

ESTUDO DE ALGUNS ASPECTOS DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EM MACACOS *CEBUS* PELO MÉTODO DO OOGRAMA QUANTITATIVO

Naftale KATZ (1) e J. PELLEGRINO (2)

RESUMO

Empregando-se o método do oograma quantitativo em fragmentos retais obtidos através de curetagem de macacos *Cebus* experimentalmente infectados com o *Schistosoma mansoni*, foram estudados os seguintes aspectos: a correlação existente entre o número de ovos por grama de tecido retal e o número de fêmeas; o problema da reinfecção e a ação de drogas sobre a infecção esquistossomótica. A curva que exprime a relação entre o número de ovos e o número de fêmeas é do tipo hiperbólico. Com até 20 fêmeas existe uma correlação aproximadamente linear, mas, acima de 40 fêmeas, forma-se um platô, oscilando o número de ovos em torno de 10.000 por grama de tecido retal. Nos macacos infectados, expostos a uma segunda carga de cercárias, houve reinfecção, evidenciada pelo aumento estatisticamente significativo do número de ovos por grama de tecido retal (coeficiente de variação: 80 a 227%). O tratamento de animais infectados, feito com diferentes drogas e esquemas mostrou que as mesmas podem ser classificadas em ativas (ausência de ovos viáveis), parcialmente ativas (diminuição do número de ovos viáveis por grama) e inativas (sem alteração do número de ovos viáveis por grama).

INTRODUÇÃO

Em trabalho anterior, KATZ & col.⁵ demonstraram, através do método do oograma quantitativo (CANÇADO & col.², CUNHA & CARVALHO⁴), que em macacos *Cebus* experimentalmente infectados pelo *Schistosoma mansoni*, a variação diária do número de ovos viáveis por grama de tecido retal não é estatisticamente significativa. Neste trabalho foi sugerido que o método do oograma quantitativo, estimando o número de ovos por grama antes e depois do uso de esquistosomicidas, poderia indicar se uma droga é ativa, inativa ou parcialmente ativa.

No presente trabalho, empregando-se o método do oograma quantitativo, foram estudados vários aspectos da esquistossomose mansoni em macacos *Cebus*: correlação entre

o número de ovos de *S. mansoni* encontrados em fragmentos de tecido retal e o número de fêmeas, a reinfecção e a ação de drogas sobre a infecção esquistossomótica.

MATERIAL E MÉTODOS

Infecção dos animais — Macacos *Cebus apella macrocephalus* adultos foram infectados através da via oral (menos frequentemente) e transcutânea, com 120 a 200 cercárias. Estas cercárias (cepa LE) eram eliminadas por *Biomphalaria glabrata*, criadas e infectadas em laboratório¹⁴.

Oograma quantitativo — Foi utilizada uma cureta para a retirada de fragmentos

(1) Centro de Pesquisas "René Rachou"-INERU-FIOCRUZ, Belo Horizonte.

(2) Grupo Inter-departamental de Estudos sobre Esquistossomose, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Contribuição n.º 56 do Grupo Inter-departamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE). Trabalho realizado com auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas e do U.S. Army (Grant n.º DADA-17-73-G-9378). Endereço: INERU Caixa Postal 1743 — 30000 Belo Horizonte, Brasil.

retais. A pesagem deste material foi descrita em trabalhos anteriormente publicados^{5, 10}. Em resumo, o método consiste em se pesar uma lâmina e uma lamínula, numa balança de 0,1 mg de sensibilidade. Em seguida colocam-se os fragmentos retirados, em número de 4, entre lâmina e lamínula e comprime-se. Uma vez pesada a preparação, o cálculo do peso dos fragmentos de tecido é então feito. Examina-se microscopicamente a preparação, classificando-se todos os ovos encontrados^{9, 15}. Finalmente calcula-se o número de ovos por grama de tecido.

Tratamento dos animais — Foram utilizadas as seguintes drogas: hycanthone (via oral e intramuscular), quinidina (via oral) e dehidroemetina (via subcutânea).

Perfusão dos animais — Os macacos foram sacrificados 4 a 30 meses após a infecção,

sendo então feita a perfusão do fígado e vasos mesentéricos⁸.

Análise estatística — Foi determinado o coeficiente de variação (C.V.) do número de ovos por grama de tecido retal nos macacos estudados.

RESULTADOS

Correlação entre o número de ovos por grama de tecido retal e o número de fêmeas

Foram sacrificados 15 macacos *Cebus* com 4 a 30 meses de infecção (Tabela I). Alguns macacos (8, 9, 11, 13, 14 e 15) haviam sido reinfetados. Após duas curetagens retais, feitas em diferentes ocasiões, em cada uma das quais se retiraram 4 fragmentos, os animais foram sacrificados para colheita dos vermes por perfusão do sistema porta.

