

OTHON DE CARVALHO, BASTOS (2)

in Gene

(17.0)

ESTUDO DO COMPORTAMENTO PARASITOLÓGICO E IMUNOLÓGICO
DAS LINHAGENS HUMANA E SILVESTRE DO *Schistosoma mansoni*
SAMBON, 1 907.

Tese de Mestrado Apresentada
ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Cam-
pinas (UNICAMP).

Orientador: Prof. L.A. MAGALHÃES (1)

Departamento de Microbiologia e Imunologia
e Setor de Parasitologia

Campinas - São Paulo

(1975)

Trabalho realizado no Setor de Parasitologia e Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas (SP).

a meu filho, a minha esposa,
aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Aos

Professores Luiz Augusto Magalhães e Humberto de
de Araujo Rangel, mestres e amigos, cujo apoio e
orientação científica, serviram de estímulo para
a execução do presente trabalho.

Ao Prof. Aquiles Eugenio Piedrabuena, pela orientação prestada na análise estatística dos dados.

A Universidade do Maranhão, através do Departamento de Parasitologia e Microbiologia, pela oportunidade de especialização.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de estudos.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e aos seus Professores, pelos seus ensinamentos.

Ao Prof. Walter August Hadler, Diretor do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela crítica dos resultados e pelos incentivos constantes prestados aos desenvolvimentos das atividades do Departamento de Microbiologia e Imunologia e ao Setor de Parasitologia.

Ao Prof. Zeferino Vaz, Magnífico Reitor da UNICAMP, pelo extraordinário apoio prestado ao desenvolvimento da pesquisa e do ensino pós-graduado.

Ao Dr. Josélio Fernandes Carvalho Branco, Secretário de Saude do Maranhão, pela licença concedida para a realização do Curso de Pós-Graduação em Imunologia.

Ao Prof. Ronald da Silva Carvalho, Diretor da Escola Técnica Federal do Maranhão, pelo incentivo prestado ao desenvolvimento do ensino profissional na Escola.

A Campanha de Combate à Esquistossomose (CACESQ), da Secretaria de Saude do Estado de S. Paulo, através de sua Superintendencia e em especial ao Dr. Antonio Carlos Mattos Pinto, engenheiro agrônomo chefe do Setor do Setor do Vale do Paraíba da CACESQ, pela colaboração prestada a várias etapas desta pesquisa.

Aos funcionários do Setor do Vale do Paraíba da CACESQ, pela colaboração nos trabalhos de campo.

Ao Dr. Luiz Cândido Souza Dias, pela cessão de parte do material utilizado para a realização dos experimentos desta Tese.

Ao Dr. Fernando d'Ávila Pires, pela classificação dos roedores silvestres.

Ao Prof. Avelino Rodrigues de Oliveira, pelo ensino da técnica de inoculação antigênica em ganglios poplíteos de coelhos.

Ao colega Raimundo Carlos Lemos Neto, companheiro de todos os momentos.

A Sra. Liliane Ziti Costa Carvalho, pela ajuda prestada na manutenção das linhagens do helminto utilizadas neste trabalho.

A colega Ana Maria Aparecida Guaraldo, pela amizade e pela ajuda prestada na montagem desta Tese.

A Srta. Maria Isabel Agnedo, pela feitura dos gráficos e a Srta. Lúcia Helena Guilherme, pela ajuda prestada na datilografia deste trabalho.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, pela amizade e constantes incentivos.

Aos colegas e funcionários do Setor de Parasitologia e Zoologia, que colaboraram neste trabalho.

MEUS AGRADECIMENTOS

Agradecemos o auxilio prestado ao Curso de Pós-Graduação
em Imunologia pelas seguintes instituições:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISAS

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO
SUPERIOR

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia)

BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA

Í N D I C E

	Página
I - INTRODUÇÃO	1
II - MATERIAL E MÉTODOS	
1. Captura de roedores silvestres no Vale do Rio Paraíba.....	6
2. Moluscos utilizados para exposição aos miracídeos procedentes das linhagens H e S do <i>S. mansoni</i>	6
3. Mamíferos de laboratório.....	7
4. Adjuvante de Freund incompleto.....	7
5. Dosagens de Proteínas.....	8
6. Isolamento das linhagens humana(H) e silvestre(S) do <i>Schistosoma mansoni</i>	8
6.1. Linhagem humana do <i>S. mansoni</i>	8
6.2. Linhagem silvestre do <i>S. mansoni</i>	9
7. Infecção de <i>Biomphalaria tenagophila</i> com miracídeos procedentes das linha- gens humana(H) e silvestre(S).....	10
8. Infecção de <i>Mus musculus</i> albinos com cercárias provenientes de <i>B. tenago-</i> <i>phila</i> infectadas com miracídeos H e S do <i>S. mansoni</i> em laboratório.....	12

9.	Manutenção das linhagens humana e silvestre do <i>S. mansoni</i> em laboratório.....	13
10.	Obtenção de esquistossomos adultos e contagem de granulomas hepáticos em <i>Mus musculus</i> albinos experimentalmente infectados.....	13
11.	Preparo de antígenos do <i>S. mansoni</i> das linhagens humana e silvestre.....	14
11.1	-Preparo do "antígeno bruto".....	15
11.2	-Preparo dos "extratos salinos"....	15
III	- RESULTADOS	
1.	Roedores silvestres capturados no Vale do Rio Paraíba.....	16
2.	Infecção experimental de <i>B. tenagophila</i> com miracídios das linhagens H e S..	21
3.	Estudo da relação granulomas/vermes nas linhagens humana e silvestre do <i>S. mansoni</i>	27
4.	Resultados da imunização de coelhos com antígenos de <i>Schistosoma mansoni</i>	33
5.	Relações antigênicas entre as linhagens humana e silvestre do <i>S. mansoni</i> ...	33
IV	- DISCUSSÃO.....	38
V	- RESUMO E CONCLUSÕES.....	43
VI	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

I- I N T R O D U Ç Ã O

Atualmente, a esquistossomose mansônica constitui um dos maiores problemas com que se defronta a saúde pública brasileira, não só pela ampliação das áreas endêmicas, como também pelo elevado número de doentes portadores da helmintose, e pelas dificuldades encontradas na aplicação de medidas profiláticas e medicamentosas.

Alguns pesquisadores admitem que a esquistossomose tenha sido introduzida no Nordeste com a chegada de escravos negros, infectados da África (MAGALHÃES & DIAS, 1944). A implantação da doença, no Brasil, dever-se-ia à existência de planorbídeos transmissores do gênero *Biomphalaria*.

Devemos a PIRAJÁ DA SILVA (1908 a 1912) e ADOLFO LUTZ (1916 a 1918), os primeiros estudos sobre a esquistossomose no país. PIRAJÁ DA SILVA apresentou uma das contribuições mais importantes para o estabelecimento da especificidade do *Schistosoma mansoni* e ADOLFO LUTZ prendeu-se a constatação de regiões endêmicas no Nordeste, tendo estudado, também, as principais espécies de planorbídeos brasileiros.

A disseminação da doença, das áreas endê

micas do Nordeste para outras regiões, tem sido progressiva. Em 1950, PELLON & TEIXEIRA constataram alta incidência desta verminose na população de 11 Estados das regiões do Nordeste e Leste. Em 1953, estes mesmos autores estenderam suas pesquisas às regiões Sul (exceto o Estado de São Paulo) e Centro Oeste. Alguns autores acreditam que o frequente deslocamento de indivíduos portadores da esquistossomose, entre as citadas regiões, seja a principal causa da disseminação da doença.

No Estado de São Paulo, coube a ARANTES (1923 e 1924) verificar os primeiros casos da helmintose, quando registrou 11 doentes autóctones na cidade de Santos. Daí por diante, outras observações foram feitas de focos e de doentes autóctones, no litoral paulista (Santos, São Vicente e Guarujá - GONZALES TORRES, 1940; MOURA, 1945 e 1952; PINTO & MACIEL, 1945; COUTINHO, 1949; MAGALHÃES, 1949; ANTUNES, 1952) e no planalto (Vale do Rio Paraíba, Ourinhos, Campinas e Americana-PIZA, 1965; FERREIRA & MEIRA, 1952; PIZA & RAMOS, 1960; MAGALHÃES & cols., 1973).

Um dos fatos mais importantes, na história da esquistossomose no Estado de São Paulo, foi a descoberta de focos no Vale do Rio Paraíba. As observações feitas por PIZA & cols., no Vale, mostraram a importância epidemiológica do tipo de irrigação utilizada no cultivo do arroz e a eficiência da *Biomphalaria tenagophila* como hospedeira intermediária do *S. mansoni*.

Tudo indica ser a esquistossomose mansônica uma parasitose recentemente implantada na região do Vale do Rio Paraíba. Antes da década de 50, inexistiam registros de casos humanos autóctones na região. Além disso, a *Biomphalaria tenagophila*, única hospedeira intermediária potencial encontrada no Vale, mostrava-se resistente à infecção em laboratório. Com o aparecimento dos primeiros doentes autóctones, intensificou-se a coleta de planorbídeos na região, tendo sido descoberto o primeiro foco da doença, em 1956 (CORREA & col.). Nesta ocasião, várias tentativas foram feitas com o objetivo de infectar *B. tenagophila* experimentalmente, não se obtendo resultados positivos. Em 1963, PARAENSE conseguiu infectar moluscos procedentes de São José dos Campos, com miracídios pertencentes a linhagem mineira de *S. mansoni*, utilizando 1.000 miracídios por molusco. Com estes resultados ficou comprovada a possibilidade da infecção dos moluscos "paulistas" com *S. mansoni* oriundo de *B. glabrata* de Minas Gerais, ainda que para isto tenha sido necessário o emprego de número elevado de miracídios por molusco.

Os índices da infecção experimental da *B. tenagophila* do Vale do Rio Paraíba com a linhagem local, eram, por outro lado, sempre inferiores aos obtidos pela infecção de *B. glabrata* de Minas Gerais com a linhagem de esquistossoma de Belo Horizonte. Estes fatos sugerem a possibilidade de que a esquistossomose

tenha sido introduzida no Vale do Rio Paraíba por migrantes de Minas Gerais.

Verifica-se, pelo trabalho de CAMERON (1928) e KUNTZ (1952), que o homem não é o único hospedeiro definitivo do helminto. CAMERON encontrou cinco macacos africanos (*Cercopithecus sabeus*) naturalmente infectados, em zonas endêmicas de esquistossomose mansônica, na ilha de Sta. Kittz, Índias Ocidentais. KUNTZ assinalou a presença de roedores (*Gerbillus pyramidum*) naturalmente infectados pelo verme, no Egito. FENIWICK (1969) descreveu a manutenção do ciclo biológico do parasita em comunidade de macacos (*Papio anubis*), na ausência do homem.

