

UM ESTUDO COMPARATIVO DAS CEPAS FEIRA DE SANTANA (BAHIA) E PORTO RICO DO *SCHISTOSOMA MANSONI* NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO

ZILTON A. ANDRADE & MOISÉS SADIGURSKY

Dois grupos de camundongos, infectados com cem cercárias do S. mansoni, um com a cepa Porto Rico e outro com a cepa Feira de Santana mostraram resultados semelhantes quanto à recuperação de esquistossômulos pulmonares, recuperação de vermes do sistema porta, número de ovos por grama de tecido no fígado e intestinos, lesões histopatológicas e mortalidade.

Na realidade as diferenças entre animais infectados pela mesma cepa foram maiores que quando os dados conjuntos das duas cepas foram considerados.

Várias tentativas têm sido feitas para verificar se existem diferenças biológicas entre cepas do *Schistosoma mansoni* provenientes de diferentes áreas geográficas (Saoud, 1966; Magalhães & Carvalho, 1978; Warren, 1967), de pacientes com diferentes formas clínicas da doença (Costa & Katz, 1982), ou daqueles que não se curaram com quimioterápicos de eficácia comprovada (Araujo et al., 1980). Por outro lado, têm sido procuradas diferenças na capacidade das cepas em infectar caramujos (Files & Gram, 1949), em infectar diversos hospedeiros tais como camundongos, hamsters e macacos (Anderson & Cheever, 1972; Powers & Cheever, 1972), e mesmo em apresentar diferenças morfológicas (Voge, 1980), isoenzimáticas (Fletcher, Lo Verde & Woodruff, 1981) e de marcadores de DNA (Mc Cutchan et al., 1984). Os métodos empregados em tais estudos são muito variados e os resultados obtidos têm sido contraditórios. Pode-se mesmo dizer que, até o momento, não se sabe se há realmente diferenças entre amostras do *S. mansoni* que possam ter um significado biológico ou patológico de nítida importância.

Todavia o problema persiste e toda a vez que se obtêm resultados discordantes em trabalhos experimentais com o *S. mansoni*, há uma tendência a se atribuir tais discrepâncias ao fator cepa do parasito. A maioria dos trabalhos experimentais feitos fora do Brasil costuma ser com a cepa Porto Rico do *S. mansoni*. No Brasil cada pesquisador utiliza a sua cepa regional e, quando estas cepas são empregadas no exterior, recebem o termo genérico de cepa Brasil. Frequentemente surge a necessidade de se comparar resultados de pesquisas feitas com a cepa Porto Rico e a cepa brasileira e não sabemos até que ponto o uso destas estará influenciando os resultados. Na literatura sobre o assunto pode-se encontrar dois trabalhos que incluem comparações entre as cepas de Porto Rico e da Bahia. O primeiro registra diferenças significativas (Warren, 1967) enquanto o segundo (Anderson & Cheever, 1972) não as encontrou, ou melhor, registrou que as diferenças porventura encontradas não diferiam daquelas variações que uma mesma cepa costuma apresentar.

Em vista do interesse do assunto, foi feito o presente trabalho para se verificar como se comportam diferencialmente as cepas Porto Rico e Bahia (Feira de Santana) na sua capacidade de causar infecção experimental no camundongo suíço albino.

MATERIAL E MÉTODOS

A cepa Porto Rico do *S. mansoni* (PR) foi obtida por gentileza do Dr. Eric Van Marck, do Instituto de Medicina Tropical de Antuérpia, Bélgica, que nos forneceu os caramujos (*Biomphalaria glabrata*) hospedeiros naturais da cepa, já infectados.

A cepa Feira de Santana (FS) foi isolada a partir de pacientes humanos da área do município de Feira de Santana, Bahia e vem sendo mantida há vários anos no laboratório através passagens em camundongos e em *B. glabrata* proveniente da mesma área.

Foram utilizados camundongos brancos, de ambos os sexos, jovens, com peso inicial de 20-22 g, mantidos em caixas amplas e alimentados com dieta padrão comercial *ad libitum*. Numa primeira experiência foram infectados vinte camundongos com 100 cercárias cada, sendo dez camundongos para cada cepa do *S. mansoni*. Estes animais foram sacrificados cinco dias mais tarde para a contagem dos esquistossômulos pulmonares.

