

SCHISTOSOMA MANSONI: ASPECTOS QUANTITATIVOS DA FERTILIDADE E SOBREVIDA DE VERMES ORIUNDOS DE CERCÁRIAS IRRADIADAS COM 3 KRAD, EM CAMUNDONGOS

Gileno de Sá CARDOSO⁽¹⁾ & Paulo Marcos Zech COELHO⁽²⁾

RESUMO

Quatro grupos de camundongos albinos (*Mus musculus*) não isogênicos foram infectados transcutaneamente com cerca de 450 cercárias (das cepas LE e SJ do *S. mansoni*) não irradiadas (grupos controles) e irradiadas com 3 Krad de radiação gama proveniente de cobalto-60, com a finalidade de observar o efeito da irradiação gama sobre a fertilidade das fêmeas e a sobrevivência dos vermes no sistema porta. A partir do 33º dia ocorre uma certa estabilidade na população dos vermes sobreviventes, ficando esta população constante, notadamente em relação à cepa LE, até o final das observações (90º dia). Concluiu-se que esta dose de radiação gama impede a produção de ovos dos vermes em 98,1% dos camundongos infectados, sendo mortos todos os ovos detectados; as fêmeas são mais resistentes à irradiação e o efeito desta sobre a mortalidade dos machos somente se torna estatisticamente significativo a partir do 61º dia de infecção. O longo tempo de permanência de vermes adultos irradiados estéreis no sistema porta de camundongos e o seu provável envolvimento no desenvolvimento de imunoproteção, tipo imunidade concomitante sem as implicações imunopatológicas para o hospedeiro, são discutidos nesse trabalho.

UNITERMOS: *Schistosoma mansoni*; Cercárias irradiadas; esterilização de vermes.

INTRODUÇÃO

Alguns autores, utilizando cercárias de *Schistosoma mansoni* irradiadas com diferentes tipos de radiação ionizante na dose aproximada

de 3 Krad, abordaram os efeitos da radiação sobre a fertilidade e sobrevivência dos vermes, delas oriundos, no sistema porta de camundongos. VILLELLA et al.¹² verificaram que camundon-

-
- (1) Laboratório de Parasitologia, Departamento de Morfologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brasil.
 - (2) Departamento de Parasitologia e Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, BII/MG-Brasil.

Endereço para correspondência: GIDE-ICB/UFMG. CP 2486. 30161 Belo Horizonte, MG, Brasil.

Abreviaturas usadas neste trabalho: GIDE = Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose; ICB = Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; CDTN = Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear; NUCLEBRÁS = Empresas Nucleares Brasileiras S.A.

gos inoculados com cercárias de *S. mansoni*, cepa de Porto Rico mantida em *Biomphalaria glabrata*, irradiadas com 3.000 rep de radiação gama proveniente de Co-60, desenvolveram imunidade a uma reinfecção com cercárias não irradiadas. Esses autores também observaram que os poucos vermes oriundos das cercárias irradiadas com esta dose de radiação eram sexualmente estéreis. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ⁹ observou que os vermes evoluídos de cercárias de *S. mansoni* irradiadas com 2.000 r de raios X, persistem no sistema porta de camundongos até o 288º dia de observação.

No presente estudo, procurou-se investigar o efeito da dose de 3 Krad de radiação gama proveniente de Co-60 sobre a evolução dos parasitos em camundongos infectados transcutaneamente com cerca de 450 cercárias, das cepas LE e SJ do *S. mansoni*. Essa retomada dos estudos com a dose de 3 Krad é justificada pelo fato de que a permanência de vermes sexualmente estéreis no sistema porta de camundongos pode ter alguma implicação no desenvolvimento de imunoproteção, tipo imunidade concomitante, sem as implicações para o hospedeiro decorrentes da presença de ovos viáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e parasitos

Camundongos albinos (*Mus musculus*) não isogênicos, fêmeas, com cerca de 30 dias de nascidos, foram infectados transcutaneamente com cerca de 450 cercárias de *Schistosoma mansoni* (cepa LE, de Belo Horizonte, mantida no GIDE em *Biomphalaria glabrata* há mais de 25 anos e cepa SJ, de São José dos Campos-SP, mantida do ICB em *B. glabrata* com repassagens sucessivas em *Biomphalaria tenagophila* há mais de 10 anos). Os planorbídeos, nascidos e criados em laboratório (segundo técnica de FREITAS⁴), foram infectados seguindo-se a técnica descrita por PELLEGRINO & KATZ⁵.