Devemos a AMORIM (1953), o primeiro encontro de roedores silvestres naturalmente infectados com *Schistosoma mansoni*, no Brasil. Embora muitos outros trabalhos sobre o tema tenham sido publicados em nosso país (AMORIM & cols., 1954 e 1962; BARBOSA & cols., 1953 e 1958; BARRETO, 1959; LUZ & cols., 1966 e 1967; MARTINS & cols., 1955; MARTINS, 1958; RODRIGUES & FERREIRA, 1969) e no exterior, o papel destes reservatórios naturais, na epidemiologia da endemia, permanecia sem conclusões definitivas. Em 1971, ANTUNES demonstrou ser possível completar o ciclo do *Schistosoma mansoni* em roedor silvestre, usando para isto o sistema *Nectomys* - *Biomphalaria glabrata* - *Nectomys*.

Em 1972, SOUZA DIAS assinalou a presen-

ça, no Vale, de diferentes espécies de roedores silvestres naturalmente infectados com *S. mansoni*.

Após a verificação da manutenção do ciclo do *Schistosoma mansoni* na natureza, na ausência do homem, cabe formular as seguintes hipóteses:

- a) ocorrência de duas linhagens de *Schistosoma mansoni*, uma própria dos animais reservatórios e outra do homem.
- b) os esquistossomos, oriundos dessas linhagens humana e silvestre, comportam-se de forma diversa frente a um hospedeiro comum (*Mus musculus*).
- c) existem diferenças na estrutura antigênica dos vermes pertencentes a essas linhagens.

A comprovação da existência destas linhagens seria importante para o estudo da relação parasita-hospedeiro, sobretudo no momento em que acreditamos estarmos assistindo ao início de um processo de adaptação do *S. mansoni* ao *B. tenagophila*.

No presente trabalho são apresentados os resultados obtidos em experiências orientadas no sentido de testar as hipóteses citadas.

II- M A T E R I A L E M É T O D O S

- 1- Captura de roedores silvestres, no Vale do Rio Paraíba (SP).

Várias viagens foram realizadas para diferentes localidades do Vale do Rio Paraíba, com a finalidade de capturar roedores silvestres. A captura desses animais foi feita no período noturno, em armadilhas colocadas ao nível do solo, contendo iscas apropriadas. Contamos com a colaboração da Campanha de Combate a Esquistossomose (CACESQ), da Secretaria de Saúde Pública do Estado de São Paulo, através de sua Unidade localizada na região. A positividade para *S. mansoni*, foi constatada nas fezes dos roedores, através da ovoidelminoscopia. A classificação dos animais silvestres foi feita pelo Dr. Fernando de Ávila Pires, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Consultor da Organização Pan Americana de Saúde (OPAS).

- 2- Moluscos utilizados para exposição aos miracídios procedentes das linhagens humana(H) e silvestre (S) do *Schistosoma mansoni*.

Para a exposição aos miracídios H e S do *S. mansoni*, foram utilizadas *Biomphalaria tenagophi-*

1ª nascidas em laboratório, medindo de 8 a 12 mm de diâmetro, descendentes de planorbídeos colhidos no campo, na região do Vale do Rio Paraíba.

3- Mamíferos de laboratório.

Foram utilizados, como hospedeiros definitivos do *S. mansoni*, *Mus musculus* albinos, pesando aproximadamente 14 a 16 g, provenientes da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (SP).

Para a obtenção de soros anti-*S. mansoni*, utilizamos coelhos procedentes do Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo.

4- Adjuvante de Freund incompleto.

Obtivemos o adjuvante de Freund emulsionando 15 mg de lanolina em 85 ml de Nujol. A lanolina foi utilizada como substância tensoativa, em substituição a Alarcel A.

5- Dosagem de Proteínas

O teor protéico de cada extrato salino antigênico foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, modificado por LOWRY (1951). A leitura espectrofotométrica foi feita em 660 mμ e em cubetas de 10 X 1cm. A curva padrão foi estabelecida usando-se soro albumina bovina (SAB), previamente dosada pelo Micro-Kjeldahl, segundo KABAT & MAYER (1961).

6- Isolamento das linhagens humana (H) e silvestre(S) do *Schistosoma mansoni*.

6.1.- Linhagem humana do *S. mansoni* (linhagem H)

A linhagem H do *S. mansoni* foi isolada a partir de miracídios obtidos de dejeções humanas, de doentes comprovadamente autóctones da região do Vale do Rio Paraíba.

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

No laboratório, as dejeções foram diluídas em água não clorada(1mg/ml), filtradas em gaze e deixadas sedimentar no escuro, por duas horas. O líquido sobrenadante era decantado e o sedimento ressuspenso em 50 ml de água. A sedimentação foi repetida e o sedi-

mento ressuspensão no volume de água acima referido.

Os miracídios foram obtidos pela exposição da suspensão final à luz e a temperatura de 28° C , provenientes de lâmpadas elétricas de 60 watts, colocadas a distância de 40 cm, durante 60 minutos (STANDEN , 1952).

6.2.- Linhagem silvestre do *S. mansoni* (linhagem S)

O isolamento da linhagem S do *S. mansoni*, foi feito a partir de miracídios obtidos de fígados de roedores silvestres, naturalmente infectados com *Schistosoma mansoni* . Os animais infectados foram necropsiados e os fígados retirados, pesados e homogeneizados em liquidificadores, com água não clorada em baixa temperatura (aproximadamente 10°C). Os homogeneizados foram coletados em frascos de sedimentação e deixados repousar no escuro, por duas horas. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensão em 50 ml de água. A suspensão final foi colocada em placas de Petri e exposta à luz e a temperatura de 28°C, provenientes de lâmpadas elétricas (STANDEN, 1952). Os miracídios eclodidos eram observados em lupa estereoscópica.

7- Infecção de *Biomphalaria tenagophila* com miracídios procedentes das linhagens humana(H) e silvestre(S).

Foram utilizados dois tipos de exposição das *B. tenagophila* aos miracídios H e S: exposição individual padronizada e exposição em massa (STANDEN, 1952)

Na exposição individual padronizada, foram tomados 90 moluscos e formados 3 grupos de 30. Um destes grupos foi constituído por moluscos não expostos, sendo tomado como controle. Este grupo controle(C) foi utilizado para determinação da percentagem de mortalidade dos moluscos não infectados. Os dois grupos restantes foram expostos, separadamente, aos miracídios H e S. Cada molusco era colocado isoladamente, em placa de Petri de 3,5 cm de diâmetro e exposto a 15 miracídios contidos em 10 ml de água, em presença de luz e temperatura de 28°C, por 5 a 6 horas. Os moluscos, após a infecção, foram mantidos isolados, em 100 ml de água e alimentação controlada. Estes animais foram observados

durante 100 dias, determinando-se a percentagem de mortalidade, número de moluscos que eliminaram cercárias e número de cercárias eliminadas.

Para exposição em massa dos moluscos aos miracídeos H e S, foi determinado, primeiramente, o número de miracídeos eclodidos. Lotes de caramujos foram expostos a miracídeos H ou S, mantendo-se uma proporção de 15 miracídeos por molusco. Foi mantido o contato molusco-miracídeos por 5 a 6 horas, em condições de luz e temperatura citadas por STANDEN (1952). Os moluscos, após a infecção, foram mantidos em recipientes, observando-se a média de 15 caramujos por aquário de vidro contendo 2.000 ml de água e alimentação adequada. Estes moluscos foram observados durante 60 dias, com a finalidade de se verificar a eliminação de cercárias. A percentagem de mortalidade dos moluscos e o número de cercárias eliminadas, durante o período de observação, foram determinados.

- 8- Infecção de *Mus musculus* albinos com cercárias provenientes de *B. tenagophila* infectadas com miracídeos H e S do *S. mansoni*.

Decorridas 4 semanas, contadas a partir da data da exposição das *B. tenagophila* aos miracídeos H e S, os moluscos foram expostos à luz e temperatura de 28°C, por 3 a 4 horas, com a finalidade de obter cercárias (PELLEGRINO & MACEDO, 1955). A presença destas larvas era observada através do uso de lupa estereoscópica.

Com as cercárias H e S obtidas, foram infectados camundongos albinos, utilizando-se a via percutânea. Empregou-se a técnica de imersão parcial do animal em água contendo cercárias (BRENER, 1959), ou a de imergir somente a cauda do animal na suspensão cercariana (OLIVER & STIREWALT, 1952; STIREWALT & BRONSON, 1955 e BARRIOS-DURAN, 1955). Quando foi utilizada a técnica de imersão exclusiva da cauda do camundongo, foi usada uma concentração de 100 cercárias para 10 ml de água. Quando se empregou a técnica de imersão parcial, a quantidade de cercárias por camundongos foi de 100 a 150.

- 9- Manutenção das linhagens humana (H) e silvestre(S)do *S. mansoni* em laboratório.

Foi empregado o sistema camundongo- planorbídeo-camundongo, para a manutenção das linhagens H e S do *S. mansoni* em laboratório. Para a exposição dos planorbídeos à ambas as linhagens do *S. mansoni* foram utilizados miracídios obtidos à partir do homogeneizado de fígados de camundongos infectados. Cada molusco foi exposto a 15 miracídios, nas condições citadas por STANDEN (1952). Com as cercárias H e S obtidas (PELLEGRINO & MACEDO,1955) foram infectados camundongos albinos, conforme técnica de imersão parcial do animal em água contendo cercárias (BRENER, 1959).

- 10- Obtenção de esquistossomos adultos e contagem de granulomas hepáticos, em *Mus musculus* albinos experimentalmente infectados.

Camundongos infectados, com cercárias H ou S, foram sacrificados entre 55 e 65 dias após a infecção. O sistema porta foi perfundido e exemplares de *S. mansoni* adultos foram retirados dos vasos mesentéricos e hepáticos (YOLLES & cols.,1947 e BRENER,1962) . Esquistossomos foram também obtidos por esmagamento do fígado, entre lâminas de vidro (STANDEN, 1953 e HILL, 1956). Os vermes foram lavados duas vezes em solução

salina fisiológica e uma vez em água destilada, sendo em seguida mantidos em congelador a -10°C .

Os fígados retirados dos camundongos infectados, foram homogeneizados em água, na temperatura de aproximadamente 10°C e, logo após, colocados em placas de Petri, para contagem dos granulomas. A contagem dos granulomas foi feita em lupa estereoscópica, seguindo-se o método descrito por PELLEGRINO & BRENER (1956) e BRENER, PELLEGRINO & OLIVEIRA (1956).

