

Observações adicionais sobre o sexo do "Schistosoma mansoni" nas infestações por cercarias de um unico molusco

por

W. Lobato Paraense

(Com 2 tabelas e 1 estampa)

Em janeiro de 1949, examinando exemplares de *Australorbis olivaceus* de um córrego existente nos terrenos do Instituto Oswaldo Cruz, verificamos que alguns deles davam saída a cercárias do *Schistosoma mansoni*. Nos dias seguintes a esta verificação foram dissecados 400 exemplares daquele planorbídeo, resultando o índice de infestação de 8.25% com formas evolutivas do *S. mansoni* (esporocistos e cercárias). Também foi encontrada outra espécie de cercaria furcocerca, ocelada, oriunda de rédia, cuja morfologia corresponde à da *Dicranocercaria ocellifera* descrita por Lutz (1933) e pelo mesmo autor (1934) reconhecida como forma larval do *Clinostomum heluans*. O índice de infestação dos planorbídeos por este outro trematódeo foi de 2.5%

Além das duas espécies referidas não foi encontrada qualquer outra forma larval de trematódeo nos 400 moluscos examinados. Isto naturalmente foi devido ao pequeno número de observações, pois é sabido que outras espécies ocorrem nos *Australorbis* de Manguinhos.

Na tabela 1 encontram-se os resultados destas verificações, nas quais tivemos o valioso auxílio do nosso colega Dr. Pedro de Vasconcelos Barros.

O córrego habitado pelos moluscos tem seu curso total dentro dos terrenos do Instituto. As investigações realizadas revelaram que a contaminação do criadouro tinha sido feita pelas fezes de operários infestados que trabalhavam nas obras de construção de novas dependências do Instituto. Ao ser informado da existência deste foco de esquistosomose nos terrenos de Manguinhos, o Diretor do Instituto mandou proceder ao tratamento do córrego infestado por meio da cal extinta. Por este motivo as nossas verificações ficaram limitadas a 400 exemplares do *A. olivaceus*.

Devemos assinalar que, em observações não publicadas feitas em 1931, o Prof. Olympio da Fonseca havia encontrado moluscos infestados pelo *S. mansoni* no criadouro referido. Durante o período que medeia entre as suas observações e as nossas atuais, o criadouro manteve-se aparentemente livre de infestação pelo referido trematódeo, o qual não foi encontrado em freqüentes exames feitos por investigadores deste Instituto que utilizam os moluscos para fins de pesquisa e de ensino.

O material que tivemos em mãos foi aproveitado para o fim de completar algumas observações já publicadas (Paraense & Malheiros Santos, 1949) sobre infestações experimentais com o *S. mansoni* produzidas pelas cercárias de um único molusco.

MATERIAL E MÉTODOS

Com cercárias de 26 planorbídeos inoculámos 26 cobaias, cada uma das quais recebeu cercárias de um único molusco. Dêste modo, cada cobaia desta série leva o mesmo número de identificação do planorbídeo com cujas cercárias foi inoculada. Dêstes 26 planorbídeos, 6 permaneceram vivos durante mais alguns dias, sendo feita com suas cercárias uma segunda série de inoculações em mais 6 cobaias. Cada cobaia da segunda série foi inoculada 10 dias depois da cobaia correspondente da primeira série.

Não foram usados nestas experiências todos os 33 caramujos infestados pelo *S. mansoni* porque em 7 dêles as cercárias ou ainda não estavam completamente desenvolvidas dentro dos esporocistos ou já estavam muito escassas em consequência do esgotamento da infestação.

As cobaias foram inoculadas por imersão parcial, durante 30 minutos, em água contendo cercárias saídas dos caramujos mediante exposição à luz do sol; em alguns casos as cercárias foram obtidas por dissecação do moluscos.

Dos 26 animais da primeira série de infestações, 2 que morreram dentro de duas semanas após a inoculação foram excluídos dêste trabalho. Os 24 restantes foram examinados dentro do período compreendido entre 111 e 248 dias após a inoculação. Os 6 animais da segunda série foram examinados entre 123 e 238 dias.