Irradiação das cercárias e infecção dos camundongos

Quatro grupos experimentais foram definidos utilizando-se cercárias não irradiadas (grupos controles com 84 camundongos de cada cepa de *S. mansoni*) e irradiadas com 3 Krad (com 90 camundongos para cada cepa de *S. mansoni*), das

duas cepas. As amostras a serem irradiadas eram transportadas para o CDTN da NUCLEBRÁS, onde eram expostas à radiação gama proveniente de cobalto-60, sendo a dose de irradiação equivalente ao tempo de exposição das cercárias a essa fonte de radiação. Os animais foram infectados transcutaneamente (cerca de 450 larvas irradiadas ou normais), segundo BARBOSA et al.¹.

Recuperação dos parasitos da pele e pulmões

Os parasitos foram recuperados da pele e pulmões conforme técnica de BARBOSA et al.¹.

Pesquisa de ovos

A partir do 40º dia pós-infecção, foram feitas pesquisas de ovos de *S. mansoni* em fragmentos do intestino delgado e fígado dos camundongos expostos às cercárias não irradiadas e irradiadas com 3 Krad, de ambas as cepas. O oograma foi feito seguindo-se a técnica de PELLEGRINO et al.⁶.

Duração total do experimento

Os grupos com cercárias irradiadas com 3 Krad, de ambas as cepas, foram sacrificados e examinados no 90º dia após infecção, que foi o último dia de observação.

Análise dos resultados

Na análise estatística dos resultados foi utilizado o método da análise de variância, trabalhando-se com proporções baseadas no rendimento cercárias/vermes, ajustadas pelo método da transformação arco-seno ou angular, de acordo com SNEDECOR & COCHRAN¹¹.

RESULTADOS

I. Oograma

O oograma detectou a presença de ovos em todos os estádios evolutivos no fígado e intestino de todos os camundongos dos grupos controles (no 40º e 47º dia após a infecção), enquanto nos camundongos expostos a cercárias irradiadas com 3 Krad somente foram detectados poucos ovos mortos em apenas dois (2) infectados com a cepa LE (no 47º e 61º dias após a infecção). Foram examinados um total de 105 camundongos expos-

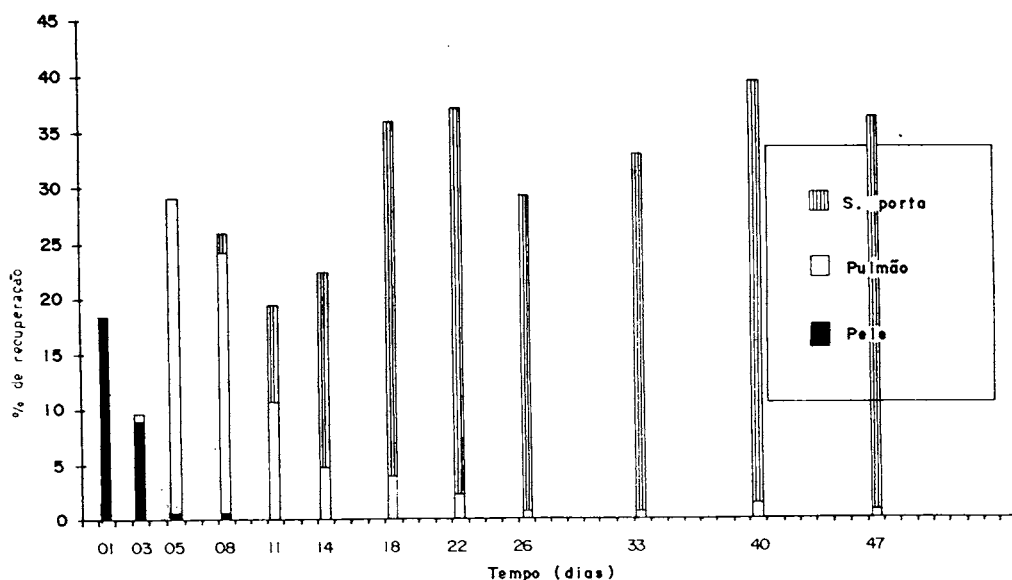


GRÁFICO 1 - Porcentagens médias de recuperação total de parasitos da pele, pulmões e sistema porta, oriundos de cercárias, da cepa LE do *S. mansoni*, não irradiadas (controle), obtidas em camundongos infectados transcutaneamente com cerca de 433 cercárias.