11- Preparo de antígenos do *S. mansoni* das linhagens humana e silvestre.

Os vermes adultos foram separados conforme linhagem e sexo, rotulados e armazenados em congelador. Estes vermes foram posteriormente liofilizados, triturados em gral e suspensos em solução salina tampoadada (0,9% de NaCl em tampão fosfato 0,02M, pH: 7.0), na proporção de 5mg por ml, conforme instrução de DAMIAN (1966). Desta forma, constituímos quatro tipos de suspensões do *S. mansoni*:

- HM - linhagem humana, macho
- HF - linhagem humana, fêmea
- SM - linhagem silvestre, macho
- SF - linhagem silvestre, fêmea

Estas suspensões foram utilizadas como antígenos para a imunização de animais (antígeno bruto) e para testes em

lâminas de gel de agar (extrato salino).

11.1- Preparo do "antígeno bruto"

As suspensões dos vermes foram emulsionadas em partes iguais com adjuvante incompleto de FREUND (1951) e inoculadas em coelhos.

11.2- Preparo dos "extratos salinos"

Para a obtenção dos extratos salinos usados como antígenos nas experiências de dupla difusão em gel de agar, segundo OUCHTERLONY (1958), as suspensões do verme foram mantidas, por 24 horas, a 4°C e centrifugadas a 18.000G, por 30 minutos, a 0°C. O sobrenadante obtido foi recolhido, sendo seu teor proteico determinado. Após a determinação do teor proteico, o sobrenadante era mantido em refrigerador, na presença de mertiolato a 1/1000.

III- R E S U L T A D O S

1- Roedores silvestres capturados no Vale do Rio Paraíba.

A área de captura dos roedores silvestres, no Vale do Rio Paraíba, ficou compreendida entre os municípios de São José dos Campos e Pindamonhangaba.

Foram capturados exemplares de diferentes espécies (Tabela I e figuras de 1 a 6), num total de 63 roedores. Do total de animais capturados, 13 (20,6%) apresentaram-se naturalmente infectados, conforme mostra a Tabela II, onde se acham também indicados o período de captura, a região e os gêneros dos roedores. Pode-se verificar, nesta tabela, que das espécies capturadas a que apresentou maior frequência de infecção foi o *Nectomys squamipes squamipes*, seguindo-se a espécie *Holochilus brasiliensis leucogaster*.

TABELA I

Espécies de roedores silvestres capturados no Vale do Rio Paraíba.

ESPÉCIES DE ROEDORES	CAPTURADOS (Nº)
<i>Akodum arviculoides arviculoides</i> (Wagner, 1842)	1
<i>Cavia aperea aperea</i> (Erxleben, 1777)	7
<i>Holochilus brasiliensis leucogaster</i> (Brandt, 1835)	18
<i>Nectomys squamipes squamipes</i> (Brants, 1827)	4
<i>Oryzomys nigripes eliurus</i> (Wagner, 1845)	10
<i>Rattus rattus alexandrinus</i> (I. Geoffroy, 1803)	3
<i>Rattus rattus frugivorus</i> (Rafinesque, 1814)	2
<i>Rattus rattus rattus</i> (Linnaeus, 1758)	1
<i>Zygodontomys lasiurus brachyurus</i> (Wagner, 1845)	17

Fig. 1



Fig. 2

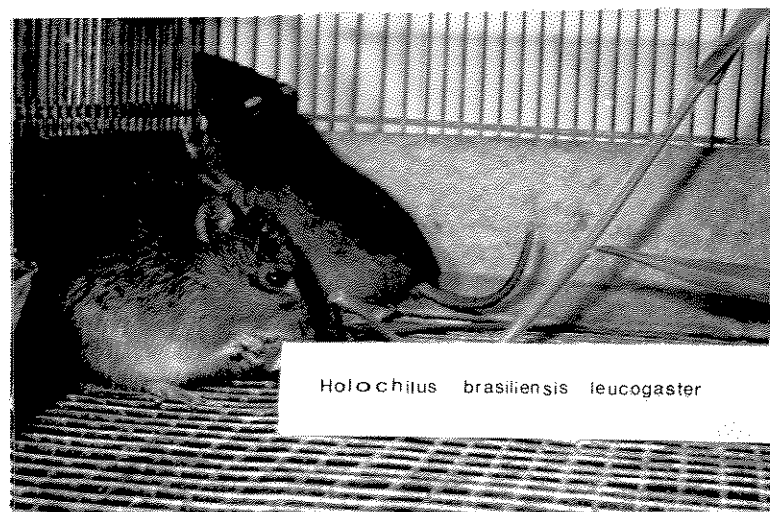


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6

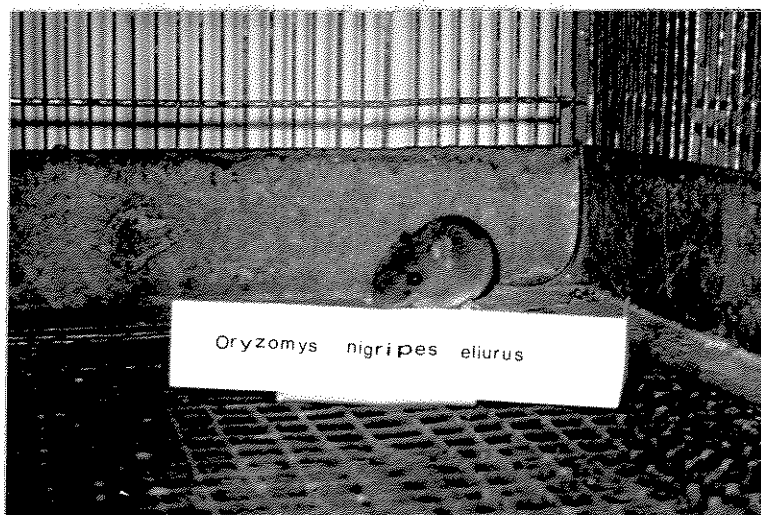


TABELA II

20

Roedores silvestres capturados no Vale do Rio Paraíba.

MES/ANO	LOCAL DE CAPTURA	ROEDORES	CAPTURADOS	INFECTADOS
09/1972	Taubaté	<i>Holochilus</i>	4	4
10/1972	Taubaté	<i>Zygodontomys</i>	1	1
		<i>Holochilus</i>	1	1
11/1972	Taubaté	<i>Holochilus</i>	1	1
05/1973	S. Luís de Piratininga	<i>Nectomys</i>	1	0
	Caçapava	<i>Oryzomys</i>	1	0
		<i>Holochilus</i>	2	1
		<i>Zygodontomys</i>	1	0
		<i>Akodun</i>	1	0
	Pindamonhangaba	<i>Oryzomys</i>	1	0
		<i>Cavia</i>	5	0
		<i>Zygodontomys</i>	1	0
	Taubaté	<i>Cavia</i>	1	0
		<i>Holochilus</i>	1	0
		<i>Oryzomys</i>	4	0
		<i>Zygodontomys</i>	1	0
08/1973	Caçapava	<i>Zygodontomys</i>	1	0
	Taubaté	<i>Oryzomys</i>	1	0
		<i>Rattus</i>	5	0
	Caçapava	<i>Cavia</i>	1	0
		<i>Holochilus</i>	1	1
	Taubaté	<i>Holochilus</i>	2	1
11/1973	Caçapava	<i>Holochilus</i>	1	0
		<i>Zygodontomys</i>	1	0
05/1974	Caçapava	<i>Nectomys</i>	3	3
		<i>Zygodontomys</i>	8	0
		<i>Oryzomys</i>	2	0
06/1974	Taubaté	<i>Holochilus</i>	5	0
		<i>Zygodontomys</i>	2	0
	Pindamonhangaba	<i>Rattus</i>	1	0
07/1974	Taubaté	<i>Zygodontomys</i>	1	0
		<i>Oryzomys</i>	1	0
Total			63	13

2- Infecção experimental de *B. tenagophila* com miracídios das linhagens humana (H) e silvestre (S).

Diferentes lotes de moluscos foram expostos aos miracídios H e S, utilizando-se a técnica de exposição em massa. A percentagem de mortalidade dos moluscos e o número de cercárias eliminadas, foram determinados durante os 60 dias de observação.

Os dados referentes às linhagens S e H estão apresentados nas Tabelas III e IV, respectivamente. Pode-se verificar, nestas tabelas, que a percentagem de mortalidade dos caramujos, expostos aos miracídios S e H, foi alto para as duas linhagens. Verifica-se também que, dos 31 lotes expostos à linhagem S, apenas 9 eliminaram cercárias. Na linhagem H, somente 6 lotes entre os 36 expostos, eliminaram cercárias. Nestas experiências não se observou relação entre o período do ano e a eliminação de cercárias.

Os dados obtidos na exposição individual padronizada, acham-se resumidos na Tabela V e Fig. 7. O grupo exposto a linhagem H apresentou percentagem de mortalidade nítidamente superior à do grupo controle C, mostrando-se infectado aos 70 dias, quando 480 cercárias foram eliminadas por 3 moluscos. O lote de moluscos

exposto a linhagem silvestre não apresentou mortalidade significativamente diferente da do grupo controle e apenas 1 dos moluscos eliminou cercárias, ao fim de 50 dias.

Pelo fato de termos obtido uma percentagem de mortalidade no grupo C julgada elevada, repetimos a experiência utilizando novos moluscos controle e a mesma técnica empregada anteriormente. Os novos resultados não diferiram significativamente dos obtidos anteriormente.

TABELA III

Percentagem de mortalidade em diferentes lotes de *Biomphalaria tenagophila* expostos a miracídios de *Schistosoma mansoni* da linhagem silvestre.

LOTE	MOLUSCOS EXPOSTOS (n°)	MORTALIDADE APÓS 50 DIAS (%)	CERCÁRIAS (n°)	ELIMINADAS data
01	6	66,6	120	março/1973
02	15	94,0	14	
03	16	62,5	120	
04	22	68,1	0	
05	5	100,0	0	
06	20	30,0	3.420	
07	5	100,0	0	
08	5	60,0	0	abril/1973
09	11	45,4	1.600	maio/1973
10	8	12,5	0	junho/1973
11	5	100,0	0	
12	12	25,0	50	
13	21	27,2	180	
14	5	100,0	0	
15	14	100,0	0	
16	6	83,3	0	julho/1973
17	20	90,0	500	
18	35	97,1	0	agosto/1973
19	30	63,3	0	
20	16	37,5	0	
22	35	57,4	0	setembro/1973
23	9	11,1	0	
24	10	40,0	0	
25	20	80,0	0	novembro/1973
26	20	90,0	0	
27	10	80,0	0	
28	10	60,0	0	
29	5	40,0	0	
30	20	90,0	0	julho/1974
31	10	60,0	0	
32	5	60,0	4	

Percentagem de mortalidade em diferentes lotes de *Biomphalaria tenagophila* expostos a miracídios de *Schistosoma mansoni* da linhagem humana.

