

DIMENSÕES DO GRANULOMA HEPÁTICO PRODUZIDO POR OVOS DE DUAS LINHAGENS GEOGRÁFICAS DO *SCHISTOSOMA MANSONI*, NO CAMUNDONGO

PAULO MARCOS Z. COELHO, PEDRO RASO, RÔMULO TEIXEIRA DE MELLO & NIVALDO H. TOPPA

Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 2486, 30161 Belo Horizonte, MG, Brasil

Size of hepatic granuloma produced by *Schistosoma mansoni* eggs (from two different geographic strains) in mice – The authors have determined the mean diameter of granulomas in the liver of mice infected with cercariae from two different and well definite geographic strains of *Schistosoma mansoni* (LE, Belo Horizonte, MG, and SJ, São José dos Campos, SP). A total of 1,170 granulomas has been measured. Granulomas measured on the 60th day after infection showed larger size than the other ones measured on the 90th day. Modulation of the immunopathologic response was significantly more efficient for the LE strain, whereas the granulomas (with 60 and 90 days) related to SJ strain were significantly larger. Data suggested a higher pathogenicity for the SJ strain. It is speculated whether these findings could explain, in part, the occurrence of regional variations of the anatomo-clinical forms of schistosomiasis.

Key words: *Schistosoma mansoni* – geographic strains – granuloma

Há muito se sabe que a estrutura e o volume dos granulomas provocados pelos ovos de *Schistosoma mansoni* se modificam de acordo com o tempo de evolução e o estado de reatividade do organismo. Porém, além dos fatores ligados ao indivíduo, como o estado imunológico, o órgão predominantemente lesado, etc., devem ser considerados outros relacionados com o parasito, como a intensidade da infecção, o número de exposições à mesma cepa ou a cepas diferentes, o número de vermes que escapam às defesas do organismo e, conseqüentemente, o número de ovos que se depositam nos tecidos.

Embora esteja muito bem estabelecido que o antígeno solúvel do ovo representa o elemento mais importante no determinismo das lesões, muito pouco ou quase nada se sabe sobre possíveis diferenças qualitativas e/ou quantitativas relacionadas a este tipo de antígeno, quando se consideram cepas geográficas do *S. mansoni*.

No presente estudo foram utilizadas duas linhagens brasileiras de *S. mansoni* bem caracte-

terizadas por aspectos biológicos e epidemiológicos. A cepa LE (BH), endêmica na região de Belo Horizonte, Minas Gerais, é uma cepa adaptada à *Biomphalaria glabrata* e foi isolada de um paciente. A cepa SJ (São José dos Campos, SP), endêmica no Vale do Paraíba, São Paulo, é uma cepa adaptada à *Biomphalaria tenagophila* e foi isolada a partir de *B. tenagophila* infectadas naturalmente, provenientes do Vale do Rio Paraíba, SP. Estas duas cepas, SJ e LE, estão sendo mantidas nos laboratórios do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE), da Universidade Federal de Minas Gerais, por períodos superiores a 10 anos (cepa SJ) e 25 anos (cepa LE).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 40 camundongos Swiss, machos, da mesma idade, de 20-25 g de peso. Exemplares de *B. glabrata* criados e infectados em laboratório, respectivamente com as cepas LE e SJ do *S. mansoni*, eram expostos à luz artificial para estimular a saída de cercárias. Estas eram obtidas em água sem cloro e concentradas segundo a técnica de Pellegrino & Macedo (1955), até o número aproximado de 120 larvas por ml. Cada camundongo recebeu 0,5 ml de suspensão cercariana (cerca de 60 larvas), inoculadas subcutaneamente no dorso

Trabalho financiado, em parte, pelo CNPq e FINEP.

Recebido em 12.09.88.

Accito em 05.01.89.

por meio de uma seringa Cornwall, provida de agulha nº 10. Vinte camundongos foram infectados com a cepa LE e vinte com a SJ. Dez animais de cada grupo foram sacrificados aos 60 e 90 dias após a infecção, por fratura cervical. O fígado foi seccionado em cortes transversais, com intervalos de 0,4 cm e todos os fragmentos foram fixados em solução de formol a 10%, incluídos em parafina, cortados com 5 µm de espessura e corados pela hematoxilina e eosina.

