

A Biblioteca do
Inst. de Biologia da
UNICAMP
17/12/76
J.V.S.

Seleção de populações de
Biomphalaria glabrata (SAY, 1818)
e Biomphalaria tenagophila (D'ORBIGNY, 1835)
suscetíveis a diferentes linhagens do
Schistosoma mansoni SAMBON, 1907

J.V.SANTANA

JOSÉ VALFRIDO DE SANTANA

Seleção de populações de Biomphalaria glabrata (SAY, 1818)
e Biomphalaria tenagophila (D'ORBIGNY, 1835) suscetíveis a
diferentes linhagens do Schistosoma mansoni SAMBON, 1907

Tese de Mestrado

Apresentada ao

Instituto de Biologia da

Universidade Estadual de

Campinas - UNICAMP

Orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães

Departamentos de Parasitologia e de Microbiologia
e Imunologia

Campinas - São Paulo

1976

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP

a meus pais e irmãos

a minha esposa e colega Elizabeth

A G R A D E C I M E N T O S

Aos profs. Luiz Augusto Magalhães e Humberto de Araujo Rangel, pelos ensinamentos recebidos, e pela orientação científica durante a execução do presente trabalho.

Ao prof. Aquiles Eugênico Piedrabuena, pelo apoio, incentivo e orientação na análise estatística dos dados.

Aos profs. William José da Silva e Francisco G. Alcântara, pela crítica dos resultados.

Aos profs. José Carneiro Leão e Ruy João Marques da U.F.PE. pelas facilidades concedidas para realização do curso de pós-graduação.

Aos professores e técnicos dos Departamentos de Parasitologia e Microbiologia e Imunologia, que de uma ou de outra maneira, contribuíram para a realização do nosso trabalho.

A Elizabeth Malagueño de Santana, minha esposa e colega, pelo apoio constante, desde a fase inicial do trabalho.

Aos colegas do curso de pós-graduação, em particular, Ana Maria Aparecida Guaraldo e Carlos Henrique de Castro Dias, pela colaboração técnica.

A aluna Eliana M. Zanotti, pela ajuda em várias etapas do presente trabalho.

A Sra. Liliiani Ziti Costa Carvalho, pela colaboração técnica e confecção dos gráficos.

A Sra. Anna Gagliardi, Bibliotecária-Chefe do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela eficiente ajuda na elaboração das citações bibliográficas.

nossos sinceros agradecimentos

O autor e a coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP, agradecem os recursos fornecidos pelas seguintes Instituições :

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FUNDAÇÃO DE 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 a realização deste trabalho, o autor foi bolsista da FAPESP, instituição que tanto tem contribuído para o desenvolvimento da Ciência no Brasil.

I N D I C E

	Página
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	6
1. Procedência de moluscos das espécies <u>B. tenagophila</u> e <u>B. glabrata</u>	6
2. Esquema de seleção de moluscos das espécies <u>B. tenagophila</u> e <u>B. glabrata</u>	6
3. Determinação da idade e tamanho dos moluscos <u>B. tenagophila</u> e <u>B. glabrata</u> , na fase da maturidade sexual	7
4. Obtenção de miracídios das linhagens paulista (SJ) e mineira (BH) do <u>S. mansoni</u> .	7
5. Infecção experimental de planorbídeos ..	8
5.1. Infecção de <u>B. tenagophila</u> e <u>B. glabrata</u> das gerações parental (P), F ₁ , F ₂ , F ₃ e F ₄	8
5.2. Infecção de <u>B. tenagophila</u> com a linhagem mineira, de <u>B. glabrata</u> com a linhagem paulista	9
6. Obtenção e contagem de cercárias	10
7. Infecção de camundongos com cercárias das linhagens paulista e mineira do <u>S. mansoni</u>	10

8. Sacrifício dos camundongos infectados. Obtenção de soros, esquistossomos e granulomas hepáticos	12
9. Reações de imunofluorescência indireta - entre cercárias das linhagens paulista e mineira	12
III - RESULTADOS	15
1. Idade e tamanho dos moluscos das espécies <u>B. tenagophila</u> e <u>B. glabrata</u> , na época da primeira oviposição.....	15
2. Índices de infecção e mortalidade para <u>B. tenagophila</u> e <u>B. glabrata</u> das gerações parental (P), F ₁ , F ₂ , F ₃ e F ₄	15
3. Índices de infecção e mortalidade para <u>B. tenagophila</u> e <u>B. glabrata</u> expostos as linhagens alopátricas do <u>S. mansoni</u>	16
4. Mortalidade, número de vermes e de granulomas hepáticos em camundongos infectados com as linhagens SJ e BH de <u>S. mansoni</u>	17
4.1. Camundongos infectados com cercárias eliminadas por moluscos suscetíveis das gerações F ₂ e F ₃ ...	17
4.2. Camundongos infectados com cercárias provenientes de <u>B. Tenagophila</u> <u>la</u> infectadas com miracídios da linhagem BH de <u>S. mansoni</u>	18

	5. Resultados da imunofluorescência indireta entre as linhagens paulista e mineira do <u>S. mansoni</u>	18
IV -	DISCUSSÃO	40
V -	RESUMO E CONCLUSÕES	55
VI -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

I - INTRODUÇÃO

O grau de suscetibilidade de moluscos planorbídeos à infecção pelo Schistosoma mansoni, constitui um dos fatores mais importantes para o estabelecimento de linhagens do parasita. Neste trabalho, propomos estudar alguns aspectos referentes a este tema, principalmente o que diz respeito aos graus de suscetibilidade apresentados por diferentes populações de planorbídeos, selecionados geneticamente, à infecção por linhagens do Schistosoma mansoni.

Em 1963, PARAENSE & CORRÊA postularam a existência de duas raças de Schistosoma mansoni, uma do vale do rio Paraíba do Sul, e outra de Belo Horizonte, tendo, respectivamente, como hospedeiros intermediários moluscos das espécies Biomphalaria tenagophila e Biomphalaria glabrata. Os mesmos autores, demonstraram também, haver um ajustamento fisiológico entre o molusco e o parasita, verificando que Biomphalaria tenagophila do vale do Paraíba, mostrava-se suscetível à cepa local do Schistosoma mansoni, e praticamente não se infectava com a cepa mineira. Fenômeno semelhante ocorre com o Biomphalaria glabrata de Belo Horizonte, pois moluscos desta espécie apresentaram-se suscetíveis à cepa mineira, e resistentes a cepa paulista do helminto em todas as populações estudadas.

As investigações de VOGEL (1941); STUNKARD (1946), CRAM et al. (1947) COWPER (1947); FILES & CRAM (1949) e WRIGHT (1952), já haviam mostrado a existência deste ajustamento

tamento entre o molusco e o parasita. Esses autores demonstraram que moluscos suscetíveis ao S. mansonii proveniente de uma determinada área geográfica, poderiam ser refratários à infecção pelo mesmo parasita oriundo de outras áreas.

De particular interesse, foram os trabalhos realizados por FILES (1951), que demonstrou que Australorbis glabratus (= Biomphalaria glabrata) procedentes de Porto Rico, apresentavam-se suscetíveis à cepa local do parasita, enquanto que moluscos da mesma espécie, mas procedentes do Brasil, mostravam-se refratários aquela cepa de S. mansonii. Os estudos morfológicos entre os moluscos dos dois países não evidenciaram nenhuma diferença.

PARAENSE & CORRÊA (1963), não encontraram correlação entre o grau de suscetibilidade e a distância que separa as populações de moluscos da cepa de S. mansonii, tendo obtido índices de infecção acima de 50%, quando testaram diferentes populações de B. glabrata procedentes de 23 localidades, incluindo moluscos de três diferentes países. Esse fato levou os autores à conclusão de que o grau de suscetibilidade populacional, depende da frequência relativa dos genótipos resistentes e suscetíveis em cada população. Das populações estudadas, seis procedentes de Salvador, mostraram-se refratárias, sendo estas reconhecidamente resistentes, mesmo para a linhagem simpátrica, conforme demonstrado por COUTINHO (1951), TRAVASSOS (1953) e BARRETO (1960).

A baixa suscetibilidade de uma população de moluscos à infecção, não significa necessariamente, que ela não possa desempenhar papel importante na manutenção de -

focos de esquistossomose. Apesar da reconhecida baixa - suscetibilidade das populações de B. glabrata de Salvador, esses moluscos são responsáveis pela manutenção de importantes focos endêmicos da doença naquela cidade. (BARRETO, 1960).

Fato semelhante, tem sido observado com a B. tenagophila, hospedeira intermediária do S. mansoni na região Sul do país. Moluscos dessa espécie, mantêm focos endêmicos em várias cidades dos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, apesar da baixa suscetibilidade a infecção. (MOURA, 1945); - COUTINHO, 1949; MOURA, 1952; RUIZ, 1952; ANTUNES, 1953; - DEANE e cols., 1953; ANDRADE & MARTINS, 1956; CORREA e cols., 1956; PARAENSE & DESLANDES, 1956; MARTINS, 1957, CODA E - cols., 1959, PIZA e cols., 1959; PIZA e cols., 1960; CORREA, 1962).

Porém, em focos ricos em miracídios, no vale do Paraíba, foram constatados índices de infecção em várias populações de moluscos, que variaram entre 6% a 48% (RAMOS e - cols., 1961).

Em laboratório, a B. tenagophila mostra-se também pouco suscetível à infecção esquistossomótica, como foi demonstrado por RUIZ (1957) que, expondo várias populações de moluscos procedentes de São Paulo e de Santos a miracídios - de origem humana, não obteve sucesso.

COELHO (1962), trabalhando com 1433 moluscos da espécie B. tenagophila, originários de várias cidades de São Paulo, incluindo cidades do vale do rio Paraíba, além de algumas localidades do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Gran

de do Sul, obteve no 359 dia, um total de cinco moluscos positivos, o que representa um percentual de 0,5% de infecção.

Por outro lado, as investigações de MAGALHÃES (1969), mostraram melhores resultados. Este autor, expondo 60 moluscos procedentes de Campinas (São Paulo) à linhagem de São José dos Campos, obteve 12 moluscos positivos até o 609 dia.

O grau de suscetibilidade dos moluscos a infecção está na dependência de fatores genéticos, conforme já sugerido pelos trabalhos de NEWTON (1953, 1955) utilizando B. glabrata. Os estudos posteriores de RICHARDS (1970, 1973 e 1975) e RICHARDS & MERRITT (1972), com estes moluscos vieram confirmar que a suscetibilidade envolve fatores genéticos do hospedeiro intermediário. Os trabalhos destes últimos autores, foram realizados com as linhagens de Porto Rico de S. mansoni, tendo sido utilizados moluscos locais, espécimes albinos e mutantes "black eye" procedentes do Brasil. Foi testada a suscetibilidade em moluscos jovens e adultos, pois, sabe-se que a mesma pode variar com a idade deste invertebrado (NEWTON, 1953 e WRIGHT, 1963). Foi verificado que moluscos jovens, suscetíveis à infecção pelo S. mansoni, quando isolados por auto-fecundação, produziam gerações de jovens altamente suscetíveis.

A baixa suscetibilidade da B. tenagophila dificulta enormemente a manutenção do ciclo do trematodeo em laboratório, e conseqüentemente, ficam prejudicados estudos sobre a biologia, patologia e imunologia da linhagem paulista. Por outro lado, não existem informações sobre as características

genéticas da B. tenagophila no que se refere a suscetibilidade à infecção destes moluscos ao S. mansoni.

Partindo do conhecimento de que a suscetibilidade é um caráter hereditário, nos propusemos realizar no presente trabalho :

- a) tentar a obtenção de populações de Biomphalaria tenagophila e de Biomphalaria glabrata altamente suscetíveis à infecção simpátrica.
- b) obter informações sobre o comportamento das populações selecionadas, à infecção alopátrica.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1. Procedência de moluscos das espécies B. tenagophila e B. glabrata.

Os moluscos B. Tenagophila da geração parental (P), utilizados neste trabalho, eram descendentes diretos de caramujos capturados no vale do rio Paraíba do Sul (SP).

Os exemplares correspondentes da espécie B. glabrata, eram descendentes diretos de caramujos capturados em Belo Horizonte.

2. Esquema de seleção de moluscos das espécies B. tenagophila e B. glabrata.

Separamos aleatoriamente um grupo de trinta moluscos, para formar a geração P. Submetemos estes moluscos à infecção pelo S. mansoni. Dos que se infectaram, obtivemos por auto-fecundação, a geração F_1 . Procedimento semelhante foi realizado em todas as gerações estudadas, utilizando-se sempre trinta moluscos por geração.

Na FIGURA 1, resumimos a metodologia empregada para a seleção de populações de moluscos das espécies B. tena

gophila e B. glabrata suscetíveis à infecção pelo S. mansoni .

3. Determinação da idade e tamanho dos moluscos B. tenagophi-
la e B. glabrata, na fase da maturidade sexual.

Desovas de moluscos nascidos em laboratório, foram -
coletadas e mantidas separadas por espécie. Logo após a eclo -
são, tres lotes de 10 moluscos foram formados para cada espé -
cie, em épocas diferentes. Os caramujos recém eclodidos foram
mantidos isolados em frascos de 250 ml , sem substrato arenoso
e plantas aquáticas, segundo indicações de KAWAZOE (1975). Foi
adicionado carbonato de cálcio à água e a alimentação baseada
em folhas de alface. Os frascos eram examinados diariamente, -
até o aparecimento da primeira desova, ocasião em que era medi -
do o diâmetro máximo dos moluscos, sendo estes considerados -
adultos a partir daquele momento.