Numa segunda experiência foram infectados cem animais com cercárias da cepa PR, sendo 50 machos e 50 fêmeas, com inóculo de cem cercárias por animal. No mesmo dia foram também infectados, da mesma maneira, cem camundongos com a cepa FS do *S. mansoni*. As cercárias foram obtidas após eliminação natural a partir de caramujos infectados no laboratório e utilizadas dentro da primeira hora. Os animais foram previamente colocados em água morna para eliminação de fezes e urina, limpos e colocados em fras-

cos individuais com a cauda e as patas imersas em água contendo aproximadamente cem cercárias, onde permaneceram por 50 minutos sob luz artificial. Os sacrifícios foram feitos oito e doze semanas após a exposição cercariana.

Foram utilizados os seguintes métodos de estudo:

1. **Contagem dos esquistossômulos pulmonares:** realizado duas vezes, em duas experiências separadas. Em ambos os casos, dez animais (cinco machos e cinco fêmeas) de cada grupo (PR e FS) foram sacrificados cinco dias após a exposição cercariana. A coleta e a contagem dos esquistossômulos pulmonares foram feitas segundo a técnica de Perez, Clegg & Smithers (1974).

2. **Recuperação de vermes adultos:** oito semanas após a infecção e com os animais mostrando presença de ovos do *S. mansoni* pelo exame direto das fezes, foram sacrificados 14 animais, sete infectados pela cepa FS e sete infectados pela cepa PR. Um mês mais tarde idêntico sacrifício foi feito em outros 14 animais. A técnica foi a da perfusão com salina utilizando-se um perfusor elétrico marca Brewer (Scientific Equipment Products, Baltimore, Md, USA). Os vermes coletados durante a perfusão e outros identificados em pequenos vasos mesentéricos ou mesmo no interior do fígado foram contados e classificados conforme estivessem acasalados ou livres (machos e fêmeas).

3. **Contagem dos ovos nos tecidos:** após a perfusão e remoção de pequenos fragmentos do fígado e do intestino para exame histopatológico, estes órgãos foram pesados e colocados separadamente em frascos com quantidades variáveis, mas precisas para cada caso, de potassa (OHK) a 5%. O material foi então colocado em estufa a 37°C por aproximadamente 18 horas. A avaliação do número total de ovos e do número de ovos por grama de tecido foi feito de acordo com o método de Cheever (1970).

4. **Histopatologia:** fragmentos de fígado, baço, pulmão e intestinos foram fixados em líquido de Bouin e impregnados em parafina, sendo as secções de 5 micrômetros de espessura coradas pela hematoxilina-eosina. Foram incluídos materiais representativos da infecção com oito e doze semanas de duração. A análise ao microscópio foi a princípio realizada sem o conhecimento do grupo a que pertencia o material.

5. **Mortalidade:** foram registrados para efeito comparativo todos os animais que morreram espontaneamente após a infecção cercariana e daí até três meses quando o experimento foi encerrado, tendo-se sacrificado os animais sobreviventes.

6. **Análise estatística:** foi aplicado o teste "t de Student" para amostras independentes.

RESULTADOS

O resultado das contagens de esquistossômulos pulmonares em duas experiências separadas está demonstrado na Fig. 1. Não houve diferença significativa entre os animais infectados com a cepa PR em relação com aqueles infectados com a cepa FS, em quaisquer dos dois experimentos.

