

## COMPORTAMENTO EXPERIMENTAL DE AMOSTRAS DE *SCHISTOSOMA MANSONI* EM RELAÇÃO ÀS FORMAS CLÍNICAS DE ESQUISTOSSOMOSE. I – ESTUDO EM CAMUNDONGOS

MARIA JOSÉ CONCEIÇÃO & JOSÉ RODRIGUES COURA

*Como já descrevemos em publicação anterior (Conceição, 1985), foram isoladas 20 amostras de S. mansoni de pacientes do sexo masculino com idades entre 13 e 30 anos, autóctones do distrito de Capitão Andrade, município de Itanhomi, no Vale do Rio Doce, em Minas Gerais. Das amostras, seis eram portadores de esquistossomose-infecção (tipo I), seis da forma hepatointestinal (tipo II) e oito da forma hepatoesplênica (tipo III), adaptadas, inicialmente, à B. glabrata da mesma área.*

*Cada uma das amostras foi inoculada em 48 camundongos em lotes de 16, respectivamente com 25, 50 e 100 cercárias, mantendo-se 12 animais não infectados, como controles. Após 90 dias perfundiou-se o sistema porta de 12 animais (quatro de cada lote).*

*Os animais mortos naturalmente em diversos períodos e a metade de cada lote sacrificada aos 90 e 180 dias foram estudados através dos seguintes parâmetros: 1º) determinação dos pesos de fígado, baço, pulmão e intestino; 2º) contagem de ovos em intestinos delgado (proximal e mediano) e grosso (distal).*

*O número de vermes obtidos pela perfusão nos três grupos foi em média de 21,9%, 22% e 17,8% para os tipos I, II e III. A mortalidade natural média dos camundongos submetidos à infecção com 25, 50 e 100 cercárias, foi respectivamente, 12,4%, 23,2% e 40,2% para o grupo I; de 4,7%, 19,3% e 22,2% para o grupo II e 11,4%, 29,5% e 41,6% para o grupo III, apresentando-se, portanto, proporcional aos inóculos.*

*O peso dos órgãos dos animais infectados bem como o número de ovos de S. mansoni foi sempre proporcional ao inóculo e a contagem mais elevada nas partes mediana e proximal do intestino nos três grupos.*

*Concluiu-se que não houve correlação entre as formas clínicas da esquistossomose e o comportamento das amostras de S. mansoni em camundongo, ressaltando-se que as alterações parasitológicas encontradas foram proporcionais ao inóculo empregado e ao tempo de infecção, evidenciando os aspectos quantitativos na determinação da doença.*

Palavras-chave: esquistossomose – comportamento experimental – amostras de *Schistosoma mansoni* – camundongos – formas clínicas

Diversas publicações têm mostrado diferenças entre cepas geográficas de *S. mansoni* no que se refere à patogenicidade em mamíferos, evidenciadas nas publicações, entre outros, de Saoud (1965), Warren (1967), Magalhães & Carvalho (1969a, b), Anderson & Cheever (1972), Lemos-Neto (1975), além de Andrade & Sadigursky (1985).

Os estudos de correlação entre o comportamento experimental de cepas de *S. mansoni* e formas clínicas da esquistossomose são relativamente poucos e recentes. Costa (1980); Costa & Katz (1982); Costa, Rocha & Katz (1984), compararam em camundongos cepas de *S. mansoni* de Belo Horizonte de pacientes com as formas toxêmica, intestinal e hepatoesplênica e não observaram diferenças significativas entre essas cepas.

Na presente pesquisa nosso objetivo foi determinar a existência ou não de correlação entre o comportamento experimental em camundongos de amostras de *S. mansoni* com a gravidade da doença dos respectivos pacientes de quem foram isoladas.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foram isoladas 20 amostras de *S. mansoni*, seis de pacientes com a forma intestinal (tipo I), seis outras de pacientes com a forma hepatointestinal (tipo II) e oito de pacientes com a forma hepatoesplênica (tipo III).