4. Obtenção de miracídios das linhagens paulista (SJ) e mineira
(EH) do S. mansoni.

Miracídios das linhagens paulista e mineira foram ob -
tidos de fígados de camundongos após 60 dias, a contar da data
de exposição às cercárias. Esses órgãos foram homogeneizados em
liquidificador, obtendo-se assim uma suspensão que era submeti-

da a passagem simultânea através de peneiras "GRANUTEST", com malhas de 0,037, 0,074 e 0,149 mm.

A suspensão contendo os granulomas, retidos na malha de 0,037 mm, era transferida para placas de Petri, e colocada durante 10 a 20 minutos sob a ação de lâmpadas elétricas, de modo a fornecer temperatura de 28°C e luminosidade suficiente para a eclosão dos miracídios (STANDEN, 1951 e 1952).

5. Infecção experimental de planorbídeos

5.1. Infecção de B. tenagophila e B. glabrata das gerações parental (P), F₁, F₂, F₃, e F₄.

Planorbídeos jovens de ambas as espécies, medindo entre 7 e 8 mm de diâmetro, coletados entre aqueles criados em laboratório, foram expostos individualmente a 10 miracídios, durante duas horas a temperatura de 28°C e luminosidade fornecidos por lâmpadas elétricas, segundo técnica descrita por STANDEN (1951 e 1952).

Para a exposição aos miracídios, os moluscos foram divididos em dois lotes, conforme transcrito abaixo.

LOTE I - constituído por 30 B. tenagophila - expostos a miracídios da linhagem paulista (SJ).

LOTE II - constituído por 30 B. glabrata - expostos a miracídios da linhagem mineira (BH).

Após o período de exposição, os moluscos foram mantidos isolados em frascos de 250 ml, sendo examinados semanalmente, do 30º ao 100º dia. Decorridos 100 dias, aqueles que permaneciam negativos, eram esmagados entre lâminas de vidro, e examinados ao microscópio estereoscópico, afim de detectarmos a presença de possíveis esporocistos retardatários.

Metodologia semelhante foi empregada para todas as gerações descendentes.

5.2. Infecção de B. tenagophila com a linhagem mineira e de B. glabrata com a linhagem paulista

Planorbídeos jovens, suscetíveis, pertencentes - as gerações F₃ e F₄, da espécie B. tenagophila foram expostos individualmente a miracídios da linhagem mineira, e B. glabrata da geração F₃, foram expostos a miracídios da linhagem paulista do helminto.

Para a exposição dos moluscos, nos baseamos na técnica de STANDEN (1952).

Findo o período de exposição aos miracídios, os moluscos foram agrupados em dois lotes, um para cada espécie, e examinados do 30º ao 100º dia.

6. Obtenção e contagem de cercárias

Decorridos trinta dias da exposição aos miracídios, planorbídeos de ambas as espécies, foram colocados sob a -
ação de lâmpadas elétricas, de modo a fornecer, durante apro -
ximadamente tres horas, a temperatura de 28°C e luminosidade -
necessária a eliminação de cercárias, segundo técnica de -
PELLEGRINO & MACEDO (1955).

Terminado este período, os moluscos foram devolvi -
dos aos aquários respectivos, sendo realizada uma estimativa
das cercárias eliminadas por cada molusco, adotando-se cri -
tério baseado na técnica de ALVIM (1974).

O número total de cercárias eliminadas por molus -
co, era estimado com base numa aliquota da suspensão cerca -
riana. Esse volume era colocado sob a forma de gôtas, em pla -
ca de Petri, sendo a contagem realizada em microscópio este -
reoscópico.

7. Infecção de camundongos com cercárias das linhagens pau - lista e mineira do S. mansoni

Oitenta camundongos albinos (Mus musculus), pe -
sando entre 14 a 16 gramas, foram expostos a cercárias das -
linhagem paulista (SJ) (LOTE I).

O mesmo número de animais, em condições idênticas,

foi exposto a cercárias da linhagem mineira (LOTE II).

A infecção foi realizada pela cauda do roedor, segundo técnica descrita por OLIVER & STIREWALT (1952), STIREWALT & BRONSON (1955) e BARRIOS-DURAN (1955).

Os lotes I e II, foram sub-divididos, adotando-se o seguinte critério :

- LOTE Ia - 40 camundongos infectados com 100 cercárias da linhagem paulista.
- LOTE Ib - 40 camundongos infectados com 200 cercárias da linhagem paulista.
- LOTE IIa - 40 camundongos infectados com 100 cercárias da linhagem mineira.
- LOTE IIb - 40 camundongos infectados com 200 cercárias da linhagem mineira.

Outro grupo de 20 camundongos, em condições semelhantes, foi exposto a cercárias originadas de B. tenagophila que haviam sido infectadas com miracídeos da linhagem alopátrica, conforme ítem 5.2.

Os camundongos foram colocados individualmente em suspensão cercariana, contendo aproximadamente 200 cercárias por animal, segundo técnica de STANDEN (1949) e BRENER (1959).

Previamente, os animais eram deixados durante 10 a 15 minutos em água a 30°C, afim de eliminarem fezes e urina, prejudiciais a vitalidade das cercárias.

8. Sacrifício dos camundongos infectados. Obtenção de soros, esquistossomos e granulomas hepáticos.

Antecedente a exposição dos camundongos às cercárias, realizamos sangria de prova pelo plexo venoso oftálmico, baseando-nos na técnica adaptada por RILEY (1960) em todos os animais.

Decorridos sessenta dias a partir da data de exposição, os camundongos foram sangrados pelo plexo vascular braquial. Os soros obtidos antes e após a infecção, foram conservados em congelador.

Após a sangria, realizamos necropsia dos animais, seguindo-se perfusão do sistema porta, de acordo com YOLLES (1947). Retirados os esquistossomos do sistema porta e mesentérico, esmagavam-se os fígados entre lâminas de vidro, para verificarmos se algum verme havia permanecido naquele órgão (STANDEN, 1953; HILL, 1956). A trituração dos fígados era completada em liquidificador, para obtenção e contagem de granulomas, conforme técnica de PELLEGRINO & BRENER (1956); BRENER, PELLEGRINO & OLIVEIRA (1956).

9. Reações de imunofluorescência indireta entre cercárias das linhagens paulista e mineira.

As reações entre os soros anti-SJ e anti-BH, e cercárias das duas linhagens, foram realizadas segundo indica -

ções de SADUN e cols. (1960); CAMARGO (1968) e LEMOS NETO (1975).

As cercárias eram conservadas em formol a 0,5% - sendo lavadas com salina tamponada a 0,01M pH 7.1 no momento do uso. Utilizamos 100 cercárias por reação.

Os antissoros inativados a 56°C por 30 minutos, foram diluídos no mesmo tampão, obtendo-se a razão 2, a partir de 1:32.

O conjugado utilizado, foi obtido da "Hyland" (soro de cabra anti-gama globulina de camundongo, conjugado ao Isotiocianato de Fluoresceína). Esse conjugado foi testado previamente, em titulações em bloco, tendo-se encontrado o título de 1:50 como sendo o mais sensível para o sistema em estudo.

Utilizamos os volumes de 0,1 ml de antissoros e de conjugado em cada reação.

A especificidade das reações antígeno-anticorpo foi determinada por absorção dos antissoros, baseando-nos na técnica de BIGUET (1965). Aos antissoros diluídos a 1:32, foram misturadas 1000 cercárias heterólogas; as misturas foram incubadas a 37°C por uma hora, e por mais 18 horas na geladeira a 8°C. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 2000 rpm, retirando-se o sobrenadante, ao qual, foram adicionadas mais 1000 cercárias heterólogas. O processo foi repetido mais uma vez.

Após absorção, os soros anti-SJ e anti-BH, foram diluídos, empregando-se o mesmo método utilizado para os antissoros não absorvidos, realizando-se a partir daí as reações homólogas e heterólogas.

Foram realizados os seguintes controles com os antissoros não absorvidos :

- a) cercárias + soro normal diluído 1:32 + conjugado.
- b) cercárias + soro normal diluído 1:32.
- c) cercárias + solução tampão + conjugado
- d) cercárias + soro imune diluído 1. 32.

Como controles para os antissoros absorvidos, realizamos reações com as cercárias utilizadas para a absorção dos antissoros.

Nossas leituras foram realizadas em microscópio - ZEISS, utilizando-se : objetiva plan 16/0,35; ocular de 10x. Tendo como fonte de luz, a lâmpada HBO-200, e sistema de filtros - excitador BG/barreira 50 (ZEISS).

As reações foram avaliadas de uma a quatro cruces (+ a ++++), de acordo com a intensidade da fluorescência. Leituras duvidosas, foram consideradas negativas.

III - RESULTADOS

1. Idade e tamanho dos moluscos das espécies B. tenagophila e B. glabrata, na época da primeira oviposição.

Os dados referentes a idade e tamanho médio de moluscos das espécies B. tenagophila e B. glabrata, ao atingirem a maturidade sexual, acham-se na TABELA I.

Nos tres lotes estudados de cada espécie, observamos na época da primeira oviposição, variações de diâmetros em B. tenagophila e B. glabrata entre 9,0 mm a 14,0 mm e 8,5 mm a 13,5 mm respectivamente. Com relação a idade, verificamos dados que variaram de 57 a 117 dias para B. tenagophila, e de 59 a 112 dias para B. glabrata.

2. Índices de infecções e mortalidade para B. tenagophila e B. glabrata das gerações parental (P), F₁, F₂, F₃, e F₄

Nas FIGURAS 2 e 3, apresentamos uma síntese dos resultados obtidos através da seleção de populações de B. tenagophila e de B. glabrata. Nas TABELAS II e III e FIGURAS 4, 5, 6 e 7 acham-se os dados referentes aos índices de infecção e mortalidade, além do número médio de cercárias eliminadas por B. tenagophila e B. glabrata das gerações P, F₁, F₂, F₃, e F₄ após o 100º dia da exposição.

Como se pode observar naquelas Tabelas e gráficos, a suscetibilidade a infecção pelo S. mansoni, aumentou visivelmente, desde a geração F_1 para B. glabrata, e a partir da geração F_2 para B. tenagophila.

Com relação aos índices de mortalidade encontrados nas várias gerações, as variações estiveram entre 16,6% e 50,0% para B. tenagophila e entre 33,3% e 73,3% para B. glabrata.

Para efeito de controle, formamos um lote de 30 moluscos por espécie, não selecionados quanto a infecção esquistossomótica. Estes moluscos não foram expostos a miracídios, sendo mantidos isoladamente durante 100 dias. O objetivo dessa experiência, era o de demonstrar que os índices de mortalidade encontrados, eram devidos à infecção dos moluscos pelo S. mansoni e não a outros fatores (técnicos ou ambientes). (TABELA IV).

O exame dos moluscos que até o 100º dia não haviam eliminado cercárias, realizado após o sacrifício de todos os moluscos que, permaneciam negativos quanto a eliminação de cercárias, não revelou nenhuma forma larvária do verme.

3. Índices de infecção a mortalidade para B. tenagophila e B. glabrata expostos as linhagens alopátricas do S. mansoni.

Tres lotes de B. tenagophila expostos a mirací

dios da linhagem mineira (BH), e um lote de B. glabrata -
expostos a miracídeos da linhagem paulista (SJ), revela -
ram elevados percentuais de infecção.

Os índices de mortalidade foram compatíveis aos
encontrados quando da exposição dos moluscos a linhagem -
simpátrica, como se pode observar na TABELA V, onde são -
apresentados os dados referentes a esta infecção cruzada.

4. Mortalidade, número de vermes e de granulomas hepáti -
cos em camundongos infectados com as linhagens SJ e BH
de S. mansoni.

4.1. Camundongos infectados com cercárias eliminadas por -
moluscos suscetíveis das gerações F₂ e F₃.

Decorridos sessenta dias após exposição às cer -
cárias, os animais dos lotes Ia, Ib, IIa e IIb foram ne -
cropsiados para retirada e contagem dos esquistossomos e
contagem de granulomas hepáticos.

Nas TABELAS VI e VII, pode-se verificar que a
mortalidade em camundongos expostos a 200 cercárias foi -
bem mais elevada do que a dos expostos a 100 cercárias ,
independentemente da procedência das cercárias.

Não houve diferença significativa em termos de
número de vermes por camundongo, entre as duas linhagens.
Constatamos maior número de vermes imaturos em animais in

fectados com cercárias de moluscos da geração F_3 . Os resultados referentes a estes estudos encontram-se nas TABELAS VIII e IX.

4.2. Camundongos infectados com cercárias provenientes de B. tenagophila infectadas com miracídios da linhagem BH de S. mansoni.

Na TABELA X, encontram-se os resultados referentes à infecção de camundongos expostos as cercárias eliminadas por B. tenagophila, previamente infectadas com miracídios da linhagem BH.

Seguindo metodologia empregada no item anterior, foram contados vermes e granulomas em 6 camundongos sobreviventes, de um lote de 20 expostos às cercárias. Obtivemos o elevado índice de 70% de mortalidade nos camundongos infectados, e uma média de 43 vermes por animal.

5. Resultados da imunofluorescência indireta entre as linhagens paulista e mineira do S. mansoni.

As análises por imunofluorescência indireta entre as linhagens SJ e BH, não revelaram diferenças de títulos, quando os antissoros absorvidos e não absorvidos foram testados com cercárias homólogas e heterólogas.