LOTE	MOLUSCOS	MORTALIDADE	CERCÁRIAS ELIMINADAS	
	EXPOSTOS (n°)	APÓS 50 DIAS (%)	(n°)	data
01	50	40,0	100	março/1973
02	20	25,0	248	
03	20	10,0	350	
04	50	64,0	5.320	abril/1973
05	5	20,0	0	
06	6	50,0	0	
07	5	60,0	0	julho/1973
08	5	100,0	0	
09	15	80,0	0	
10	30	86,6	0	
11	15	93,3	0	
12	25	100,0	0	agosto/1973
13	30	90,0	*	
14	10	70,0	100	
16	10	75,0	0	
17	20	40,0	0	
18	12	100,0	0	
19	16	12,5	0	
20	17	29,4	0	setembro/1973
21	30	100,0	0	
22	20	100,0	0	
23	10	100,0	0	dezembro/1973
24	10	100,0	0	
25	20	100,0	0	
26	24	70,8	0	fevereiro/1974
27	8	87,5	0	março/1974
28	50	60,0	0	
29	24	91,6	0	abril/1974
30	24	65,5	0	
31	50	100,0	*	junho/1974
32	45	46,6	210	
33	14	50,0	0	
34	33	42,4	0	julho/1974
35	50	48,0	0	
36	8	37,5	0	
37	6	33,3	0	

* = desprezados

TABELA V

Dados referentes a exposição padronizada de moluscos às linhagens silvestre e humana.

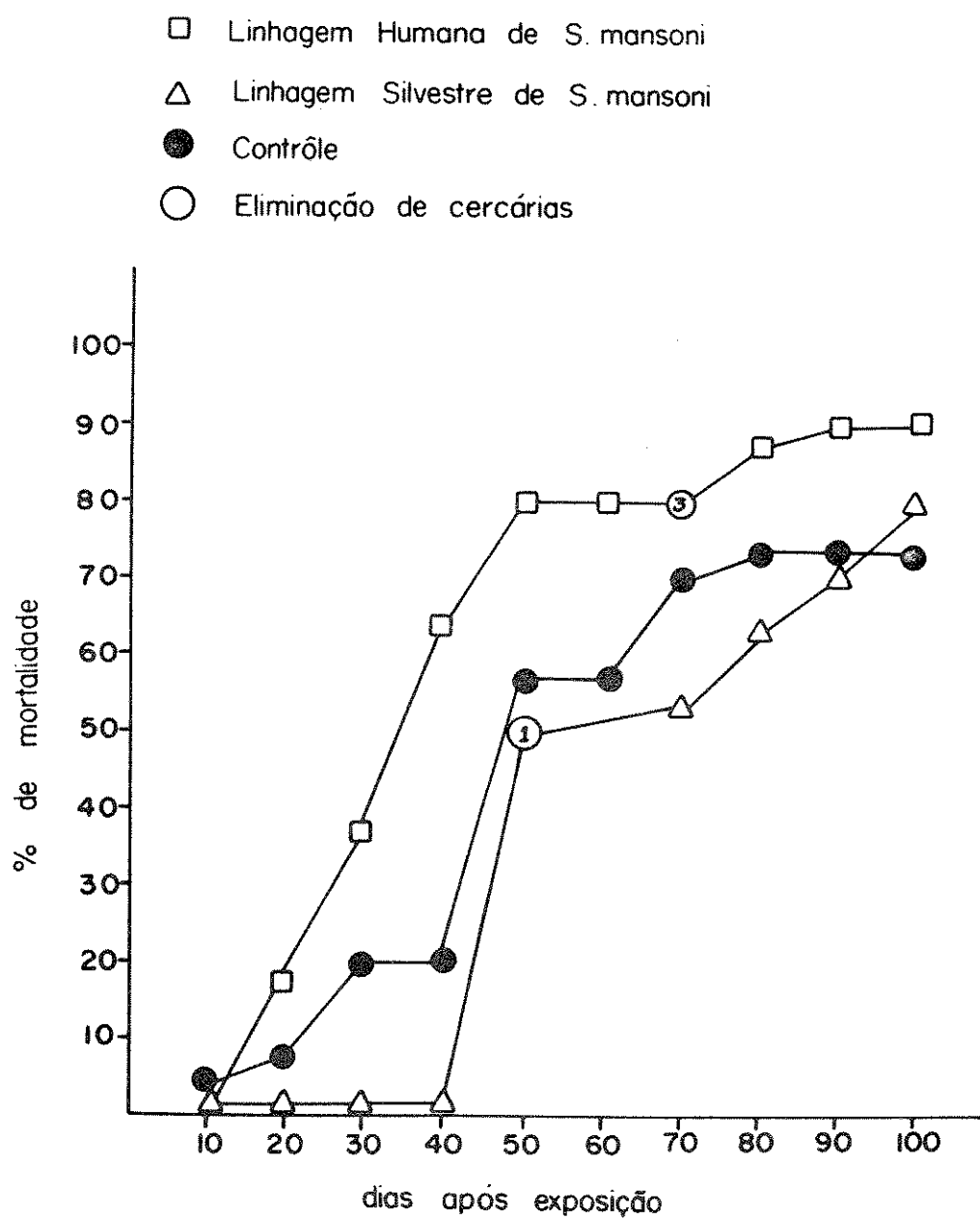
LINHAGEM	DIAS APÓS EXPOSIÇÃO:	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
HUMANA	Moluscos vivos	30	25	19	11	6	6	5	4	3	3
	% de mortalidade	0	16,7	36,6	63,3	80,0**	80,0	86,6	86,6	90,0	90,0
	Nº de moluscos que e- liminaram cercárias	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
	Nº de cercárias elimi- nadas	0	0	0	0	0	0	480	0	0	0
SILVESTRE	Moluscos vivos	30	30	30	30	15	15	14	11	9	6
	% de mortalidade	0	0	0	0	50,0	50,0*	53,3	63,3	70,0	80,0
	Nº de moluscos que e- liminaram cercárias	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	Nº de cercárias elimi- nadas	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
CONTROLE (molus- cos não expostos à in- fecção)	Moluscos vivos	29	18	24	24	13	13	9	8	8	8
	% de mortalida- de	3,3	6,6	20	20	56,6**	56,6*	70,0	73,3	73,3	73,3

* $\chi^2 = 3,8$ $p > 0.05$

** $\chi^2 = 11,59$ $p < 0.01$

FIGURA 7

Curva de mortalidade após exposição de moluscos às linhagens humana e silvestre do *Schistosoma mansoni*.



3- Estudo da relação granulomas-vermes nas linhagens humana e silvestre do *S. mansoni*.

A patogenicidade das linhagens humana e silvestre do *S. mansoni* foi estudada através das relações observadas entre os granulomas hepáticos e os vermes adultos encontrados na veia porta, mesentério e fígado de camundongos infectados com um número fixado de cercárias.

Os dados obtidos nestas experiências estão apresentados nas Tabelas VI e VII e Figs. 8 e 9 , onde se verifica que tanto o número de vermes, como o número de granulomas por animal, teve amplas variações. A análise estatística da relação granulomas-vermes, nas duas linhagens em estudo, acha-se apresentada na Tabela VIII, onde se verifica que foi possível estabelecer um coeficiente de correlação significativo somente para os dados referentes a linhagem humana.

TABELA VI

Relação entre granulomas hepáticos e número de vermes obtidos de ca mundongos infectados com a linhagem humana.

HELMINTOS			GRANULOMAS x 1000	DIAS APÓS A INOCULAÇÃO	RELAÇÃO GRANULOMAS/VERMES
machos	fêmeas	total			
85	75	150	4.8	55	32,4
63	80	143	4.8	51	34,1
81	53	134	5.6	51	42,2
63	55	118	11.3	53	96,3
56	46	102	4.3	51	42,4
54	41	95	6.4	51	67,4
44	38	82	8.0	53	97,8
31	25	56	5.4	51	97,8
35	21	56	3.3	51	60,6
22	2	24	2.5	53	106,1
8	12	20	3.1	53	157,6
12	2	14	1.8	53	131,4
10	3	13	3.3	49	258,1
5	1	6	1.8	53	302,5
2	0	2	0.7	59	366,0

TABELA VII

Relação entre granulomas hepáticos e número de vermes obtidos de ca mundongos infectados com a linhagem silvestre.

HELMINTOS			GRANULOMAS x 1000	DIAS APÓS A INOCULAÇÃO	RELAÇÃO GRANULOMAS/VERMES
machos	fêmeas	total			
118	50	168	2.8	56	16,7
65	11	76	3.2	50	12,5
34	34	68	5.5	50	81,6
26	26	52	1.6	49	31,2
41	9	50	4.2	50	85,3
20	19	39	3.7	49	95,1
17	17	34	6.5	50	192,9
15	18	33	1.2	49	37,5
15	12	27	2.4	49	89,6
18	9	27	3.8	50	143,9
12	4	16	2.1	50	137,1
9	7	16	2.1	76	137,4
8	8	16	4.3	76	274,8
7	7	14	5.0	76	359,9
5	5	10	4.2	76	427,4
5	1	6	1.2	76	209,0

FIGURA 8

Correlação granulomas hepáticos / vermes obtida em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* da linhagem humana.

