

VIABILIDADE DE MIRACÍDIOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI*, OBTIDOS DE FEZES E DE GRANULOMAS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM A LINHAGEM BH*

Eliana Maria Zanotti-Magalhães**
Sônia Minervino de Paiva***
Luiz Augusto Magalhães**
José Ferreira de Carvalho****

ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M. et al. Viabilidade de miracídios de *Schistosoma mansoni*, obtidos de fezes e de granulomas hepáticos de camundongos experimentalmente infectados com a linhagem BH. Rev. Saúde públ., S. Paulo, 22:479-83, 1988.

RESUMO: Estudou-se comparativamente a viabilidade, em moluscos hospedeiros, de miracídios de *Schistosoma mansoni* de duas origens: de ovos eliminados com as fezes e de granulomas hepáticos. Procurou-se saber se havia efeito da origem sobre o número total de cercárias obtidas e sobre o período de eliminação de cercárias. Foram também verificados o período pré-patente da infecção dos moluscos, a sobrevivência do caramujo após a infecção e o sexo das cercárias eliminadas. Concluiu-se que: a) o período pré-patente foi maior nos moluscos infectados por miracídios provenientes de granulomas hepáticos; b) a sobrevivência dos moluscos após a infecção foi maior naqueles infectados por miracídios provenientes de granulomas hepáticos; c) o número de cercárias eliminadas por molusco infectado com miracídios provenientes de granulomas hepáticos foi três vezes maior que o número de cercárias eliminadas por moluscos infectados com miracídios provenientes de ovos eliminados com as fezes.

UNITERMOS: *Schistosoma mansoni*. Relações hospedeiro-parasita. *Biomphalaria glabrata*, parasitologia. Camundongos, parasitologia.

INTRODUÇÃO

Na manutenção do ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*, em laboratório, são utilizadas comumente duas técnicas para obtenção de miracídios: extração das larvas de ovos colhidos nas fezes ou em granulomas hepáticos.

Procurando testar a eficiência desses métodos, estudamos a viabilidade de miracídios provenientes de fezes e de granulomas hepáticos de camundongos albinos, experimentalmente infectados por *S. mansoni* da linhagem BH (Pa-raense e Corrêa¹⁰, 1963).

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos miracídios provenientes de ovos colhidos nas fezes

Camundongos albinos Swiss, heterogênicos, com aproximadamente 60 dias de infecção,

foram colocados em gaiolas com tampa de tela. As gaiolas contendo os camundongos foram depositadas, com a tampa de tela voltada para baixo, sobre bandejas forradas com papel umidificado. As fezes foram obtidas, por esse procedimento, durante a noite.

As fezes depositadas nas bandejas foram recolhidas, misturadas em água desclorada e sedimentada no escuro, no interior de um refrigerador, por aproximadamente 3 horas (Souza e cols.¹², 1981).

O sedimento após ser lavado em água foi exposto à ação da luz e do calor (aproximadamente 28°C) fornecidos por lâmpada elétrica incandescente de 60 W.

Assim que os miracídios eclodiram, foram transportados, individualmente, com pipeta, para pequenos frascos que continham um molusco *Biomphalaria glabrata* albino de 7 a 9mm de diâmetro.

Cada molusco foi colocado em contacto com

* Realizado com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq — Proc. n° 403797/82).

** Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Caixa Postal 6109 — 13081 — Campinas, SP — Brasil.

*** Departamento de Histologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) — Caixa Postal 6109 — 13081 — Campinas, SP — Brasil.

**** Departamento de Estatística do Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) — Caixa Postal 6109 — 13081 — Campinas, SP — Brasil.

10 miracídios e exposto à luz e ao calor por cerca de 12 h.

Foram utilizados 50 moluscos. Decorridos 30 dias de exposição aos miracídios, os moluscos foram examinados semanalmente para a verificação da liberação de cercárias.

A contagem das cercárias foi feita semanalmente, enquanto o molusco permanecia vivo. Isto significa que os valores que expressam o número de cercárias eliminadas refletem, também, o período de sobrevivência do molusco.

As cercárias foram obtidas pela exposição dos moluscos à luz e ao calor fornecidos por lâmpada elétrica (aproximadamente 28°C) durante 2 h. As cercárias foram contadas em placas de Petri com fundo quadriculado.

Anotaram-se o primeiro e o último dia da eliminação de cercárias e o dia da morte do molusco.