Os resultados acham-se nas TABELAS XI, XII, XIII e XIV. Realizamos as reações com os antissoros diluídos de 1:32. Justifica-se este fato, por termos evidenciado certa região de "prozona", quando da titulação do conjugado.

Os títulos encontrados com os antissoros não absorvidos foram de 1:2048 para as duas linhagens. Quando absorvidos, obtivemos fluorescência somente até a diluição - de 1:256 para as linhagens SJ e BH de S. mansoni.

Estes resultados indicam a presença de determinantes antigênicos comuns as linhagens SJ e BH.

Todos os controles realizados com os antissoros não absorvidos, apresentaram-se negativos.

As reações feitas com as cercárias utilizadas para absorção, mostraram-se fortemente fluorescentes (positivas).

TABELA I

Idade e tamanho médios dos moluscos por ocasião
da primeira oviposição

Espécies	Número	Diâmetro Médio	Idade Média
		mm	dias
<u>B. tenagophila</u>	30	11,81 ± 1,16	81,89 ± 6,63
<u>B. glabrata</u>	30	11,17 ± 1,49	88,73 ± 6,45

T A B E L A II

Resultados obtidos após o 100º dia da exposição de B. Tenagophila a linhagem SJ de S. mansoni
(Lotes de 30 moluscos por geração, e exposição a 10 miracídios por molusco)

Gerações	Moluscos Infectados	Percentagem de moluscos Infectados	Mortalidade	Total de Cercárias Eliminadas	Cercárias/ Moluscos Infectados
	Nº	%	%	Nº	Nº
P	2	6,6	36,6	2.412	1.206
F1	7	23,3	23,3	18.800	2.586
F2	29	96,6	46,6	45.885	1.582
F3	29	96,6	50,0	40.993	1.413
F4	29	96,6	16,6	53.387	1.841

T A B E L A III

Resultados obtidos após o 100º dia da exposição de B. glabrata a linhagem BH de S. mansoni
 (Lotes de 30 moluscos por geração, e exposição a 10 miracídeos por molusco)

Gerações	Moluscos		Porcentagem de moluscos Infectados		Mortalidade	Total de Cercárias Eliminadas		Cercárias/Molusco Infectado	
	nº	%	%	nº		nº	nº		
P	12	40,0	33,3	30.605		2.567			
F1	26	93,2	63,3	100.438		3.587			
F2	28	93,3	40,0	224.234		8.000			
F3	25	83,3	73,3	79.924		3.197			
F4 ⁺	29	96,6	50,0	366.105		13.314			

+ Até o 100º dia, estudados apenas 25 caramujos.

T A B E L A I V

Mortalidade para moluscos não infectados por S. mansoni e não selecionados quanto a suscetibilidade a infecção esquistossomótica (Período de observação - 100 dias).

E S P É C I E S	TOTAL DE MOLUSCOS	MORTALIDADE
	Nº	%
<u>B. tenagophila</u>	30	0,0
<u>B. glabrata</u>	30	13,3

T A B E L A V

Resultados obtidos após c 100o dia da exposição de B. tenagophila e B. glabrata as linhagens alopátricas do Schistosoma mansoni

ESPÉCIE DE MOLUSCO	GERAÇÃO	LINHAGEM DE <u>S. mansoni</u>	MIRACÍDIOS POR MOLUSCO		MOLUSCOS EXPOSTOS		INFECÇÃO	MORTALIDADE
			nº	%	nº	%		
<u>B. tenagophila</u>	F ₃	BH	10		20	18	90,0	40,0
<u>B. tenagophila</u>	F ₃	BH	10		20	11	55,0	40,0
<u>B. tenagophila</u>	F ₄	BH	50		11	7	63,6	40,0
<u>B. glabrata</u>	F ₃	SJ	10		20	6	30,0	60,0

TABELA VI

Índices de mortalidade de camundongos expostos a cercárias de linhagem SJ, provenientes de moluscos suscetíveis

GERAÇÕES DE <i>B. fenagophila</i> DOADORES DE CERCÁRIAS.	CERCÁRIAS POR CAMUNDONGO	CAMUNDONGOS MORTOS	MORTALIDADE
	nº	nº	%
F ₂	100	5	25
F ₂	200	9	45
F ₃	100	4	20
F ₃	200	13	65

T A B E L A VII

Índices de mortalidade de camundongos expostos a cercárias da linhagem BH, provenientes de moluscos suscetíveis

GERAÇÕES DE <u>B.</u> <u>glabrata</u> DOADO RES DE CERCÁRIAS	CERCÁRIAS POR CAMUNDONGO	CAMUNDONGOS MORTOS	MORTALIDADE
	nº	nº	%
F ₂	100	6	30
F ₂	200	12	60
F ₃	100	6	30
F ₃	200	9	45

TABELA VIII

Média de vermes, granulomas hepáticos nos camundongos infectados com a
linhagem SJ de S. mansoni

GERAÇÕES DE <u>B. tenagophylla</u> DOA- DORES DE CERCÁRIAS	CERCÁRIAS POR CAMUNDONGO	VERMES POR CAMUNDONGO	GRANULOMAS HEPÁTICOS POR CAMUNDONGO	GRANULOMAS HEPÁTICOS POR VERME
	nº	nº	nº	nº
F ₂	100	27	1.440	53
F ₂	200	60	1.939	32
F ₃	100	24	3.018	124
F ₃	200	55	3.545	64

T A B E L A IX

Média de vermes e granulomas hepáticas nos camundongos infectados com a

linhagem BH de S. mansoni

GERAÇÕES DE B. <u>laborata</u> DOADORES DE CERCÁRIAS	CERCÁRIAS	VERMES	GRANULOMAS	GRANULOMAS
	POR CAMUNDONGO	POR CAMUNDONGO	HEPÁTICOS P/CAMUNDONGO	HEPÁ TICOS POR VERME
	nº	nº	nº	nº
F ₂	100	19	1.535	81
F ₂	200	67	3.184	47
F ₃	100	28	1.861	67
F ₃	200	44	2.062	47

T A B E L A X

Camundongos infectados com aproximadamente 200 cercárias originadas de B. tenagophila infectadas com miracídios da linhagem BH,- 60 dias após exposição.

TOTAL DE CAMUNDONGOS	MORTALIDADE	VERMES POR CAMUNDONGO	GRANULOMAS HEPÁTICOS POR VERME
	8	nº	nº
20	70	43	68

TABELA XI

Resultados das reações de imunofluorescência indireta com o soro anti-SJ
 não absorvido

LINHAGENS		DILUIÇÕES DO SORO ANTI-SJ								
		1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:3072	1:4096
SJ	++++	++++	++++	++++	++	++	+	+	-	-
BH	++++	++++	++++	++	++	+	+	-	-	-

- (++++) Fortemente fluorescente
- (++) Fluorescente
- (+) Fracamente fluorescente
- (-) Não fluorescente (negativo)

T A B E L A XII

Resultados das reações de imunofluorescência indireta com soro anti-BH
 não absorvido

LINHAGENS		DILUIÇÕES DO SORO ANTI-BH								
		1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:2072	1:4096
SJ		++++	++++	++++	++	++	+	+	-	-
BH		++++	++++	++++	++	++	+	+	-	-

- (++++) Fortemente fluorescente
- (++) Fluorescente
- (+) Fracamente fluorescente
- (-) Não fluorescente (negativo)

T A B E L A XIII

Resultados das reações de imunofluorescência indireta
com o soro anti-SJ absorvido com cercárias BH

LINHAGENS	DILUIÇÕES DO SORO ANTI-SJ					
	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
SJ	++	+	+	+	-	-
BH	++	+	+	+	-	-

- (++) Fluorescente
(+) Fracamente fluorescente
(-) Não fluorescente (negativo)

T A B E L A X I V

Resultados das reações de imunofluorescência indireta
com o soro anti-BH absorvido com cercárias SJ

LINHAGENS	DILUIÇÕES DO SORO ANTI-BH					
	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
SJ	+	+	+	+	-	-
BH	+	+	+	+	-	-

(+) Fracamente fluorescente

(-) Não fluorescente (negativo)

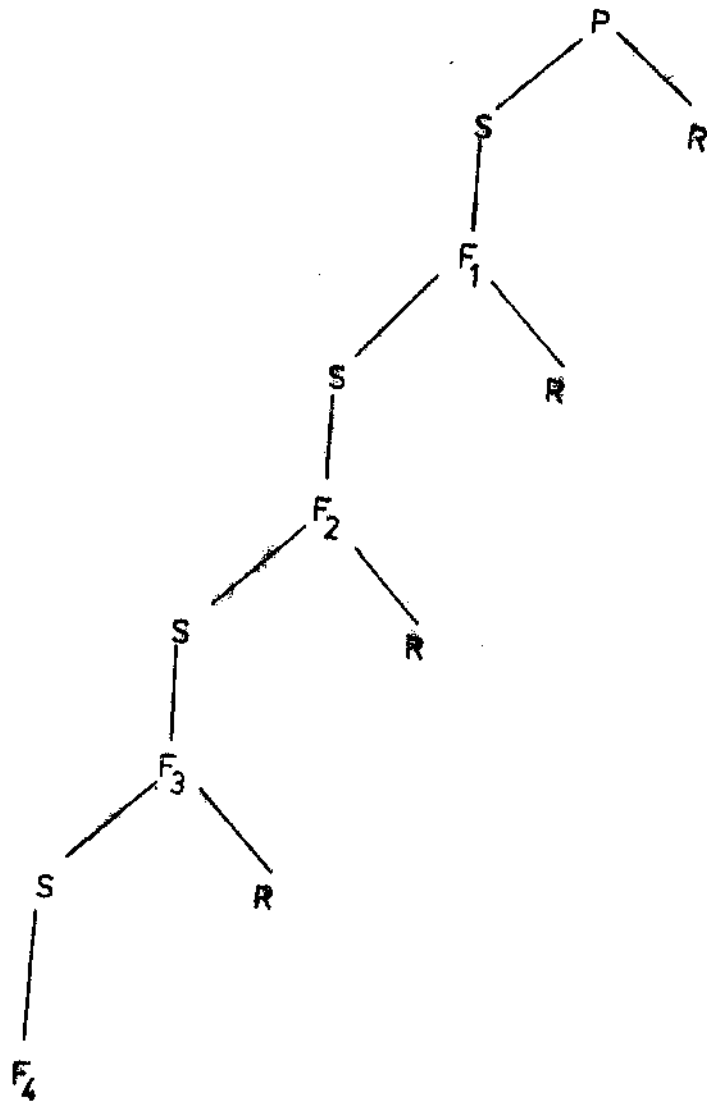


FIGURA 1 - Esquema de seleção para a obtenção de populações de moluscos das espécies B. tenagophila e B. glabrata, suscetíveis ao S. mansoni; (30 moluscos por geração para cada espécie). S - suscetíveis; R - resistentes.

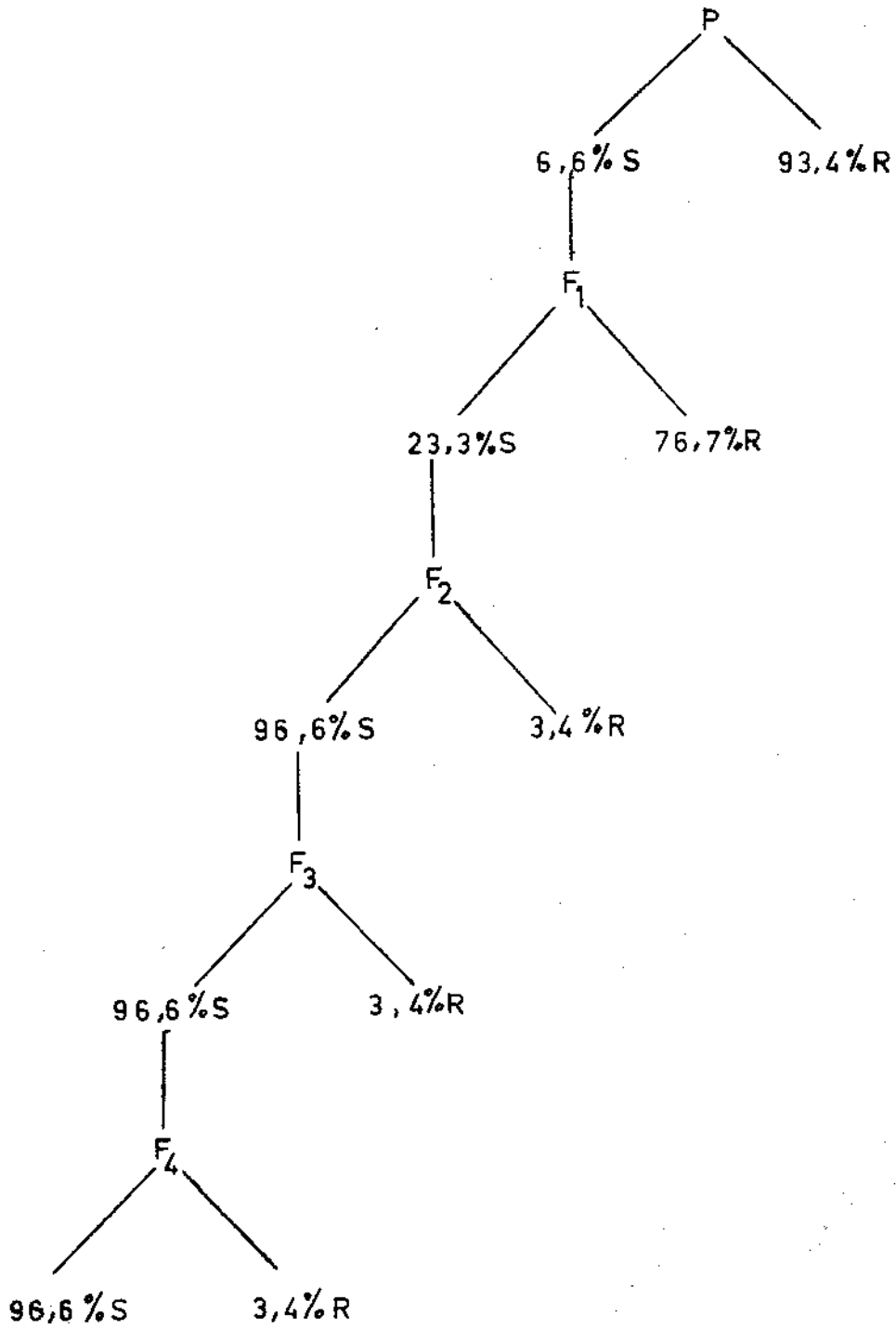


FIGURA 2 - Isolamento de gerações suscetíveis de B. tenagophila, a partir de uma população (P). Índices de suscetíveis e resistentes, para cinco gerações estudadas. S - suscetíveis; R - resistentes. (30 moluscos por geração).