O diâmetro dos granulomas foi obtido por meio de uma ocular milimetrada Zeiss, adaptada a um microscópio binocular Zeiss, com objetiva 10 X. Cada divisão, no aumento usado (oc. 10 e obj. 10) equivale a 12 µm. Em média, foram medidos 20 granulomas por corte histológico.

Utilizou-se o teste t de Student para a análise estatística dos dados.

RESULTADOS

Achados histopatológicos

Animais com 60 dias de infecção

Cepa SJ – Nos animais estudados observou-se uma pequena variação apenas quanto à intensidade das lesões hepáticas. Apesar disso, de um modo geral, as lesões fundamentais eram semelhantes e se caracterizavam por: a) um grande número de granulomas nos tratos portais e intralobulares, por vezes confluentes, quase todos em cura por fibrose. Eram raros os granulomas na fase necrótico-exudativa. Em sua maioria exibiam neoformação conjuntiva com arranjo circular ou irregular e, às vezes, apresentavam capilares neoformados e semi-abertos, especialmente nas áreas periféricas. Quase sempre havia ovo de *S. mansoni* no centro do granuloma e, freqüentemente, escasso exsudato inflamatório granulocítico periférico; b) outra lesão era representada pelo fenômeno exsudativo exuberante, composto predominantemente por eosinófilos, difuso nos tratos portais e em focos múltiplos e pequenos dentro dos lóbulos. Os fenômenos regressivos dos hepatócitos eram intensos e se caracterizavam por degeneração hidrópica e vacuolar e, às vezes, por necrose por coagulação de hepatócitos isolados. A poliploidia era discreta. Havia moderada congestão portal e dos sinusóides. As células de Küpfer eram hipertróficas e hiperplásicas e continham pequena quantidade de pigmento esquistosso-

mótico. Em momento algum observaram-se lesões provocadas por vermes.

Cepa LE – As lesões fundamentais eram as mesmas assinaladas na cepa SJ. Todavia, a exsudação inflamatória e os fenômenos regressivos eram menos acentuados. Em um dos animais verificaram-se, com certa freqüência, microabscessos no centro dos granulomas. Além disso, havia ovos de *S. mansoni* circundados por eosinófilos que, às vezes, se encontravam no interior dos mesmos.

Animais com 90 dias de infecção

Cepa SJ – A lesão anatômica fundamental consistia na presença de numerosos granulomas, por vezes confluentes, tanto nos tratos portais quanto nos lóbulos. Todos os granulomas estavam na mesma fase evolutiva – curados por fibrose – e envolviam ovos de *S. mansoni* ou suas cascas. A fibrose dos granulomas era concêntrica e raramente de forma irregular, semelhante a um “ninho de passarinho”. A reação inflamatória era escassa nos lóbulos e acentuada nos tratos portais. Os hepatócitos mostravam discretos fenômenos regressivos e poliploidia discreta. Havia hiperplasia e hipertrofia das células de Küpfer que continham moderada quantidade de pigmento esquistossomótico. Ausência de vermes e de lesões por eles provocadas.

Cepa LE – De um modo geral, embora as lesões fossem as mesmas que as da cepa SJ, elas eram menos intensas. Observou-se um grande número de granulomas, de tamanhos variados, mas quase todos em fibrose, envolvidas por moderado exsudato inflamatório eosinofílico. Por vezes, a fibrose portal era difusa e se estendia entre grupos de hepatócitos. Fenômenos regressivos de hepatócitos eram mais discretos.

Medidas dos granulomas: o resultado das medidas dos granulomas com 60 e 90 dias das cepas SJ e LE estão resumidos na Tabela.

