Três casos de esquistossomose mansoni procedentes do interior do Estado de São Paulo (Ourinhos, Palmital e Ipauçu): Foco autóctone na cidade de Ourinhos. *Rev. Paul. Med.*, 41 (1): 15-18.
- FISHER, R.H. & YATES, F., 1971 - Tabelas estatísticas para pesquisa em Biologia, Medicina e Agricultura. São Paulo, Polígono e EDUSP. p. 78-79.
- FREUND, J., 1951 - The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization. ( A review of Jules Freund ). *Am. J. Clin. Path.*, 21: 645-656.
- GONZALES TORRES, D.M., 1940 - Sobre um caso de schistosomose intestinal autóctone de Santos. Apendicite por *Schistosoma mansoni*. *Arq. Inst. Biol.*, 11: 579-588.
- HILL, J., 1956 - Chemotherapeutic studies with laboratory infections of *Schistosoma mansoni*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 50: 39-48.
- KABAT, E.A. & MAYER, M.M., 1964 - Experimental immunology. 2ed. Illinois, Springfield.

LAWRENCE, J.D., 1973 - The ingestion of red blood cells by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 59(1): 60-63.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. &  
RANDALL, R.J., 1951 - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

LUTZ, A. & PENNA, O., 1918 - Estudos sobre a eschistosomose, feitos no norte do Brasil, por uma comissão do Instituto Oswaldo Cruz. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 10: 83-94.

MAGALHÃES, B.F. & DIAS, C.B., 1944 - Esquistossomose de Manson. Estudos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41(3): 363-446.

MAGALHÃES, L.A.; CAMARGO, L.A.P.; MUNIZ, J.R.O. &  
ANDRADE, D., 1967 - Novo foco de esquistossomose mansoni na cidade de Campinas ( Estado de São Paulo, Brasil ). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 9(6): 378-380.

MAGALHÃES, L.A., 1969 - Técnica para avaliação da viabilidade de penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. *Hospital*, 75(5): 137-140.

MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F., 1969 - Determinação do número de cercárias provenientes de cepas diferentes de *Schistosoma mansoni* que conseguem penetrar, sob determinadas condições de laboratório, em *Mus musculus*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 3(5): 249-251.

MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F., 1973 - Desenvolvimento do *S. mansoni* das linhagens de Belo Horizonte (M.G.) e de São José dos Campos (S.P.) em *Mus musculus*. *Rev. Saúde Publ.*, 7: 285-287.

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

MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. - Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1.907. Proposição para método de estudo quantitativo ( no prelo ).

MAGALHÃES, L.A.; SOUZA DIAS, L.C.; PIZA, J.T.; TAKAKU, L. & PEREIRA, A. A., 1973 - Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansônica na região da Represa de Americana, Estado de São Paulo. *Rev. Saúde Publ.*, 7: 21-28.



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

MAGALHÃES, Z.P., 1949 - Esquistossomose mansoni. Novo foco autóctone em Santos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 9: 5-17.

MARTINS, A.V. & VERSIANI, W., 1939 - Plano de combate à Schistosomose mansonica em Belo Horizonte. *Hospital*, 15(3): 563-570.

MOORE, D.V. & MELENEY, H.E., 1952 - Adaptability of *Schistosoma mansoni* of human origin to mice and hamsters. *Exp. Parasitol.*, 1(2): 157.

MOURA, S.A.L., 1945 - Esquistossomose mansoni autóctone em Santos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 5(2): 279-311.

MOURA, S.A.L., 1945 - Esquistossomose mansoni autóctone em Santos. *Rev. Paul. Med.*, 27(5): 412-413.

MOURA, S.A.L., 1952 - Contribuição do laboratório regional de Santos na epidemiologia da esquistossomose mansônica em Santos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 12: 97-109.

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

OUCHTERLONY, O., 1958 - Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, 5: 1-78.

PARAENSE, W.L., 1959 - Esquistossomose. Histórico. *Rev. Bras. Malariol Doenç. Trop.*, 11(2/3): 105-117.

PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R., 1963a - Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do *Schistosoma mansoni* no Brasil. SBPC - XV Reunião - Campinas: 6.

PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R., 1963b - Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5(1): 23-29.

- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R., 1963c - Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5(1): 15-22.
- PELLEGRINO, J. & BRENER, Z., 1956 - Method for isolating Schistosome granulomas from mouse liver. *J. Parasitol.*, 42(6): 564.
- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D.G., 1955 - A simplified method for the concentration of cercariae. *J. Parasitol.*, 41(3): 329-330.
- PELLON, A.B. & TEIXEIRA, I., 1950 - Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil. Publicação da "Divisão de Organização Sanitária" do Ministério da Saúde, Rio de Janeiro.
- PELLON, A.B. & TEIXEIRA, I., 1953 - Inquérito helmintológico escolar em cinco estados das regiões leste, sul e centro-oeste. Publicação da "Divisão de Organização Sanitária" do Ministério da Saúde, Rio de Janeiro.
- PIEDRABUENA, A.E. & BARACHO, I.R. - Teste de significância entre os coeficientes de correlação. (no prelo)

- PINTO, C.F. & MACIEL, J.J., 1945 - Estudo sobre a esquistossomose ou chistosa em São Paulo. *Lab. J. Maciel*, 1-4.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1908a - Contribuição para o estudo da schistosomiase na Bahia. *Brazil-Médico*, 22: 281-283.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1908b - Contribuição para o estudo da schistosomiase na Bahia. Dezesesseis observações. *Brazil-Médico*, 22: 441-444.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1908c - Contribuição para o estudo da schistosomiase na Bahia. Vinte observações. *Brazil-Médico*, 22: 451-454.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1908d - La schistosomose à Bahia. *Arch. Parasit.*, 13: 283-302
- PIRAJÁ DA SILVA, 1909 - Contribution to the study of schistosomiasis in Bahia. *Brazil. J. Trop. Med. Hyg.*, 12: 159-164.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1912a - Cercaire brésilienne (*cercária blanchardi*, à queue bifurquée. *Arch. Parasit.*, 15: 398-400.

- PIRAJÁ DA SILVA, 1912b - Uber einige helminthen aus Bahia. *Arch. Schiffs-Tropen-Hyg.*, 16: 485-487.
- PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H.; FIGUEIREDO, C.G., 1959 - A esquistossomose no Vale do Paraíba ( Estado de São Paulo - Brasil ). Observações sobre a doença em alguns de seus municípios e a fauna planorbídica da região. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 19 ( único ): 97-143.
- PIZA, J.T. & RAMOS, A.S., 1960 - Os focos autóctones de esquistossomose no Estado de São Paulo. *Arq. Hig. Saúde Públ.*, 25(86): 261-271.
- PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H.; FIGUEIREDO, C.G. & CAMARGO, L.V., 1960 - Vale do Paraíba, foco endêmico da esquistossomose ( Estado de São Paulo, Brasil ) importância epidemiológica do *Taphius nigricans* ( Spix. 827 ). *Arq. Hig. Saúde Públ.*, 25 (83): 35-40.
- PIZA, J.T., 1967 - Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansônica em São Paulo. XVI Congr. Bras. de Higiene, Curitiba.

RAMOS, A.S.; PIZA, J.T. & CAMARGO, L.S.V., 1961 - Observações sobre *Australorbis tenagophilus*, transmissor da esquistossomose mansônica. *Arq. Hig. Saúde Públ.*, 26(88): 121-124.

RUIZ, J.M., 1957 - Contribuição ao conhecimento dos planorbídeos da cidade de São Paulo. *Rev. Bras. Malariol. Doenç. Trop.*, 9(1): 57-65.

SADUN, E.H.; WILLIAMS, J.S. & ANDERSON, R.I., 1960 - Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of schistosomiasis in human. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105: 289-291.

SNEDECOR, G.W., 1948 - Métodos de Estadística; su aplicación a experimentos en Agricultura y Biología. Trad. de A. Marino. Buenos Aires, Acme Agency.

STANDEN, O.D., 1949 - Experimental schistosomiasis. II. Maintenance of *Schistosoma mansoni* in the laboratory with some notes on experimental infection with *S. haematobium*. *Ann. Trop. Med.*, 43: 263-283.

STANDEN, O.D., 1951 - The effects of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova *Schistosoma mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 45: 225-241.

STANDEN, O.D., 1952 - Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni*. I. Individual and mass infection of snails, and the relationship of infection to temperature and season. *Ann. Trop. Med.*, 44(1): 48-53.

STANDEN, O.D., 1953 - Experimental schistosomiasis. III. Chemotherapy and mode of drug action. *Ann. Trop. Med.*, 47: 26-43.

STIREWALT, M.A.; KUNTZ, R.E. & EVANS, A.S., 1951 - The relative susceptibilities of the commonly used laboratory mammals to infection by *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med.*, 31(7): 57-82.

STIREWALT, M.A. & BRONSON, J.F., 1955 - Description of plastic mouse restraining case. *J. Parasitol.*, 41:328.

YOLLES, T.K.; MOORE, D.V.; DE GINSTI, D.L.; RIPSOM, C. A. & MELENEY, H.E., 1947 - A technique for the perfusion of laboratory animals for the recovery of Schistosomes. *J. Parasitol.*, 33: 419-426.