

Infecção experimental de camundongos albinos com cercárias de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, previamente submetidas a ação de termofosfato magnésiano*.

Roberto Milward-de-Andrade**

Marcos B. Souza**

Marco Aurélio S. Paranhos**

Foi realizada infecção experimental de camundongos albinos ("Swiss inbred") com cercárias de Schistosoma mansoni, cepa LE, submetidas à ação do adubo termofosfato magnésiano (Tfm), usualmente utilizado em latossolos tropicais e capaz, quando ingerido, de provocar o bloqueio da ovogênese de moluscos planorbídeos. Nas condições do experimento, observou-se a infecção dos roedores. Porém, o número de ovos eliminados pelo grupo controle, representado por cinco camundongos, foi sensivelmente maior que o do grupo Tfm, ainda que a recuperação de vermes, por perfusão, tenha sido bem menor. Do grupo Tfm, foram recuperados 163 (98,2%) vermes adultos machos e apenas 3 (1,8%) fêmeas, isoladas. Do grupo controle, a perfusão proporcionou 53 vermes adultos, sendo 13 machos, 18 fêmeas e 11 casais. Cada camundongo foi exposto a 150 cercárias.

INTRODUÇÃO

Dados experimentais (Milward-de-Andrade, 1980) revelaram que *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) infectadas com *S. mansoni* sofreram bloqueio da ovogênese e redução quantitativa de cercárias liberadas, quando os planorbíneos encontravam-se sob a ação do adubo termofostato magnésiano (Tfm) — composto mineral resultante ordinariamente da mescla, em altas temperaturas (1.500°C), de apatita (rocha fosfática) e dolomita (rocha calcomagnésiana) ou olivina (ortossilicato de Fe e Mg) (Guardani, 1979).

Por outro lado, foi também admitido (Milward-de-Andrade & Torga, 1981) que a aplicação continuada de Tfm em latossolos irrigados de regiões endêmicas de esquistossomose poderia, secundariamente, contribuir para a redução de populações naturais moluscos — posto que uma relação alta de Mg/Ca resulta sempre na interrupção da oviposição de planorbídeos (Harrison

* Trabalho complementado com auxílio do FIPPEC (Fundação Banco do Brasil S/a) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

** Profissionais da Escola de Saúde Pública — ENSP/FIOCRUZ.

& cols., 1966; Leveque & cols., 1978; Milward-de-Andrade & cols., 1984a, b, c, d, e; 1986a, b; 1987).

No presente trabalho, apresentam-se os resultados da infecção experimental de camundongos albinos com cercárias de *S. mansoni* (cepa LE), submetidas à ação do termofosfato magnésiano previamente à infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento aqui relatado teve duração de 88 dias, sendo anteriormente comunicados seus resultados essenciais (Milward-de-Andrade & cols., 1986). A seguir, indicam-se os materiais utilizados e o detalhamento metodológico adotado.

1. *Termofosfato magnésiano (Tfm)* — Utilizou-se produto industrializado em Liberdade, MG, cuja análise (nº 1297/84) processada em espectrofotômetro de absorção atômica, no INCQS/FIOCRUZ, indicou a presença de 13 diferentes elementos químicos, a saber: Ca, Mg, P, Si, Ba, Al, Fe, Cr, Ti, Mn, Na, K e Zn. Adiante, em local apropriado, encontram-se registradas as concentrações verificadas.

2. *Camundongos utilizados* — Foram utilizados 10 camundongos albinos, jovens, machos, homocigóticos ("Swiss inbred"), de linhagem mantida no Biotério Central da FIOCRUZ. Os animais referidos foram divididos em dois grupos: Controle e Tfm, ambos com cinco indivíduos. Antes da infecção experimental, e ao término do trabalho, os animais foram pesados em balança analítica (Tab. 1).

TABELA 1

Condições da infecção experimental de camundongos albinos com cercárias de *Schistosoma mansoni*, expostas ao termofosfato magnésiano (Tfm) no momento da infecção. (FIOCRUZ/ENSP, Rio de Janeiro, RJ)

Camundongos				Nº de cercárias por camundongo	Tempo de exposição (hora)	pH do meio
Grupo	Nº	Peso médio (g)				
		Inicial	Final			
Tfm	5	23,5	34,6	150	3	9,6
Controle	5	16,4	3,6	150	3	7,5

3. Infecção e contagem de cercárias

3.1 *Infecção* — À bateria controle, constituída de 05 tubos de ensaio, foram vertidos, em cada um deles, 10 ml de água de torneira, desclorada, 24 horas

antes da introdução de cercárias nos tubos. Na outra bateria, também de 05 tubos, foi adicionado um grama de Tfm, pulverulento. Em ambos os casos, o pH foi determinado em peagômetro digital, assinalando-se ainda as temperaturas da água e do ar. Os roedores foram infectados com cercárias expelidas de *B. glabrata*, anteriormente infectadas com micacídeos de *S. mansoni*, cepa LE. Em todos os casos, foram utilizadas 150 cercárias/camundongo, aplicando-se a técnica de imersão da cauda, com tempo de exposição igual a 03 horas consecutivas.

