

OCORRÊNCIA DE LINHAGENS HUMANA E SILVESTRE DE *SCHISTOSOMA MANSONI*, NA PRÉ-AMAZÔNIA.

I — ESTUDO EM MOLUSCOS.

Othon de Carvalho Bastos *
Argélia Maria Andrade Silva *
Eliane Pires de Souza *
Raimundo Carlos Lemos Neto *
Aquilino Eugenio Piedrabuena **

BASTOS, O. de C. et al. Ocorrência de linhagens humana e silvestre de *Schistosoma mansoni*, na pré-amazônia. I — Estudo em moluscos. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 16:292-8, 1982.

RESUMO: Foram isoladas na região da Baixada Maranhense (Brasil), linhagens humana (H) e silvestre (S) de *Schistosoma mansoni* a partir de miracídios eclodidos de ovos encontrados em fezes de doentes humanos autóctones da Região e de fígados de roedores silvestres naturalmente infectados. *Biomphalaria glabrata*, descendentes de caramujos coletados no campo, foram expostos, isoladamente, aos miracídios H e S, mantidos isolados em moluscário e observados durante 100 dias. Moluscos normais foram mantidos nas mesmas condições de ambiente em que foram submetidos os infectados e tomados como controle da experiência. Foram anotados os índices de infecção dos moluscos, as datas da eliminação de cercárias, quantidade de larvas eliminadas e mortalidade dos moluscos. Os dados sugeriram melhor adaptação do esquistossomo da linhagem H à *B. glabrata*. A linhagem S, por sua vez, foi três vezes mais virulenta do que a linhagem H. Estes dados foram comparados com os encontrados na literatura especializada e verificada diversidade nos comportamentos parasitológicos das linhagens em estudo, quando comparados com os encontrados nas linhagens H e S criadas do Vale do Rio Paraíba do Sul, no Estado de São Paulo (Brasil).

UNITERMOS: *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose mansônica, Região da Baixada Maranhense, Brasil.

INTRODUÇÃO

Estudos realizados no sentido de esclarecer aspectos da relação parasita-hospedeiro mostram que, durante a evolução da esquistossomose, ocorrem modificações estruturais, tanto por parte do parasita como do hospedeiro¹; que o mosaico antigênico de superfície corporal do verme adquire características próprias relacionadas com a

espécie hospedeira^{2,3} e que estas características induzem uma resposta parasito-imunológica específica capaz de levar ao estabelecimento de linhagens do verme^{2,4,5}.

Bastos e col.³ verificaram a ocorrência de duas linhagens de *Schistosoma mansoni*, na região do Vale do Rio Paraíba do Sul, no Estado de São Paulo: linhagens humana

* Da Universidade Federal do Maranhão (Programa de Pesquisa e Pós-Graduação em Imunologia) — Campus Universitário do Bacanga, Bloco 3 — Sala 3A — 65000 — São Luís, MA — Brasil.

** Do Departamento de Genética e Evolução do Instituto de Biologia da UNICAMP — Caixa Postal 6109 — 13100 — Campinas, SP — Brasil.

(H), isolada de doentes autóctones da Região, e silvestre (S), obtida de pequenos mamíferos silvestres, naturalmente infectados no Vale. Nesta data, os autores acreditavam estar assistindo ao início de um processo de adaptação do parasita ao hospedeiro natural da Região, a *Biomphalaria tenagophila*.

Em continuidade a esta linha de pesquisa, os trabalhos foram orientados no sentido de verificar a existência de linhagens H e S em outras regiões brasileiras. Conseqüentemente, seria constatada a importância da influência do meio e da adaptabilidade do parasita aos hospedeiros locais. A princípio, foi escolhida a região da Baixada do Maranhão, pelos seguintes motivos: localização ao nível do mar; peculiaridade em conter um misto de fauna e flora das regiões Norte e Nordeste; a esquistossomose ser doença endêmica¹ e, em seus campos, coabitarem dois hospedeiros definitivos do esquistossomo: homem e roedor silvestre.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Isolamento da linhagem humana (H) de *S. mansoni*.