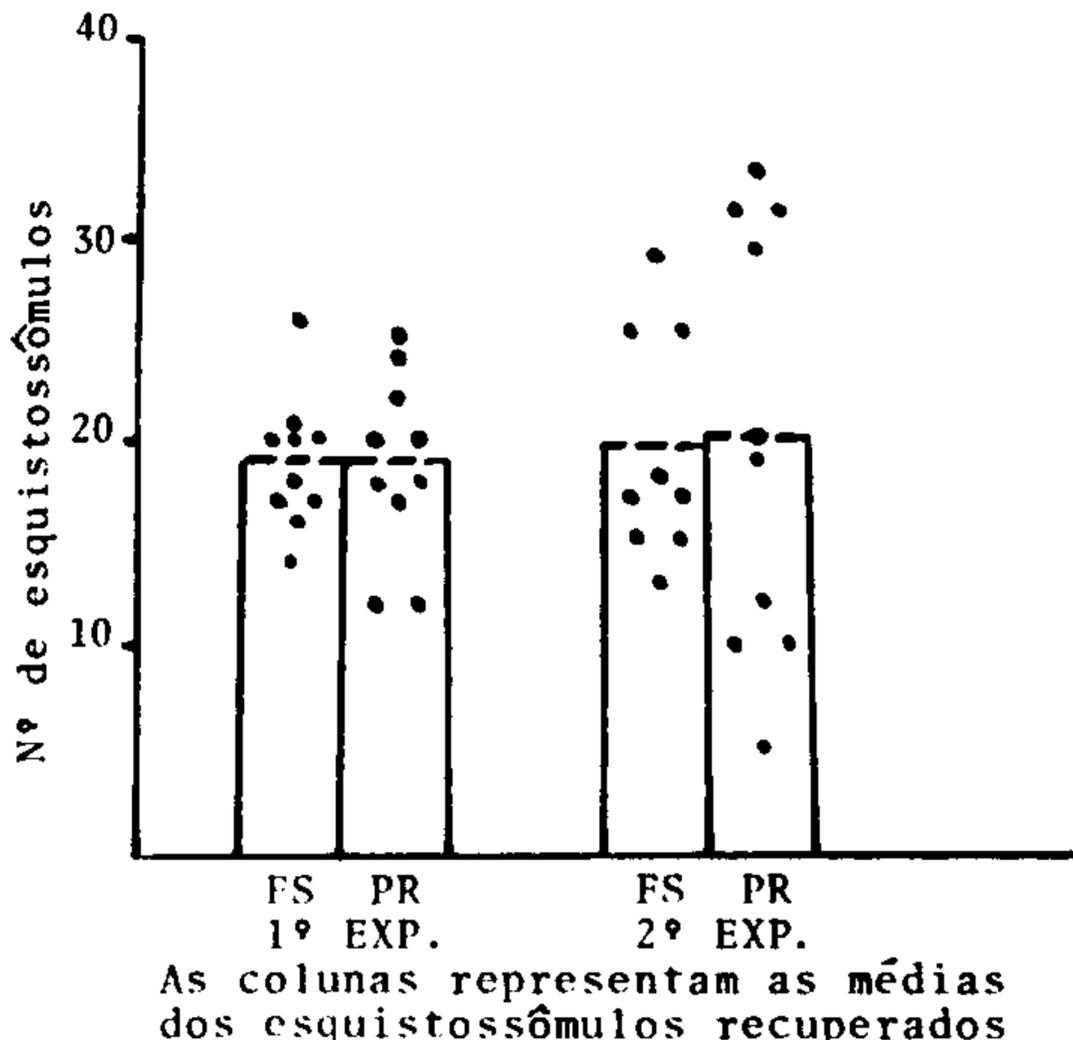


Fig. 1: contagem dos esquistossômulos recuperados do pulmão de camundongos após cinco dias da infecção com cem cercárias do *Schistosoma mansoni*, das cepas Feira de Santana (FS) e Porto Rico (PR), em dois experimentos separados.