Obtenção de miracídios provenientes de granulomas hepáticos

Camundongos com aproximadamente 60 dias de infecção foram sacrificados e deles extraído o fígado. O órgão foi triturado em liquidificador doméstico (Pellegrino e Brener¹¹, 1956) com água desclorada e recolhido em copo de sedimentação, que foi mantido em refrigerador, por aproximadamente 3 h. O sedimento obtido, após ser lavado em água, foi depositado em placa de Petri e exposto à ação da luz e do calor, fornecidos por lâmpada elétrica de 60 W. Logo após a eclosão, os miracídios foram colocados frente a exemplares de *B. glabrata* albinos de 7 a 9mm de diâmetro. Cada molusco foi colocado em contacto com 10 miracídios. Foram utilizados 50 moluscos. A partir deste momento, procedeu-se da mesma maneira já mencionada e referente a miracídios obtidos de ovos eliminados pelas fezes.

Determinação do sexo das cercárias

As cercárias obtidas de cada molusco foram utilizadas para a infecção de camundongos albinos (100 cercárias por roedor). Os camundongos foram infectados através da exposição da cauda dos animais à suspensão cercariana. Após 60 dias da data de infecção, os roedores foram sacrificados para a determinação do sexo dos esquistossomos.

Análise estatística

O experimento foi conduzido de forma completamente aleatorizada, com dois tratamentos:

obtenção de miracídios das fezes e obtenção de miracídios do fígado. Como descrito anteriormente, tomaram-se 100 moluscos, que foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 50.

As respostas de interesse foram: o total de cercárias obtidas, o tempo de produção de cercárias, a taxa de infecção dos moluscos e a sobrevivência dos moluscos após a eliminação de cercárias. A análise das duas primeiras respostas e da sobrevivência dos moluscos foi baseada em procedimento de análises de variância, ajustando-se modelos lineares, com uma bateria de análises de resíduos, para verificação da validade do modelo. Valores aberrantes foram eliminados pela análise de resíduos. A taxa de infecção foi analisada através de procedimentos para tabelas de frequências, usando-se estatísticas qui-quadrado de Pearson.

Os cálculos foram feitos com o SAS (Statistical Analysis System), em computador IBM/370-155 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, sob OS-VS.

RESULTADOS

Os resultados estão contidos nas Tabelas 1 e 2.

Dos moluscos expostos a miracídios provenientes de granulomas hepáticos infectaram-se 29 exemplares (58%), e dos moluscos expostos a miracídios provenientes de ovos eliminados com as fezes infectaram-se 28 (56%). Estas taxas de infecção foram consideradas equivalentes.

A análise do efeito dos métodos de obtenção de miracídios sobre a mortalidade dos moluscos e a eliminação de cercárias foi feita usando o método de Grizzle e cols.⁷ (1969). Não foram observadas diferenças nas distribuições do cruzamento de mortalidade com eliminação entre os dois métodos ($p = 0,35$).

A taxa de mortalidade foi obtida durante o período de realização do experimento, ao longo de 11 meses. Ao fim desse período, nos dois moluscos sobreviventes que tinham sido submetidos aos miracídios oriundos de ovos colhidos nas fezes, e nos seis moluscos sobreviventes que tinham sido submetidos aos miracídios oriundos de granulomas hepáticos e que nunca apresentaram eliminação de cercárias, não se observaram esporocistos em desenvolvimento após observação em lupa estereoscópica.

Verificou-se que houve efeito de origem, quanto ao período pré-patente, quanto à sobrevivência do molusco submetido à infecção e quanto ao número de cercárias eliminadas.

Não foi observado efeito de origem dos mira-

TABELA 1

Resultado das observações feitas em *Biomphalaria glabrata* submetida à infecção com 10 miracídios de *Schistosoma mansoni* (linhagem BH) obtidos de ovos colhidos nas fezes de camundongos.

Molusco	Período de eliminação de cercárias*	Período pré-patente*	Sobrevida do molusco após a infecção*	Número de cercárias eliminadas	Sexo das cercárias
1	5	43	49	916	MF
2	5	43	49	1832	M
3	20	43	63	2068	MF
4	20	43	63	3294	MF
5	28	43	71	4233	MF
6	20	43	63	3690	MF
7	32	43	105	4668	MF
8	34	43	77	2859	MF
9	125	56	181	153	ND
10	75	56	131	6088	MF
11	34	60	124	3326	MF
12	7	67	105	1700	MF
13	7	98	105	23	ND
14	7	112	119	600	ND
15	44	47	91	8185	ND
16	44	47	91	8304	MF
17	14	47	61	920	MF
18	16	56	72	1090	ND
19	47	56	92	6934	MF
20	12	56	63	14	ND
21	57	56	113	4377	MF
22	21	56	77	973	ND
23	8	70	78	750	ND
24	33	70	92	2581	MF
25	21	70	91	1494	MF
26	48	84	132	662	MF
27	7	84	91	46	ND
28	79	119	198	4959	MF
29	76	119	195	365	ND
Média	33	63	98	2659	-

* - em dias; M - masculino; F - feminino; ND - não determinado.

cídios quanto ao período de eliminação de cercárias.