---

Trabalho realizado com auxílio financeiro do CNPq nos Departamentos de Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz – Caixa Postal 926, 20000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil e Medicina Preventiva da UFRJ.

Recebido para publicação em 28 de maio e aceito em 11 de setembro de 1985.

A partir das fezes procedentes de cada um dos 20 pacientes foram obtidas a eclosão e concentração de miracídios pela técnica de Chaia (1956).

Para cada uma das amostras um total de 20 bionfalárias (diâmetro de 0,7 a 1 cm) da linhagem L<sub>3</sub> foram expostas, individualmente, a cinco miracídios.

Para cada uma das 20 amostras foram infectados experimentalmente 48 camundongos albinos, machos, de 21 dias, com peso variável entre 8 e 11 gramas, infectando-se 16 com 25 cercárias, 16 com 50 e 16 com 100 cercárias, mantendo-se ainda um grupo-controle de 12 camundongos para cada amostra. No total foram estudados 1.200 animais, ou seja 60 para cada uma das amostras (960 infectados e 240 controles).

Para infecção dos camundongos de cada amostra obtinham-se cercárias dos respectivos grupos de moluscos, que eram contadas em número de 25, 50 e 100 e colocadas em recipientes individuais de plástico, com diâmetro de 4,5 cm e altura de 2 cm, com um orifício lateral de 0,5 cm de diâmetro para introdução da cauda do camundongo. Após a contagem das cercárias acrescentava-se água desclorada até o nível inferior ao do orifício e procedia-se à homogeneização do líquido.

O contacto da cauda do camundongo com o líquido sob a ação do foco de luz tinha a duração de 60 minutos. Decorrido esse prazo o animal era retirado e o líquido era corado com lugol e anotado o número de cercárias que persistiam no recipiente para se estimar o total de cercárias que penetraram.

Decorridos 90 dias de infecção procedeu-se à perfusão do sistema porta de 12 camundongos de cada grupo, dos quais quatro infectados com 25 cercárias, quatro com 50 e quatro com 100, empregando-se a técnica de Radke, Berrios-Duran & Moran (1961) adaptada por Paraense & Corrêa, no Departamento de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz. Contavam-se os vermes machos e fêmeas (por meio de microscópio estereoscópico, marca Zeiss com aumento de 160 vezes), os quais eram mantidos em solução salina a 0,9%, em frascos individuais para cada amostra.

Avaliamos a virulência pelo número de dias que os animais sobreviveram após o término do período pré-patente.

A metade dos demais animais dos grupos infectados e dos controles foi sacrificada por secção medular aos 90 dias e o restante aos 180 dias. O peso do fígado, baço, pulmão e intestino foi determinado em grama através de uma balança analítica (marca Owa Labor).

Para a contagem de ovos de *S. mansoni* no intestino três segmentos de 2 cm foram seccionados, distendidos e comprimidos entre lâmina e lamínula das seguintes partes: a) proximal (abaixo do piloro), b) mediana (distância média entre o piloro e o ceco), e c) distal (distância média entre o ceco e o reto), segundo adaptação da técnica de Brener (1956).

## RESULTADOS

Os resultados encontrados no decorrer desta pesquisa foram submetidos à análise da variância considerando-se os componentes das diferenças das médias entre os grupos e dentro dos grupos (resíduos). Após a determinação da razão de variância (F), entre os diversos fatores estudados e os resíduos, naqueles casos onde se encontraram diferenças significativas para um nível de 0,05, procedeu-se à análise de contrastes entre as médias dos grupos, de acordo com o teste *t* de Student.

No grupo I a média de vermes através da perfusão do sistema porta dos camundongos ao final de 90 dias de infecção com o inóculo de 25 cercárias foi de 10,25% de machos e 10,90% de fêmeas com um total de 21,15%; com 50 cercárias foi de 6,08% de machos e 12,40% de fêmeas, com um total de 18,48%, e com 100 cercárias, 10,65% de machos e 8,69% de fêmeas, totalizando 19,34%.