A procura dos trematódeos foi feita no fígado, retirado após ligadura dos vasos aferentes e eferentes e em seguida dissociado com agulhas, em solução fisiológica, separando-se os trematódeos obtidos para contagem e observação. Dentre os exemplares machos, 250 foram fixados em formol acético e, depois de corados pelo carmim clorídrico alcoólico, foram montados

em bálsamo do Canadá. As fêmeas foram todas examinadas a fresco, entre lâmina e lamínula. De 16 cobaias, inclusive todas as infestadas por fêmeas, foram fixados fragmentos do fígado e do intestino em líquido de Bouin, sendo feitos cortes histológicos que foram corados pela hematoxilina-eosina.

Na tabela 2 encontram-se os dados relativos às 24 inoculações da primeira série e às 6 da segunda.

RESULTADOS

UNISSEXUALIDADE DAS INFESTAÇÕES

As infestações produzidas pelas cercárias dos 24 moluscos foram todas unissexuais, aparecendo trematódeos machos em 13 casos e fêmeas em 11.

Como ficou visto, o índice de infestação da amostra de planorbídeos que utilizámos foi de 8.25%. Esse índice permite a expectativa de 0.34% para as infestações bissexuais. Seria necessário, portanto, utilizar cerca de 294 moluscos para ocorrer uma única probabilidade de infestação bissexual.

A unissexualidade de todas as infestações aqui produzidas ocorreu, portanto, de acordo com a expectativa. Quando foram feitas duas inoculações sucessivas de cercárias do mesmo planorbídeo os resultados foram concordantes.

RELAÇÃO NUMÉRICA ENTRE OS SEXOS

Como no trabalho anterior já citado, também aqui é verificada a relação de 1 : 1 entre os sexos do *S. mansoni* ($\chi^2 = 0.16$).

MATURAÇÃO SEXUAL DO *S. mansoni* NAS INFESTAÇÕES UNISSEXUAIS

A idéia de investigar esta questão foi o móvel principal das experiências aqui relatadas.

É sabido, principalmente em consequência das investigações de Severinghaus (1928) feitas com o *S. japonicum*, que nas infestações unissexuais a maturidade sexual dos machos não é retardada.

Quanto às fêmeas, concordam os autores em admitir que não alcançam a maturidade sexual na ausência de machos, em vista de nunca apresentarem ovos no útero na referida condição. Na literatura que pudemos consultar, somente as observações de Short (1947, 1948), feitas com o *Schistosomatium douthitti*, demonstram com segurança a possibilidade de fêmeas de

Schistosomatidae produzirem ovos na ausência de machos. É interessante assinalar que já em torno de 30 dias após a inoculação aparecem ovos com miracídios viáveis nos tecidos do hospedador (Short, 1947), e que estes miracídios partenogênicos são capazes de realizar o ciclo evolutivo completo em moluscos receptivos (Short, 1948). Quanto às espécies do gênero *Schistosoma*, entretanto, julgamos não existirem verificações semelhantes às de Short. Em um trabalho de Jaffé, Mayer & Pifano (1945) há referências a um caso de infestação unissexual experimental por fêmeas que apresentavam ovos maduros no útero, aparecendo também ovos maduros no fígado do hospedador. Entretanto os próprios autores referidos lançam dúvidas sobre a natureza unissexual do caso mencionado.

Produção de ovos nas infestações unissexuais

No trabalho anterior (Paraense & Malheiros Santos, 1949) foi confirmada a noção geralmente admitida de que as fêmeas não amadurecem sexualmente na ausência de machos. Observamos entretanto que 2 fêmeas de um dos casos de infestação unissexual apresentaram no útero um corpúsculo de aspecto céreo, deformável, que interpretamos como uma formação ovular abortiva desprovida de casca. Um destes corpúsculos está figurado no referido trabalho. Essa verificação foi feita em um animal sacrificado aos 179 dias da infestação, que foi o prazo máximo de observação de animais portadores do *Schistosoma* naquelas experiências.