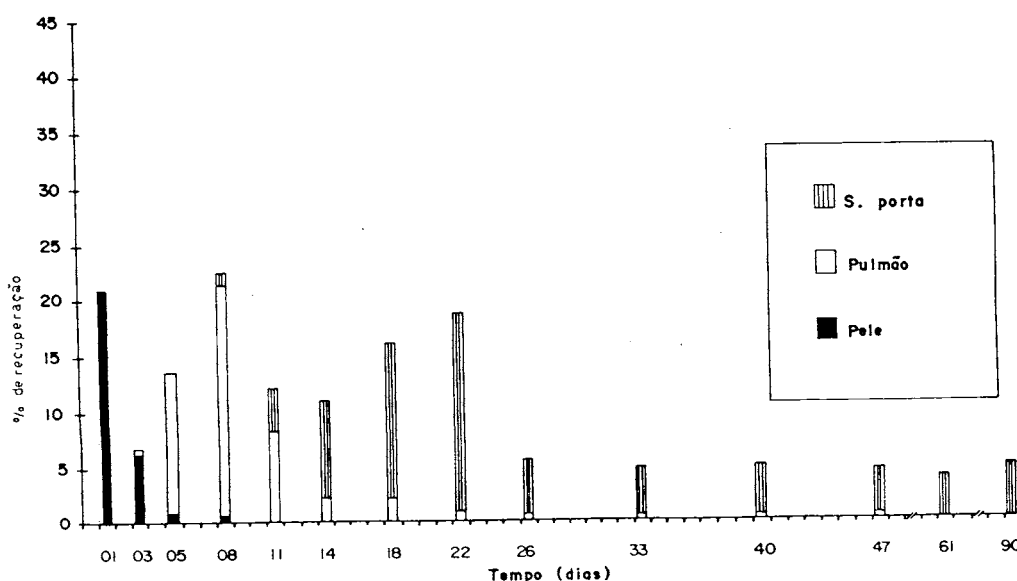


GRÁFICO 2 - Porcentagens médias de recuperação total de parasitos da pele, pulmões e sistema porta, oriundos de cercárias, da cepa LE do *S. mansoni*, irradiadas com 3 Krad, obtidas em camundongos infectados transcutaneamente com cerca de 394 cercárias.