TABELA I

Número de esquistossomos, número de fêmeas e número de ovos viáveis por grama de tecido retal em macacos *Cebus* experimentalmente infectados.

Macacos	Tempo de infecção (meses)	Número total de vermes	Número de fêmeas	Número de ovos viáveis por grama de tecido retal (+)
1	30	4	1	33
2	4	11	4	70
3	17	13	6	2719
4	11	14	6	4984
5	11	37	12	2768
6	6	54	14	2210
7	8	29	14	2520
8(++)	4	76	22	8330
9(++)	4	131	42	11240
10	26	129	42	9823
11(++)	4	110	48	13466
12	6	97	56	16470
13(++)	6	170	69	9934
14(++)	5	273	85	10151
15(++)	23	275	139	19548

(+) Valor médio de 2 curetagens retais feitas em diferentes ocasiões.

(++) Reinfetados com 150-200 cercárias.

Os dados obtidos foram projetados em papel mono-log. A inspecção da curva (Fig. 1) mostra que a mesma é do tipo hiperbólico, havendo, com até 20 fêmeas, uma correlação

aproximadamente linear e que, acima de 40 fêmeas, forma-se um platô, oscilando então o número de ovos por grama de tecido retal na faixa de 10.000 por grama.

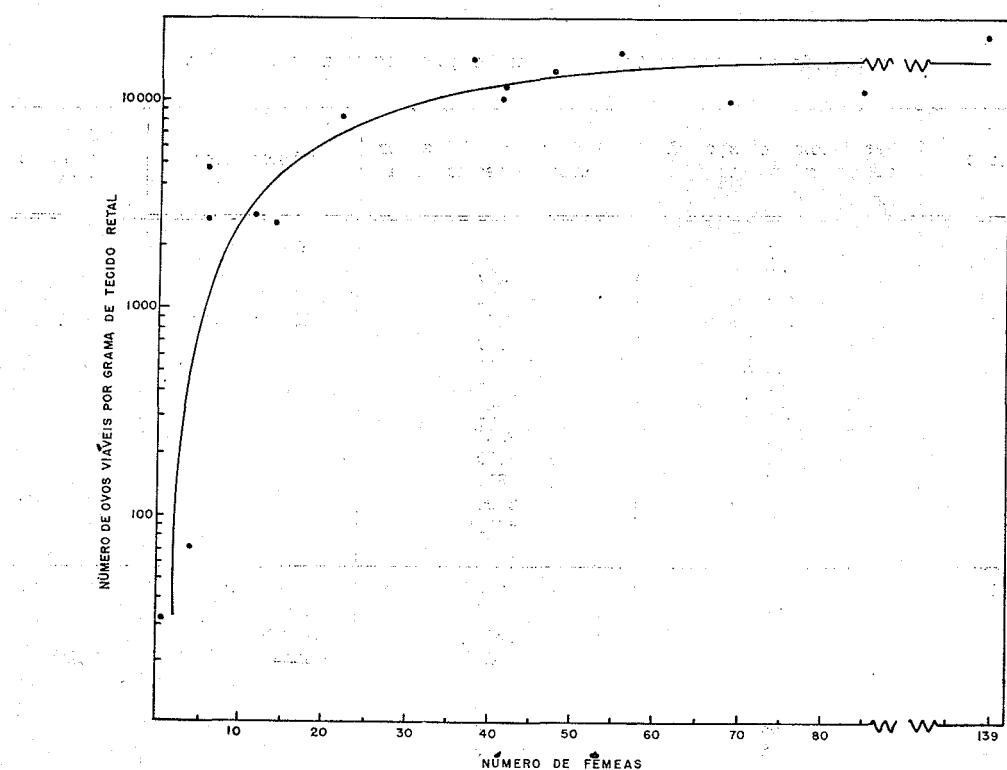


Fig. 1 — Correlação entre o número de fêmeas do *Schistosoma mansoni* e o número de ovos por grama de tecido retal em 15 macacos *Cebus* experimentalmente infectados.

Reinfecção

Seis macacos *Cebus*, com 2 a 4 meses de infecção (150 a 200 cercárias), foram reinfetados, por via transcutânea, com 120 a 180 cercárias. Os resultados estão resumidos na Tabela II. Em todos os casos houve aumento estatisticamente significativo do número de ovos por grama de tecido retal. Os coeficientes de variação oscilaram entre 80 e 227%. Na Tabela IV podem ser vistos os resultados obtidos no grupo controle. Os coeficientes de variação estiveram entre 14,5 e 64%.