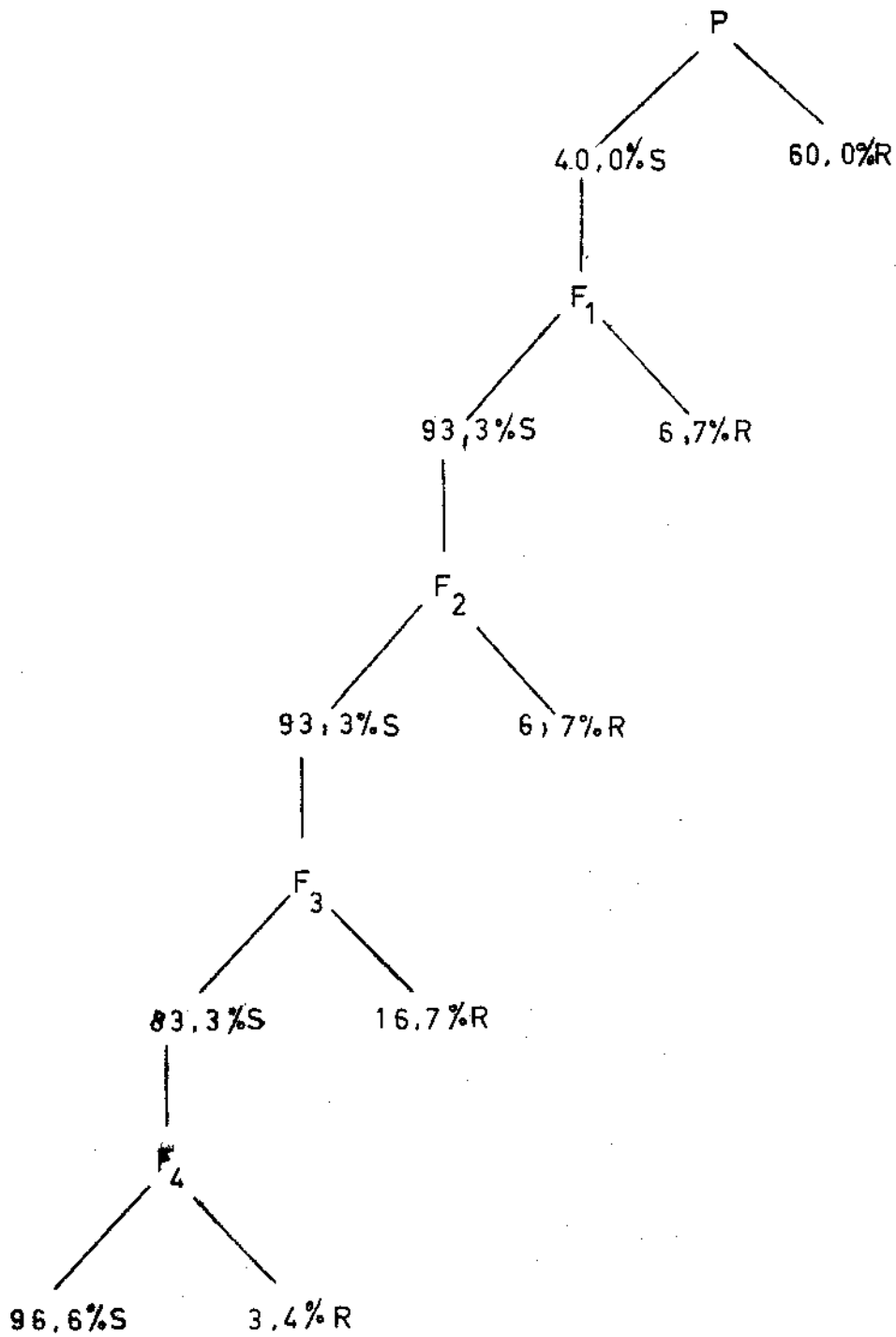


FIGURA 3 - Isolamento de gerações de B. glabrata suscetíveis, a partir de uma população (P). Índices de suscetíveis e resistentes para cinco gerações estudadas. S - suscetíveis; R - resistentes. (30 moluscos por geração).

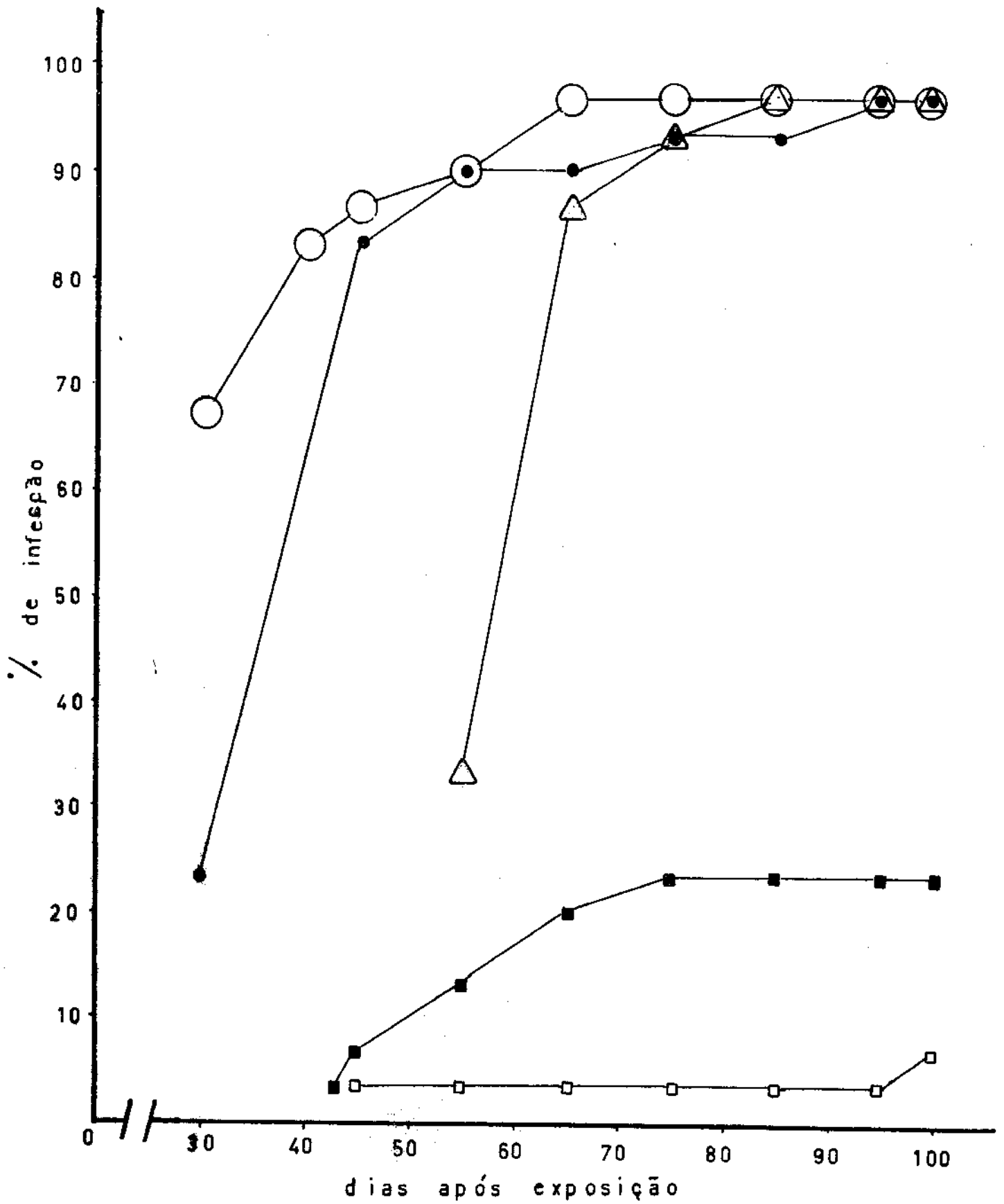


FIGURA 4 - Infecção obtida após exposição de *B. tenagophila* a linhagem SJ de *S. mansoni*. GERAÇÕES: P □ ; F₁ ■ ; F₂ ○ ; F₃ ● ; F₄ △

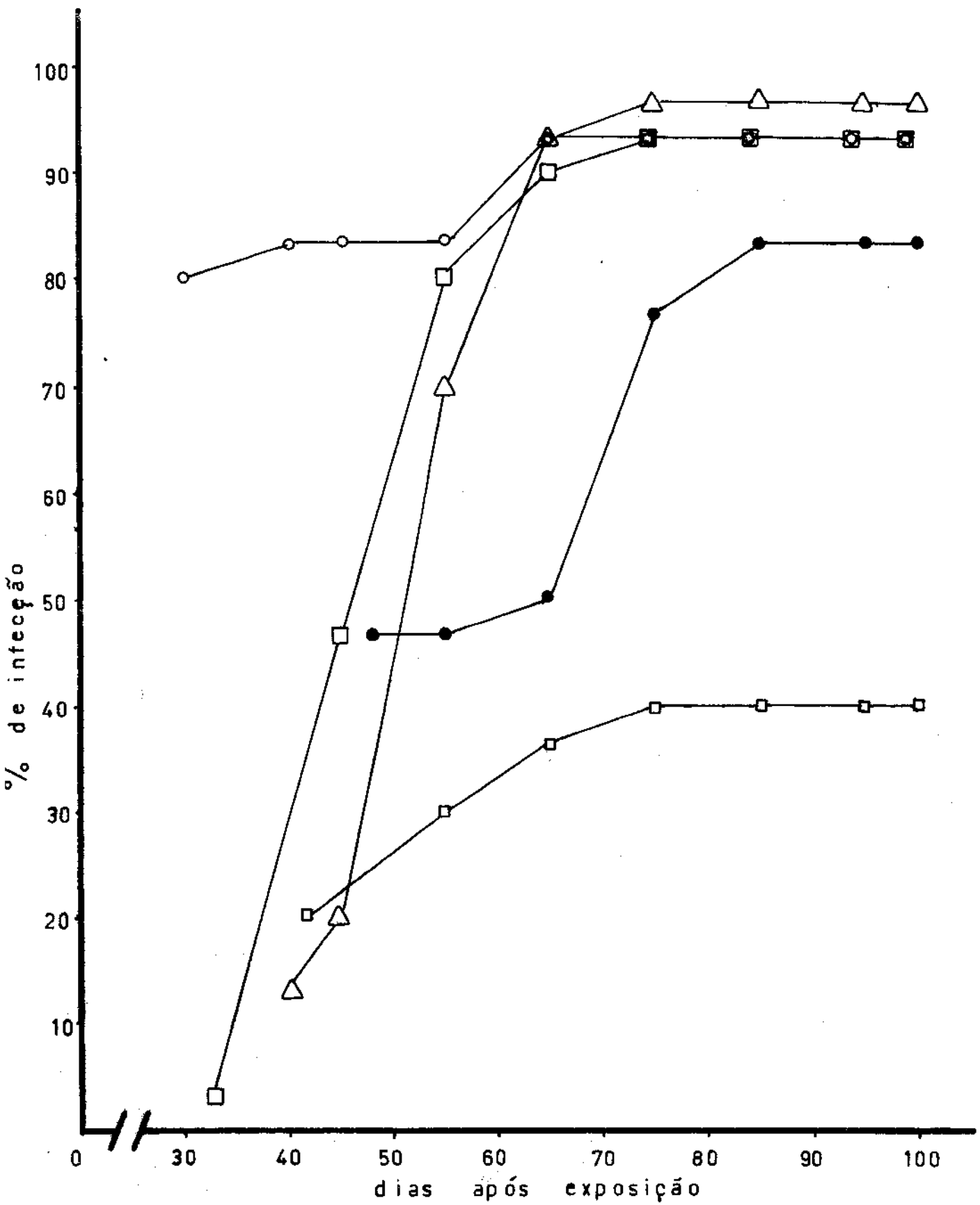


FIGURA 5 - Infecção obtida após exposição de *B. glabrata* a linhagem BH de *S. mansoni*. GERAÇÕES: P □ ; F₁ □ ; F₂ ○ ; F₃ ● ; F₄ △