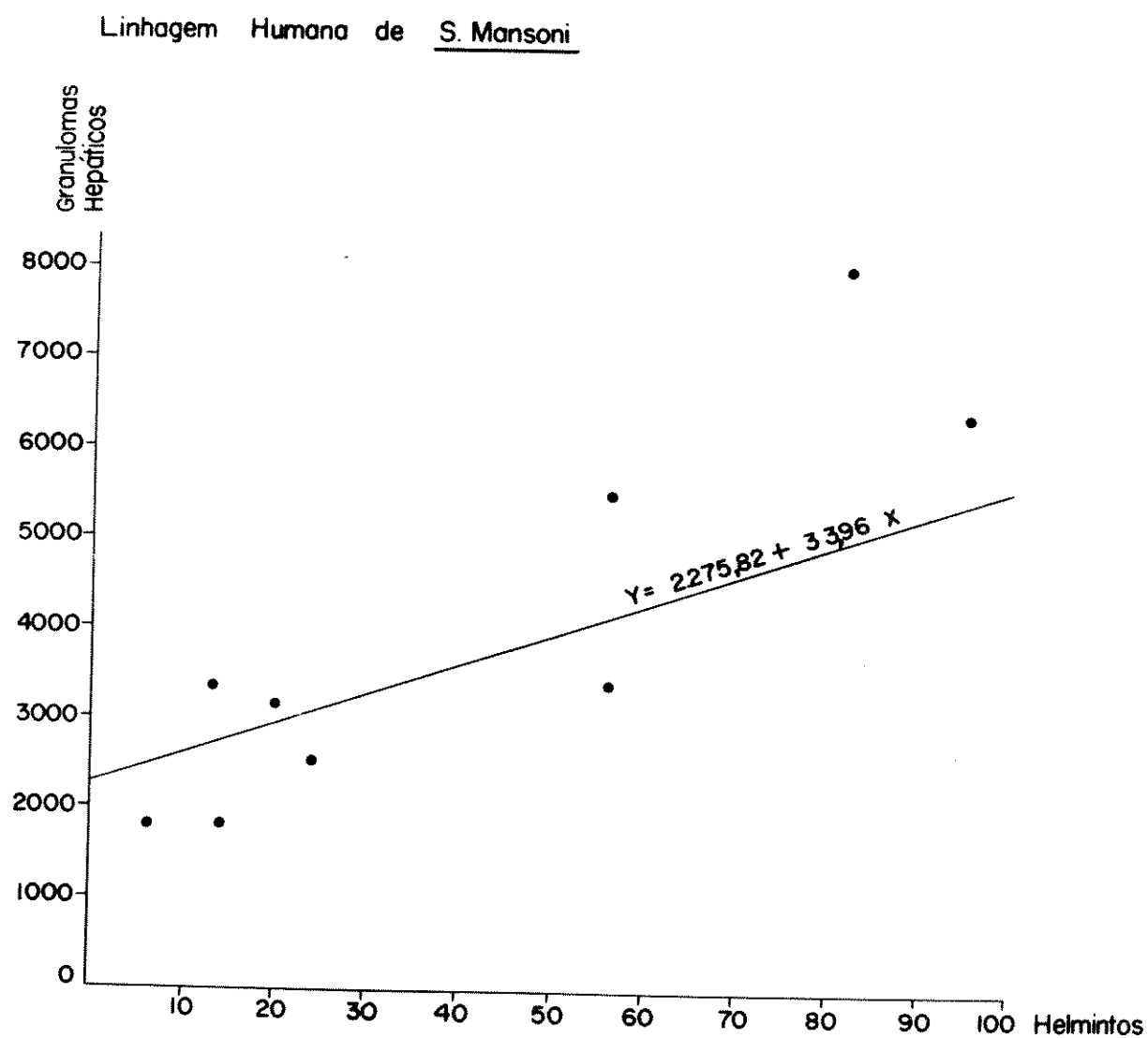


FIGURA 9

Correlação granulomas hepáticos / vermes obtida em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* da linhagem silvestre.

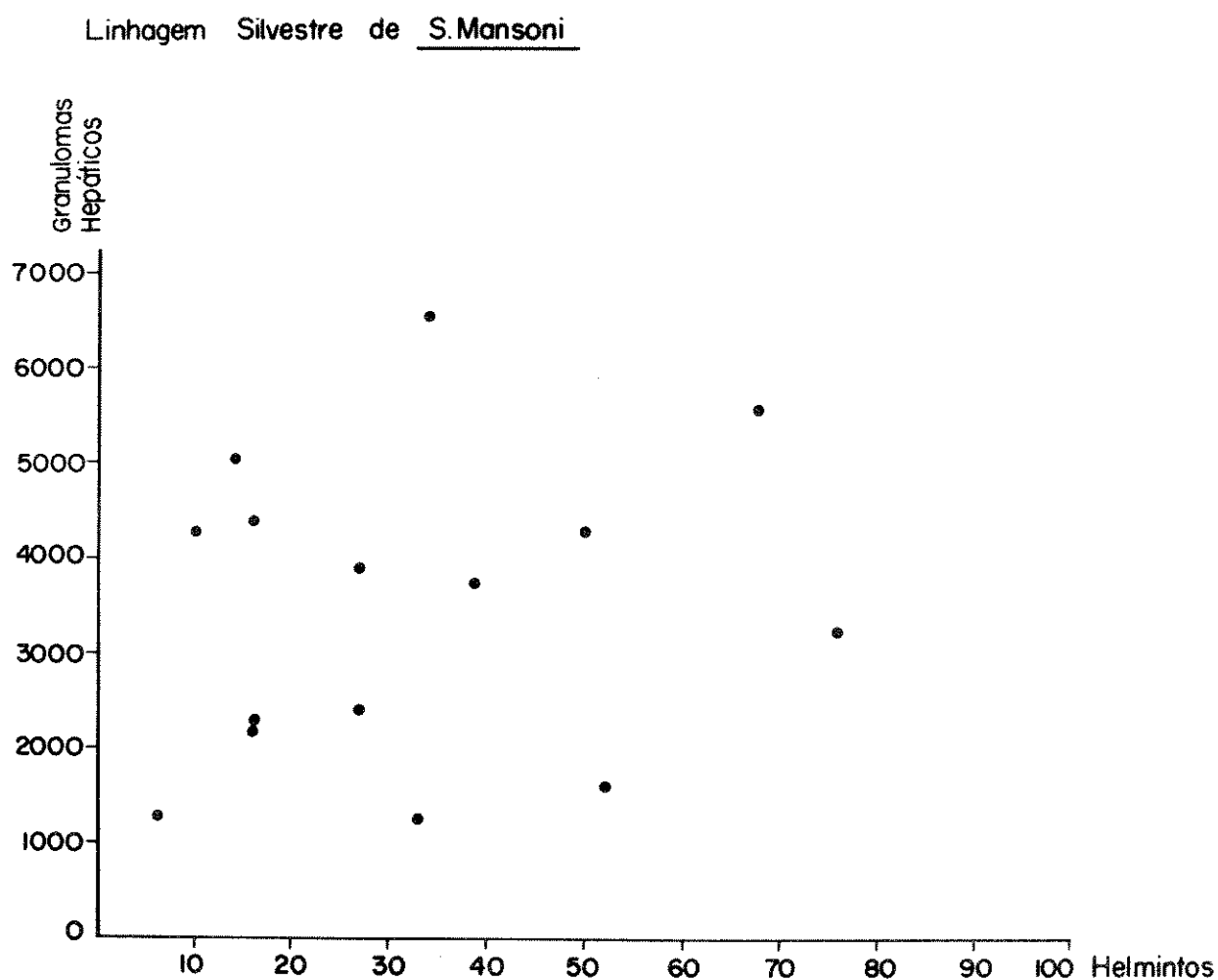


TABELA VIII

Análise da correlação granulomas/nº de vermes, para as linhagens humana e silvestre.

LINHAGENS:	HUMANA	SILVESTRE
Coeficiente de correlação (r)	0,65138**	0,0064
Coeficiente de regressão (b)	33,95633	0,26234
Termo independente (a)	2.275,82167	3.403,80964

** = Significativo ao nível de 1%

4- Resultados da imunização de coelhos com antígenos de *Schistosoma mansoni*.

Quatro antígenos de *S. mansoni* (HM, HF, SM, SF), foram inoculados em coelhos, obedecendo-se a vários esquemas de imunização. Entre os esquemas testados, o único capaz de tornar o coelho hipersensível, aos 59 dias de imunização, encontra-se apresentado na Tabela IX. A positividade da reação de Arthus foi obtida com 500 γ de proteína em 0,1 ml de solução salina tamponada (0,9% de NaCl em tampão fosfato 0,02M, pH: 7.0), inoculada por via intradérmica.

5- Relações antigênicas entre as linhagens humana e silvestre de *S. mansoni*.

As linhagens humana e silvestre foram comparadas entre si, através da experiência de imunodifusão, utilizando-se soros obtidos de coelhos imunizados com os antígenos em estudo. Estes soros eram: anti-HM, anti-HF, anti-SM e anti-SF. A concentração proteica dos extratos salinos utilizados nestas reações como antígenos, foi de 100 γ por ml. Os coelhos, usados no presente trabalho, foram sangrados antes de iniciarmos o processo de imunização, tendo os soros obtidos, apresentado reação de precipitação negativa, frente aos antígenos em estudo. Com os anti-soros resultantes

da imunização destes animais, realizamos testes de precipitação em meio gelificado, frente ao soro normal de camundongo. Os resultados encontrados nestas reações foram negativos.

Com alguns dos soros anti-HM utilizados, observou-se a existência de dois sistemas precipitantes em HM. Estes sistemas aparentemente mantiveram relação de identidade com o sistema SM e reagiram cruzadamente com o antígeno SF (Fig. 10).

Com outro soro anti-HM (Fig.14), foi possível também demonstrar dois sistemas precipitantes, sendo que um deles reagiu cruzadamente com SM, HF e SF.

Com os soros anti-SM utilizados, também foram observados dois sistemas precipitantes com o antígeno homólogo. Estes sistemas dependeram do soro utilizado, mostrando reação de identidade (Fig. 11), ou reação cruzada (Fig. 12) com o sistema HM.

TABELA IX

Esquema de imunização de coelhos com antígenos de *Schistosoma mansoni* das linhagens humana e silvestre.

INOCULAÇÕES ANTIGÊNICAS			INTERVALO INTER-INOCU- LAÇÕES(dias)	TESTES REALIZADOS com os anti-soros	RESULTADOS
(nº)	(mg)	(via)			
1	10	G		Ring- test	-
			30		
2	10	G		Ring- test	-
			15		
3	5	D		R. de Arthus	-
			7		
4	5	D		R. de Arthus	-
			7		
5	5	D		R. de Arthus	+
			7		
				R. de Arthus	+

Vias de inoculação: Intra-muscular em regiões próximas aos gânglios poplíteos (G); sub-cutânea no dorso do coelho (D).

Resultados: reação positiva (+) e negativa (-).

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO EM GEL DE ÁGAR, DOS ANTÍ-GENOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM HUMANA E DA SILVESTRE, FRENTE AOS ANTI-SOROS HOMÓLOGOS E HETERÓLOGOS.