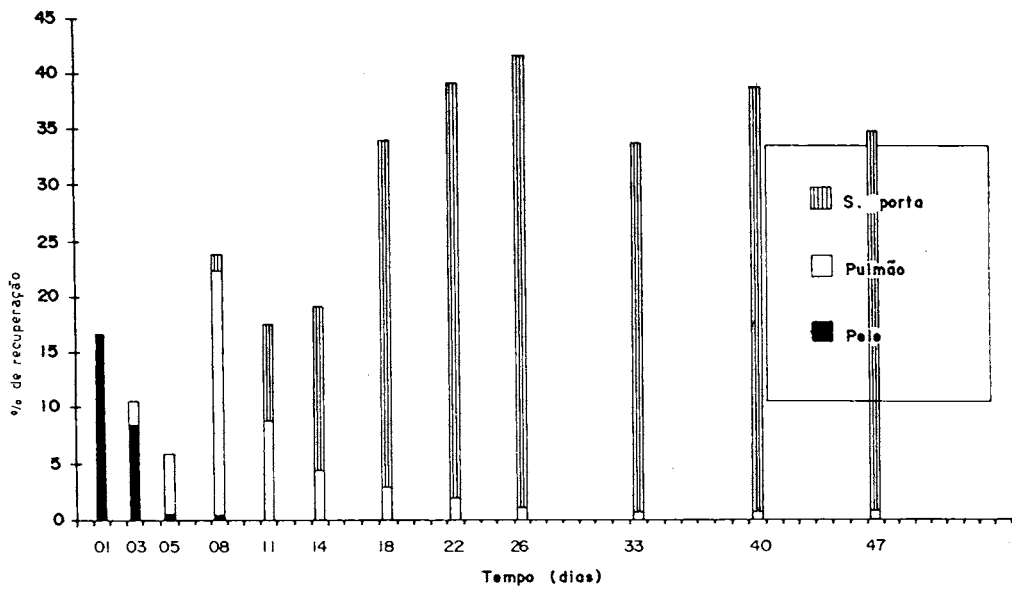


GRÁFICO 3 – Percentagens médias de recuperação total de parasitos da pele, pulmões e sistema porta, oriundos de cercárias, da cepa SJ do *S. mansoni*, não irradiadas (controles), obtidas em camundongos infectados transcutaneamente com cerca de 409 cercárias.

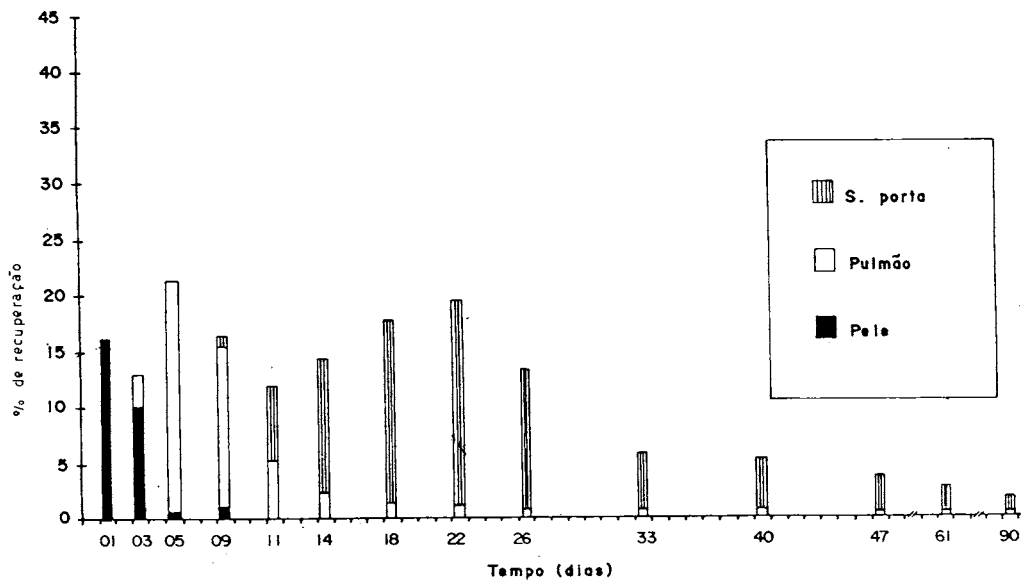


GRÁFICO 4 – Percentagens médias da recuperação total de parasitos da pele, pulmões e sistema porta, oriundos de cercárias, da cepa SJ do *S. mansoni*, irradiadas com 3 Krad, obtidas em camundongos infectados transcutaneamente com cerca de 465 cercárias.

tos a cercárias irradiadas com 3 Krad, dando um percentual de apenas 1,9% para a presença de ovos (mortos) no intestino e fígado desse grupo de camundongos.

2. Recuperação total dos parasitos

Nos gráficos 1, 2, 3 e 4 estão representados as porcentagens médias totais de recuperação de parasitos oriundos de cercárias, das cepas LE e SJ do *S. mansoni*, não irradiadas e irradiadas com 3 Krad de radiação gama proveniente de Co-60.

Os resultados são a média da recuperação de parasitos obtidos da pele, pulmões e sistema porta de seis (6) camundongos de cada grupo sacrificados a cada dia dos experimentos, levando-se em conta os tempos de infecção. Os percentuais são calculados em relação aos números de cercárias infectantes para cada infecção.

3. Relação macho/fêmea

Na tabela 1, temos o número total de vermes adultos recuperados e as respectivas distribuições em machos e fêmeas para cada uma das infecções com cercárias não irradiadas e irradiadas com 3 Krad em ambos os experimentos, com as cepas

LE e SJ do *S. mansoni*.