Pensamos então em verificar, no presente trabalho, se em infestações unissexuais de longa duração as fêmeas apresentariam com maior frequência os referidos corpúsculos no útero. Assim é que só iniciamos o exame das cobaias 111 dias após a inoculação. Só a partir de 145 dias começaram a aparecer formações intrauterinas, agora mais bem caracterizadas do que aquelas observadas no trabalho anterior.

Dos 14 casos de infestação por fêmeas (incluídos 3 da segunda série de inoculações), somente em 6 foram encontradas fêmeas com as aludidas formações. Dêstes 6 casos foram colhidas 338 fêmeas, 53 das quais eram portadoras dos corpúsculos referidos (detalhes na tabela 2).

Sem nenhuma dúvida tratava-se de ovos produzidos por fêmeas do *S. mansoni* na ausência de machos. Quase todos estes ovos achavam-se contidos na luz do útero propriamente dito; em 8 casos estavam localizados no ootipo. No útero o seu número variou entre 1 e 6, sendo freqüente a presença de mais de 1; no ootipo nunca foi encontrado mais de 1.

O aspecto dêstes ovos, do qual dão uma idéia muito aproximada as figs. 2 a 15, é diferente do normal. A um exame superficial do helminto não se nota a presença dos ovos porque êstes não contrastam com os tecidos circunvizinhos. Só quando a fêmea é comprimida sob a lamínula êles ficam bem visíveis. São translúcidos e dotados de casca rígida e hialina.

Em quase todos os exemplares existe o espinho mais ou menos profundamente alterado. Algumas vezes o espinho é postero-lateral e de aspecto semelhante ao normal (figs. 10 a 12). Na maioria das vezes, entretanto, apresenta-se muito modificado em forma e posição (figs. 2 a 9, 13 a 15), predominando a situação terminal. No ovo da fig. 5 aparece um duplo espinho terminal.

A forma dos ovos é muito variável. Quando o espinho é postero-lateral conserva-se a forma geral dos ovos do *S. mansoni* (figs. 10 a 12). Sendo o espinho terminal, reproduz-se muitas vezes o aspecto de uma retorta (figs. 4, 8, 13 e 14) e em certos casos o do *S. haematobium* (fig. 15). Na fig. 2 aparece um ovo que lembra o da *Trichobilharzia ocellata*.

Como seria de esperar em ovos infecundos, não se encontra embrião em evolução no interior da casca. Esta é cheia por um material granuloso homogeneamente distribuído (figs. 2, 4, 5, 8 e 9). Êste material pode acumular-se em alguns pontos, formando grumos isolados (figs. 10, 12 e 15). Muitos ovos contêm glóbulos de aspecto granuloso cujo número variou de 1 a 8 nos exemplares examinados (figs. 3, 6, 7, 11, 13 e 14).

Apenas 4 vezes, em fêmeas da cobaia nº 19, foram encontradas massas de glóbulos hialinos que lembravam as estruturas intrauterinas assinaladas no trabalho anterior. Estas formações, das quais é exemplo a fig. 1, não possuíam qualquer vestígio de casca.

Quanto à natureza dos glóbulos de aspecto granuloso que aparecem em certo número de ovos dotados de casca, é provável que se trate de material vitelino. Glóbulos semelhantes a êstes foram vistos algumas vezes no interior do ootipo (figs. 16 e 17). Na fig. 17 êles aparecem juntamente com um fragmento de casca, dando a impressão de que o material elaborado pelos diversos órgãos produtores do ovo estava prestes a reunir-se no ootipo. É provável que entre êstes glóbulos granulosos que se encontram dentro da casca exista uma célula ovular indistinguível dos outros glóbulos ao exame do trematódeo vivo.

Em muitas fêmeas das infestações mais antigas o ovário parecia bem desenvolvido e continha células germinais; estas células eram também freqüen-

temente encontradas, em número variável, deslocando-se ao longo da luz do oviduto sob a ação das contrações do corpo do helminto (fig. 18).