3.2 *Contagem de cercárias* — Após 03 horas de exposição, os tubos de ensaio de ambos os grupos (Controle e Tfm) tiveram seus conteúdos examinados, para registro do número de cercárias penetradas na cauda de cada um dos animais. No caso, utilizou-se placas de Petri com quadrículas no fundo e lugol, para facilitar as contagens. Não foi possível, entretanto, registrar os eventuais números de cercárias sobranes nos 05 tubos com Tfm, face ao grau de turbidez e, possivelmente, a ação abrasiva do termofosfato sobre as cercárias, supostamente ainda existentes ou não penetradas. No grupo controle, as cercárias que não penetraram estão registradas mais adiante.

4. *Manutenção e alimentação* — Após a infecção, os roedores foram mantidos em gaiolas convencionais, processando-se a limpeza duas vezes por semana, com troca de água. A ração e o estado geral dos animais eram verificados diariamente.

5. *Exames coproscópicos* — Após os primeiros 45 dias de inoculação das cercárias nos camundongos, foram iniciados os exames coproscópicos; ou seja, dois exames/semana ou 10 coproscópias para cada animal (exceto um), até o término das observações programadas. O método adotado foi o de Kato-Katz (Katz & cols., 1972).

6. *Helmintos recuperados* — Após a última coproscopia de cada roedor, os animais foram sacrificados, com éter, e perfundidos — registrando-se, assim, o número de vermes existentes em cada camundongo então infectado. Ao longo das verificações, foram anotados os números de vermes isolados e acasalados e, ainda, o número de machos, de fêmeas e de casais.

Todos os dados numéricos do experimento realizado encontram-se explicitados nas Tabelas 1, 2 e 3.

RESULTADOS

1. *Termofosfato magnésiano (Tfm)* — Como mencionado, uma amostra do material foi analisada em espectrofotômetro de absorção atômica, registrando-se os seguintes valores, expressos em mg/l:

ARTIGO

Ca	—	242,2	±	5,5	Cr	—	0,65	±	0,02
Mg	—	103,0	±	0,5	Ti	—	0,14	±	0,02
P	—	161,0	±	0,1	Mn	—	3,4	±	0,1
Si	—	136,6	±	1,0	Na	—	3,61	±	0,04
Ba	—	17,3	±	1,5	K	—	0,80	±	0,02
Al	—	14,7	±	0,3	Zn	—	18,33	x 10 ⁻³	± 2,76 x 10
Fe	—	5,1	±	0,5					

Observa-se, aqui, que nas águas naturais e para certos objetivos específicos (FEEMA, 1979), a concentração, por exemplo, de bário não deve ultrapassar de 1 mg/1 Ba; a de cromo, de 0,05 mg/1 Cr; a de ferro, de 0,3 mg/1 somados à de Mn. Tais valores são, portanto, muito inferiores aos detetados na amostra do adubo utilizado — que é um pó inodoro, cinza, incapaz de absorver umidade atmosférica, insolúvel n'água, com pH entre 8,0 e 8,5, porém fisicamente neutro, mas que torna-se solúvel quando em contato com os ácidos fracos do solo e das raízes das plantas (Defelipo & col., 1978).

Assinala-se, por outro lado, que o zinco — presente no adubo utilizado — é metal-traço essencial, em pequenas quantidades, para mamíferos e peixes (Frieden, 1972); já quantidades maiores são tóxicas para diferentes organismos aquáticos. Nos mares, as concentrações máximas são de cerca de 0.010 mg/1 Zn, porém algumas espécies acumulam zinco em quantidades que vão de 6 a 1.500 mg/kg (EPA, 1976).

Não há evidência, por outro lado, de que o elemento titânio seja essencial para o homem e animais. A administração, por exemplo, de 3 gramas/dia de TiO a coelhos e gatos, durante 390 dias, não ocasionou qualquer efeito danoso (WHO, 1982). Os demais elementos químicos, nas concentrações indicadas, ao que se sabe, não imprimiriam efeitos biológicos adversos ao ser vivo.