Os dados obtidos resultam das medidas da média do maior e do menor diâmetro de um total de 1.170 granulomas, ou seja: cepa SJ – 600 granulomas (300 com 60 e 300 com 90 dias); cepa LE – 570 (270 com 60 e 300 com 90 dias). A análise estatística destes dados mostra:

– que aos 60 dias, os granulomas quase todos no início de cicatrização, são maiores do que

os de 90 dias, em ambas as cepas. Os dos camundongos infectados com a cepa SJ eram maiores (diâmetro médio $291,4 \pm 21,9 \mu\text{m}$) do que os da cepa LE (diâmetro médio $230,0 \pm 12,9 \mu\text{m}$). As diferenças são estatisticamente significativas ($p < 0,001$);

- que os granulomas aos 90 dias de infecção, em fase mais avançada de cicatrização, também eram maiores nos camundongos infectados com a cepa SJ (diâmetro médio $254,2 \pm 11,0 \mu\text{m}$) do que os da cepa LE (diâmetro médio = $152,2 \pm 24,8 \mu\text{m}$);
- a modulação da resposta imunopatológica foi significativamente mais eficiente na cepa LE (LE — 60 dias = $230,0 \pm 12,9 \mu\text{m}$; 90 dias = $152,2 \pm 23,8 \mu\text{m}$. SJ — 60 dias = $291,4 \pm 21,9 \mu\text{m}$; 90 dias = $254,2 \pm 11,0 \mu\text{m}$). Em percentagem, a diminuição do tamanho dos granulomas dos 60 dias em relação aos de 90 dias foi para a cepa LE de 34% e para a SJ de 13%;
- tomando por base o tamanho e o número dos granulomas do fígado e a capacidade de modulação da resposta imunopatológica, parece que a cepa SJ é mais agressiva do que a LE. Estes dados são corroborados pelos achados histopatológicos.

DISCUSSÃO

Tendo como base a teoria de Darwin, 1859, aceita-se que o isolamento geográfico, com as conseqüentes dificuldades de intercâmbio de material genético entre duas populações de uma determinada espécie de ser vivente pode, no passar dos anos, em decorrência de mutações espontâneas e pela seleção natural, levar ao aparecimento de marcantes diferenças entre os indivíduos destas duas populações. Diferenças estas que podem estar relacionadas com a morfologia, fisiologia, comportamento, etc., e, conforme a intensidade destas alterações, seriam elas suficientes para determinar o aparecimento de raças, subespécies e, finalmente, com o impedimento de cruzamentos naturais, seja por incompatibilidade genética, diferenças morfológicas nos órgãos reprodutivos ou comportamento sexual, o aparecimento de espécies independentes.

No caso do *S. mansoni* os trabalhos pioneiros que mostraram diferenças entre raças geográficas do parasito foram relacionados com a adaptação de cepas geográficas do *S. mansoni* aos caramujos locais (Files & Cram, 1949; Newton,

1953; Barbosa & Barreto, 1960; Paraense & Corrêa, 1963).

A variação de virulência entre cepas geográficas de *S. mansoni* foi primeiramente estudada por Lurie & De Meillon em 1956. Estes autores compararam uma cepa do Egito com uma da África do Sul. Foram utilizados macacos, *Mastomys* e camundongos como hospedeiros. Entretanto, os resultados foram inconclusivos. Posteriormente, Saoud (1966) estudando quatro cepas de *S. mansoni* (Wellcome, Porto Rico, Egito e Tanzânia), verificou que cepa fornecida pelos Laboratórios Wellcome mostrou ser a mais virulenta e a da Tanzânia a menos, principalmente em relação à sobrevivência dos camundongos infectados. Este autor também verificou que a cepa de Porto Rico era a que produzia a maior quantidade de ovos e a do Egito a menor. É interessante ressaltar que a cepa cedida pelos Laboratórios Wellcome foi isolada no Egito e os procedimentos relativos ao processo de manutenção da cepa por 19 anos, em condições de laboratório, poderiam ter exercido uma seleção artificial, seleção esta que poderia explicar, em parte, as diferenças verificadas em relação a outra cepa do Egito, isolada mais recentemente. No ano seguinte, Warren (1967) fez um estudo muito bem elaborado comparando cepas geográficas de Porto Rico, Brasil, Egito e Tanzânia, quando à capacidade de penetração das cercárias, desenvolvimento dos vermes e produção de doença hepática. Quanto a este último parâmetro, os resultados mostraram que as cepas provenientes do Brasil e Porto Rico eram as mais virulentas. A cepa do Egito apresentou um tamanho da reação granulomatosa significativamente menor em relação às outras três cepas.