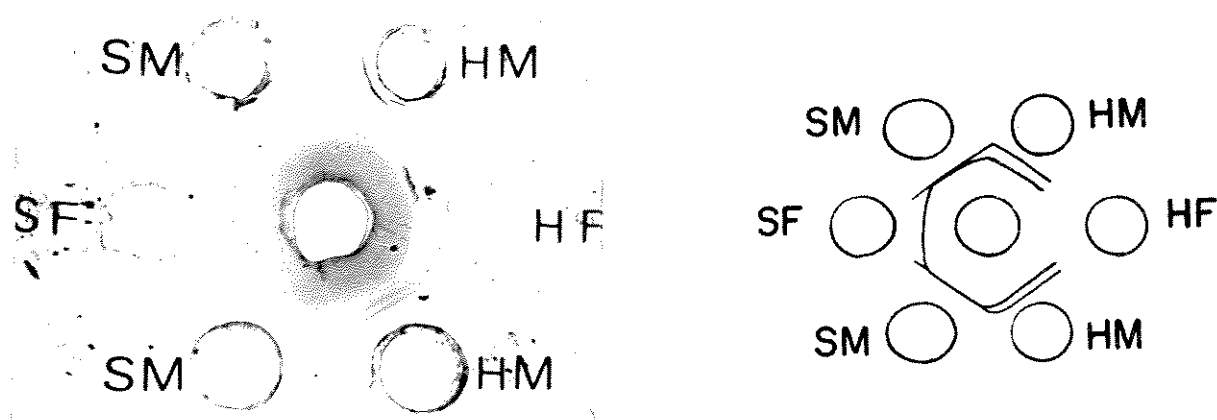


Fig. 10 - Reação de precipitação em gel, entre o soro anti-HM e os diferentes antígenos.

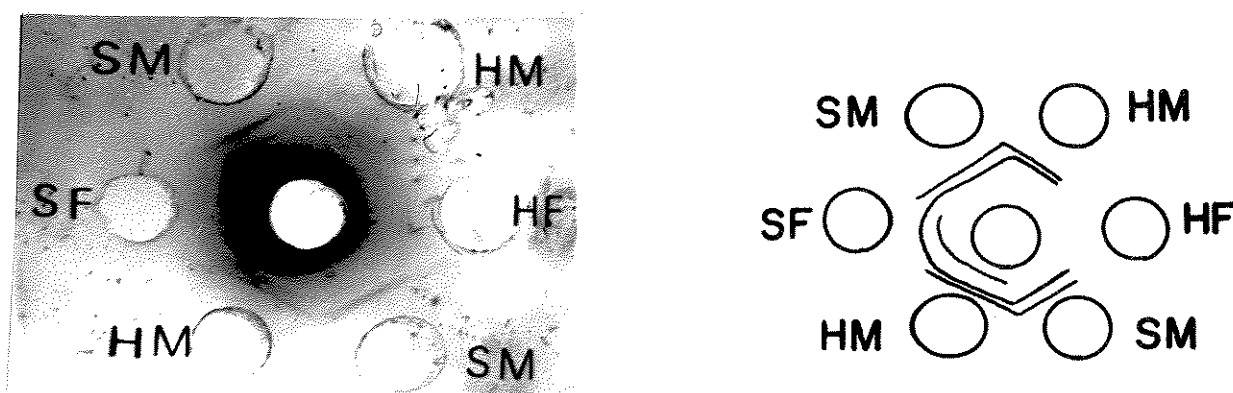


Fig. 11 - Reação de precipitação em gel entre o soro anti-SM e os diferentes antígenos.

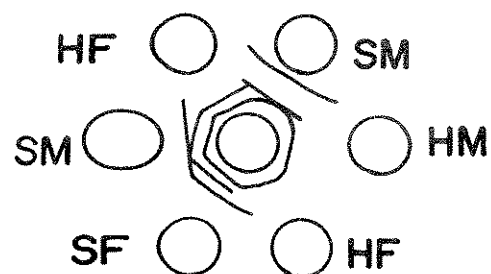
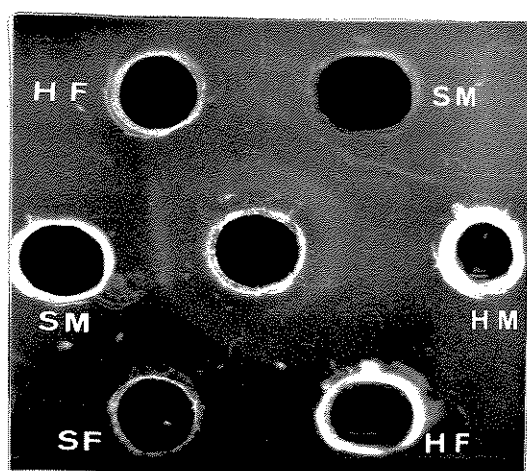


Fig. 12 - Reação de precipitação em gel entre o soro anti-SM e os diferentes antígenos.

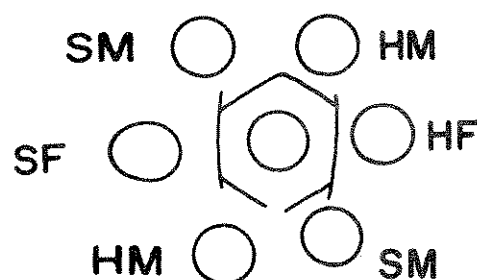
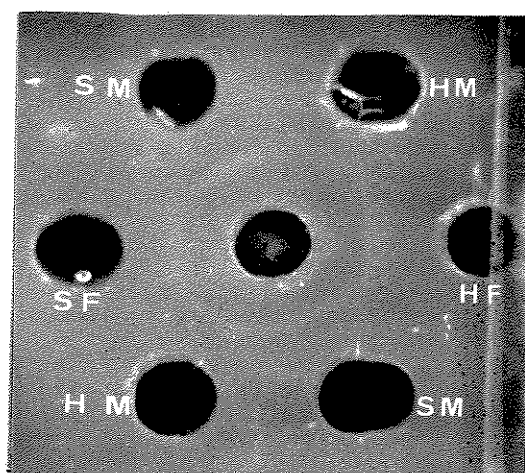


Fig. 13 - Reação de precipitação em gel entre o soro anti-HF e os diferentes antígenos.

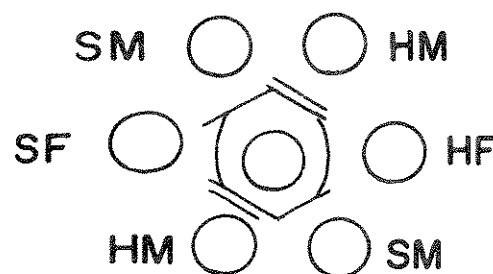
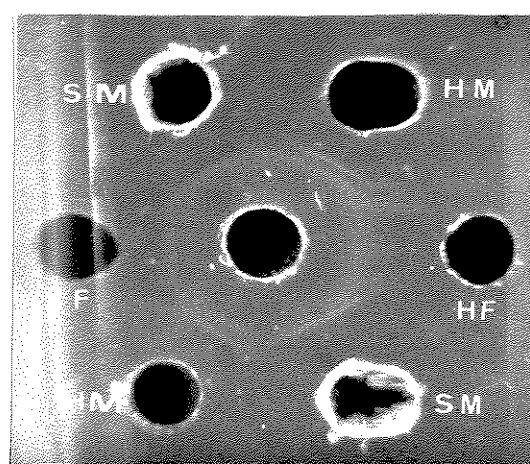


Fig. 14 - Reação de precipitação em gel entre o soro anti-HM e os diferentes antígenos.

IV- D I S C U S S Ã O

Os roedores silvestres, capturados para o isolamento da linhagem S, eram procedentes de diversas localidades, situadas às margens do Rio Paraíba do Sul. Entre os animais capturados, tres espécies apresentaram-se naturalmente infectadas (*Holochilus b. leucogaster*, *Nectomys s. squamipes* e *Zigodontomys l. brachiu rus*). Estas espécies foram capturadas nos municípios de Taubaté e Caçapava. Entre os animais capturados, *Nectomys* foi o gênero que, proporcionalmente, apresentou maior índice de infecção. Segundo GILMOUR & GREGOR (1969), o habitat dos animais deste gênero localiza-se em zonas suburbanas e rurais, quase sempre peri-domíci- liares (hortas e outras culturas). Esta observação re- força a hipótese de que o *Nectomys* desempenhe importan- te papel como reservatório natural do *S. mansoní* no Brasil, devido principalmente à frequência com que é en- contrado parasitado e a amplitude de sua distribuição (AMORIM, 1953 a 1962; AMORIM & cols., 1954; MARTINS & cols., 1955; MOOJEM, 1952; MARTINS, 1958; NELSON, 1960; ANTUNES, 1971). As demais espécies de roedores, por nós encontradas parasitadas, são também consideradas impor- tantes na epidemiologia da helmintose. Esta conclusão é baseada em fatos que parecem demonstrar o papel deci-

sivo destes animais, na dispersão da doença. Assim é que, os roedores infectados foram encontrados em vasta área pesquisada e seus índices de infecção podem ser considerados elevados. Segundo informação pessoal de SOUZA DIAS, 25,9% dos roedores capturados na região do Vale, apresentaram-se infectados com *S. mansoni*. Nós mesmos, obtivemos um índice de infecção natural de 20,6%, nos 63 roedores capturados.

No que se refere aos resultados obtidos com a infecção dos planorbídeos com as linhagens humana e silvestre, verificamos que os moluscos expostos à linhagem silvestre apresentaram mortalidade de 50%, no 60º dia após a data de exposição padronizada, enquanto que na linhagem humana, a mortalidade correspondente foi de 80%. Esta alta mortalidade apresentada pela *B. tenagophila*, infectada pela linhagem H, foi também encontrada por MAGALHÃES (1969), quando trabalhou com esta mesma espécie de caramujo, infectada com *S. mansoni* de São José dos Campos. Este mesmo autor trabalhou com *B. glabrata*, infectada com *S. mansoni* da linhagem mineira e obteve bem menor mortalidade (27,5%). Estes dados são coerentes com a hipótese que sugere adaptação recente do *S. mansoni* à *B. tenagophila* do Vale do Rio Paraíba.

A diferença encontrada entre a mortalidade, nos grupos de moluscos expostos a linhagem silvestre e no grupo controle, não foi significativa ($p > 0.05$). A diferença entre a mortalidade obtida nos grupos de mo

luscos expostos a linhagem silvestre e a linhagem humana, foi significativa ($p < 0.01$). Foi evidenciado, também, menor período de maturação dos esporocistos da linhagem silvestre. Estes fatos sugerem estar a linhagem S mais adaptada ao hospedeiro intermediário do que a linhagem H. Esta sugestão encontra apoio nos argumentos apresentados por SCHWETZ (1956), que admite ser a infecção esquistossomótica nos roedores anterior a do próprio homem. SCHWETZ observou em animais silvestres frequentes infecções crônicas, com baixa patogenicidade, podendo este fato indicar maior adaptação hospedeiro-parasita.