Os resultados mostram que a relação macho/fêmea dos vermes irradiados com 3 Krad, de ambas as cepas, sempre se manteve acima de 1 até o 61º dia de observação após a infecção e, somente no 90º dia, essa relação tornou-se inferior à unidade, concluindo-se que os vermes machos são mais susceptíveis à irradiação gama, sendo que o efeito somente se torna evidente após o 61º de infecção (cepa SJ).

DISCUSSÃO

Como pode ser observado nos gráficos 1, 2, 3 e 4, a recuperação a nível de pele, pulmões e sistema porta dos parasitos irradiados e controles, cepas LE e SJ de *S. mansoni*, mostra claramente um decréscimo da população dos parasitos irradiados com 3 Krad, tanto a nível da pele e pulmões, como no sistema porta, ocorrendo uma certa estabilidade da população, a partir do 33º dia de infecção, notadamente na cepa LE, até o final das observações (90º dia).

O efeito da dose de 3 Krad de radiação gama sobre a fertilidade das fêmeas foi avaliado através do oograma que detectou a presença de ovos em

TABELA 1

Distribuição de vermes adultos machos e fêmeas e a relação macho/fêmea encontrada respectivamente em camundongos infectados transcutaneamente com cerca de 450 cercárias não irradiadas e irradiadas com 3 Krad (das cepas LE e SJ de *Schistosoma mansoni*).

		18º ao 47º dia*			61º dia**			90º dia**		
		Total de Machos	Total de Fêmeas	M/F	Total de Machos	Total de Fêmeas	M/F	Total de Machos	Total de Fêmeas	M/F
CEPA	Controle	1683	1145	1,47	–	–	–	–	–	–
	LE 3 Krad	154	86	1,79	36	22	1,64	30	47	0,64
CEPA	Controle	1747	845	2,07	–	–	–	–	–	–
	SJ 3 Krad	125	61	2,05	28	18	1,55	12	24	0,50

Observações: * 36 camundongos ** 4 camundongos

M/F = relação Macho/Fêmea

apenas dois (2) de um total de 105 camundongos examinados, dando um percentual de 1,9%. Foram encontrados 24 e 27 ovos (mortos), respectivamente no 47º e 61º dia após a infecção, no intestino e fígado de ambos os camundongos infectados com cercárias da cepa LE. Já nos camundongos controles, de ambas as cepas, foram detectados inúmeros ovos viáveis e em todos os estádios evolutivos, tanto no intestino como no fígado examinados no 40º e 47º dia após a infecção.

Todos os ovos encontrados nos camundongos expostos a cercárias irradiadas estavam mortos e, de acordo com BOROS & WARREN³, esses ovos não induzem alterações patológicas, pois seria a secreção do miracídio (o antígeno solúvel do ovo) o elemento fundamental na patologia da equistossomose. De fato, o fígado e intestino dos camundongos infectados com cercárias irradiadas com 3 Krad, inclusive nos dois que apresentaram ovos mortos, estavam com uma aparência macroscópica normal.

Além do encontro de ovos (mortos) em apenas 1,9% dos camundongos examinados, foram vistos diversos casais de vermes adultos irradiados com 3 Krad, de ambas as cepas, em cópula, donde se conclui que a radiação gama, nessa dose, torna a grande maioria dos vermes adultos sexualmente estéreis. Isto está de acordo com VILLELLA et al.¹², que observaram que os poucos vermes que se desenvolveram de cercárias, de uma cepa de *S. mansoni* de Porto Rico mantida em *B. glabrata*, irradiadas com 3.000 rep (aproximadamente 3 Krad) de radiação gama proveniente de Co-60, eram estéreis.