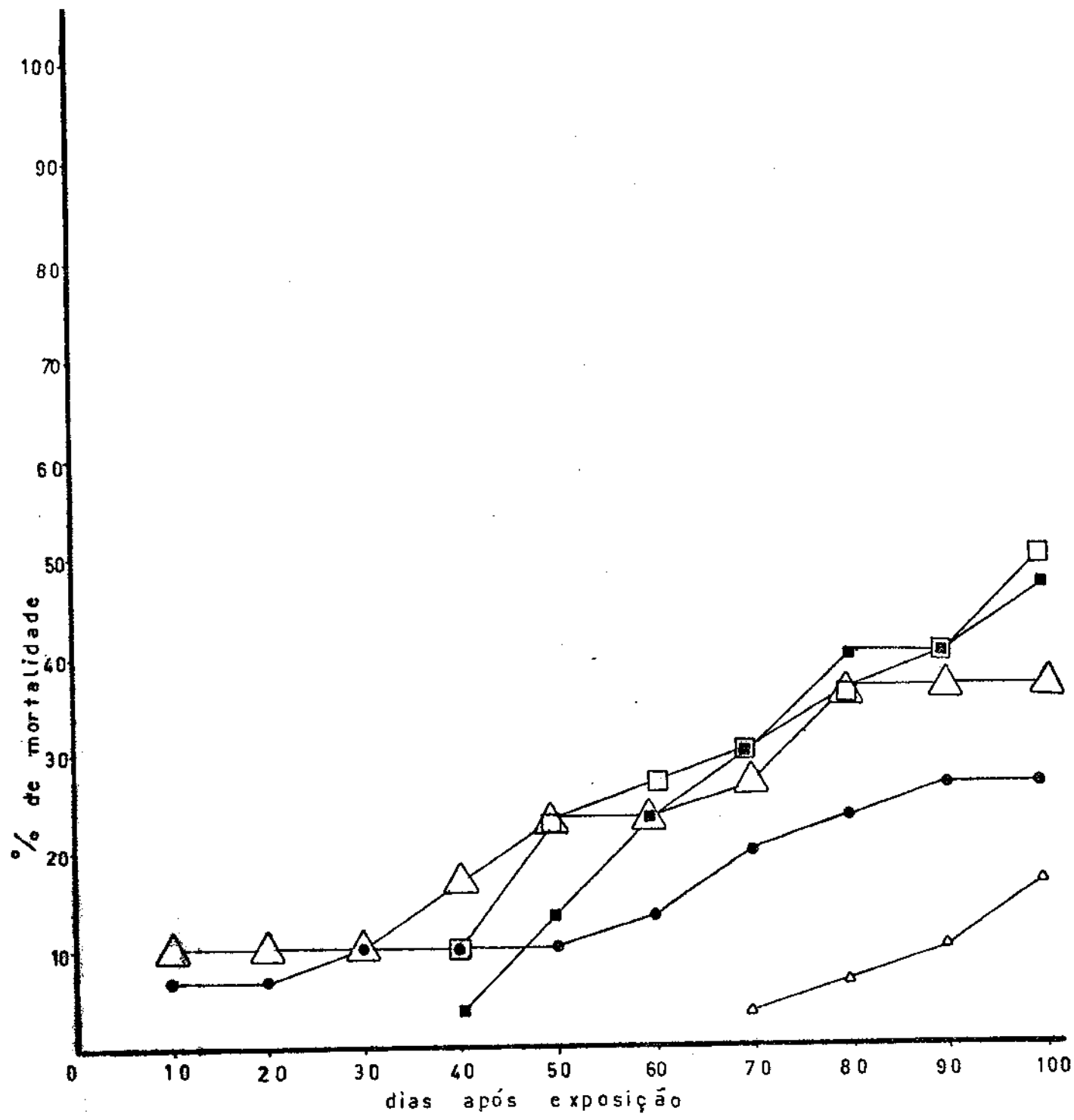


FIGURA 6 - Mortalidade obtida após exposição de *B. tenagophila* a linhagem SJ de *S. mansoni*. GERAÇÕES: P △; F₁ ●; F₂ □; F₃ ■; F₄ △

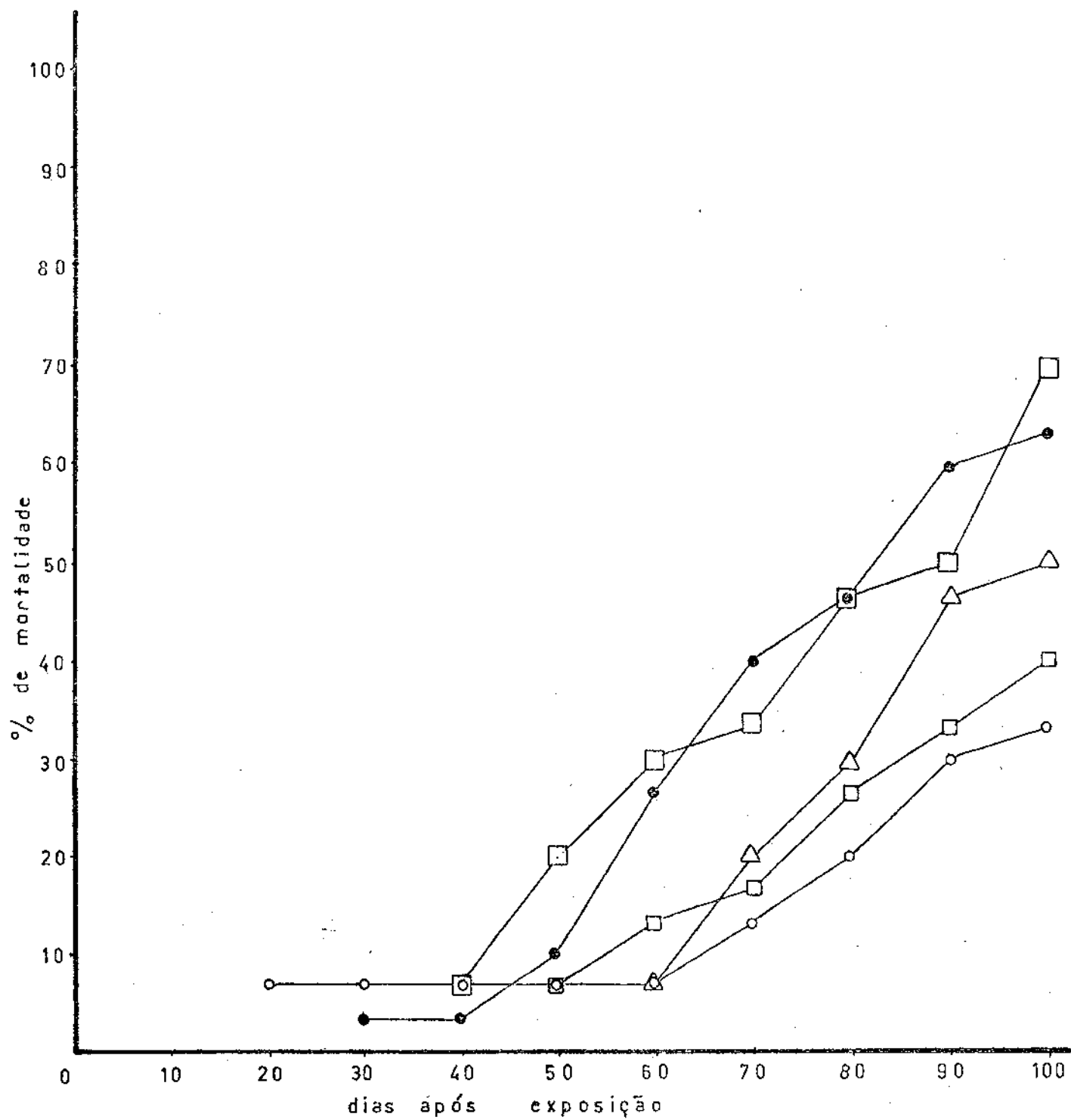


FIGURA 7 - Mortalidade obtida após exposição de *B. glabrata* a linhagem BH de *S. mansoni*. GERAÇÕES: P ○ ; F₁ ● ; F₂ □ ; F₃ □ ; F₄ △

IV - D I S C U S S Ã O

Para a realização deste trabalho, procuramos inicialmente, determinar a época da maturidade sexual para moluscos das espécies B. tenacophila e B. glabrata, pois, sabe-se que a suscetibilidade varia com a idade do molusco (NEWTON, 1953; WRIGHT, 1963).

NEWTON, verificou que a suscetibilidade a infecção diminuía a medida que os moluscos tornavam-se mais velhos, tendo utilizado em seus experimentos, moluscos da espécie B. glabrata.

Os estudos de RICHARDS (1973) também com a B. glabrata, indicaram que moluscos de determinados "stocks" de laboratório, quando jovens mostraram 100% de suscetibilidade. Porém, posteriormente, utilizando moluscos adultos procedentes do mesmo "stock", verificou que estes eram refratários à infecção pelo S. mansoni.

Com relação a idade e tamanho de moluscos por ocasião da maturidade sexual, existe uma grande variabilidade de dados encontrados na literatura, fato este, devido sobretudo, a diversidade das condições de ambiente e alimentação.

A maioria dos autores tem realizado pesquisas utilizando B. glabrata. Nossos resultados, referentes a moluscos desta espécie, foram semelhantes aos dados encontrados por vários autores (BRUMPT, 1941; RIPSON, 1949; PEREIRA & DESLANDES, 1954; RITCHIE e cols. 1963), em relação ao tama-

nho do molusco por ocasião da maturidade sexual.

Com respeito ao tamanho e idade quando da primeira oviposição nossos dados concordam em parte com aqueles - apresentados por AZEVEDO e cols. (1960). Os referidos autores, verificaram a primeira oviposição em B. glabrata, entre 60 a 90 dias, quando apresentaram um diâmetro médio de 11,5mm . A primeira oviposição em nossos moluscos ocorreu entre 59 a 112 dias, quando o diâmetro médio obtido foi de 11,17mm.

KAWAZOE (1975) verificou que a primeira oviposição ocorreu em B. glabrata, entre 53 a 98 dias, tendo obtido a idade média de 73,5 dias, e diâmetro médio de 8,3 mm, variando de 4,5 mm a 11,0 mm. Para B. tenagophila, a mesma autora constatou variações de idade entre 53 a 81 dias, com média de 66,8 dias e diâmetro médio de 6,3 mm, tendo variado entre 4,0 mm a 9,2 mm. Os dados médios obtidos por - KAWAZOE, mostraram-se significativamente diferentes daqueles por nós apresentados, principalmente para moluscos da espécie B. tenagophila, apesar dos estudos terem sido realizados em condições semelhantes. Provavelmente, este fato tenha ocorrido, em virtude daquela autora ter utilizado em suas experiências, moluscos pareados. De acordo com os trabalhos de PERLOWAGORA (1958), sabe-se que em moluscos pareados, a primeira oviposição ocorre mais precocemente e - em moluscos com diâmetros inferiores daqueles encontrados para indivíduos isolados.

Baseados nos resultados obtidos em nossas experiências preliminares, expusemos aos miracídeos, apenas -

moluscos que ainda não haviam atingido a maturidade.

Para a exposição dos moluscos às linhagens simpátricas de S. mansoni, foi utilizado igual número de miracídio por molusco, obedecendo-se o mesmo esquema durante toda a execução do trabalho.

Nossos resultados referentes a B. glabrata, mostraram que desde a geração F_1 , foi possível obter um alto índice de suscetibilidade. Mesmo a geração parental, apresentou uma elevada suscetibilidade, o que mostra que estes moluscos apresentaram-se adaptados a infecção esquistossomótica. Na geração F_1 , no 100º dia após a data de infecção, encontramos 28 moluscos positivos, o que representa o elevado Índice de 93,3% de infecção. Estes dados se mantiveram, sem apresentarem diferenças significativas, até a quarta geração. Na geração F_3 , houve diminuição desse percentual de infecção, o que pode ser justificado pelo fato de ter ocorrido a morte de cinco moluscos, antes do período de observação, o que nos impossibilitou a constatação da infecção. Entretanto, verificamos perda de capacidade de reprodução desses moluscos, sendo esta uma indicação de que provavelmente, estes moluscos estavam infectados. Não foi possível o exame dos moluscos após a morte, devido ao adiantado estado de autólise.

Nossas observações sobre a redução da capacidade reprodutiva dos moluscos de todas as gerações estudadas, infectados pelo S. mansoni, foram concordantes com os trabalhos citados na literatura. HUBENDICK (1958), afirmou que quando a infecção ocorre nos primeiros estádios da vida, -

os moluscos tornam-se estéreis. Em moluscos infectados - pouco antes da maturidade sexual, verifica-se redução quantitativa na produção de ovos, havendo mesmo extinção de postura logo após a eliminação das primeiras cercárias. (STURROCK & STURROCK, 1970).

COELHO (1954), estudando a ação da infecção pelo S. mansoni sobre a reprodução da B. glabrata, encontrou grande redução da oviposição, e da viabilidade das desovas durante o período de eliminação de cercárias. O exame histológico dos ovotestes, revelou sempre, algumas células sexuais em atividade.

BRUMPT (1941), observou que moluscos infectados, realizam posturas normais até aproximadamente 18 dias após exposição aos miracídios. Quando os esporocistos migram para a glândula genital, a postura cessa quase inteiramente.

Quanto à suscetibilidade, os dados por nós encontrados, relacionados a B. glabrata, estão de acordo com os resultados obtidos por PARAENSE & CORREA (1963). Estes autores referiram percentuais de infecção acima de 95,0% em moluscos desta espécie, expostos a linhagem de Belo Horizonte de S. mansoni.