Ação de drogas sobre a infecção esquistosomótica

Quatro macacos *Cebus*, experimentalmente infectados com o *S. mansoni*, foram tratados com hycanthone (2 animais), dehidroemetina e quinidina. Curetagens retais foram

praticadas antes e em diferentes períodos após o tratamento. O critério de atividade foi baseado no desaparecimento ou diminuição do número de ovos viáveis por grama de tecido retal. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela III. No macaco 1, tratado com hycanthone (3 mg/kg/dia x 5, i.m.), houve parada permanente da postura (C.V. = 643%). No animal 2, tratado com dehidroemetina (4 mg/kg/dia x 10, s.c.), houve apenas interrupção temporária da postura (C.V. = 108%). Diminuição persistente do número de ovos foi observada no macaco 3, tratado com hycanthone por via oral (C.V. = 119%). Finalmente, no macaco 4, a quinidina (200 mg/kg/dia x 5, oral) mostrou-se completamente inativa (C.V. = 40%). Em 10 macacos usados como controle (expostos a 150-200 cercárias), os coeficientes de variação estiveram entre 14,5 e 64% (Tabela IV).

T A B E L A II

Reinfecção de macacos *Cebus*: avaliação pelo oograma quantitativo

Macaco	Dias depois da exposição ou da reinfecção (R)	N.º de ovos viáveis por grama de tecido retal	Observações	Coeficiente de variação (%)
1	53 77 109 245 269 99 R 126 130 133 137 147 151 176	3821 330 2874 173 2090 5356 13595 4733 14222 3650 6372 5000 5255	1.ª exposição: 150 cercárias Reinfecção: 180 cercárias	80,0
2	55 79 110 230 237 241 266 128 R 146 187 190	674 670 3500 1526 331 184 494 9116 13039 12057 11500	1.ª exposição: 150 cercárias Reinfecção: 180 cercárias	111,0
3	42 110 125 137 116 R 254	942 314 0 0 5986 14326	1.ª exposição: 200 cercárias por via oral Reinfecção: 180 cercárias	227,0
4	240 253 267 39 R 121	3160 3313 1562 4107 12558	1.ª exposição: 150 cercárias Reinfecção: 120 cercárias	88,0
5	370 403 443 124 R	100 88 969 13424	1.ª exposição: 150 cercárias Reinfecção: 180 cercárias	179,0
6	22 R 31 44 56 59 62 89 108	203 380 865 5309 3613 6652 9826 11512	1.ª exposição: 150 cercárias Reinfecção: 150 cercárias	90,4

TABELA III

Avaliação da atividade antiesquistossomótica em macacos *Cebus* pelo oograma quantitativo

Macacos	Esquema de tratamento	Dias antes (-) ou após (+) o início do tratamento	N.º de ovos viáveis por grama do tecido retal	Observações
1	Hycanthone (sulfamato) 3 mg/kg/dia x 5, i.m.	- 71 - 2 + 9 + 16 + 23 + 30 + 58 + 118 + 135	2418 9029 348 60 0 0 0 0 0	Cura parasitológica. C.V. = 643%
2	Dehidroemetina 4 mg/kg/dia x 10, s.c.	- 170 - 162 - 28 + 11 + 19 + 27 + 33 + 40 + 65 + 116 + 120 + 132	5399 6438 2465 85 0 0 423 38 290 4065 3000 5474	Interrupção temporária da oviposição. C.V. = 108%
3	Hycanthone 1.ª dose: 2,5 mg/kg/dia x 5, oral 2.ª dose: 4,0 mg/kg/dia x 5, oral	- 10 - 7 + 7 + 10 + 22 + 38 + 49 + 59 + 105 + 129 + 146 + 160 + 182 + 210 + 267 + 410	8593 3866 2208 896 2921 3357 6526 1709 3104 647 316 233 550 140 442 429	Redução do número de ovos após o segundo tratamento iniciado no dia + 118. C.V. = 119%
4	Quinidina 200 mg/kg/dia x 5, oral	- 23 - 2 + 5 + 9 + 16 + 23 + 30 + 138	3976 10825 10261 16838 16127 8500 7669 13262	Tratamento ineficaz. C.V. = 40%

TABELA IV

Resultados de curetagens seriadas em macacos *Cebus* infectados com *S. mansoni* e não tratados