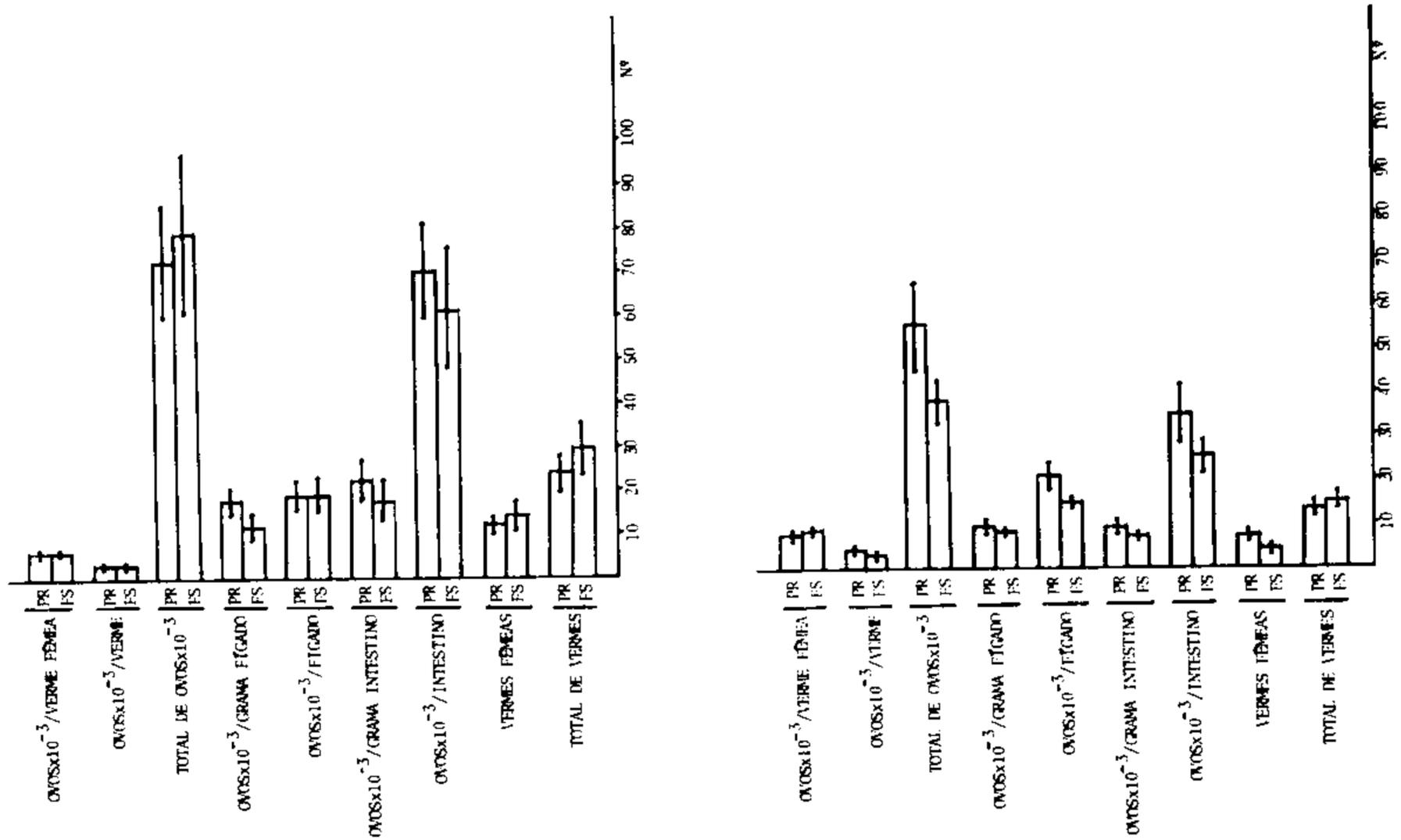


Fig. 2: dados parasitológicos comparativos entre duas cepas do *Schistosoma mansoni* (FS e PR) em camundongos infectados com cem cercárias há oito semanas. Fig. 3: dados parasitológicos comparativos obtidos de camundongos infectados há doze semanas por cem cercárias provenientes de duas cepas do *Schistosoma mansoni* (FS e PR).

Nas Figs. 2 e 3 estão expressos os resultados com a recuperação de vermes e a contagem dos ovos, respectivamente para os animais infectados durante oito e doze semanas. O exame histopatológico revelou lesões granulomatosas formadas em torno dos ovos maduros do *S. mansoni* ao lado de inflamação crônica inespecífica no fígado, pulmão e intestino. Não foi possível se separar lâminas através de alguns aspectos microscópicos, quando o exame foi feito "às cegas". Não foram notadas diferenças significativas no tamanho dos granulomas periovulares, na sua composição celular, na presença de eosinófilos, de fibrose, na relação entre ovos maduros e imaturos.

Quanto à mortalidade, morreram coincidentemente 37 animais em cada grupo, a maioria no terceiro e último mês da infecção, quando morreram 22 animais infectados pela cepa FS e 20 pela cepa PR.