No Brasil, o trabalho de Magalhães & Carvalho (1976) se propõe a estabelecer um método para o estudo quantitativo de duas linhagens de *S. mansoni* obtidas uma de *B. glabrata* de Belo Horizonte, MG, e a outra de *B. tenagophila* do Vale do Paraíba, SP. Foram usados critérios, tais como sobrevivência dos camundongos infectados e número de granulomas produzidos. Os resultados mostraram que a cepa de Belo Horizonte apresentou um número significativamente maior de granulomas a partir de uma certa população de vermes e que os camundongos infectados com esta cepa também tinham uma sobrevivência menor. Os autores não mediram o tamanho dos granulomas.

O presente trabalho teve como objetivo determinar diferenças patológicas entre duas cepas regionais, bem definidas, do *S. mansoni*. Assim, trata-se de uma tentativa de demonstrar a influência dos fatores ligados ao parasito no determinismo das lesões.

O exame histopatológico do fígado com 60 e 90 dias de evolução demonstrou que as lesões, embora fossem as mesmas, eram muito mais exuberantes nos animais infectados com cepa SJ. Em ambos os grupos havia grande número de granulomas nos espaços portobiliares e na intimidade do parênquima, a maioria em cura por fibrose e raros na fase necrótico-exsudativa. A outra lesão, bastante representativa, igualmente observada nos dois grupos com 60 e 90 dias de infecção, era caracterizada pela exsudação de eosinófilos e células mononucleares e pela fibrose periportal. Ambas eram mais acentuadas, também nos animais infectados com a cepa SJ. Além disso, havia, principalmente, no 60º dia de infecção, fenômenos regressivos acentuados dos hepatócitos representados pela degeneração hidrópica e, às vezes, pela necrose de coagulação de hepatócitos isolados.

As medidas dos granulomas revelam que a reação em torno dos ovos é significativamente maior nos animais infectados pela cepa SJ (Tabela). O diâmetro médio dos granulomas obtidos nos animais com 60 dias, como era de se esperar, foi maior do que nos de 90 dias nas duas cepas. Estes dados estão de acordo com os achados de Andrade & Warren (1964) e Cheever (1986) em animais de experimentação, e com os de Raso et al. (1978) no homem.

TABELA

Dimensões dos granulomas causados pelos ovos de *Schistosoma mansoni* no fígado de camundongos infectados pelas cepas SJ e LE

Cepas	Diâmetro médio (μm)		Nº de granulomas medidos
	60 dias	90 dias	
SJ	291,4 \pm 21,9	254,2 \pm 11,0	600
LE	230,0 \pm 12,9	152,2 \pm 24,8	570

Há uma redução apreciável do volume nos granulomas mais antigos. É notável a diferença entre os da forma aguda e os da forma crônica da doença. Nas formas crônicas de mais longa

duração, como a hepatoesplênica, o número dos granulomas é sensivelmente inferior ao encontrado na fase aguda. Há seguramente, com o passar do tempo, reabsorção de ovos e granulomas e a sucessiva substituição progressiva por conjuntivo fibroso.

A modulação da resposta imunopatológica evidenciada pela diminuição do tamanho do granuloma entre o 60º e 90º dias da infecção mostra que na cepa LE esta redução foi significativamente maior do que na cepa SJ. Por outro lado, a resposta imunoprotetora na imunidade concomitante relativa à cepa LE foi significativamente mais eficiente nos animais com primo infecção com a cepa LE (Coelho et al., 1987). Estes dois últimos resultados mostram que o sistema imune do hospedeiro estaria atuando mais eficientemente na cepa LE, tanto no sentido de diminuir a resposta imunopatológica (modulação da resposta) como para induzir a um estado de resistência adquirida mais eficaz na imunidade concomitante (Coelho et al., 1987). Deve-se considerar com certa cautela estas observações quando se pretende extrapolar estes resultados para as linhagens atuais de *S. mansoni* que permanecem nos locais de origem.

A manutenção por mais de 10 anos da cepa SJ e 25 anos da LE em condições de laboratório poderia ter induzido modificações que levariam ambas a se afastarem das características das populações das quais foram originadas. Por outro lado, também as populações mantidas no ambiente natural poderiam sofrer modificações equivalentes nestes períodos de tempo.