No grupo II, com 25 cercárias obtiveram-se por perfusão 9,5% de vermes machos e 8,0% de fêmeas, num total de 17,5%. Com 50 cercárias perfundiram-se 13,0% de vermes machos e 6,6% de fêmeas, alcançando 19,6%. Nos animais infectados com 100 cercárias obtiveram-se 7,05% de machos e 10,0% de fêmeas, somando 17,05%.

No grupo III, com 25 cercárias recuperaram-se 16,0% de machos e 11,0% de fêmeas, somando 27,0%. Com 50 cercárias, 17,5% de machos e 10,5% de fêmeas, num total de 28,0%. Com 100 cercárias houve 9,5% de machos e 7,7% de fêmeas e um total de 17,2%. Os dados referentes à perfusão de vermes encontram-se na Tabela I.

A razão de variância (F) igual a 7,5 não mostrou diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ); no entanto, essa diferença existiu em relação à variância do inóculo, comparada à dos

resíduos. O contraste entre as médias dos inóculos pelo teste *t* indicou diferença significativa para o inóculo de 100 cercárias em relação aos de 50 e 25 ( $\bar{x}_3 - \bar{x}_1 : t = 0,5 < 0,05$ ;  $\bar{x}_3 - \bar{x}_2 : t = 0,3 < 0,05$ ).

TABELA I

Número e percentual médios de vermes obtidos após 90 dias de infecção no sistema porta de camundongos infectados com 25, 50 e 100 cercárias de amostras de *S. mansoni* isoladas de pacientes dos grupos I, II e III

Grupo	Inóculos								
	25			50			100		
	Nº de Vermes	Desvio Padrão	%	Nº de Vermes	Desvio Padrão	%	Nº de Vermes	Desvio Padrão	%
I	5,7	(1,6)	21,1	11,3	(3,2)	18,4	16,2	(3,1)	19,5
II	4,7	(2,4)	17,5	10,2	(5,1)	19,6	19,2	(4,4)	17,0
III	6,2	(3,1)	27,0	12,9	(4,4)	28,0	17,3	(4,8)	17,2
Total	5,5	(2,4)	21,9	11,5	(4,3)	22,0	17,1	(4,1)	17,8

F = 7,5 > 0,05 (NS).

Entre os camundongos do grupo I ocorreu a média de morte natural de 12,4%, 23,2% e 40,2% nos infectados, respectivamente, com 25, 50 e 100 cercárias, com sobrevida média dos animais de 106,8; 87,2 e 66,1 dias.

Nos animais do grupo II a média de mortalidade foi de 4,7%, 19,3% e 22,2% nos infectados, respectivamente, com 25, 50 e 100 cercárias, com sobrevida média dos animais de 88,6; 60,9 e 94,1 dias.

Nos animais do grupo III a média de mortalidade foi de 11,4%, 29,5% e 41,6%, nos infectados respectivamente, com 25, 50 e 100 cercárias, com sobrevida média dos animais de 67,6, 58,7 e 67,4 dias. Não se registrou mortalidade nos controles dos três grupos de infecção (Tabela II).

A razão de variância (F) foi de 4,6, sendo maior que a probabilidade de 0,05, portanto, não significativa (NS) quando comparada à variância dos resíduos (dentro dos grupos).

A análise de variância referente aos componentes das diferenças entre as médias de animais mortos, naturalmente, após a infecção com as amostras dos três grupos, revelou razão de variância (F) de 5,1 > 0,05. Esse resultado não indicou diferença significativa entre os grupos.

TABELA II

Distribuição da média de mortalidade natural de camundongos infectados com 25, 50 e 100 cercárias de amostras de *S. mansoni* isoladas de pacientes dos grupos I, II e III

Inóculo	Sobrevida média		Número de animais mortos		
	Dias	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	%
Grupo I					
25	106,8	(0,5)	1,5	(0,1)	12,4
50	87,2	(0,6)	2,8	(0,4)	23,5
100	66,1	(0,4)	4,8	(0,5)	40,2
Grupo II					
25	88,6	(0,5)	1,0	(0,3)	4,7
50	60,9	(0,4)	2,3	(0,3)	19,3
100	94,1	(0,5)	2,6	(0,4)	22,2
Grupo III					
25	67,6	(0,5)	1,3	(0,2)	11,4
50	58,7	(0,4)	3,6	(0,6)	29,5
100	67,4	(0,4)	5,0	(0,5)	41,6

F = 4,6 > 0,05 NS; F = 5,1 > 0,05 NS.