A linhagem H de *S. mansoni* foi isolada a partir de miracídios obtidos de dejeções humanas, de portadores comprovadamente autóctones da cidade de São Bento, localizada na região da Baixada Maranhense.

As fezes coletadas na região foram transportadas para o laboratório em recipientes fechados, em completa ausência de luz e baixa temperatura (4°C).

No laboratório as dejeções foram diluídas em 100 ml de água não clorada (1 mg/ml), filtradas em gaze e deixadas sedimentar no escuro, por duas horas. O líquido sobrenadante foi decantado e o sedimento ressuspenso no volume de água acima referido.

Os miracídios foram obtidos pela exposição da suspensão final à luz e à tempera-

tura de 28°C, provenientes de lâmpadas elétricas de 60 watts, colocadas a distância de 40 cm, durante 60 min.¹⁴.

2. Isolamento da linhagem silvestre (S) de *S. mansoni*.

A linhagem S de *S. mansoni* foi isolada a partir de miracídios obtidos de fígados de roedores silvestres, naturalmente infectados pelo trematodeo, capturados em São Bento e classificados como *Nectomys squamipes amazonicus* Hershkovitz, 1944. Os animais infectados foram necropsiados e os fígados retirados e homogeneizados em liquidificadores, com água deionada, em baixa temperatura (aproximadamente 10°C). Os homogeneizados foram colocados em frascos de sedimentação e deixados repousar no escuro, por duas horas. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 50 ml de água^{2,3}. A suspensão final foi colocada em placas de Petri e exposta à luz e à temperatura de 28°C, provenientes de lâmpadas elétricas¹⁴.

3. Infecção de *B. glabrata* com miracídios das linhagens silvestre (S) e humana (H).

Foram tomadas *B. glabrata* nascidas em laboratório, medindo de 8 a 12 mm de diâmetro máximo, descendentes de planorbídeos colhidos na região da Baixada Maranhense (município de São Bento), para a constituição de grupos de moluscos para a infecção com 15 miracídios (GI) e para controle da experiência, não expostos às larvas (GC).

Os caramujos submetidos à infecção foram colocados individualmente em placas de Petri de 3,5 cm de diâmetro, à temperatura de 28°C, por 5 a 6 horas. Em seguida, estes animais foram mantidos isolados, em frascos de 100 ml de água e com alimentação controlada, constituída por alface.

O experimento foi desenvolvido durante 100 dias. A partir do 10º dia de infecção, era anotada, a cada 10 dias, a percentagem

de mortalidade, o número de moluscos que eliminaram cercárias e o número de cercárias eliminadas.

4. Obtenção de cercárias

Os moluscos dos GI, após o 10º dia de observação, eram colocados individualmente em frascos contendo 10 ml de água deionizada e expostos à ação de luz e calor¹³, durante duas horas. Em seguida, as cercárias eram contadas em lupas estereoscópicas. Estas observações eram feitas diariamente.

5. Estudos estatísticos

Para estudo matemático de comparação entre as mortalidades encontradas nas *B. glabrata* expostas às linhagens em estudo, procedeu-se a determinação da potência de uma linhagem com respeito à outra (Título), testando pelo método de probitos e verificando o paralelismo existente entre ambas as linhagens.

A linhagem H foi tomada como padrão. Os resultados pertinentes ao GC não foram utilizados para reduzir a mortalidade natural existente.

Para o cálculo dos probitos, foram tomados os dias de exposição para variável independente (x), em cinco níveis (30, 50, 60, 70 e 90) para a linhagem S e em quatro (70, 80, 90 e 100), para linhagem H.

RESULTADOS

1. Linhaem S

1.1 — Índice de mortalidade dos moluscos

As taxas de mortalidade registradas nos grupos GI e GC, constam da Tabela 1. Assinala-se a mortalidade inicial de 23% no GI, observada no 10º dia após a infecção. Somente no 40º dia, esta taxa foi alterada para 33%, alcançando 80% no 100º dia.