Não conseguimos distinguir receptáculo seminal em nenhuma das fêmeas examinadas.

O estado de desenvolvimento da glândula vitelógena, quando foi possível evidenciá-la, apresentou todos os graus de variação, de muito rudimentar a muito adiantado. Em nenhum caso, entretanto, foi atingido o completo desenvolvimento peculiar às fêmeas normalmente amadurecidas. Dentro dos folículos glandulares podiam ser vistas, nos casos favoráveis, células vitelinas com o aspecto desenhado na fig. 19.

Destino das formações ovulares

Evidentemente as formações ovulares acima descritas não estão destinadas a uma evolução ulterior, visto como dentro delas não aparecem vestígios de organização embrionária. Este fato é confirmado pelo exame dos cortes histológicos do fígado, que revelou a existência de ovos desprovidos de estruturas embrionárias, reduzidos quase exclusivamente a uma casca delgada e hialina, envolvida e invadida por células epitelióides, não provocando lesões muito intensas. Devido à escassez de estruturas intraovulares e de reação celular periovular, a maioria dos ovos existentes nos cortes do fígado poderia passar despercebida a uma observação menos acurada.

Nos cortes do intestino não foram encontrados ovos do *Schistosoma*.

Maturidade sexual e hermafroditismo secundário dos machos

Não fizemos observações detalhadas sobre estes aspectos, limitando-nos a examinar 300 exemplares provenientes de 3 infestações das mais antigas (ns. 18, 21 e 17-A).

A observação microscópica dos exemplares vivos revelou a presença de testículos aparentemente bem desenvolvidos. Contamos os testículos de 200 exemplares corados pelo carmin, obtendo números variáveis de 4 a 9, com predominância de 7, assim distribuídos:

<i>Número de testículos</i>	<i>Número de exemplares</i>
4	6
5	18
6	48
7	73
8	41
9	14

Nos testículos corados apareceram dois tipos de células: umas com núcleos grandes e redondos, correspondendo a células germinais imaturas; outras com núcleos muito menores, puntiformes ou alongados, correspondendo a espermatozoides (fig. 20).

Em 48 dos 300 machos examinados foram vistas formações arredondadas, situadas na linha mediana, entre o grupo de testículos e o ponto de junção dos cecos intestinais no ceco único. As dimensões das referidas formações eram em certos casos iguais às de um testículo, mas ocorriam algumas de tamanho bem maior. Em 3 casos a existência de espermatozoides mostrava tratar-se de testículos supranumerários. Porém a nossa impressão é que tais formações nos casos restantes eram ovários rudimentares desenvolvidos secundariamente nos exemplares machos. A existência desses machos secundariamente hermafroditas foi ultimamente comprovada por Vogel (1947) e por Short (1948 a). Eles se desenvolvem de preferência em cobaias, coelhos e hamsters, sendo muito mais freqüentes quando as fêmeas são ausentes ou raras.

Nos exemplares vivos esse ovário rudimentar, quando presente, era sempre único e de aspecto globoso ou enovelado. Nos exemplares corados tinha aspecto globoso ou lobado, aparecendo às vezes dois corpúsculos próximos resultantes provavelmente de fragmentação por efeito da compressão exercida ao ser o trematódeo fixado.

A aparência desses ovários rudimentares diferia da dos testículos pela ausência de espermatozoides, existindo apenas células de núcleo redondo (fig. 21). Em nenhum caso foi possível evidenciar glândula vitelógena, dutos ou quaisquer outras estruturas sexuais femininas além dos ovários rudimentares.

Os referidos casos de hermafroditismo secundário foram muito freqüentes nas amostras examinadas: 29% na cobaia nº 18, com 23 casos em 78 exemplares; e 25% na cobaia nº 21, com 22 casos em 88 exemplares, além de 2 com testículo supranumerário. Da cobaia nº 17-A foram examinados 134 exemplares, nos quais a única anormalidade encontrada foi um caso de testículo supranumerário.