Na maior parte das vezes, os moluscos, quer infectados por miracídios de fezes quer por miracídios de granulomas hepáticos, apresentaram eliminação de cercárias dos dois sexos.

Em alguns casos não foi possível a determinação do sexo das cercárias, ou porque as cercárias foram insuficientes para a infecção dos camundongos, ou porque os camundongos infectados morreram antes que fosse possível a verificação do sexo dos vermes.

DISCUSSÃO

Frandsen⁵ (1979) lembrou que dependendo da espécie de hospedeiro vertebrado utilizado para manutenção do ciclo, o *S. mansoni* sofre pressões seletivas diversas e tem, por este motivo, seu comportamento diversificado.

Taylor e cols.¹³ (1977) assinalaram que essas pressões seletivas aumentam quando são utilizados para a infecção de moluscos, miracídios provenientes de ovos eliminados pelas fezes.

Em nosso experimento, os miracídios provenientes do fígado não pareceram ter sofrido qualquer ação por parte do hospedeiro vertebrado e que tivesse afetado sua viabilidade, uma vez que o grupo de moluscos infectados com miracídios oriundos do fígado apresentou maior número de cercárias eliminadas e maior sobrevivência dos moluscos.

São numerosas as pesquisas que demonstram a presença de mecanismos imunológicos do molusco, agindo contra as larvas de *S. mansoni* (Michelson⁹, 1964; Lie e col.⁸, 1980; Bayne e col.⁴, 1980; Abdul-Salam & Michelson^{1,2,3}, 1980, 1983; Granath & Yoshino⁶, 1984).

Sabe-se que a larva do *S. mansoni*, no molusco, pode escapar a esta ação de caráter imunológico por estar envolta com material do pró-

TABELA 2

Resultado das observações feitas em *Biomphalaria glabrata* submetida à infecção com 10 miracídios de *Schistosoma mansoni* (linhagem BH) obtidos de granulomas hepáticos de camundongos.

Molusco	Período de eliminação de cercárias *	Período pré-patente *	Sobrevida do molusco após a infecção *	Número de cercárias eliminadas	Sexo das cercárias
1	96	48	144	20874	MF
2	118	48	166	19243	MF
3	21	48	69	2245	MF
4	7	48	55	48	ND
5	7	48	55	88	ND
6	42	62	104	5550	MF
7	21	62	83	424	ND
8	21	62	83	2435	MF
9	45	66	111	3178	MF
10	28	66	94	440	ND
11	42	76	118	700	MF
12	7	76	83	17	ND
13	21	97	118	2291	MF
14	21	97	118	126	ND
15	97	73	87	40936	MF
16	34	132	166	1292	MF
17	14	63	77	27	ND
18	230	63	293	104065	MF
19	24	63	87	400	MF
20	61	63	124	3679	F
21	27	70	95	306	MF
22	10	77	87	80	ND
23	82	84	166	19730	MF
24	40	84	124	2915	M
25	34	97	131	31	ND
26	69	97	166	7345	MF
27	26	152	179	1368	MF
28	62	159	221	13300	M
Média	47	78	121	9040	-

* - em dias; M - masculino; F - feminino; ND - não determinado.

prio molusco, não sendo assim reconhecida pelos amebócitos como corpo estranho.

O retardamento do desenvolvimento dos esporocistos, oriundos dos miracídios obtidos de granulomas hepáticos, verificado em nosso experimento, pode dever-se à presença de determinantes antigênicos adquiridos pelo miracídio durante a permanência do ovo no parênquima hepático. Estes determinantes poderiam ocasionar uma maior ação amebocitária, o que retardaria o desenvolvimento dos esporocistos.

O menor número de cercárias eliminadas pelo grupo de moluscos infectados com miracídios provenientes de ovos colhidos nas fezes poderia ser uma consequência da menor viabilidade dos miracídios causadas pelos produtos tóxicos presentes nas fezes e urina dos camundongos.