1.2 — Eliminação de cercárias

A eliminação de cercárias ocorreu entre o 28º e o 90º dia de trabalho. O perfil registrado desta experiência apresentou dois picos distintos, sendo que o valor máximo do primeiro foi de 18.350 cercárias, ao 30º dia, e o segundo, foi de 19.800, ao 50º dia da experiência (Tabela 1). O índice de infecção dos moluscos pela linhagem S foi de 75%.

T A B E L A 1

Resultados da infecção por *Schistosoma mansoni*, linhagem silvestre da Baixada Maranhense, em *Biomphalaria glabrata* simpátrica (30 exemplares infectados e 30 controles).

Dias de Observação	M o l u s c o s					
	Controles		Infectados			
	Vivos (nº)	Mortalidade (%)	Vivos (nº)	Mortalidade (%)	Eliminaram cercárias (nº)	Cercárias eliminadas (%)
10	30	0	23	23	0	0
20	30	0	23	23	0	0
30	30	0	23	23	13	18.350
40	30	0	20	33	13	1.500
50	29	3	20	33	15	19.800
60	29	3	15	50	8	640
70	29	3	8	73	6	100
80	29	3	8	73	6	100
90	29	3	6	80	6	100
100	29	3	6	80	0	0

2. Linhagem H

2.1 — Índice de mortalidade dos moluscos

A percentagem de mortalidade foi verificada, tanto no grupo de moluscos infectados com a linhagem H, como nos normais, tomados como controle da experiência (Tabela 2). O primeiro registro ocorreu no grupo controle GC, ao 50º dia após a data da infecção. No grupo de animais infectados GI, a percentagem de 6% foi a primeira registrada e aconteceu ao 60º dia de trabalho. O índice mais alto obtido neste grupo foi de 31%, anotado ao final da experiência. Os demais índices de mortalidade registrados no intervalo dos pontos acima referidos e a constância com que se manteve a mortalidade do GC podem ser observados na Tabela 2.

2.2 — Eliminação de cercárias

A eliminação de cercárias H iniciou-se no 26º dia após a data da exposição dos moluscos ao parasita e estendeu-se até ao final do trabalho experimental. Dois picos

bem distintos foram evidenciados no perfil de eliminação destas larvas, sendo que o primeiro apresentou o ponto máximo de 27.000 unidades larvárias, ao 50º dia, e o segundo de 9.300, ao 70º dia a infecção. O índice de infecção dos caramujos pela linhagem H foi de 100%. Os demais dados, pertinentes aos grupos infectados e controle, estão expostos na Tabela 2

5. Análises estatísticas

A análise de heterogeneidade e paralelismo realizada com as linhagens humana e silvestre está resumida na Tabela 3, onde se pode verificar que apresentou:

$$R = \begin{cases} t & \% \\ 1,47 \\ 5,94 \end{cases}$$

indicando que a linhagem S é aproximadamente 3 vezes mais virulenta que a linhagem H, com uma confiança que vai de 1,5 a 6 vezes, aproximadamente.

T A B E L A 2

Resultados da infecção por *Schistosoma mansoni*, linhagem humana, da Baixada Maranhense, em *Biomphalaria glabrata* simpátrica (35 exemplares infectados e 35 controles).

Dias de Observação	M o l u s c o s					
	Controles		Infectados			
	Vivos (nº)	Mortalidade (%)	Vivos (nº)	Mortalidade (%)	Eliminaram cercárias (nº)	Cercárias eliminadas (nº)
10	35	0	35	0	0	0
20	35	0	35	0	0	0
30	35	0	35	0	34	2.000
40	35	0	35	0	35	22.000
50	34	3	35	0	35	27.000
60	34	3	33	6	28	3.000
70	34	3	33	6	33	9.300
80	34	3	29	17	25	4.500
90	34	3	26	26	20	4.000
100	34	3	24	31	17	1.000

T A B E L A 3

Análise da heterogeneidade e paralelismo.