SUMÁRIO

Em um córrego situado nos terrenos do Instituto Oswaldo Cruz, em Manginhos, no qual existe uma população de *Australorbis olivaceus*, foi verificada a infestação natural deste planorbídeo pelo *Schistosoma mansoni*, com o índice de 8.25% baseado na dissecação de 400 moluscos.

As cercárias de 24 planorbídeos foram inoculadas em 24 cobaias, cada vertebrado recebendo as cercárias de um único molusco. Uma segunda série de inoculações em 6 cobaias foi feita com as cercárias de 6 planorbídeos sobreviventes, 10 dias após a primeira série.

As infestações resultantes foram tôdas unissexuais (13 vezes por machos, 11 vezes por fêmeas), observando-se entre os sexos a relação de 1 : 1.

Em 6 casos infestados por fêmeas, cerca de 15% destas apresentaram no útero ou no ootipo formações ovulares (figs. 1 a 15), desprovidas de estruturas embrionárias, cujo número variou entre 1 e 6. Êstes ovos, quando depositados no fígado, davam origem a ligeiro infiltrado de células epitelióides e não apresentavam organização embrionária. Não foram vistos ovos nos cortes de intestino. Os órgãos sexuais das fêmeas achavam-se aparentemente bem desenvolvidos em grande número de exemplares.

Os machos apresentaram testículos de aparência normal, em número variável de 4 a 9. Em 1% dos exemplares examinados foram encontrados testículos supranumerários. Em 2 casos foram encontrados machos secundariamente hermafroditas (respectivamente 29% e 25%).

REFERÊNCIAS

JAFFÉ, R., M. MAYER & F. PIFANO

1945. Estudios biológicos y anatomopatológicos en animales infectados con un solo sexo de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Sanid. Asist. Social* 10 (1) : 95-107.

LUTZ, A.

1933. Notas sobre *Dicranocercarias* brasileiras. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 27 (4) : 349-376

LUTZ, A.

1934. Evolution du *Clinostomum heluans*. *C. R. Soc. Biol.* 118 : 289.

PARAENSE, W. L. & J. MALHEIROS SANTOS

1949. O sexo do *Schistosoma mansoni* nas infestações produzidas por cercárias de um único molusco. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 47 (1-2) : 35-49.

SEVERINGHAUS, A. E.

1928. Sex studies on *Schistosoma japonicum*. *Quart. Jour. Micr. Sci.* 71 (284) : 653-702.

SHORT, R. B.

1947. Unisexual infections with *Schistosomatium douthitti* (Trematoda). *Jour. Parasit.* 33 (6) sec. 2 (supp.) : 9.

SHORT, R. B.

1948. Infective uniparental miracidia of *Schistosomatium douthitti* (Trematoda : Schistosomatidae). *Jour. Parasit.* 34 (6) sec. 2 (supp.) : 30.

SHORT, R. B.

1948a. Hermaphrodites in a Puerto Rican strain of *Schistosoma mansoni*. *Jour. Parasit.* 34 (3) : 240-242.

VOGEL, H.

1947. Hermaphrodites of *Schistosoma mansoni*. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 41 (2) : 266-277.

ASPECTOS OBSERVADOS EM EXEMPLARES DO "SCHISTOSOMA MANSONI"
PROVENIENTES DE COBAIAS COM INFESTAÇÕES UNISSEXUAIS
EXPERIMENTAIS

Fig. 1 — Aglomerado de glóbulos hialinos no útero. Cobaia 19.

Figs. 2 a 12 — Ovos uterinos infecundos. Cobaia 10, 19, 20 e 10-A.

Figs. 13 a 15 — Ovos infecundos no ootipo. Cobaia 19 e 3-A.

Figs. 16 e 17 — Ootipos com glóbulos de aspecto granuloso (células vitelinas e ovulares?). Na fig. 17 aparece também um fragmento de casca. Cobaia 19.