A patogenicidade nos camundongos (*Mus musculus*) foi estudada através da relação granulomas/vermes adultos. Escolhemos *Mus musculus* albinos como hospedeiro definitivo do *S. mansoni*, em nosso trabalho, devido a publicações anteriores que demonstram a eficiência deste animal na manutenção das linhagens do verme (WARREN, 1967; TAYLOR & ANDREWS, 1973). Como resultados destes experimentos, verificamos que houve relação causal significativa na linhagem humana, possibilitando um ajustamento linear, cuja função está apresentada na Fig. 8. Por outro lado, a linhagem silvestre não se comportou de maneira idêntica (Fig. 9). Acreditamos que esse resultado se deva ao fato de termos trabalhado com fígados oriundos de três espécies diferentes de roedores silvestres, naturalmente infectados.

A comparação entre os antígenos das linhagens H e S, através de soros de coelhos imunizados, mostrou a existência de pelo menos dois sistemas precipitantes, frente ao antígeno homólogo. Estes antígenos guardavam relações de identidade ou cruzada com os antígenos heterólogos, dependendo do soro utilizado. O fato de termos usados coelhos cujos soros não reagiram, antes da imunização, com os antígenos testados, exclui a possibilidade de termos obtido reação cruzada entre antígenos e anticorpos naturais. Não foram obtidas, também, reações de soro de coelho com soro de camundongo normal, eliminando-se assim a possibilidade de termos trabalhado com antígenos comuns ao parasita e ao camundongo. Não incluímos antígenos das formas de desenvolvimento do verme, baseado em CAPRON (1965), que refere semelhança antigênica entre *esquistossomolus* e vermes adultos. Com os anti-soros utilizados, foi possível verificar a existência de determinantes antigênicos próprios de cada linhagem. O pequeno número de vermes obtido não nos permitiu realizar absorções do soro, de modo a obtermos anticorpos específicos de cada linhagem.

Os resultados do presente trabalho corroboram a hipótese da existência de duas linhagens; uma silvestre, capaz de produzir baixa mortalidade à *B. tenagophila* e de apresentar determinantes antigênicos próprios; outra humana, também com determinantes antigênicos próprios, ocasionando alta mortalidade aos

hospedeiros intermediários e apresentando coeficiente de correlação significativo quanto a relação granulosas/vermes.

Existem hipóteses sobre o mecanismo do estabelecimento de diferentes linhagens, como a de DEVAY & cols. in MIROCHA & URITANI (1967), que admitem a possibilidade dos hospedeiros exercerem uma pressão seletiva sobre o parasita, através de diferentes respostas imunes, próprias de cada espécie. Outra teoria que explica a diversidade de constituição antigênica entre as linhagens, sugere a síntese de antígenos por parte do parasita, com a finalidade de se tornar imperceptível às defesas naturais do hospedeiro (CAPRON & cols., 1968). A distinção entre as duas linhagens poderia ser, também, atribuída a antígenos do hospedeiro incorporados à constituição antigênica superficial do parasita, por mecanismos desconhecidos (SMITHERS, 1972). Experiências, que parecem comprovar estas últimas teorias, mostram que, em macacos previamente imunizados com hemácias de camundongos, não se desenvolveram *S. mansoni* transplantados de camundongos infectados (SMITHERS & cols., 1969).

V- R E S U M O E C O N C L U S Õ E S

Roedores silvestres foram capturados no Vale do Rio Paraíba(SP), tendo-se encontrado uma alta percentagem de infectados.

A partir de fígados dos roedores natural - mente infectados, foram obtidos miracídios para o isolamento da linhagem silvestre(S). Para o isolamento da linhagem humana(H), foram utilizados miracídios procedentes de fezes de doentes comprovadamente autóctones do Vale do Rio Paraíba.

O comportamento das duas linhagens do parasita foi estudado em *Biomphalaria tenagophila*, hospedeiro intermediário natural da região do Vale e em camundongos albinos, tomados como hospedeiros definitivos.

Coelhos foram imunizados com antígenos preparados a partir de vermes adultos, obtidos de camundongos infectados. Os anti-soros obtidos foram testados frente a diferentes extratos salinos(antígenos) das duas linhagens do *S. mansoni*, pela técnica de imunodifusão.

O estudo comparativo destas duas linhagens mostrou que:

- a- A mortalidade das *B. tenagophila* expostas à linhagem S, não foi estatisticamente diferente da mortalidade apresentada pelos moluscos usados como controle, ao

passo que, foi significativa, a diferença encontrada entre a mortalidade obtida nos grupos de moluscos expostos a linhagem silvestre e a linhagem humana.

- b- Na linhagem humana, foi encontrado coeficiente de correlação significativo entre o número de granulomas hepáticos e o de vermes adultos. Não nos foi possível estabelecer esta correlação com os dados obtidos na linhagem S.
- c- Na análise de imunodifusão, cada extrato salino dos vermes adultos pertencentes às linhagens H e S, continham, pelo menos, dois sistemas precipitantes, observando-se uma relação de identidade parcial (reação cruzada) entre os antígenos da linhagem H e os da linhagem S.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- 1- Existem duas linhagens do *S. mansoni* no Vale do Rio Paraíba; uma silvestre, isolada de roedores do campo; outra humana, isolada de doentes autóctones não tratados.

- 2- As linhagens humana(H) e silvestre(S) do *Schistosoma mansoní* diferiram entre si quanto ao comportamento nos hospedeiros intermediários e definitivos.
- 3- As linhagens humana(H) e silvestre(S) possuem determinantes antigênicos próprios.
- 4- Existem dois ciclos paralelos do *S. mansoní*: um mantido pelo homem e outro mantido pelos roedores silvestres. Os roedores silvestres capturados apresentaram-se frequentemente infectados e é provável que desempenhem papel importante na dispersão da esquistossomose mansônica no Vale do Rio Paraíba.

VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, J.P., 1953 - Infestação experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni*. (Nota prévia). *Rev.Bras.Malariol.D.trop.*, 5:219-222.
- AMORIM, J.P., ROSA, D. & LUCENA, D.T., 1954 - Ratos silvestres, reservatórios do *Schistosoma mansoni* no Nordeste do Brasil. *Rev.Bras.Malariol.D.Trop.*, 6 : 13-28.
- AMORIM, J.P., 1962a - Roedores silvestres como disseminadores de ovos de *Schistosoma mansoni*. *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo*, 4:397-402.
- AMORIM, J.P., 1962b - Infestação do homem e de roedores silvestres pelo *Schistosoma mansoni* em localidades do município de Viçosa (Estado de Alagoas, Brasil). *Arq.Hig.Saúde Públ.*, 27:335-339.
- ANTUNES, P.A.A. - 1952 - A Esquistossomíase em São Paulo. Estudo epidemiológico da esquistossomíase na baixada de Santos. *Anais do X Congresso Brasileiro de higiene*, Belo Horizonte :393-397.

- ANTUNES, C.M. de F., 1971 - *Nectomys squamipes squamipes* Brants, 1827 na epidemiologia da esquistossomose mansonii. Tese de mestrado apresentada ao Departamento de Zoologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da U.F. de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ARANTES, A., 1923 - Sobre dois casos de Schistosomose autóctone em Santos. *An.Paul.Med. e Cir.*, 14:95-96.
- ARANTES, A., 1924 - Onze casos de Schistosomose em Santos. *Bol.Soc.Med.Circ.São Paulo*, 7:64-65.
- ARTHUS, M., 1903 - Injection repetees de serum de cheval chez le lapin. *C.R.Soc.Biol.*, 55:817.
- BARBOSA, F.S., DOBBIN JR., J.E. & COELHO, M.V., 1953 - Infestação natural de *Rattus rattus frugivorus* por *Schistosoma mansonii* em Pernambuco. *Publ.Av.Inst. Aggeu Magalhães*, 2:43-46.
- BARBOSA, F.S., COELHO, M.V. & COUTINHO-ABATH, E., 1958 - Infestação natural e experimental de alguns mamíferos de Pernambuco por *Schistosoma mansonii*. *Rev.Bras. Malariol.D.trop.*, 10:137-144.
- BARRETO, A.C., 1959 - Infestação natural de rato de esgoto (*Rattus norvegicus*) por *Schistosoma mansonii* na cidade de Salvador, Bahia. *Bol.Fund.Gonçalo Muniz*, 14: 1-5.

- BARRIOS-DURAN, L. A., 1955 - An efficient device for exposing mice to *Schistosoma cercariae* and holding small animal for *post-mortem* examination. *J. Parasitol.*, 41: 641-642.
- BIGUET, CAPRON & VAN KY, 1962 - Les antigens de *S. mansoni*. 1: Etude electrophoretique et immunoelectrophoretique. Caracterisation des antigenes specifiques. *Annales de L'Institut Pasteur*, 103:763-777.
- BIGUET, J., ROSE, F., CAPRON, A. & TRAN VAN KY, P., 1965 - Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique a la connaissance des antigenes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoélectrophorèse. *Rev. d'Immunologie*, 29:5-30.
- BRENER, Z., 1956 - Observações sobre a infecção do camundongo pelo *S. mansoni*. *Rev. Bras. de Malariol. e Doenças Trop.* 8:565-570.
- BRENER, Z., PELLEGRINO, J. & OLIVEIRA, F.C., 1956 - Terapêutica experimental da Esquistossomose mansoni. Aplicação do método de isolamento de granulomas do fígado de camundongos. *Rev. Bras. de Malariol. e Doenças Trop.* 8:583-587.

- BRENER, Z. , 1959 - Esquistossomose experimental. *Rev. Bras. de Malariol. e Doenças trop.* 11:473-506.
- BRENER, Z. , 1962 - Contribuição ao estudo da Terapêutica experimental da esquistossomose mansônica. Tese de Cátedra - Belo Horizonte.
- CAMERON, T. W. M., 1928 - A new definitive host for *Schistosoma mansoni*. *J. Helminth.*, 6:219-222.
- CAPRON, A.; BIGUET, J.; ROSE, F. & VERNES, A., 1965 - Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. II. Etude immunoélectrophorétique de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques de la cercaire et de l'adulte de *S. mansoni*. *Ann. Inst. Pasteur* 109: 798-810.
- CAPRON, A.; BIGUET, J.; VERNES, A. & AFCHEIN, D., 1968 - Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. Biol.* 16:121-138.
- CORRÊA, R.R.; CODA, D. & OLIVEIRA, U. A., 1956 - Um foco autóctone de esquistossomose no Vale do Paraíba - *Folia Clínica et Biologica* 26:85-90.