Constrastes	G.L.	χ^2	Valor ao nível de 5%
Linhagem humana	3	5,6965 (Ns)	7,815
Linhagem silvestre	2	0,1587 (Ns)	5,991
Heterogeneidade	(5)	5,8552 (Ns)	11,070
Desvio do paralelismo	1	1,4914 (Ns)	3,841
Total	6	7,3466 (Ns)	12,592

$$Y_h = 2,7356 + 3,1530 X$$

$$Y_s = 1,2517 + 3,1530 X$$

Sendo X = log do tempo

$$M = 0,4706$$

$$S_m = 0,1546$$

$$I_c = 0,4706 \pm 1,96 \times 0,1546 \begin{cases} 0,1676 \\ 0,7736 \end{cases}$$

$$M \text{ é o log } R: R = \frac{\text{Atividade de uma}}{\text{Atividade da outra}}$$

t%

$$R = 2,96 \begin{cases} 1,47 \\ 5,94 \end{cases}$$

R = antilog de M

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Comparando os dados parasitológicos que foram obtidos no estudo das linhagens H e S maranhenses com os que foram encontrados por Bastos e col.³, quando trabalharam com as linhagens H e S do Vale do Rio Paraíba do Sul, em São Paulo, verificou-se nítida diferença entre eles, a respeito da adaptabilidade do parasita ao seu hospedeiro intermediário. As linhagens do Maranhão parecem ser mais adaptadas ao molusco da Região (*B. glabrata*) do que o esquistossomo paulista à *B. tenagophila*, por apresentarem superioridade numérica na eliminação de cercárias e de moluscos infectados, além do fato dos esporocistos amadurecerem mais precocemente. Estas observações estão de acordo com os conhe-

cimentos históricos que citam ser o estabelecimento da esquistossomose na região Nordeste anterior ao da região Sudeste brasileira e, também, com os trabalhos publicados sobre a esquistossomose autóctone do Vale^{7,8,9,10,11,12} que mostram baixos índices de infecção dos moluscos pelo verme e maturação tardia dos esporocistos^{8,5}.

Outras divergências verificadas entre as linhagens das duas Regiões em análise estão relacionadas com a virulência do parasita para as *Biomphalaria*, determinada pela taxa de mortalidade dos caramujos. Em São Paulo, a linhagem S apresentou-se com baixa virulência, sem diferenças significativas entre os grupos GI e GC, durante toda a fase da experiência. Entretanto, a linhagem H agrediu demasiadamente o hos-

pedeiro, chegando a 80% de mortalidade, ao 60º dia de trabalho^{2,3}. Na região da Baixada Maranhense, o ocorrido foi exatamente o contrário. A linhagem S apresentou-se três vezes mais virulenta do que a linhagem H, com uma confiança que vai por volta de 1,5 a 6 vezes (Tabelas 1, 2 e 3).

A mortalidade dos moluscos tomados como controle da experiência não foi considerada nos estudos estatísticos, pelas seguintes causas: a mortalidade foi sumariamente pequena (3%), mantendo-se constante durante todo o experimento, e incapaz de afetar o paralelismo das duas retas.

Os valores proibícos da mortalidade foram homogêneos, tanto para linhagem H como para a S, ou para seu conjunto (H + S). Embora sejam interpretadas por duas retas diferentes, ambas não se afastam significativamente do paralelismo, dando um conjunto total "não significativo". Este fato nos leva a deduzir que os esquistossomos oriundos da região estudada da Pré-Amazônia, quer seja da linhagem H ou

da linhagem S, têm uma mesma forma de ataque que lhe é específica, distinguindo-se somente na sua virulência, o que se pode ver na potência R (Tabela 3), de aproximadamente três vezes. Deduz-se, ainda, que a linhagem H da região da Baixada Maranhense se adapta melhor à *B. glabrata* simpática do que a linhagem S. Possivelmente, a relação entre o molusco e a linhagem murina seja a mais recente interação da Baixada, chegando até ser desfavorável ao *S. mansoni*.