2. *Temperaturas (°C)* — No momento da infecção dos roedores, a temperatura do ar era de 23°C e a da água de 26°C. Ao longo do tempo do experimento, a temperatura mínima registrada foi de 21,0°C, enquanto a máxima não ultrapassou de 28,1°C.

3. *pH* — As amostras d'água contidas nos tubos de ensaio, juntamente com as cercárias, mostraram, no caso do controle, pH igual a 7,5; para os tubos contendo Tfm, o valor foi maior, ou seja, 9,6. Sem embargo, em ambas as condições mencionadas, as cercárias foram capazes de infectar os camundongos (Tab. 1).

4. *Contagem de cercárias* — O número de cercárias, em cada tubo de ensaio do grupo controle, após

03 horas de contato com a cauda dos roedores, foi variável. Isto é, deixaram de penetrar as seguintes quantidades: $C_1 = 55$ cercárias ou 36,7%; $C_2 = 40$ (26,7%); $C_3 = 65$ (43,3%); $C_4 = 43$ (28,7%); $C_5 = 49$ (32,7%).

Em última análise, não penetraram, de 40 (26,7%) a 65 (43,3%) cercárias, de cada grupo de 150 expostas aos animais utilizados. Ou, ainda, 242 (32,3%) cercárias, entre as 750 expostas aos cinco camundongos do grupo controle.

No caso das cercárias associadas ao termofosfato magnésiano, como anteriormente mencionado, não foi possível visualizar uma única após as 03 horas de exposição. Assim, pode-se supor que, ou houve penetração de todas elas, ou ocorreu impossibilidade de contagem (malgrado diluições procedidas), por má visibilidade; ou, ainda, teria ocorrido destruição do material em decorrência de processo abrasivo: movimentação da cauda do roedor em meio contendo o material pulverulento.

5. *Contagem de ovos de S. mansoni* — Observou-se (Tab. 2) acentuada diferença numérica no registro de ovos detetados, através do método Kato-Katz. Assim, no grupo controle, a média variou de 12,0 (exemplar C_1) a 847,2 (exemplar C_4). Para o total de cinco exemplares desse grupo (um deles foi negativo) a média de ovos/exame foi igual a 287,5.

No caso do grupo Tfm, apenas um único exemplar de roedor (T_5) revelou ovos nas fezes: média de 91,2 ovos entre os 10 exames realizados. Salienta-se que um animal morreu após o 4º dia de infecção. Computando-se todos os exames realizados, a média de ovos detetados, no caso, não ultrapassa de 22,8 ovos/exame, resultado bem inferior ao do controle.

6. *Helmintos recuperados* — Através das perfusões, observou-se sensível diferença numérica na recuperação de vermes dos dois grupos estudados: controle e Tfm (Tab. 3).

No primeiro caso, foram detetados 53 vermes adultos. Isoladamente; 13 eram machos e 18 eram fêmeas. A esses 31 exemplares, somam-se outros 22, representados por 11 casais. Dessa forma, verifica-se que a taxa de recuperação foi de 7,1% (53), uma vez que 750 cercárias foram expostas aos cinco camundongos do grupo controle.

O exemplar C_4 — cujo número médio de ovos (847,2%) contados nas fezes foi maior (Tab. 2) — também revelou maior número de helmintos recuperados, ou seja, 18,7% (28). Reversamente, o exemplar (C_1) que ofereceu apenas 12,0 ovos/exame coproscópico, foi o que proporcionou menor recuperação de vermes adultos: apenas um macho e duas fêmeas, isolados (Tab. 3).

ARTIGO

TABELA 2

Resultados dos exames de fezes dos camundongos infetados com cercárias de *Schistosoma mansoni* expostas a termofosfato magnésiano no momento da infecção.
(FIOCRUZ/ENSP. Rio de Janeiro, RJ)

Grupo Controle				Grupo Tfm			
Camundngo	Nº de exames	Ovos detetados		Caundongo	Nº de exames	Ovos detetados	
		total	média			total	média
C ₁	10	120	12,0	T ₁	10	zero	-
C ₂	10	0	-	T ₂	10	zero	-
C ₃	10	3.072	307,2	T ₃	10	zero	-
C ₄	10	8.472	847,2	T ₄ **	0	-	-
C ₅	10	2.712	271,2	T ₅	10	912	91,2
Totais	50	14.376	287,5	Totais	40	912	(22,8)