COUTINHO, J. O. , 1949 - Diagnóstico da Esquistossomose pela Intradermo-reação com Antígenos de Esquistossomos adultos. *Rev. Clin. de São Paulo* 25: 7-15.

DAMIAN, R. T. , 1966 - An immunodiffusion analysis of some antigens of *S. mansoni* adults. *Exp. Parasit.* 18 , 255-265.

FENWICK, A., 1969 - Baboons as reservoirs host of *Schistosoma mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 63: 557-567.

FERREIRA, J. M. & MEIRA, J. A., 1952 - Três casos de esquistossomose mansoni procedentes do interior do Estado de São Paulo (Ourinhos, Palmital e Ipauçu). Foco autóctone na cidade de Ourinhos. *Rev. Paul. Med.*, 41 :15-18.

FREUND, J., 1951 - The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization. (A Review of Jules Freund) *Am J. Clin. Path.* 21:645-656.

GILMOUR, J. S. L. & GREGOR, J. W., 1939 - Demes: a suggested new terminology. *Nature*, 144:333.

- GONZALEZ TORRES, D. M., 1940 - Sobre um caso de Schistosomose intestinal autóctone de Santos. Apendicite por *Schistosoma mansoni*. *Arq. Inst. Biol.*, 11: 579 - 588.
- HILL, J., 1956 - Chemoterapeutic studies with laboratory infections of *Schistosoma mansoni*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 50: 39-48.
- KABAT, E. A. & MAYER, M. M., 1961 - Experimental Immunochemistry 1ª ed. Charles C. Thomas Publisher Spring - field Illinois, USA.
- KUNTZ, R. E., 1952 - Natural infection of an Egyptian gerbil with *Schistosoma mansoni*. *Proc. helminth. Soc. Wash.*, 19:123-124.
- LOWRY, O. H., 1951 - Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- LUTZ, A., 1916 - Observações sobre a evolução do *Schis*tosoma mansoni. Nota prévia. *Brazil-Médico*, 30:385-387.
- LUTZ, A. & PENNA, O., 1918 - Estudos sôbre a Schistosomatose feitos no Norte do Brazil, por uma comissão do Instituto Oswaldo Cruz. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 10: 83-94.

LUZ, E; LIMA, E. C. & CONSOLIN, J., 1966-67 - Reservatõrios silvestres de *Schistosoma manson*i numa área endêmica de esquistossomose no Estado do Paraná. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Paraná*, 9-10:113-120.

MAGALHÃES, B.F. & DIAS, C. B., 1944 - Esquistossomose de Manson - Estudos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 41:363-446.

MAGALHÃES, Z.P., 1949 - Esquistossomose mansoni. Novo foco autóctone em Santos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 9 : 5 - 17.

MAGALHÃES, L. A., 1966 - Moluscos planorbídeos do Distrito Federal, Brasília. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas-São Paulo.

MAGALHÃES, L. A., 1969 - Estudo dos dados obtidos de uma população de *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte infectada com *Schistosoma manson*i da mesma cidade, e de uma população de *B. tenagophila* de Campinas, infectada por *S. manson*i de São José dos Campos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 3 : 195-196.

- MAGALHÃES, L.A.; SOUZA DIAS, L. C.; PIZA, J. T.; TAKAKU, L. & PEREIRA, A., 1973 - Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansônica na região da represa de Americana. Est. de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Públ., S. Paulo* 7: 21-28.
- MARTINS, A. V.; MARTINS, G. & BRITO, R. S., 1955 - Reservatórios silvestres do *Schistosoma mansoni* no Estado de Minas Gerais. *Rev. Bras. Malariol. D. trop.*, 7 : 259-265.
- MARTINS, A.V., 1958 - Non human vertebrate host of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. *Bull. Wrlld. Hlth. Org.*, 18:931-944.
- MIROCHA, C.J. & URITANI, I., 1967 - The dinamic role of molecular constituents in Plant-Parasite Interaction. *The American Phytopathological Society, INC. St. Paul, Minnesota.*
- MOOJEN, J., 1952 - Os roedores do Brasil. Ministério da Educação e Saúde, Instituto Nacional do Livro. Rio de Janeiro.
- MOURA, S.A.L., 1945 - Esquistossomose mansoni autóctone em Santos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 5:279-311.

- MOURA, S.A.L., 1952 - Contribuição do Lab. Regional de Santos na Epidemiologia da Esquistossomose em Santos. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, 12:97-109.
- NELSON, G.S., 1960 - Schistosoma infections as zoonoses in África. *Trans.R.Soc.trop.Med.Hyg.*, 54:301-316.
- OLIVER, L. & STIREWALT, M.A., 1952 - An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J.Parasitol.* 38:19-23.
- OUCHTERLONY, O., 1958 - Diffusion-in-Gel Methods for Immunological Analysis; in *Progr. Allergy*, 5:1-78.
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R., 1963a - Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do *Schistosoma mansoni* no Brasil. SBPC - XV Reunião - Campinas:6.
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R., 1963b - Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo*, 5:23-29.
- PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R., 1963c - Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo* 5:15-22.
- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D.G., 1955 - A simplified method for the concentration of cercariae. *J.Parasitol.* 41:329-330.

- PELLEGRINO, J. & BRENER, Z., 1956 - Method for isolating schistosoma granulomas from Mouse liver. *Reprinted from the Journal of Parasit.* 42:564.
- PELLEGRINO, J. & KATZ, N., 1969 - Infection of Baby mice with *S. mansoni*: Some aspects in connection with experimental chemotherapy. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 63:568-575.
- PELLON, A.B. & TEIXEIRA, I., 1950 - Distribuição Geográfica da Esquistossomose mansônica no Brasil. Publicação da "Divisão de Organização Sanitária" do Ministério da Saúde, Rio de Janeiro.
- PELLON, A.B. & TEIXEIRA, I., 1953 - O Inquérito Helminológico Escolar em cinco Estados das Regiões Leste, Sul e Centro Oeste. Publicação da "Divisão de Organização Sanitária" do Ministério da Saúde, Rio de Janeiro.
- PINTO, C. & MACIEL, J., 1945 - Estudo sobre a Schistosomose ou chistosa em S.P., Lab. J. Maciel: 1-4.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1908a - Contribuição para o estudo da schistosomiose na Bahia. *Brazil-Médico*, 22:281-283.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1908b - Contribuição para o estudo da schistosomiose na Bahia. Dezesseis observações. *Brazil-Médico*, 22: 441-444.

- PIRAJÁ DA SILVA, 1908c - Contribuição para o estudo da schistosomiase na Bahia. Vinte observações. *Brazil-Médico*, 22: 451-454.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1908d - La schistosomose à Bahia. *Arch. Parasit.*, 13: 283-302.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1909 - Contribution to the study of schistosomiasis in Bahia, Brazil. *J.Trop.Med.Hyg.* 12: 159-164.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1912a - Cercaire brésilienne (*Cercaria Blanchardi*) à queue bifurquée. *Arch.Parasit.* 15: 398-400.
- PIRAJÁ DA SILVA, 1912b - Über einige Helminthen aus Bahia. *Arch.Schiffs-Tropen-Hyg.*, 16:485-487.
- PIZA, J.T. & RAMOS, A.S., 1960 - Os focos autóctones de esquistossomose no Estado de S.P. *Arq.Hig. Saúde Publ.*, 25:261-271.
- PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H.; FIGUEIREDO, C.G. & CAMARGO, L.V., 1960 - Vale do Paraíba, foco endêmico da Esquistossomose. *Arq.Hig. e Saúde Pública*, 25:35-40.
- PIZA, J.T., 1965 - A Esquistossomose no Estado de S. Paulo. O que nos ensina a experiência de seis anos de trabalho no Campo. *Arq.de Hyg.e Saúde Pública* 30/1 :6-24.

- RODRIGUES, D.C. & FERREIRA, C.S., 1969 - Primeiro encontro de roedor (*Nectomys squamipes*) naturalmente infestado pelo *Schistosoma mansoni*, no Estado de São Paulo (Brasil). *Rev.Inst.Med.trop.São Paulo*, 11 :306-308.
- RUFFER, M.A., 1910 - Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of twentieth dynasty. (1250 - 1000 B.C.). *British M.J. Part. 1*: 16'.
- SCHWETZ, J., 1956 - Role of wild rats and domestic rats (*Rattus rattus*) in schistosomiasis of man. *Trans.R.Soc.trop.Med.Hyg.*, 50:275-282.
- SMITHERS, S.R.; TERRY, R.J. & HOCKLEY, D.J., 1969 - *Proc.R.Soc.B.*, 171:483.
- SMITHERS, S.R., 1972 - Recent advances in the immunology of schistosomiasis. *Br.med.Bull.* 28:49-54.
- SOUZA DIAS, L.C.; PINTO.A.C.M.; PIZA, J.T.;GUALDO, M. B. & CURY, J.J., 1972 - Roedores silvestre hospedeiros definitivos do *Schistosoma mansoni*. *Rev. Paul.Med.*, 79:99.
- STANDEN, O.D., 1951 - The effect of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova of *S. mansoni*. *Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 45:225-241.

STANDEN, O. D., 1952 - Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *S. mansoni* I. Individual and mass infection to temperature and season. *Ann. Trop. Med. & Parasitology* 46:48-53.

STANDEN, O. D., 1953 - The relationship of sex in *S. mansoni* to injection within the hepatic port system of experimentally infected mice. *Ann. Trop. Med. Parasitology* 47: 139-145.

STIREWALT, M. A. & BRONSON, J. F., 1955 - Description of a plastic mouse restraining case. *J. Parasitology* 41: 328.

TAYLOR, M. G. & ANDREWS, J. B., 1973 - Comparison of the Infectivity and Pathogenicity of six species of African Schistosomes and their Hybrids 1. Mice and Hamsters. *J. of Helminthology*, 47:439-453.

YOLLES, T.; MOORE, D.; DE FINST, D. L.; RIPSON, C.A.
& MELENEY, H. E., 1947 - A technique for the perfu
sion of laboratory animals for the recovery of
schistosomos. *J. Parasitology* 33: 419-426.

WARREN, K. S., 1967 - A comparison of Puerto Rican,
Egyptian and Tanzanian strains of *S. mansoni* in
mice. Penetration of cercariae, maturation of
Schistosomos and Production of Liver Disease. *Trans
Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 61:795-802.