Fig. 18 — Ovário contendo células germinais; oviduto contendo óvulos livres. Cobaia 19.

Fig. 19 — Células vitelinas do interior dos folículos glandulares. Cobaia 19.

Fig. 20 — Testículo contendo células germinais imaturas (com núcleo grande e redondo) e espermatozóides (com núcleo puntiforme ou alongado). Cobaia 18.

Fig. 21 — Ovário rudimentar em macho secundariamente hermaphrodita. Cobaia 18.

Com exceção das figuras 20 e 21, feitas de material corado pelo carmim, todas as outras reproduzem aspectos observados *in vivo*, sem coloração.

TABELA 1

RESULTADOS OBTIDOS PELA DISSECÇÃO de 400 *A. OLIVACEUS* DO FOCO REFERIDO NESTE TRABALHO, PARA OBTENÇÃO DOS ÍNDICES DE INFESTAÇÃO POR LARVAS DE TREMATODEOS

DIAMETRO DOS MOLUSCOS (mm)	NÚMERO DE EXEMPLARES	INFESTADOS POR SCHISTOSOMA MANSONI	INFESTADOS POR CLINOSTOMUM HELUANS
2	1		
3	1		
4	1		
5	3		
6	3		
7	5		
8	10	1	
9	6		
10	7		
11	11		
12	17	2	
13	22	2	
14	26	2	1
15	35	2	1
16	38	2	1
17	42	8	2
18	45	4	1
19	36	5	1
20	39	1	1
21	26	1	
22	14	3	1
23	6		
24	3		
25	1		
26	1		
27	1		1
	400	33 (8.25%)	10 (2.5%)

TABELA 2

RESULTADOS DAS INOCULAÇÕES DE CERCÁRIAS DO *S. MANSONI* em 30 COBAIAS, CADA UMA DESTAS ÚLTIMAS RECEBENDO CERCÁRIAS PROVENIENTES DE UM ÚNICO MOLUSCO