Macacos	Dias após a infecção	Número de ovos viáveis por grama de tecido retal	Coeficiente de variação (%)
1	110	5941	38,0
	114	12229	
	121	4257	
	125	5816	
	132	7229	
	231	7633	
2	128	9116	14,5
	146	13039	
	187	12057	
	190	11500	
3	243	6751	57,0
	254	12653	
	267	7651	
	273	1934	
4	242	3129	24,0
	254	2251	
	277	3686	
5	116	10854	25,0
	127	6725	
	143	10748	
	225	12893	
6	130	14750	51,0
	137	6889	
7	130	15598	60,0
	137	38781	
8	133	21612	37,0
	137	36970	
9	268	6126	64,0
	336	2561	
	392	1000	
	422	3642	
10	137	7253	19,0
	140	9591	

DISCUSSÃO

Em nossos laboratórios, o macaco *Cebus apella macrocephalus* — bom hospedeiro para o *S. mansoni*^{1,3} — tem sido usado

rotineiramente no estádio de ensaios pré-clínicos. Algumas vantagens para a utilização destes animais são: a) preço relativamente baixo; b) fácil manutenção e manuseio em condições normais de laboratório; c) alta

porcentagem de cercárias que evoluem até vermes adultos (30 a 50%); d) grande número de ovos de *S. mansoni* excretados com as fezes e encontrados também na mucosa retal; e) falta de tendência para a cura espontânea, pelo menos até 3 anos de observação e f) boa correlação da resposta terapêutica a drogas, quando comparada com aquela verificada no homem^{6, 7, 11, 12, 14}.

Utilizando-se o método do oograma quantitativo em fragmentos retais obtidos por curetagem em macacos *Cebus* foi possível obter-se novas informações sobre o comportamento da infecção esquistosomótica nestes animais. De fato, observou-se correlação aproximadamente linear entre o número de ovos por grama de tecido retal e o número de fêmeas quando estas não ultrapassavam 20. Quando os macacos albergavam de 40 a 190 fêmeas, o número de ovos esteve em torno de 10.000 por grama. Por outro lado foi demonstrado que, ao contrário do que acontece com o macaco *Rhesus*^{16, 18}, em macacos *Cebus* com baixa carga parasitária (evidenciada pelo número de ovos por grama de tecido retal), quando reinfetados, parte das cercárias chega a desenvolver-se até vermes adultos, fazendo com que o número de ovos por grama de tecido aumente bastante. A análise estatística dos dados representados pelo número de ovos por grama de tecido retal, antes e após a reinfecção, revelou coeficientes de variação de 80 a 227%.

Tratando-se macacos *Cebus* com diferentes drogas e esquemas terapêuticos é possível classificar estas drogas em ativas (quando desaparecem por completo os ovos viáveis), parcialmente ativas (quando o número de ovos por grama de tecido diminui significativamente, persistindo porém ovos viáveis) e inativas (quando não há alteração significativa no número de ovos viáveis). Deve-se ressaltar que em 14 macacos usados como controle (não tratados) os coeficientes de variação estiveram entre 14,5 e 64%.

Usando-se os critérios do oograma qualitativo e quantitativo vê-se, na Tabela III que, após a administração de uma droga, várias combinações podem ocorrer: a) com hycanthone (3 mg/kg/dia x 5, i.m.) houve parada total da postura, pois até 4,5 meses (período total da observação) não foi possível detectar ovos viáveis; b) com a dehidroeme-

tina (4 mg/kg/dia x 10, s.c.) houve apenas interrupção temporária da oviposição, tendo sido observado, após o 3º mês, aproximadamente o mesmo número de ovos por grama de tecido que o encontrado antes da administração da droga (efeito supressor temporário sobre a postura); c) com hycanthone na dose de 2,5 mg/kg/dia x 5, oral, não houve praticamente alteração no número de ovos. Já com 4,0 mg/kg/dia x 5, oral, apesar de terem sido encontrados ovos viáveis de *S. mansoni*, o número destes foi bem menor do que antes do tratamento (CV = 119%), mostrando que, com este esquema, o hycanthone funcionou como droga parcialmente ativa; e finalmente d) com a quinidina (200 mg/kg/dia x 5, oral) não houve alteração no número de ovos por grama (CV = 40%), indicando ter sido a droga inativa no esquema utilizado.

Como foi demonstrado, o método do oograma quantitativo, aplicado a fragmentos retais obtidos por curetagem em macacos *Cebus*, pode ser muito útil quando se pretende estudar aspectos da imunidade^{13, 17} ou da quimioterapia na esquistossomose.

SUMMARY

Studies on some aspects of schistosomiasis mansoni in Cebus monkeys by the quantitative oogram method

The following aspects of the infection of *Cebus* monkeys with *Schistosoma mansoni* have been studied: correlation between the number of schistosome eggs per gram of rectal tissue and the number of female worms, the reinfection, and the action of drugs.