* Método Kato-Katz

** Morto, após o 4º dia de infecção.

TABELA 3

Schistosoma mansoni recuperados, através de perfusão, dos camundongos albinos infectados com 150 cercárias/roedor, da cepa LE.
(FIOCRUZ/ENSP. Rio de Janeiro, RJ)

Grupo Controle						Grupo Tfm					
Camun- dongo	♂	♀	Casais	Total		Camun- dongo	♂	♀	Casais	Total	
				Nº	%					Nº	%
C ₁	1	2	0	3	2,0	T ₁	25	0	0	25	16,7
C ₂	0	0	0	0	-	T ₂	59	0	0	59	39,3
C ₃	1	4	2	9	6,0	T ₃	48	0	0	48	32,0
C ₄	7	9	6	28	18,7	T ₄ *	-	-	-	-	-
C ₅	4	3	3	13	8,7	T ₅	31	3	0	34	22,7
Totais	13	18	11	53	7,1	Totais	163	3	0	166	27,7

* Morto, após o 4º dia de infecção.

Para o grupo Tfm, como anteriormente mencionado, um único camundongo (T₅) eliminou ovos nas fezes (Tab. 2). Esse foi, também, o único exemplar

que revelou machos (31) e fêmeas (3) adultos, como resultado das perfusões. Houve, pois, uma taxa de recuperação igual a 22,7% (34). Os roedores T₁, T₂ e T₃ abrigavam apenas helmintos machos, ou seja, 25, 59 e 48 exemplares, respectivamente (Tab. 3). Assim, para os quatro camundongos sobreviventes, a taxa de recuperação de vermes adultos foi de 27,7% (166); sendo o número de machos sensivelmente maior (163 = 98,2%) que o de fêmeas (3 = 1,8%).

DISCUSSÃO

O bloqueio da ovogênese em bionfalárias — resultante da ação contraceptiva do termofosfato magnesiano, e também da aparente redução quantitativa da liberação de cercárias de *Schistosoma mansoni* — constitui fenômeno que pode contribuir de alguma forma para a minimização de infecções humanas, em condições naturais. De fato, admite-se que a aplicação daquele adubo mineral e seu arraste pelas chuvas pode, secundariamente, influir na redução de populações naturais de planorbíneos. Essa assertiva apóia-se, de um lado, na verificação de que em águas com alta relação Mg/Ca não ocorrem planorbíneos (Harrison & cols., 1966); e, de outro, que, experimentalmente, foi demonstrado que o elemento Mg bloqueia ou reduz significativamente a oviposição daqueles moluscos, quando Ca ocorre em concentrações diminutas (Leveque & cols., 1978; Milward-de-Andrade & cols., 1980, 1981, 1984 a, b, c, d, e; 1986 a, b; 1987).

No experimento ora relatado, procurou-se verificar um outro aspecto da questão: ou seja, eventual efeito do termofosfato magnesiano sobre as cercárias de *S. mansoni*. Ou melhor, procurou-se verificar se as cercárias expostas à ação do adubo (Tfm) perderiam ou não sua capacidade infectante. Os dados obtidos mostraram que o mencionado adubo, nas condições do experimento, não impediu a infecção dos camundongos albinos por cercárias da cepa LE. Entretanto, curiosamente, o número de helmintos recuperados, por perfusão, foi maior no grupo de animais submetidos ao Tfm, porém, o número de ovos de *S. mansoni* — segundo contagens feitas através do método Kato-Katz (Katz & cols., 1972) — foi bem inferior ao do grupo controle. Esse fato se explica pelo fato de que raras fêmeas foram detetadas e recuperadas dos camundongos infectados com cercárias submetidas à ação do termofosfato magnesiano — predominando, pois, infecções com vermes machos. Restaria, portanto, verificar se algum dos componentes químicos do material utilizado exerceria ação seletiva: no caso, favorecendo a predominância de indivíduos machos.