A eliminação de cercárias dos dois sexos pelos moluscos mostrou que os planorbídeos submetidos à infecção por vários miracídios podem ser infectados por mais de uma larva e que os

esporocistos formados podem desenvolver-se concomitantemente até sua completa maturação.

CONCLUSÕES

- 1) A taxa de infecção dos moluscos infectados por miracídios das duas origens foi equivalente.
- 2) O período pré-patente foi maior nos moluscos infectados por miracídios provenientes de granulomas hepáticos.
- 3) A sobrevivência dos moluscos, após a infecção, foi maior naqueles infectados por miracídios provenientes de granulomas hepáticos.
- 4) No final do experimento, a quantidade de cercárias obtidas de moluscos infectados por miracídios oriundos de granulomas hepáticos

cos foi cerca de três vezes maior do que a obtida de moluscos infectados com miracídeos provenientes de ovos eliminados com as fezes.

É importante lembrar que a obtenção de miracídeos de granulomas hepáticos apresenta o inconveniente do sacrifício do camundongo, fonte produtora das larvas.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M. et al. [Viability of *Schistosoma mansoni* miracidia obtained from feces and liver granuloma of experimental mice infected with the BH strain]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 22:479-83, 1988.

ABSTRACT: The viability of *Schistosoma mansoni* miracidia in host molluscs, obtained from two origins is examined: from eggs eliminated with feces of the definitive hosts and liver granuloma eggs. The effect of the origin of the miracidia on the number of cercariae and on the time of cercariae elimination was investigated. The prepatent period of cercariae elimination, snail survival after infection and the sex of the eliminated cercariae were also observed. The following results were obtained: a) snails infected with miracidia from liver granuloma eggs took longer to begin to eliminate cercariae; b) snail survival after infection was longer in the group infected with miracidia from liver granuloma eggs; c) the total number of cercariae produced by the snail group infected with miracidia from liver granuloma eggs was three times that of the group infected with miracidia from eggs eliminated with feces.

UNITERMS: *Schistosoma mansoni*. Host-parasite relations. *Biomphalaria glabrata*, parasitology. Mice, parasitology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. *B. glabrata* amoebocytes: effects of *S. mansoni* infection on in vitro phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 35:241-8, 1980.
2. ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. *B. glabrata* amoebocytes: assay of factors influencing in vitro phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 36:56-9, 1980.
3. ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. *Schistosoma mansoni*: immunofluorescent detection of its antigen reacting with *Biomphalaria glabrata* amoebocytes. *Exp. Parasit.*, 55:132-7, 1983.
4. BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M.; DEWAN, P.C. *Schistosoma mansoni*: cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail host for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasit.*, 50:409-16, 1980.
5. FRANSEN, F. Discussion of the relationship between *Schistosoma* and their intermediate hosts, assessment of the degree of host-parasite compatibility and evolution of *Schistosoma* taxonomy. *Z. Parasitenkd.*, 58:275-96, 1979.
6. GRANATH Jr., W.O. & YOSHINO, T.P. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasit.* 58:188-93, 1984.
7. GRIZZLE, J.E.; STARMER, C.F.; KOCH, G.G. Analysis of categorical data by linear models. *Biometrics*, 25:489-504, 1969.
8. LIE, K.J.; JEONG, K.H.; HEYNEMAN, D. Tissue reactions induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 74:157-66, 1980.
9. MICHELSON, E.H. Miracidia-immobilizing substances in extracts prepared from snails infected with *Schistosoma mansoni*. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 13:36-42, 1964.
10. PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L. Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 5:23-9, 1963.
11. PELLEGRINO, J. & BRENER, Z. Method for isolating *Schistosoma mansoni* granulomas from mouse liver. *J. Parasit.*, 42:564, 1956.
12. SOUZA, C.P.; RODRIGUES, M.S.; AZEVEDO, M.L.L.; ARAUJO, N. Estudo comparativo de duas técnicas para obtenção de miracídeos de *Schistosoma mansoni* em fezes humanas. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 23:251-5, 1981.
13. TAYLOR, M.G.; JAMES, E.R.; NELSON, G.S.; BICKLEY, Q.; DUNNE, D.W.; DOBINSON, A.R.; DARGIE, J.D.; BERRY, C.; HUSSEIN, M.F. Modification of pathogenicity of *Schistosoma mattheei* for sheep by passage of parasite in hamsters. *J. Helminthol.*, 51:337-45, 1977.

Recebido para publicação em 3/2/1988.
Reapresentado em 2/9/1988.
Aprovado para publicação em 8/9/1988.