Na Tabela III apresenta-se o número mediano de ovos de *S. mansoni* em intestinos proximal, mediano e distal nos camundongos sacrificados ao final de 90 e 180 dias, pertencentes aos grupos I, II e III, com os inóculos de 25, 50 e 100 cercárias.

TABELA III

Distribuição do número mediano de ovos de *S. mansoni* em intestino delgado (proximal e mediano) e grosso (distal) de camundongos infectados com 25, 50 e 100 cercárias de amostras isoladas de pacientes dos grupos I, II e III

Número de Cercárias	Tempo de infecção (dias)					
	90			180		
	Número de ovos no intestino			Número de ovos no intestino		
	Proximal	Mediano	Distal	Proximal	Mediano	Distal
<b>Grupo I</b>						
25	136,0	169,5	0,0	215,0	221,5	11,0
50	196,0	332,0	1,0	342,5	298,0	41,0
100	868,5	1.068,5	0,0	830,0	753,5	35,0
<b>Grupo II</b>						
25	53,0	208,5	6,5	63,0	217,5	5,5
50	179,0	400,5	16,5	333,5	410,0	56,0
100	643,0	907,0	48,0	297,0	478,5	90,5
<b>Grupo III</b>						
25	181,0	265,0	7,5	178,5	245,0	35,0
50	305,0	718,0	72,5	613,5	887,0	50,1
100	867,5	878,5	163,5	943,0	1.353,0	77,0

$F = 3,2 > 0,05$  (NS).

Nas amostras do grupo I, após 90 dias de infecção, com os inóculos de 25 a 100 cercárias, o número mediano de ovos variou de 169,5 a 1.068,5; no grupo II de 208 a 907 e no grupo III de 265 a 878,5. Após 180 dias, no grupo I a variação foi de 221,5 a 753,5 no grupo II de 217 a 487,5 e no grupo III de 245 a 1.353.

Realizou-se a análise de variância dos componentes das diferenças entre as médias do número de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes em intestino delgado (proximal e mediano), e em intestino grosso (distal). A razão de variância (F) igual a 3,2 ( $> 0,05$ ), não mostrou diferença significativa entre os grupos. Essa diferença, também, não ocorreu ao se considerar, como fonte de variação, o tempo de infecção. No entanto, essa diferença foi significativa em relação ao inóculo.

Foram assinaladas na Tabela IV as variações das médias de peso (em grama) de fígado, baço, pulmão e intestino dos camundongos submetidos à infecção com 25, 50 e 100 cercárias e dos grupos-controle, após o tempo de infecção de 90 e 180 dias.

A média do peso de fígado nas amostras do grupo I após 90 dias, com os inóculos de 25 a 100 cercárias, foi de 1,60 a 1,89 (grupo-controle 1,38). No grupo II de 1,74 a 2,30 (controle 1,62) e no grupo III variou de 1,76 a 1,91 (controle 1,55). Depois de 180 dias de infecção no grupo I a variação foi de 1,78 a 2,23 (controle 1,61); no grupo II, 1,88 a 2,19 (controle 1,87) e no grupo III, 1,56 a 1,75 (controle 1,57).

A análise de variância dos componentes das diferenças entre as médias de peso de fígado, baço, pulmão e intestino dos camundongos, ao final de 90 e 180 dias, indicou o valor da razão de variância (F) igual a 4,9, não significativo entre os grupos, ao nível de 0,05, quando comparado aos resíduos.