O efeito da radiação ionizante, em doses equivalentes ou aproximadas a 3 Krad de radiação gama, sobre a fertilidade das fêmeas, provavelmente está relacionado com as alterações morfológicas por ela induzidas nos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas. Assim, PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ⁹ observou que vermes irradiados com 2.000 r e 2.500 r (aproximadamente 2 e 2,5 Krad) de raios X eram estéreis e se apresentavam atrofiados, sendo que a maioria dos machos mostrava tubos digestivos anormais. VILLELLA & WEINBREN¹³ observaram que a radiação gama proveniente de Co-60 nas doses de 2.000 e 2.500 rad (equivalente a 2 e 2,5 Krad) produz malformações nas estruturas reprodutivas de vermes de ambos os sexos que os tornam sexualmente estéreis e, segundo os autores, as fêmeas estérteis apresentavam atrofia geral do corpo e órgãos reprodutivos malformados. BICKLE et al.² observaram que todas as fêmeas irradiadas com 2,3

Krad, coradas com carmin, não possuíam ovários visíveis e que somente 43% dos machos corados tinham testículos visíveis.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ⁸ adverte ainda para o fato de que vermes machos e fêmeas, provenientes de cercárias irradiadas com 2.000 r (aproximadamente 2 Krad) de raios X, são capazes de por ovos quando copulam com vermes normais e, portanto, a introdução de cercárias atenuadas pela irradiação, durante o processo de imunização, poderia representar uma ameaça à segurança do hospedeiro. BICKLE et al.² observaram que vermes irradiados com 2,3 Krad de radiação gama, de ambos os sexos, foram capazes de reproduzir satisfatoriamente na presença de parceiros não irradiados, quando camundongos foram infectados com 1.200 cercárias machos irradiadas juntas com 50 fêmeas normais ou infectados com 50 cercárias machos normais juntas com 1.200 fêmeas irradiadas.

Nos resultados obtidos (gráfico 2 para a cepa LE e gráfico 4 para a SJ), verificou-se que os vermes irradiados com 3 Krad, de ambas as cepas, foram detectados no sistema porta a partir do 8º dia após a infecção e os picos máximos de recuperação verificaram-se entre o 18º e 26º dias. No 26º dia após a infecção, as taxas de recuperação sofrem uma redução estatisticamente significativa ($P < 0,01$) e a partir do 33º dia elas se mantêm em uma proporção constante até o último dia de observação. Portanto, os vermes irradiados com 3 Krad, de ambas as cepas, foram detectados no sistema porta até o 90º dia após a infecção. Isto está de acordo com PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ⁹ que observou que apesar de poucos vermes irradiados com 2.000 r (aproximadamente 2 Krad) de raios X alcançarem o sistema porta de camundongos infectados com 300 cercárias de *S. mansoni*, cepa de Porto Rico, eles foram encontrados ainda no 200º dia após a infecção. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ¹⁰ observou em camundongos infectados com cercárias de um sexo, cepa de Porto Rico, irradiadas com 2.000 r (aproximadamente 2 Krad) de raios X que, apesar da baixa taxa de recuperação, tanto dos vermes machos irradiados como das fêmeas irradiadas, a persistência de ambos no sistema porta manteve-se até o fim das observações, que foi correspondente aos períodos de 9 e 12 meses, respectivamente.

Em nossos estudos, verificamos que os vermes adultos machos, tanto da cepa LE como da SJ, são mais sensíveis à irradiação gama (na dose de 3 Krad) que as fêmeas e o efeito da radiação

sobre mortalidade dos machos em relação às fêmeas somente se torna estatisticamente significativo após o 61º dia de infecção (tabela 1). Isto está de acordo com a literatura no que diz respeito à maior sensibilidade dos vermes machos à irradiação, porém, discorda no que se refere ao tempo no qual se detecta os efeitos da irradiação. Assim, PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ⁸ verificou que a radiação X na dose de 2.000 r (aproximadamente 2 Krad) diminui o número de vermes machos até provocar proporções macho/fêmea menores que a unidade, quando normalmente esta relação é maior que 1, concluindo que esse fenômeno pode ser atribuído à maior suscetibilidade do parasito macho aos raios X e também que o efeito da irradiação se faria sentir logo de início, prolongando-se até o final das observações. BICKLE et al.² observaram que os vermes machos foram mais sensíveis do que as fêmeas aos efeitos da irradiação, já no 28º dia de observação, em camundongos infectados intramuscularmente com esquistossômulos irradiados 2,3 Krad de radiação gama proveniente de Co-60.