MAGALHÃES (1969), expondo B. glabrata de Belo Horizonte à linhagem simpátrica do helminto, confirmou a elevada suscetibilidade dessa espécie.

Outros trabalhos, tem demonstrado a alta suscetibilidade da B. glabrata à infecção pelo S. mansoni das linhagens autóctones (BARBOSA & COELHO, 1954; RUIZ, 1957; COELHO, 1962; KAGAN & CEIGER, 1965; STURROCK & STURROCK, 1970;

MAGALHÃES, 1970; BARBOSA & FIGUEIREDO, 1970; CHIEFFI, 1975).

Por outro lado, a B. tenagophila, tem-se apresetado pouco suscetível à infecção natural pelo S. mansoni, como demonstrado por (MOURA, 1945; COUTINHO, 1949; MOURA, 1952; RUIZ, 1952; DEANE e cols., 1953; ANTUNES, 1953; CORREA e cols., 1956; ANDRADE & MARTINS, 1956; PARAENSE & DESLANDES, 1956; MARTINS, 1957; CODA e cols., 1959, PIZA e cols., 1959; PIZA e cols., 1960; CORREA e cols., 1962). Apesar da baixa suscetibilidade da B. tenagophila, moluscos dessa espécie, são os principais hospedeiros do S. mansoni em várias regiões brasileiras, sobretudo no estado de São Paulo.

Em laboratório, COUPINHO (1956), confirmou a elevada resistência daqueles moluscos à infecção esquistossomótica. Os resultados deste autor, foram confirmados por RUIZ (1957) e COELHO (1957 e 1962).

A despeito desses resultados, em focos ricos em miracídeos, foram obtidos índices de infecção que variaram entre 6,0% a 51,3% (RAMOS e cols., 1961).

Em infecções experimentais, utilizando B. tenagophila criada em laboratório, e procedentes do vale do rio Paraíba do Sul, submetidas a linhagem simpátrica do helminto, PARAENSE & CORREA (1963) encontraram taxas de infecções de 65,8%, 100,0% e 93,7% para exposições a 10, 50 e 100 miracídeos respectivamente.

MAGALHÃES (1969), obteve 40% de infecção para B. tenagophila oriunda de Campinas, e expostas a linhagem de São José dos Campos de S. mansoni.

Estes dados foram confirmados por CHIEFFI (1975), que expondo B. tenagophila de São José dos Campos a 10 miracídios da linhagem simpátrica, obteve 81,52% de infecção.

Em contrapartida, os resultados obtidos por BASTOS (1975), vieram confirmar a elevada resistência de B. tenagophila à infecção simpátrica. Em nossos próprios dados, verificamos grande resistência à infecção em moluscos não selecionados, como pode-se observar na geração parental, na qual, dos 30 moluscos expostos aos miracídios, da linhagem simpátrica, apenas dois mostraram-se infectados até o 100º dia. Em outros lotes não mencionados neste trabalho, confirmamos a elevada resistência a infecção em B. tenagophila criada em laboratório, e originada de moluscos procedentes do vale do rio Paraíba do Sul.

Os índices de infecção variáveis obtidos para B. tenagophila, na natureza e no laboratório, poderiam ser devidos a graus diversos de adaptação fisiológica entre o parasita e o hospedeiro, e não apenas a maior ou menor suscetibilidade do caramujo (PARAENSE & CORRÊA, 1963).

A partir da geração F₂ de B. tenagophila, conseguimos isolar populações mais suscetíveis. Essas populações apresentaram comportamento diferentes das correlatas obtidas de B. glabrata, no que diz respeito principalmente ao número de cercárias eliminadas por molusco. Enquanto que para B. glabrata, obtivemos até 13.000 cercárias por molusco, para B. tenagophila o máximo obtido foi de aproximadamente 2.700 cercárias por molusco.

O número de cercárias eliminadas, figura entre os

fatores considerados como importantes na determinação das qualidades de vetor dos moluscos hospedeiros do S. mansoni (BARBOSA & COELHO, 1954).

Para os pesquisadores que realizam infecções de moluscos em laboratório, a quantidade de cercárias eliminadas tem grande importância, principalmente para a obtenção de antígenos das diversas fases larvárias do parasita.

Os trabalhos que estudam a eliminação de cercárias do S. mansoni, tem sido realizados na grande maioria em B. glabrata (FAUST & HOFFMAN, 1934; GIOVANNOLA, 1936; KUNTZ, 1946; SCHREIBER & SCHUBERT, 1949; TRAVASSOS, 1953; BARBOSA, COELHO & DOBBIN, 1954; STIREWALT, 1954; BARRETO & BARBOSA, 1959; BARRETO, 1960; STURROCK & STURROCK, 1970, ALVIM, 1974; BARBOSA, 1975). Alguns autores, tem se referido a eliminação de cercárias em B. straminea (COELHO & BARBOSA, 1956; BARBOSA, 1975).

Os dados obtidos no presente trabalho, com relação ao número médio de cercárias eliminadas por molusco, não podem ser comparados com aqueles obtidos pelos autores consultados, devido sobretudo, a grande variação na duração da infecção, métodos de exposição e métodos de contagem de cercárias. FAUST & HOFFMAN (1934) verificaram que dois moluscos que sobreviveram 15 meses à infecção, produziram cerca de 200.000 cercárias. STURROCK & STURROCK (1970), referem-se ao encontro de 16.000 cercárias por moluscos. BARBOSA E cols. (1954), obtiveram num molusco que sobreviveu 18 semanas após a infecção, o total de aproximadamente seiscentas mil cercárias. Noutro experimento, os mesmos

autores, encontraram cerca de sete mil cercárias em um ca -
ramujo que sobreviveu quatro semanas à infecção.

Nossos dados para a B. glabrata, relativos a pro -
dução de cercárias, mostraram um aumento significativo nas
gerações F_2 e F_4 , em relação as gerações P e F_1 . Os dados
referentes a geração F_3 ficaram prejudicados, em razão da
grande mortalidade de moluscos. Os resultados apresentados
neste trabalho, demonstram que a medida que os moluscos vão
sendo selecionados geneticamente por auto-fecundação, tendo
em vista o caráter suscetibilidade, aumenta o número de cer -
cárias produzidas por moluscos da espécie B. glabrata.

Por outro lado, para B. tenagophila, não foi ob -
servado o mesmo fenômeno. O número de cercárias por molus -
co, manteve-se sem apresentar diferenças significativas em
todas as gerações.

Levando-se em consideração as cinco gerações estu -
dadas, o número total aproximado foi de 821.506 e 161.478 -
cercárias, para B. glabrata e B. tenagophila respectivamen -
te. Esta maior resistência da B. tenagophila, no que concer -
ne a produção de cercárias, deve-se provavelmente a meca -
nismos de imunidade natural. Experimentos histológicos condu -
zidos por COELHO (1957 e 1962), demonstraram grande resis -
tência apresentada pelos tecidos de B. tenagophila aos espo -
rocistos do S. mansoni, provocando geralmente a lise dessas
larvas nos primeiros dias após exposição aos miracídios, com
reabsorção dos tecidos parasitários. Este autor não verifi -
cou em B. glabrata, reação a penetração e evolução do trema -
tódeo.

COELHO & BARBOSA (1956) trabalhando com T. centimetralis e A. glabratus, NEWTON (1952) com A. glabratus e BROOKS (1953) realizando pesquisas em T. havanensis e A. glabratus, verificaram a ocorrência de reações celulares envolvendo miracídios nos moluscos infectados pelo S. mansoni. Fato semelhante foi relatado por BARRETO & BARBOSA (1956) - em A. glabratus e BARBOSA (1968) em B. straminea.

Em caramujos suscetíveis, os esporocistos desenvolveram-se sem reação tecidual no hospedeiro. Em caramujos resistentes, estas larvas são reconhecidas como corpos estranhos, sendo rapidamente englobadas por amebocitos e fibroblastos, seguindo-se sua destruição (BASCH, 1976).

Tudo indica que essa resposta celular dos moluscos sobre as larvas do S. mansoni, seja de natureza inespecífica, haja visto, que pequenas partículas como grãos de pólen ou poliestireno, foram fagocitadas por células de B. glabrata, sendo em seguida, encapsuladas por fibroblastos com formação de nódulos (TRIPP, 1961). Em moluscos da espécie Otala lactea, foi verificado fenômeno semelhante, utilizando-se leveduras, eritrocitos de mamíferos e bactérias (ANDERSON & GOOD, 1976).

O fenômeno de cura natural descrito anteriormente por LAGRANGE et al., 1949; BARBOSA & COELHO, 1954; STIREWALT, 1954; BARBOSA et al, 1954) em B. glabrata, não foi verificado por nenhuma das duas espécies de moluscos por nós estudadas.

Entre os fatores envolvidos na infecção de moluscos hospedeiros do Schistosoma mansoni, estão aquelas de -

natureza genética. NEWTON (1953), foi um dos primeiros a se referir a influência genética do molusco sobre a suscetibilidade à infecção, afirmando que a suscetibilidade de B. glabrata ao S. mansoni, era um caráter hereditário. Este fato foi confirmado por RICHARDS (1970), que verificou em B. glabrata descendente de uma geração parental suscetível ao S. mansoni, produção por auto-fecundação, de prole que apresentou índices de infecção que variaram de 90 a 100%. Moluscos da mesma espécie, porém, descendentes de pais refratários, produziram uma prole 100% refratária ao S. mansoni. A obtenção dessas populações, tanto de suscetíveis, como de refratários, foi conseguida através de três gerações. Cruzamento entre populações de alta e baixa suscetibilidade, apresentaram 1/2 dos moluscos infectados. Nossos dados, foram plenamente concordantes com aqueles observados por RICHARDS, no que concerne a descendentes suscetíveis, obtidos por auto-fecundação. O rápido progresso obtido na seleção de moluscos das duas espécies, é aparentemente devido a alta herdabilidade do caráter "suscetibilidade", que é condicionado por pequeno número de genes.

RICHARDS (1972), sugere que a suscetibilidade de moluscos jovens ao S. mansoni, seria provavelmente controlado por um complexo de quatro fatores genéticos.

Nossos resultados referentes a mortalidade observada em B. glabrata das gerações P, F₁, F₂, e F₃, decorridos 100 dias após a exposição aos miracídeos, mostraram-se bastante heterogêneos. Comparadas as quatro gerações entre si, pelo teste de χ^2 , utilizando-se a fórmula de Brandt-Snedecor, encontramos um valor para χ^2 igual a

12,9902, altamente significativo ao nível de 1% para 3 graus de liberdade. Não foi possível a inclusão da geração F_4 , para efeito de estudos estatísticos, em virtude da não complementação do período de 100 dias, pré-estabelecido para nossas observações. De qualquer modo, verificamos que aos 60 dias, tínhamos quase 50% de moluscos sobreviventes.

Comparando nossos dados relacionados aos moluscos infectados, das cinco gerações estudadas, com o lote constituído por moluscos que não tiveram contacto com miracídios, verificamos grande diferença nos índices de mortalidade. Praticamente quase todos os moluscos não infectados, permaneceram vivos, e reproduzindo-se intensamente, durante o período em que se desenvolveram nossas observações. Isso demonstra que, os elevados percentuais de mortalidade, e o decréscimo da capacidade de reprodução verificados nos moluscos infectados, eram devidos ao alto grau de parasitismo.

Outros autores já haviam demonstrado que moluscos infectados apresentam uma espectância de vida bem reduzida. (SCHREIBER & SCHUBERT, 1949; PARAENSE & SANTOS, 1949).

Entretanto, apesar de termos verificado elevados percentuais de mortalidade para algumas das gerações de B. glabrata, nossos dados foram inferiores aqueles encontrados por vários autores. O maior índice de mortalidade por nós obtido, foi de 73,3% para a geração F_3 .

BARRETO & BARBOSA (1959), trabalhando com B. glabrata procedentes do estado de Pernambuco, realizando infecções individuais com aproximadamente 10 miracídios por molusco, obtiveram mortalidade total de um lote de 27 moluscos, após o 70º dia de infecção. Em outro lote de 24

moluscos, após o 100º dia, apenas um caramujo encontrava-se vivo, o que representa aproximadamente 96,0%.

BARBOSA & COELHO (1954), obtiveram índices de mortalidade em torno de 40,0% para B. glabrata, originárias do Nordeste do Brasil, no período compreendido entre 28 a 36 dias após a data de infecção. Para esta mesma espécie, nossos resultados estiveram abaixo de 10% para todas as gerações estudadas, no período compreendido até o 40º dia de infecção. Contudo, nossos resultados foram concordantes com os de MACALHÃES (1969). O referido autor, obteve para B. glabrata de Minas Gerais, experimentalmente infectada com a linhagem simpátrica do S. mansoni, aos 60 dias da infecção, o índice de 27,5% de mortalidade. Os dados por nós encontrados estiveram entre 6,6% a 30,0% nas gerações P, F₁, F₂, F₃, e F₄.

Os índices de mortalidade obtidos para B. tenagophila, estiveram entre 16,6% na geração F₄ e 50,0% na geração F₃. As cinco gerações comparadas entre si, através do χ^2 pela fórmula de Brandt-Snedecor, forneceram um valor igual a 11,0675, significativo ao nível de 5% para 4 graus de liberdade. Por outro lado, comparando-se as gerações P, F₁, F₂, e F₃, obtem-se um χ^2 igual a 5,2028, não significativo ao nível de 5% para 3 graus de liberdade. Logo, pode-se concluir que a heterogeneidade observada quando comparamos em conjunto as cinco gerações ocorre por conta da geração F₄. Provavelmente, a baixa mortalidade verificada para esta última geração, seja devida a adaptação à infecção esquistossomótica, atingida pelos moluscos daquela geração.