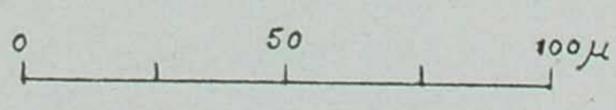
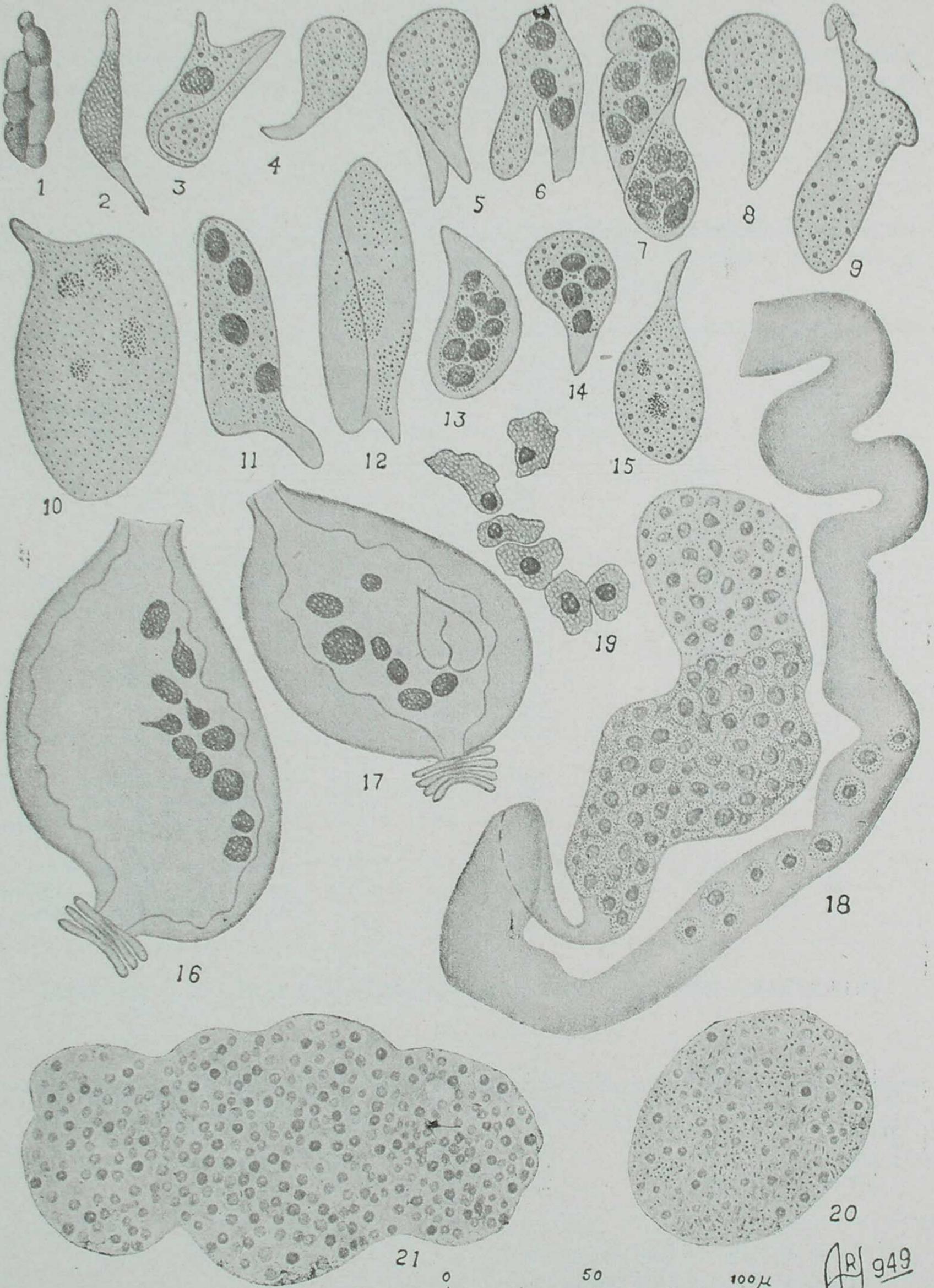
COBAIA N.º	MOLUSCO N.º	DURAÇÃO DA INFESTAÇÃO EM DIAS	NÚMERO DE TREMATÓDEOS NO FÍGADO		OBSERVAÇÕES
			♂♂	♀♀	
1	1	111	165	0	
2	2	112	276	0	
3	3	120	0	306	Ausência de ovos no útero
4	4	126	0	238	Ausência de ovos no útero
5	5	129	0	61	Ausência de ovos no útero
6	6	131	301	0	
7	7	133	0	72	Ausência de ovos no útero
8	8	140	628	0	
9	9	150	227	0	
10	10	160	0	34	9 com ovos no útero
11	11	230	0	83	Ausência de ovos no útero
12	12	231	0	64	Ausência de ovos no útero
13	13	233	88	0	
14	14	234	168	0	
15	15	235	0	26	1 com ovo no útero
16	16	236	520	0	
17	17	237	958	0	
18	18	238	323	0	29% hermafroditas secundários
19	19	239	0	79	28 com ovos no útero
20	20	241	0	53	3 com ovos no útero
21	21	242	356	0	25% hermafroditas secundários
22	22	244	0	18	Ausência de ovos no útero
23	23	246	2	0	Poucas cercárias inoculadas
24	24	248	3	0	Poucas cercárias inoculadas

INFESTADOS POR ♂♂ — 13 CASOS — INFESTADOS POR ♀♀ — 11 CASOS

2ª Série	2-A	2	137	372	0	
	3-A	3	145	0	63	4 com ovos no útero
	7-A	7	123	0	12	Ausência de ovos no útero
	8-A	8	205	34	0	
	10-A	10	233	0	83	8 com ovos no útero
	17-A	17	238	285	0	

Total de ♂♂ — 4706 (média 294)

Total de ♀♀ — 1192 (média 85)



ARJ 949