Experimental infection of white mice (Swiss inbred) with LE strain Scistosoma mansoni cercariae submitted to the action of magnesium thermophosphate (Tfm), usually used in tropical latosoils, was performed. This product is able to block ovogenesis of planorbid molluscs. In these experimental conditions, rodents were infected. But, the number of eggs released by the control group (five mice) was markedly greater than that of the Tfm group, although a short number of worms were recovered by perfusion. From the Tfm group, 163 adult worms (98,2%) were recovered and only 3 females (1,8%). Of the control group, perfusion recovered 62 adult worms (22 male worms, 18 female and 11 couples). Each mice was exposed to 150 cercariae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EPA, Environmental Protection Agency - 1976 - *Quality criteria for water*. Washington, DC, 501 p.
- FEEMA - 1979 - *Manual do Meio Ambiente. Sistema de Licenciamento de Atividade Poluidora*, SLAP. Rio de Janeiro, RJ, 305 p.
- FRIEDEN, E. - 1972 - The chemical elements of life. *Scientific American*, 227: 52-60.
- DEFELIPO, B. et al. - 1978 - Adubos fosfatados na correção da acidez do solo. *Seiva*, Viçosa, MG, 33 (86): 41-50.
- GUARDANI, R. - 1979 - Alguns aspectos da evolução das pesquisas em produção de termofosfatos. *Centro Ests. Fertil., Inst. Pesq. Tecnol.* Est. S. Paulo (IPT). 28p.
- HARRISON, A. D.; NDUKU, W. & HOOPER, A. S. C. - 1966 - The effects of a high magnesium-to-calcium ratio on the egg-laying rate of an aquatic planorbid snail, *Biomphalaria pfeifferi*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 60: 121-214.
- KATZ, N.; CHAVES, A. & PELEGRINO, J. - 1972 - A simple device for quantitation stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 14: 397-402.
- LEVÊQUE, C.; POINTIER, J-P. & TOFFART, J-L. - 1978 - Influence de quelques facteurs du milieu sur la fécondité de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Pulmonata) dans les conditions du laboratoire. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, 53: 393-402.
- MILWARD-DE-ANDRADE, R. - 1980 - Liberação de cercárias de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) por *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) mantidas em meio de termofosfato magnésiano. *Rev. brasil. Malariol. D. trop.*, 32: 60-72.
- MILWARD-DE-ANDRADE, R. & TORGA, L. F. - 1981 - Ação inibidora do termofosfato magnésiano sobre a fecundidade de planorbídeos e seu possível significado no controle da esquistossomose mansoni. *Rev. Saúde Públ.* São Paulo, 15: 59-71.
- MILWARD-DE-ANDRADE, R.; CRUZ, O. J. & DUTRA, R. M. A. - 1984 - Bloqueio da ovogênese de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) com termofosfato magnésiano. In: *Resumos XI Congr. Brasil. Zoologia*, pp. 53-54. Belém, PA, 12-17/fev./1984.

- MILWARD-DE-ANDRADE, R. R. & GRAULT, C. E. — 1984 — Bloqueio da ovogênese de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), em laboratório. In: *Resumos, XI Congr. Brasil. Zoologia*, pp. 54–55. Belém, PA, 12–17/fev./1984.
- MILWARD-DE-ANDRADE, R. & CRUZ, O. J. — 1984 — Ação bloqueadora de MgCl₂ sobre a ovogênese de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). In: *Resumos, XI Congr. Brasil. Zoologia*, pp. 56. Belém, PA, 12–17/fev./1984.
- MILWARD-DE-ANDRADE, R.; GRAULT, C. E. & DUTRA, R. M. A. — 1984 — Controle experimental da ovogênese de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e sua possível aplicação na natureza. In: *Resumos, XI Congr. Brasil. Zoologia*, pp. 57–58. Belém, PA, 12–17/fev./84.
- MILWARD-DE-ANDRADE, R. — 1984 — Relação existente entre a natureza do substrato e a reprodução de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), em laboratório. In: *Resumos, XI Congr. Brasil. Zoologia*, pp. 58–59. Belém, PA, 12–17/fev./1984.
- MILWARD-DE-ANDRADE, R.; SOUZA, M. B. & PARANHOS, M. A. S. — 1986 — Infecção experimental de camundongos albinos com cercárias de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, previamente submetidas a ação de termofosfato magnésiano. In: *Resumos, 38ª Reunião Anual SBPC, Supl. 38(7): 989*. Curitiba, PR.
- MILWARD-DE-ANDRADE, R. & CRUZ, O. J. — 1986 — Observação preliminar dos efeitos do termofosfato magnésiano sobre populações naturais de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), em Sumidouro, RJ. In: *Resumos, 38ª Reunião Anual SBPC, Supl., 38(7): 705*. Curitiba, PR.
- MILWARD-DE-ANDRADE, R.; MILWARD-DE-ANDRADE, C. R. V. & CRUZ, O. J. — 1987 — Utilização de dolomita pulverizada na criação de *Biomphalaria glabrata*, em laboratório. In: *Resumos, Inter. Symposium on Schistosomiasis*, Rio de Janeiro, October 25–30, 1987.
- WHO — 1982 — Titanium. Environmental Health Criteria 24. IPCS, *Internat. Programme on Chemical Safety*. 68pp., WHO/OMS, Geneva.