Nossos dados, foram concordantes em parte, com

aqueles obtidos por RUIZ (1957). O referido autor, encontrou índices de mortalidade que variaram de 0% a 15%, aos 30 dias da infecção. Nossos resultados estiveram entre 0% a 10% em igual período de tempo de infecção.

Outros autores, tem apontado índices de mortalidade de mais elevados em relação aos nossos (MAGALHÃES, 1969; COELHO, 1962, BASTOS 1975).

Tendo obtido populações de moluscos altamente suscetíveis às linhagens autóctones, verificamos que B. tenagophila das gerações F₃ e F₄, e B. glabrata da geração F₃, mostram elevados índices de infecção quando expostos as linhagens alopátricas do S. mansoni.

Pelos nossos resultados, podemos admitir a possibilidade de uma futura melhor adaptação das populações de B. tenagophila de São Paulo, às linhagens simpátricas, alopátricas e parapátricas do S. mansoni.

Para confirmar a hipótese de que, a medida que fossem sendo selecionadas populações de moluscos, as cercárias eliminadas em cada geração, poderiam tornarem-se mais virulentas, contribuindo assim, para um aumento gradativo da patogenicidade em camundongos, foram realizadas infecções padronizadas desses animais. Estas infecções, foram feitas com cercárias eliminadas por caramujos das gerações F₂ e F₃ das linhagens SJ e BH de S. mansoni.

Nossos resultados referentes a mortalidade de camundongos, dentro de cada linhagem, considerando-se as infecções com cercárias das duas gerações, não apresentaram diferenças significativas, tendo-se encontrado valores de χ^2 iguais para ambas. Os χ^2 obtidos, tanto para a linhagem BH -

como para SJ, foram iguais a 0,46875 para 1 grau de liberdade. Entre linhagens, também não houve diferença significativa, sendo o χ^2 igual a 0,10416 para 1 grau de liberdade.

Índices muito baixos de mortalidade entre camundongos infectados, em relação aos nossos, foram obtidos por LEMOS NETO (1975). Este autor realizando pesquisas com as linhagens SJ e BH, utilizando cercárias eliminadas por caramujos não selecionados geneticamente, encontrou índices de mortalidade de 7,69% e de 14,2% em camundongos infectados com 100 a 200 cercárias da linhagem BH. Para a linhagem SJ, obteve percentuais de 7,69%, quando utilizava 100 ou 200 cercárias. Provavelmente, este fato tenha ocorrido, em virtude de em nossos camundongos tenham se desenvolvido a um maior número de cercárias.

Por outro lado, o número de granulomas hepáticos por verme, encontrados em nossos estudos, para ambas as linhagens, foram muito inferiores aos obtidos pelo autor acima referido.

Comparando-se estatisticamente, o número de vermes produzidos pelas linhagens BH e SJ, encontramos χ^2 igual a 0,2706, não significativo para grau de liberdade igual a 1.

Apesar do pequeno número de vermes desenvolvidos, MAGALHÃES (1976), verificou elevados índices de mortalidade em camundongos infectados com 100 a 200 cercárias das linhagens SJ e BH de S. mansoni.

Devido as limitações da nossa experiência, ficamos impossibilitados de chegar a uma conclusão satisfatória, sobre um possível aumento da virulência das cercárias procedentes de caramujos de diferentes gerações. Ficando o assunto

to, como sugestão para um futuro estudo mais detalhado.

Nossos resultados das análises pela imunofluorescência indireta entre as linhagens paulista e mineira do S. mansoni, confirmaram os dados de LEMOS NETO (1975). Verificamos comportamento semelhantes, tanto para os antissoros absorvidos, como para os não absorvidos. Estes resultados indicam a existência de determinantes antigênicos comuns às duas linhagens.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

Populações de B. tenagophila e de B. glabrata, apresentando elevados índices de infecção às linhagens de S. mansoni de São José dos Campos e de Belo Horizonte, foram obtidas por seleção, utilizando-se a auto-fecundação através de várias gerações.

Para a obtenção dessas populações altamente suscetíveis, partimos de uma população inicial de cada espécie, a qual denominamos de parental "P". Os moluscos da geração parental, revelaram-se menos suscetíveis à infecção pelo S. mansoni. A partir da geração F_1 para B. glabrata e F_2 para B. tenagophila, foram obtidos no 100º dia da exposição aos miracídios, índices de infecção acima de 90,0%. Nossos estudos foram realizados até a 4a. geração.

Investigamos também, o comportamento de B. tenagophila das gerações F_3 e F_4 , e de B. glabrata da geração F_3 , frente as linhagens alopátricas do S. mansoni. Foram obtidos índices de infecção que variaram de 55,0% a 90,0% para B. tenagophila exposta a linhagem mineira. Moluscos B. glabrata expostos a linhagem paulista, apresentaram índices de infecção de 30,0%.

Os índices de mortalidade nas populações de moluscos infectados com as linhagens sinpátricas, variaram de 33,3% a 73,3% para B. glabrata e de 16,6% a 50,0% para B. tenagophila.

Na populações expostas as linhagens alopátricas,

verificamos mortalidade dentro desses limites.

Em todas as gerações B. glabrata eliminou mais cercárias do que B. tenagophila.

Com as cercárias procedentes de moluscos das gerações F_2 e F_3 , infectamos comundongos albinos (Mus musculus). Verificamos que o número de esquistossomos recuperados, não revelou diferenças significativas entre gerações, nem mesmo, entre as linhagens. Em termos de mortalidade, também não foram constatadas diferenças significativas, nem entre as gerações, nem entre as linhagens.

As análises pela imunofluorescência indireta com cercárias pertencentes as linhagens paulista e mineira, revelaram títulos iguais a 1:2048 quando utilizava-se antissoros não absorvidos. Quando absorvidos com 3.000 cercárias heterólogas, estes antissoros foram positivos até a diluição de 1:256 em ambas as linhagens.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que :

- a) moluscos das espécies B. tenagophila e B. glabrata, através da seleção, tornam-se altamente suscetíveis tanto a linhagem simpátrica, como a linhagem alopátrica do S. mansoni.
- b) existem determinantes antigênicos comuns às linhagens paulista e mineira do S. mansoni.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVIM, M.C. - Suscetibilidade de B. glabrata e B. straminea do Maranhão a uma cepa simpátrica de Schistosoma mansoni. Belo Horizonte, 1974. Tese - Departamento de Zoologia e Parasitologia Inst. de Ciências Biológicas Universidade - Federal de Minas Gerais.
- ANDERSON, R.S. & GOOD, R.A. - Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes. J. Invertebr. Pathol., 27 (1) :57-64, 1976.
- ANDRADE, R.M. & MARTINS, R.S. - Contribuição para conhecimento dos criadouros de planorbídeos no Distrito Federal. II. Resultado geral das pesquisas efetuadas para a localização de focos de transmissão da esquistossomose mansoni. Rvta bras. Malar. Doenç trop., 8:379-385, 1956
- ANTUNES, P.A.A. - A esquistossomíase em São Paulo: estudos epidemiológicos da esquistossomíase na baixada de Santos. Anais X Congr. Brasil. Hig., Belo Horizonte, 393-397, 1953
- AZEVEDO, J.F. FARO, M.M. & PEQUITO, M.M. - Estudo do desenvolvimento do Australorbis glabratus olivaceus em relação com a alimentação, natureza da água e luminosidade. Anais Inst. Med. trop. 17(1-2): 37-50, 1960.
- BARBOSA, F.S. & COELHO, M.V. - Qualidades de vetor dos hospedeiros de S. mansoni no Nordeste do Brasil. I - suscetibilidade de A. glabratus e T. centimetalis à infestação por S. mansoni. Publ. Av. Inst. Aggeu Magalhães, 3 (3):55-62, 1954.

- BARBOSA, F.S. ; COELHO, M.V. & DOBBIN, JR., J.E. - Qualidades de vetor dos hospedeiros de Schistosoma mansoni no Nordeste do Brasil. II - Duração de infestação e eliminação de cercárias em Australorbis glabratus. Publ. Av. - Inst. Aggen Magalhães, 3(7):79-92, 1954.
- BARBOSA, F.S. - A note on Biomphalaria straminea (DUNKER , 1848) from Manaus, State of Amazonas, Brasil. Revta Soc. Bras. Med. trop., 2(2):77-78, 1968.
- BARBOSA, F.S. & FIGUEIREDO, T. - Susceptibility of the - snail intermediate hosts of schistosomiasis from North-eastern Brazil to the infection with Schistosoma mansoni. Revta. Inst. Med. trop. S.Paulo, 12 (3):198-206, 1970.
- BARBOSA, F.S. - Survival and cercaria production of Brazilian Biomphalaria glabrata and Biomphalaria straminea infected with Schistosoma mansoni. J. Parasit., 61 (1): 151-152, 1975.
- BARRETO, A.C. & BARBOSA, F.S. - Qualidades de vetor dos hospedeiros de Schistosoma mansoni no Nordeste do Brasil. IV - Eliminação de cercárias de S. mansoni por Australorbis glabratus de diâmetros diversos. Anais Soc. Biol. - Pernamb., 16 (1):13-18, 1959.
- BARRETO, A.C. - Esquistossomose mansônica na cidade de Salvador. Salvador, 1960. Tese.Faculdade de Farmácia, Univ. da Bahia.

- BARRETO, A.C. - Esquistossomose mansônica na cidade de Salvador. Estudo do vetor, relações parasito-hospedeiro e aspectos epidemiológicos. Bol. Fund. Gonçalo Muniz, 16 : 1-80, 1960.
- BARRIOS-DURAN, L.A. - An efficient device for exposing mice to schistosoma cercariae and holding small animal for post-mortem examination. J. Parasit., 41:641-642, 1955.
- BASCH, P.F. - Parasitological review - Intermediate host specificity in Schistosoma mansoni. Exol. Parasit. 39, 150 - 169, 1976.
- BASTOS, O.C. - Estudo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens humana e silvestre do Schistosoma mansoni Sambon, 1907. Campinas, 1975. Tese Inst. de Biolo. Univ. de Campinas.
- BIGUET, J. ; ROSÉ, F.; CAPRON, A. & TRAN VON KY, P. - 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. Revue Immunol., 29 (1-2):5-30, 1965.
- BRENER, Z.; PELLEGRINO, J. & OLIVEIRA, F.D. - Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. Aplicação do método de isolamento de granulomas do fígado de camundongos. Revta bras. Malar. Doenc trop., 8 (4):583-587, 1956.
- BRENER, Z. - Esquistossomose experimental. Rvta bras. Malar Doenc trop., 11:473-506, 1959.

- BROOKS, C.P. - A comparative study of Schistosoma mansoni -
in Tropicorbis havanensis and Australorbis glabratus. J
Parasit., 32 (2): 1959-165, 1953.
- BRUMPT, E. - Observations biologiques diverses concernant
Planorbis (Australorbis) glabratus hôte intermédiaire de
Schistosoma mansoni. Ann. Parasitol., 18(1-3):9-45, 1941.
- CAMARGO, M.E. - Introdução às técnicas de imunofluorescên-
cia. (Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 1968,
mimeografado).
- CHIEFFI, P.P. - Suscetibilidade à infecção por Schistosoma
mansoni, de cepas de Biomphalaria tenagophila originá -
rias dos Estados de São Paulo e Paraná. Revta Inst. Med.
trop. S. Paulo, 17 (2): 92-96, 1975.
- CODA, D.; FALCI, N. & MENDES, F.A.T. - Contribuição para o
estudo e a profilaxia da esquistossomose mansônica no es-
tado de São Paulo. Revta Inst. Adolfo Lutz 19:25-68, 1959.
- COELHO, M.V. - Ação das formas larvárias de Schistosoma -
mansoni sobre a reprodução de Australorbis glabratus .
Publ. Av. Inst. Aggeu Magalhães, 3:39-54, 1954.
- COELHO, M.V. & BARBOSA, F.S. - Qualidades de vetor dos hos-
pedeiros de Schistosoma mansoni no Nordeste do Brasil.
III - Duração da infestação e eliminação de cercárias em
Tropicorbis centimetralis. Publ. Av. Inst. Aggeu Maga -
lhães, 5(3):21-29, 1956.
- COELHO, M.V. - Aspectos do desenvolvimento das formas lar-
vais de Schistosoma mansoni em Australorbis nigricans.
Revta bras. Biol. 17: 325-337, 1957.