TABELA IV

Distribuição do peso médio de fígado, baço, pulmão e intestino de camundongos infectados com 25, 50 e 100 cercárias de amostras isoladas de pacientes dos grupos I, II e III

Número de cercárias	Tempo de Infecção (Dias)							
	90				180			
	Peso dos órgãos (g)				Peso dos órgãos (g)			
	Fígado	Baço	Pulmão	Intestino	Fígado	Baço	Pulmão	Intestino
<b>Grupo I</b>								
25	1,60	0,18	0,22	4,80	1,78	0,20	0,21	5,44
50	1,64	0,22	0,23	5,43	2,23	0,26	0,23	6,81
100	1,89	0,24	0,27	5,84	1,92	0,32	0,23	6,47
Controle	1,38	0,15	0,20	4,58	1,61	0,14	0,19	5,12
<b>Grupo II</b>								
25	1,74	0,21	0,21	4,96	1,88	0,25	0,21	4,92
50	2,30	0,32	0,23	5,89	2,19	0,22	0,22	5,19
100	2,02	0,33	0,26	5,99	2,10	0,27	0,23	5,67
Controle	1,62	0,16	0,19	4,63	1,87	0,17	0,21	5,29
<b>Grupo III</b>								
25	1,77	0,26	0,24	5,81	1,56	0,18	0,20	5,50
50	1,76	0,26	0,25	5,49	1,59	0,27	0,25	5,55
100	1,91	0,26	0,25	5,50	1,75	0,34	0,32	6,17
Controle	1,55	0,15	0,19	4,43	1,57	0,16	0,23	5,33

F = 4,9 > 0,05 (NS).

## DISCUSSÃO

Ao se considerar a infecção esquistossomótica em camundongos, assinalou-se o período pré-patente, verificando-se que o tempo médio de eliminação de ovos nas fezes ocorreu em torno de 35 a 40 dias nos três grupos, com positividade de maior número de animais infectados com inóculos de 50 e 100 cercárias.

A infectividade foi o critério que expressamos pelo número de vermes recuperados em sistema porta 90 dias após a exposição às cercárias. Não houve diferença significativa nos três grupos, do mesmo modo que os resultados de Costa (1980); Costa & Katz (1982); Costa, Rocha & Katz (1983) ao compararem linhagens de *S. mansoni* de Belo Horizonte de pacientes com as formas toxêmica, intestinal e hepatoesplênica. No que se refere à perfusão de vermes machos e fêmeas, destacou-se o percentual de vermes recuperados, variável de 16 a 25% nos inóculos de 25, 50 e 100 cercárias, o que se aproximou da média em torno de 20%, registrada por Kuntz, Huang & Moore (1979), além de Stirewalt, Shepperson & Lincicome (1965).

A distribuição do peso médio em fígado, baço, pulmão e intestino indicou aumento proporcional, sobretudo em fígado, aos inóculos de 50 e 100 cercárias nos animais dos grupos I, II e III ao final de 90 e 180 dias. Não se distinguiram diferenças no peso dos órgãos entre os animais dos diversos grupos. O peso dos órgãos também foi considerado por Warren (1967) ao estudar cepas de Porto Rico, Brasil, Egito e Tanzânia, obtendo maior peso de fígado e baço, com a cepa do Brasil (BH).

No decorrer do estudo em camundongos verificamos que as amostras foram homogêneas em sua capacidade de penetração no hospedeiro e na patogenicidade.

## SUMMARY

Twenty isolates of *Schistosoma mansoni* were obtained from patients, all males 13 to 30 years old, autochthonous from the Village of Capitão Andrade, municipality of Itanhomi, state of Minas Gerais, where an evolutive study of Manson's schistosomiasis is being performed since 1973. The isolates came from six patients with schistosome-infections (type I), six with the hepato-intestinal form (type II), and eight with the hepatoesplenic form (type III).

Each isolate was inoculated in mice divided in three groups of 16, exposed to 25, 50 and 100 cercariae, respectively. Controls were 12 uninfected mice. After 90 days adult worms were recovered from the portal by perfusion, from four mice of each experimental groups.

Mice dying at various intervals and half of the rest of mice in each group sacrificed on the 90th and the 180th days were studied according to the following parameters: 1) weight of liver, spleen, lung and intestine; 2) egg count in the small intestine (proximal and medial) and large intestine (distal).