The curve expressing the relationship between the number of eggs in rectal snips and the number of females is hyperbolic (monolog paper). There is a correlation approximately linear up to 20 female worms. From 40 females up the number of eggs per gram of rectal tissue is around 10,000 per gram.

In monkeys receiving a challenge infection the number of eggs per gram of tissue increased and the coefficient of variation was very high (80 to 227%), indicating that reinfection occurred.

Treatment with different schedules and classes of drugs demonstrated that, as far as *S. mansoni* infection is concerned, compounds can be classified as active, inactive and partially active. For this classification, the following criteria were used: quantitative oogram (progressive disappearance of immature eggs); steady decrease in the number of eggs, and coefficient of variation. The quantitative oogram method is very useful for studies on immunological and chemotherapeutic aspects of schistosomiasis in *Cebus* monkeys.

AGRADECIMENTO

Os Autores agradecem a ANTONIO EMÍDIO FERREIRA pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRENER, Z. & ALVARENGA, R.J. — Susceptibilidade do *Cebus apella macrocephalus* Spix, 1823 a infecções experimentais pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:180-186, 1962.
2. CANÇADO, J.R.; CUNHA, A.S.; CARVALHO, D.G. & CAMBRAIA, J.N. — Evaluation of the treatment of human *Schistosoma mansoni* infections by the quantitative oogram technique. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 33: 557-566, 1965.
3. COELHO, B. & MAGALHÃES FILHO, A. — Resultados patológicos da infecção experimental de *Schistosoma mansoni* em macacos *Cebus* sp. *Publ. Avul. Inst. Aggeu Magalhães* 2:61-97, 1953.
4. CUNHA, A.S. & CARVALHO, D.G. — Estudo do método do oograma quantitativo na esquistossomose mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:113-121, 1966.
5. KATZ, N.; PELLEGRINO, J. & MEMÓRIA, J.M.P. — Quantitative oogram method in *Cebus* monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.* 52:917-919, 1966.
6. KATZ, N.; PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C.A. & CUNHA, A.S. — Experimental chemotherapy of schistosomiasis. II — Laboratory and clinical trials with A-16612, a piperazine derivative. *J. Parasit.* 53:1229-1232, 1967.
7. KATZ, N. — *II Simpósio sobre Esquistossomose*. Em: PRATA, A. & ABOIM, E. — Ed. Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, pp. 184-192 e 251-252, 1970.
8. PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A.F. — Técnica de perfusão para a colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev. Brasil. Malar. Doenças Trop.* 8:589-597, 1956.
9. PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C.A.; FARIA, J. & CUNHA, A.S. — New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 11:201-215, 1962.
10. PELLEGRINO, J.; KATZ, N.; OLIVEIRA, C.A. & OKABE, K. — Rectal biopsy and mucosal curettage in *Cebus* monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *J. Parasit.* 51:617-621, 1965.
11. PELLEGRINO, J.; KATZ, N. & RAICK, A. — Therapeutical activity of Ciba 32,644-Ba, a new nitro-thiazole derivative, on mice, hamsters and *Cebus* monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *Folha Med.* 52:333-342, 1966.
12. PELLEGRINO, J.; KATZ, N. & SCHERRER, J.F. — Oogram studies with Hycanthone R, a new antischistosomal agent. *J. Parasit.* 53:55-59, 1967.
13. PELLEGRINO, J. & KATZ, N. — Cercarial slide flocculation and circumoval precipitin tests on *Cebus* monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.* 53:216-217, 1967.
14. PELLEGRINO, J. & KATZ, N. — Experimental Chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. In *Advances in Parasitology*, 6:233-290. Ed. BEN DAVES. New York, Academic Press, 1968.
15. PRATA, A. — *Biópsia retal na esquistossomose mansoni. Bases e aplicação no diagnóstico e tratamento*. Tese. Rio de Janeiro, Serviço Nacional de Educação Sanitária, 197 pp., 1957.
16. SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. — Naturally acquired resistance to experimental infections of *Schistosoma mansoni* in the *Rhesus* monkey (*Macaca mulatta*). *Parasitology* 55:701-710, 1965.
17. VOGEL, H. — Acquired resistance to *Schistosoma* infection in experimental animals. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 18:1097-1103, 1958.
18. VOGEL, H. — Beobachtungen über die erworbene Immunität von *Rhesus*-affen gegen *Schistosoma* Infektionen. *Z. Tropenmed. Parasit.* 13:397-404, 1962.