- COELHO, M.V. - Suscetibilidade de Australorbis tenagophilus à infecção por Schistosoma mansoni. Revta Inst. Med. trop. S. Paulo, 4 (5): 289-295, 1962.
- CORRÊA, R.R.; CODA, D. OLIVEIRA, U.A. - Um foco autóctone de esquistossomose no vale do Paraíba. Folia clin. biol., 26: 85-90, 1956.
- CORRÊA, R.R.; PIZA, J.T.; RAMOS, A.S. & CAMARGO, L.V. - Planorbídeos do estado de São Paulo: sua relação com a esquistossomose. Archos Hig. Saúde públ., 27: 139-159, 1962.
- COUTINHO, J.O. - Contribuição para o estudo de hospedadorin intermediário do Schistosoma mansoni em Santos, São Paulo. Revta clin. S. Paulo, 25:31-38, 1949.
- COUTINHO, J.O. - Contribuição ao estudo da esquistossomose mansônica no Estado da Bahia - Brasil. Archos Hig. Saúde públ., 16(17): 3-42, 1951.
- COUTINHO, J.O. - Nota sobre a infestação experimental do Australorbis nigricans (Spix) do Município de São Paulo, pelo Schistosoma mansoni. Archos Fac. Hig. Saúde públ. Univ. S. Paulo, 10:61-64, 1956.
- CRAM, E.B.; FILES, V.S. & JONES, M.F. - Experimental molluscan infection with Schistosoma mansoni and Schistosoma haematobium. Natl. Inst. Hlth Bull., 189:81-94, 1947.
- COWPER, S.G. - Observations on the life-cycle of Schistosoma mansoni in the laboratory, with a discussion on the snail vectors of S. mansoni and S. haematobium. Ann Trop. Med. Parasit., 41:173-177, 1947.

- DEANE, L.M.; MARTINS, R.S. LOBO, M.B. - Um foco ativo de esquistossomose mansônica em Jacarepaguá, Distrito Federal. Revta bras. Malar. Doenc trop., 5:249-252, 1953.
- FAUST, E.C. & HOFFMAN, W.A. - Studies on Schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III - Biological studies, I the extra mammalian phases of the life cycle. J. publ.Hlth trop. Med., 10 : 1-97, 1934.
- FILES, V. & CRAM, E.B. - A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of Schistosoma mansoni, J. Parasit., 35:555-560, 1949.
- FILES, V.S. - Study of the vector-parasite relationships - in Schistosoma mansoni. Parasitology, 41:264-269, 1951.
- GIOVANNOLA, A. - Some observations on the emission of cercariae of S. mansoni from A. glabratus. Proc. helminth. Soc. Wash., 3(2):60-61, 1936.
- HILL, J. - Chemotherapeutic studies with laboratory infections of Schistosoma mansoni. Ann. trop. Med. Parasit., - 50:39-48, 1956.
- HUBENDICK, B. - A possible method of schistosome-vector control by competition between resistant and susceptible strains. Bull. Org. Mond. Santé, 18(5-6):1113-1116, 1958.
- KAGAN, I.G & GEIGER, S.J. - The susceptibility of three - strains of Australorbis glabratus to Schistosoma mansoni from Brazil and Puerto Rico. J. Parasit., 51(4): 622-627, 1965.

- KAWAZOE, U. - Alguns aspectos da biologia de Biomphalaria glabrata (SAY, 1818) e Biomphalaria tenagophila (D'ORBIGNY, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). Belo Horizonte, 1975. Tese Departamento de Zoologia e Parasitologia. Inst. de Ciências Biológicas. Univ. Fed. de Minas Gerais.
- KUNTZ, R.E. - Effect of light and temperature on shedding of S. mansoni cercariae. Nav. Med. Res. Inst. Bethesda, 7:1-16, 1946.
- LAGRANGE, E.; SCHEECOMANS, G. & PROMEL, R. - Sur diverses modalités d'infestations dos Planorbis glabratus par Bilharzia mansoni. C. r. Séanc. Soc. Biol., 143: 1605, 1949.
- LEMOS NETO, R.C. - Estudo comparativo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens mineira e paulista do Schistosoma mansoni Sambon, 1907. Campinas, - 1975.
Tese Inst. de Biologia Univ. Estadual de Campinas.
- MAGALHÃES, L.A. - Estudo dos dados obtidos de uma população de Biomphalaria glabrata de Belo Horizonte infectada por Schistosoma mansoni da mesma cidade, e de uma população de B. tenagophila de Campinas, infectada por S. mansoni de São José dos Campos. Revta Soc. bras. Med. - trop., 3 (4): 195-196, 1969.
- MAGALHÃES, L.A. - Estudo do comportamento da cepa de S. mansoni de Brasília. Hospital, Rio de Janeiro, 77 (2): 273-283, 1970.

- MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. - Sobre o comportamento - de duas linhagens de Schistosoma mansoni Sambon, 1907. Proposição para método de estudo quantitativo. Revta Soc. bras. Med. trop., 10, 1976 (no prelo).
- MARTINS, R.S. - Focos ativos de esquistossomose em Niteroi, Estado do Rio de Janeiro. Revta bras. Malar. Doenç trop., 9: 361-364, 1957.
- MOURA, S.A.L. - Schistosoma mansoni autóctone em Santos. Revta Inst. Adolfo Lutz, 5:279-311, 1945.
- MOURA, S.A.L. - Contribuição do Laboratório Regional de Santos na epidemiologia da esquistossomose mansoni em Santos. Revta Inst. Adolfo Lutz, 12: 97-109, 1952.
- NEWTON, W.L. - The comparative tissue reaction of two strains of A. glabratus to infection with Schistosoma mansoni. J. Parasit., 38(4):362-366, 1952.
- NEWTON, W.L. - The inheritance of susceptibility to infection with Schistosoma mansoni in Australorbis glabratus. Expl. Parasit., 2:242-257, 1953
- NEWTON, W.L. - The establishment of a strain of Australorbis glabratus which combines albinism and high susceptibility to infection with Schistosoma mansoni. J. Parasit., 41 : 526-528, 1955.
- OLIVER, L. & STIREWALT, M.A. - An efficient method for exposure of mice to cercariae of Schistosoma mansoni. J. Parasit., 38 : 19-23, 1952.

- PARAENSE, W.L. & SANTOS, J.M. - O sexo do Schistosoma mansoni nas infestações produzidas por cercárias de um único molusco. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 47:35-49, 1949.
- PARAENSE, W.L. & DESLANDES, N. - Australorbis nigricans as the transmitter of schistosomiasis in Santos, state of S. Paulo. Revta bras. Malar. Doenç trop., 8:235-245, 1956.
- PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. - Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do Schistosoma mansoni no Brasil. Apresentado na XV Reunião da SBPC, Campinas, 1963.
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. - Variation in susceptibility of populations of Australorbis glabratus to a strain of Schistosoma mansoni. Revta Inst. Med. trop. S.Paulo, 5 (1) :15-22, 1963.
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. - Susceptibility of Australorbis tenagophilus to infection with Schistosoma mansoni. Revta Insc. Med. trop. S.Paulo, 5 (1): 23-29, 1963.
- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D.G. - A simplified method for the concentration of cercariae. J. Parasit., 41 (3) : 329-330, 1955.
- PELLEGRINO, J. & BRENER, Z. - Method for isolating Schistosoma granulomas from mouse liver. J. Parasit., 42 (6):564, 1956.
- PEREIRA, O. & DESLANDES, N. - Resultados de uma tentativa para determinar a idade de Australorbis glabratus (Say, 1818). Revta Serv. esp. Saúde públ., Rio de J., 4 (2) :433-465, 1954.

- PERLOWAGORA, S.A. - Studies on the biology of Australorbis glabratus, schistosome-bearing brasilian snail.
Revta bras. Malar. Doenc trop., 10 (4) : 459-529, 1958.
- PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H. & FIGUEIREDO, C.G.
A esquistossomose no vale do Paraíba. Revta. Inst. Adolfo Lutz, 19 : 97-143, 1959.
- PIZA, J.T. & RAMOS, A.S. - Os focos autóctones da esquistossomose no estado de São Paulo. Archos Hig. Saúde públ., 25 : 261-271, 1960.
- PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H.; CAMARGO, L.S.V. & GONÇALVES, J.R. - Descoberta de um foco autóctone de esquistossomose em Caçapava. Archos Hig. Saúde públ., 25 : 181-184, 1960.
- PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H.; FIGUEIREDO, C.G. & CAMARGO, L.S.V. - Vale do Paraíba, foco endêmico de esquistossomose. Archos Hig. Saúde públ., 25 : 35-40, 1960.
- RAMOS, A.S.; PIZA, J.T. & CAMARGO, L.S.V. - Observações sobre Australorbis tenagophilus, transmissor da esquistossomose mansônica. Archos Hig. Saúde Públ., 26 : 121-124, 1961.
- RICHARDS, C.S. - Genetics of a molluscan vector of Schistosomiasis. Nature, 227 : 806-810, 1970.
- 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 (4) : 425-434, 1972.

- RICHARDS, C.S. - Susceptibility of adult Biomphalaria glabrata to Schistosoma mansoni infection. Am. J. trop. Med. Hyg., 22 (6): 748-756, 1973.
- RICHARD, C.S. - Genetic factors in susceptibility of Biomphalaria glabrata for different strains of Schistosoma mansoni. Parasitology, 70:231-241, 1975.
- RILEY, V. - Adaptation of orbital bleeding technique to rapid serial blood studies. Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 104 : 751, 1960.
- RIPSON, C.A. - Reproduction of the time factor in rearing Australorbis glabratus. Am. Midl. Nat., 42 (3): 757-758, 1949.
- RITCHIE, D.S.; BARRIOS-DURAN, L.A. & DEWEESE, R. - Biological potentials of Australorbis glabratus : growth and maturation. J. Trop. Med. Hyg., 12 (2) : 264-268, 1963.
- RUIZ, J.M. - Contribuição ao estudo das formar larvárias de trematóides brasileiros. 2 Fauna de Santos, Estado de São Paulo. Mem Inst. Butantan, 24: 17 - 36, 1952.
- RUIZ, J.M. - Esquistossomose experimental. 5. dados sobre a infestação experimental de "Biomphalaria tenagophila" (ORBIGNY) e "Australorbis glabratus" (SAY). Revta. bras. Biol., 17 (2) ; 179-185, 1957.
- SADUN, E.H.; WILLIAMS, J.S. & ANDERSON, R.I. - Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of schistosomiasis in human. Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 105 : 289-291, 1960.

- SCHREIBER, F.C. & SCHUBERT, M. - Experimental infection of the snail Australorbis glabratus with the trematode Schistosoma mansoni and the production of cercariae. J. Parasit., 35: 91-100, 1949.
- SCHREIBER, F.G. & SCHUBERT, M. - Experimental infection of the snail Australorbis glabratus with trematoda Schistosoma mansoni and the production of cercariae. J. Parasit., 35 : 77-200, 1949.
- SNEDECOR, G.W. - Métodos de Estadística; su aplicación a experimentos en Agricultura y Biología. Trad. de A. Marino. Buenos Aires, Acme Agency, 1948.
- STANDEN, O.D. - Experimental schistosomiasis. II. Maintenance of Schistosoma mansoni in the laboratory with some notes on experimental infection with S. haematobium. Ann. Trop. Med. Parasit., 43 (3-4) : 263-283, 1949.
- STANDEN, O.D. - The effect of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova of S. mansoni. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg., 45: 225-241, 1951.
- STANDEN, O.D. - 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. Parasitol., 46 (1) : 48-52, 1952.
- STANDEN, O.D. - Experimental schistosomiasis. III. Chemotherapy and mode of drug action. Ann trop. Med., 47 : 26-43, 1953.

- STIREWALT, M.A. - Effect of snail maintenance temperatures on development of Schistosoma mansoni. Expl. Parasit., 3(6) : 504-516, 1954.
- STIREWALT, M.A. & BRONSON, J.F. - Description of a plastic mouse restraining case. J. Parasit., 41: 328, 1955.
- STUNKARD, H.W. - Possible snails hosts of human schistosomes in the United States. J. Parasit., 32 : 539-552, 1946.
- STURROCK, R.F. & STURROCK, B.M. - Observations on some factors affecting the growth rate and fecundity of Biomphalaria glabrata (SAY). Ann Trop. Med. Parasit., 64 (3) : 349-355, 1970.
- STURROCK, B.M. & STURROCK, R.F. - Laboratory studies of the host-parasite relationship of Schistosoma mansoni and Biomphalaria glabrata from St. Lucia, West Indies. Ann. Trop. Med. Parasit., 64 (3): 357-363, 1970.
- TRAVASSOS, L. - Algumas observações sobre a bionomia do Schistosoma mansoni Sambon, 1907, feitas na cidade do Salvador, Bahia. Anais Acad. bras. Cienc., 25 (2): 157 - 165, 1953.
- TRIPP, M.R. - The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail Australorbis glabratus. J. Parasit., 47:745-751, 1961.
- VOGEL, H. - Infektionsversuche an verschiedenen Bilharzia-Zwischenwirten mit einem einzelnen Mirazidium von Bilharzia mansoni und B. japonica. Zentbl. Bakt. Parasitkde, 148 : 29-35, 1941.

WRIGHT, C.A. & ROSS, G.C. - Electrophoretic studies of -
blood and egg proteins in Australorbis glabratus (Gas -
tropoda, Planorbidae). Ann. Trop. Med. Parasit., 57 :
47-51, 1963.

WRIGHT, W.H. - The snail factor in the epidemiology of bi-
lharziasis. Wld. Hlth. Org., 15:17, 1952.

YOLLES, T.K.; MOORE, D.V.; DE GINSTE, D.L.; RIPSON, C.A. &
MELENEY, H.E. - A technique for the perfusion of labora-
tory animals for the recovery of Schistosomes.
J. Parasit., 33 : 419-426, 1947.

As referências bibliográficas citadas neste trabalho, estão
de acordo com as normas da :

- WORLD MEDICAL PERIODICALS, 3 ed. New York, World
Medical Associations, 1961.

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - Normaliza-
ção da documentação no Brasil. 2ª ed. Rio de Janeiro.
Instituto Brasileiro de Bibliografia e Documentação,
1964.