COMENTÁRIOS

Com as técnicas de recuperação de esquistossômulos pulmonares, recuperação de vermes adultos do sistema porta, contagem de ovos nos intestinos e no fígado, exame histopatológico e observação da mortalidade não foi possível se notar qualquer diferença significativa entre os camundongos infectados com cem cercárias da cepa Porto Rico do *S. mansoni* e aqueles com igual infecção pela cepa Feira de Santana.

Estes dados sugerem que as diferenças encontradas nestes parâmetros em trabalhos experimentais usando estas cepas, provavelmente dependem de outros fatores que não uma particular diferença biológica entre as cepas. Em ambas as cepas, o maior número de ovos nos tecidos do camundongo, e daí o maior grau de lesões, se correlacionou com o número de vermes fêmeas presentes.

Os achados observados não excluem a possibilidade de existência de diferenças entre as cepas do *S. mansoni* provenientes de diferentes áreas geográficas. O uso de técnicas sensíveis de caracterização de segmentos do DNA por Mc Cutchan et al. (1984) permitiu detectar diferenças genéticas características de cepas particulares do *S. mansoni*, mas ao mesmo tempo, também diferenças individuais numa mesma cepa. Há, portanto, um polimorfismo genético nas cepas do *S. mansoni*, que a reprodução bissexuada pode tornar cada vez mais complexo. Costa & Katz (1982) verificaram que as cepas de uma mesma área podem apresentar diferenças estatisticamente significantes na infecção do camundongo no período prepatente, na infectividade, na contagem leucocitária, no número de ovos por fêmeas e na resposta terapêutica. Estes autores concluem que estas diferenças não parecem influenciar o curso da doença humana e estão dentro dos limites das variações esperadas numa mesma cepa.

Nossos resultados também mostraram que as variações individuais produzidas pela mesma cepa na infecção do camundongo, embora mínimas, foram maiores que aquelas observadas no conjunto entre a cepa Feira de Santana e a de Porto Rico.

SUMMARY

A comparative study of mice infected either with the Porto Rican or a Brazilian (Feira de Santana) strain of *Schistosoma mansoni* failed to show any difference regarding recovery of five day lung worms, recovery of adult worms from the portal system, number of eggs per gram of tissue in liver and intestines, histopathology or mortality rate.

In fact, the differences, although small, were greater among animals infected with the same strain, that when the total results from both strains were compared.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, L.A. & CHEEVER, A.W., 1972. Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 46 :233-242.
- ARAUJO, N.; KATZ, N.; DIAS, E.P. & SOUZA, C.P., 1980. Susceptibility to chemotherapeutic agents of strains of *Schistosoma mansoni* isolated from treated and untreated patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 :890-894.
- CHEEVER, A.W., 1970. Relative resistance of eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 43 :601-603.
- 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.
- FILES, V.S. & CRAM, E.B., 1949. A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 35 :555-560.
- FLETCHER, M.; LO VERDE, P.T. & WOODRUFF, D.S., 1981. Genetic variation in *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30 :406-421.
- MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F., 1973. Estudo morfológico de *Schistosoma mansoni* pertencentes a linhagens de Belo Horizonte (MG) e de São José dos Campos (SP). *Rev. Saúde Pùb. São Paulo*, 7 :289-294.
- MC CUTCHAN, T.F.; SIMPSON, J.G.; MULLINS, J.A.; SHER, A.; NASH, T.; LEWIS, F. & RICHARDS, C., 1984. Differentiation of schistosomes by species, strain, and sex by using cloned DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 :889-893.
- PEREZ, H.; CLEGG, J.A. & SMITHERS, S.R., 1974. Acquired immunity to *S. mansoni* in the rat: Measurement of immunity by lung recovery technique. *Parasitology* 69 :349-359.
- POWERS, K.G. & CHEEVER, A.W., 1972. Comparison of geographical strains of *Schistosoma mansoni* in the rhesus monkey. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 46 :295-300.
- SAOUD, M.F.A., 1966. The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60 :585-600.
- VOGE, M., 1980. An unusual structural feature of the Egyptian strain of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 66 :862-863.
- WARRE, 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. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61 :795-802.