Em um experimento (a ser publicado) foi verificado que camundongos isogênicos Balb/c infectados transcutaneamente com cerca de 445 cercárias irradiadas com 3 Krad, da cepa LE do *S. mansoni*, desenvolveram uma imunoproteção de, aproximadamente, 70%, a uma reinfeção desafiada com cerca de 57 cercárias normais não irradiadas administrada no 70º dia após a primeira infecção. Este resultado associado aos achados do presente estudo leva-nos a pressupor que a longa sobrevivência, no sistema porta de camundongos, dos vermes estéreis irradiados com 3 Krad poderia manter por longo tempo uma imunidade contra infecções cercarianas, sem as implicações patológicas devidas ao granuloma produzido por ovos viáveis.

SUMMARY

***Schistosoma mansoni*: quantitative aspects of the fertility and survival of worms obtained from irradiated cercariae (3 Krad), in mice**

The effect of gamma irradiation on the fertility of female mice, as well as the survival of worms in their portal system, have been observed in four groups of outbred albino mice (*Mus musculus*), experimentally infected with ca 450 cercariae of *Schistosoma mansoni* (LE and SJ strains), by transcutaneous route. The cercariae used were a)

non-irradiated (control groups), and b) irradiated with 3 Krad of gamma irradiation (Co-60). From the 33rd day on, some stability in the population of surviving worm could be observed. This population remained constant till the end of the observation period (90th day), notably in relation to the LE strain. Thus, it was concluded that gamma irradiation (at the dose of 3 Krad) is able to hinder the worm egg production in 98.1% of the infected mice. Further, it was observed that the few detected eggs were dead. Females were found to be more resistant to irradiation. The irradiation effect on the mortality of male worms was statistically significant scarcely from the 61st day on. The long period of permanence of the sterile adult irradiated worms in the portal system of mice and their probable involvement in the development of immunoprotection (the so-called concomitant immunity, without the immunopathological involvements for the host) are here discussed.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Adelino Ferreira, Alberto Geraldo dos Santos, Alice Neni Faria, Atenágoras Nascimento Silva, José de Souza Filho, Maurício Virícimo dos Santos e Zenir de Souza pela assistência técnica.

Este trabalho foi financiado, em parte, pelo CNPq, FINEP e CPqUFMG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBOSA, M.A.; PELLEGRINO, J.; COELHO, P.M.Z. & SAMPAIO, I.B.M. – Quantitative aspects of the asynchronism in the development of *Schistosoma mansoni* in mice. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20:121-132, 1978.
2. BICKLE, Q.D.; DOBINSON, T. & JAMES, E.R. – The effects of gamma-irradiation on migration and survival of *Schistosoma mansoni* schistosomula in mice. *Parasitology*, 79:223-230, 1979.
3. BOROS, D.L. & WARREN, K.S. – Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Parasit.*, 132:488, 1970.
4. FREITAS, J.R. – Ritmo de crescimento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Padronização da técnica de criação. Belo Horizonte, 1973. (Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais). 108 pp.
5. PELLEGRINO, J. & KATZ, N. – *Schistosoma mansoni*: some biological aspects in connection with

- experimental chemotherapy. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 63:568-575, 1969.
6. PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C.A.; FÁRIA, J. & CUNHA, A.S. – New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 11:201-215, 1962.
 7. PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A.F. – Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev. bras. Malar.*, 8:589-597, 1956.
 8. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. – O papel das cercárias atenuadas na imunização efetiva contra o *Schistosoma mansoni*. *Rev. bras. Malar.*, 16:505-525, 1964a.
 9. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. – Studies on acquired resistance to *Schistosoma mansoni* in mice exposed to X irradiated cercariae. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 30:401-412, 1964b.
 10. PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. – Studies on acquired resistance to *Schistosoma mansoni* in mice exposed to X irradiated cercariae of one sex. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 8:203-218, 1966.
 11. SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. – Two way classification. In: SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. – *Statistical methods*. 6th ed. Iowa, The State University Press. 1971. v.2, chapter 11, p.327-329.
 12. VILLELLA, J.B.; GOMBERG, H.J. & GOULD, S.E. – Immunization to *Schistosoma mansoni* in mice inoculated with radiated cercariae. *Science*, 134:1073-1075, 1961.
 13. VILLELLA, J.B. & WEINBREN, M.P. – Abnormalities in adult *Schistosoma mansoni* developed from gamma-irradiated cercariae. *J. Parasit.*, 51:42, 1965.

Recebido para publicação em 26/6/1989.