AGRADECIMENTOS

Aos professores L. A. Magalhães e L. C. de S. Dias, pelas valiosas sugestões científicas.

A Diretoria Regional da SUCAM, na pessoa do Dr. Ernani Wilson Bezerra Carneiro; ao CNPq e à CAPES, pela viabilização do trabalho.

Ao Prof. Fernando de Ávila Pires, pela taxonomia dos roedores.

BASTOS, O. de C. et al. [Occurrence of wild and human strains of *Schistosoma mansoni* in lower Amazonia. I — Study in moluscs]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 16:292-8, 1982.

ABSTRACT: The wild (W) and human (H) strains of *Schistosoma mansoni* were isolated in the Lowland Region of the Maranhão State (Brazil). The snail progenies from *Biomphalaria glabrata* collected from that region were exposed to the W miracidia, obtained from livers of wild rodents, and H miracidia from eggs in human stools. A control group of normal snails was kept in the same conditions as the infected one. The date of the elimination of cercariae, the quantity of eliminated larvae, the infection index of the moluscs and the mortality rate of the snails were recorded. These data suggested better adaptation of the H strain to *B. glabrata*. The W strain presented three times more virulence to snails than the H strain. These results were compared with published data of H and W strain from the Paraíba do Sul River Valley and different parasitologic behavior was verified.

UNITERMS: *Schistosoma mansoni*. Schistosomiasis, Lowland Region of Maranhão State, Brazil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVIM, M. de C. & FIQUENE, S. Situação atual da esquistossomose mansoni do Maranhão. *Rev. Soc. Parasitol. Doen. trop. Maranhão*, 1(1):49-74, 1974.
2. BASTOS, O. de C. Estudo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens humana e silvestre de *Schistosoma mansoni* Sambon 1907. Campinas, 1975. [Dissertação de Mestrado — Universidade Estadual de Campinas].
3. BASTOS, O. de C.; MAGALHÃES, L.A.; RANGEL, H. de A. & PIEDRABUENA, A.E. Alguns dados sobre o comportamento parasitológico das linhagens humana e silvestre do *Schistosoma mansoni*, no Vale do Rio Paraíba do Sul, S. Paulo — Brasil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:184-99, 1978.
4. IMMUNOLOGY of schistosomiasis. *Bull. Wild Hlth Org.*, 51:553-95, 1974.
5. LEMOS NETO, R.C. Estudo comparativo do comportamento parasitológico e imunológico das linhagens mineira e paulista do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Campinas, 1975. [Dissertação de Mestrado — Universidade Estadual de Campinas].
6. LEMOS NETO, R.C.; MAGALHÃES, L.A. & PIEDRABUENA, A.E. Alguns aspectos referentes ao estudo da linhagem de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, provenientes dos Estados de Minas Gerais e São Paulo — Brasil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 12:277-90, 1978.
7. MAGALHÃES, L.A. Estudo dos dados obtidos de uma população de *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte infectada com *Schistosoma mansoni* da mesma cidade, e de uma população de *B. tenagophila* de Campinas, infectada por *Schistosoma mansoni* de São José dos Campos. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 3:195-6, 1969.
8. MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. Determinação do número de cercárias provenientes de cepas diferentes de *Schistosoma mansoni* que conseguem penetrar, sob determinadas condições de laboratório, em *Mus musculus*. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 3:249-51, 1969.
9. MAGALHÃES, L.A. & CARVALHO, J.F. Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 — Proposição para método de estudo quantitativo. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 10:169-94, 1976.
10. PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do *Schistosoma mansoni* no Brasil. *Cienc. Cult.*, 15:245-6, 1963.
11. PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 5:23-9, 1963.
12. PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 5:15-22, 1963.
13. SMITHERS, S.R. & TERRY, R. The immunology of schistosomiasis. *Adv. Parasitol.*, 14:399-422, 1976.
14. STANDEN, O.D. Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *S. mansoni*. I — Individual and mass infection to temperature and season. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 46:48-53, 1952.

Recebido para publicação em 22/04/1982

Aprovado para publicação em 28/06/1982