A diferença encontrada entre as duas cepas no diâmetro médio dos granulomas constitui mais um dado objetivo mostrando a influência de cepas no determinismo das lesões. Estes achados podem ser explicados por diferenças quantitativas e/ou qualitativas no material antigênico excretado pelos miracídios das duas cepas. Esta hipótese poderia justificar a maior exsudação de células nos espaços porta e, em consequência, a difusão do antígeno além do local da deposição dos ovos, determinar os fenômenos degenerativos e necróticos mais evidentes nos camundongos infectados pela cepa SJ.

Extrapolando os resultados deste trabalho para a esquistossomose humana, poder-se-ia tentar explicar as diferenças regionais de inci-

dência de forma anátomo-clínica da doença. E para se alcançar uma melhor compreensão das variações regionais da morbidade da doença, além da carga parasitária, da imunopatologia e da imunidade protetora inerente ao indivíduo, também a linhagem do parasito deve ser considerada com mais atenção.

RESUMO

Dimensões do granuloma hepático produzido por ovos de duas linhagens geográficas do *Schistosoma mansoni*, no camundongo — Os autores determinaram o diâmetro médio dos granulomas de fígado de camundongos infectados com cercárias de duas cepas geográficas bem definidas do *Schistosoma mansoni* (LE, Belo Horizonte e SJ, São Paulo). No total foram medidos 1.170 granulomas. Os granulomas com 60 dias eram de dimensões maiores do que os de 90 dias. A modulação da resposta imunopatológica foi significativamente mais eficiente na cepa LE e os granulomas, tanto aos 60 como aos 90 dias, da cepa SJ eram significativamente maiores. Os dados obtidos indicam uma maior patogenicidade da cepa SJ. Especula-se se o significado destes achados poderiam, em parte, explicar a ocorrência das variações regionais das formas anatomo-clínicas da esquistossomose.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni* — cepas geográficas — granuloma

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. & WARREN, W. S., 1964. Wild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in the host response with tissue and the development of portal fibrosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58: 53-57.
- BARBOSA, F. S. & BARRETO, A. C., 1960. Differences in susceptibility of Brazilian strains of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasit.*, 9: 137-140.
- CHEEVER, A. W., 1986. The intensity of experimental schistosome infections modulates hepatic pathology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31: 124-133.
- COELHO, P. M. Z.; RASO, P.; MELLO, R. T.; TOPPA, N. H.; TAVARES, C. A. P. & ANTUNES, C. M. F., 1987. *Schistosoma mansoni*: diferenças entre cepas no hospedeiro vertebrado. I International Symposium on Schistosomiasis, no. 132, Rio de Janeiro, RJ.
- DARWIN, C., (1859), 1958. *The Origin of Species*. New York, New American Library.
- FILES, V. S. & CRAM, E. B., 1949. A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 35: 555-560.
- LURIE, H. J. & MEILLON, B., 1956. Experimental bilharziasis in laboratory animals. III — A comparison of the pathogenicity of *S. bovis*, South African and Egyptian strains of *S. mansoni* and *S. haematobium*. *S. A. Medical Journal*, 30: 79-82.
- MAGALHÃES, L. H. & CARVALHO, J. F., 1976. Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni*, Sambon 1907. Reposição para método de estudo quantitativo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 4: 169-194.
- NEWTON, W. L., 1953. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasit.*, 2: 242-257.
- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R., 1963. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 5: 15-22.
- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G., 1955. A simplified method for the concentration of cercariae. *J. Parasit.*, 41: 329-330.
- SAOUD, M. F. A., 1966. The infectivity and pathogenicity of geographic strains of *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 60: 585-600.
- RASO, P.; BERNARDES, R. C.; TAFURI, W. L.; BOGLIOLO, L. & NEVES, J., 1978. As dimensões do granuloma causado pelos ovos do *Schistosoma mansoni* no fígado humano. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 12: 45-49.
- WARREN, K. S., 1967. A comparison of Puerto Rican, Brazilian, Egyptian and Tanzanian strains of *Schistosoma mansoni* in mice: penetration of cercariae, maturation of schistosomes and production of liver disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61: 795-802.