The average numbers of worms obtained by perfusion from groups I, II and III were 21.9%, 22% and 17.8% respectively. The average natural mortality rates of mice submitted to infection with 25, 50 and 100 cercariae were, respectively, 12.4%, 23.2% and 40.2% for group I, 4.7%, 19.5% and 22.2% for group II and 11.4%, 29.5% and 41.6% for group III, being therefore proportional to the inoculum.

The weight of the organs of the infected animals and the number of *S. mansoni* eggs was always proportional to the inoculum and the highest number of eggs were found in the median and proximal portion of the intestines in all three groups.

The conclusion was the following: there was no correlation between the clinical forms of schistosomiasis and the behaviour of the isolates of *S. mansoni* in mice, the parasitological alterations being proportional to the inoculum used and the duration of the infection.

Key words: schistosomiasis – experimental behaviour – isolates of *Schistosoma mansoni*  
– mice – clinical forms

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L.A. & CHEEVER, A.W., 1972. Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 46 :233-242.
- ANDRADE, Z.A. & SADIGURSKY, M., 1985. Um estudo comparativo entre cepas de Feira de Santana (Bahia) e Porto Rico do *Schistosoma mansoni* na infecção experimental. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80 :37-40.
- BRENER, Z., 1956. Observações sobre a infecção do camundongo pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 8 :565-575.
- CHAI, G., 1956. Técnica para concentração de miracídeos. *Rev. Bras. Malariol. D. Trop.*, 8 :355-357.
- CONCEIÇÃO, M.J., 1985. Comportamento experimental de amostras de *Schistosoma mansoni* em relação às formas clínicas da esquistossomose. Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 108 p. (Tese de Doutorado).
- COSTA, M.F.F.L., 1980. Estudo comparativo de linhagens de *S. mansoni* isoladas de pacientes que apresentavam forma toxêmica e forma intestinal de esquistossomose. Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, 123p (Tese de Mestrado).
- COSTA, M.F.F.L. & KATZ, N., 1982. Comparative study of *Schistosoma mansoni* strains isolated from patients with toxemic or intestinal forms of schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31 :499-504.
- COSTA, M.F.F.L.; ROCHA, R.S. & KATZ, N., 1984. Comparative study of *Schistosoma mansoni* isolated from patients with hepatosplenic and intestinal clinical forms of schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33 :918-923.
- KUNTZ, R.E.; HUANG, T.H. & MOORE, J.A., 1979. African baboon (*Papio cynocephalus*) infected with three strains of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 65 :463-464.
- LEMOS-NETO, R.C.A., 1975. Estudo comparativo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens mineira e paulista do *Schistosoma mansoni*. Sambon, 1907. Campinas, Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas, 68p. (Tese de Mestrado).
- MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F., 1969a. Determinação do número de cercárias provenientes de diferentes cepas de *S. mansoni* que conseguem penetrar sob determinadas condições de laboratório em *Mus musculus*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 13 :249-253.
- MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F., 1969b. Verificação do número de machos e fêmeas de *S. mansoni* capturados em camundongos infectados por duas cepas de helminto. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 13 :253-254.
- RADKE, M.G.; BERRIOS-DURAN, L.A. & MORAN, K., 1961. A perfusion procedure (Perf-o-suction) for recovery of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 47 :366-368.
- SAOUD, M.F.A., 1965. Comparative studies on the characteristics of some geographical strains of *Schistosoma mansoni* in mice and hamsters. *J. Helminth.*, 39 :101-112.
- STIREWALT, M.A.; SHEPPERSON, J.R. & LINCICOME, D.R., 1965. Comparison of penetration and maturation of *Schistosoma mansoni* in four strains of mice. *Parasitology*, 55 :227-235.
- WARREN, K.S., 1967. A comparison of Puerto Rican, Brazilian, Egyptian and Tanzanian strain of *Schistosoma mansoni* in mice: penetration of cercariae, maturation of Schistosomes and products of liver disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61 :795-802.