

OBSERVAÇÕES SÔBRE A INFECÇÃO DO CAMUNDONGO PELO *SCHISTOSOMA MANSONI*

Z. BRENER

(Instituto Nacional de Endemias Rurais, Centro de Pesquisas de Belo Horizonte)

Em trabalhos de esquistossomose *mansoni* experimental vários animais de laboratório têm sido empregados, apresentando a infecção, de um modo geral, aspectos particulares em cada um deles. A evolução da helmintose depende, como assinalam STIREWALT, KUNTZ e EVANS (1), do equilíbrio estabelecido entre o hospedeiro e o parasita, variando, em função desse equilíbrio, o tamanho dos vermes, a ausência de ovos nas fezes, a migração dos vermes para as veias mesentéricas, a reação tissular e o índice de letalidade dos animais. Para aqueles autores, o "hamster", o camundongo e o "cottonrat" constituem os hospedeiros mais indicados para a manutenção da infecção em laboratório. Desses animais, o camundongo, pelo seu fácil manejo, pela facilidade com que é inoculado e mantido e pelo curso da infecção que apresenta, parece ser o mais apropriado para as pesquisas experimentais. Assim é que ele tem sido empregado, com freqüência, no estudo de certos aspectos histopatológicos do fígado, na descrição de aspectos do ciclo evolutivo do *S. mansoni*, em provas de terapêutica experimental e, finalmente, como fonte de material para estudos imunológicos. A sua importância é ainda acrescida pelo fato de que, conforme mostraram MOORE & MELENEY (2), as cepas humanas se adaptam facilmente ao camundongo tornando desnecessária a adaptação gradual.

O papel do camundongo como hospedeiro experimental do *S. mansoni* foi estudado por MOORE, YOLLES e MELENEY (3) e por STIREWALT, KUNTZ e EVANS (1) e KUNTZ (4) tendo sido comparado com vários outros animais. As primeiras fases do ciclo evolutivo dos vermes, sobretudo as referentes à passagem pelos pulmões, foram detalhadamente descritas por OLIVIER (5). As lesões hepáticas — antes e após a postura — foram estudadas por MELENEY e cols. (6), MELENEY e cols. (7) e também por MOORE, YOLLES e MELENEY (3). Ensaios de terapêutica experimental foram relatados por um grande número de autores destacando-se, pela sua importância, os trabalhos de LUTTERMOSER (8), SCHUBERT (9), STANDEN (10). Estudos detalhados sobre a distribuição dos vermes na árvore portal foram levados a efeito por STANDEN (11). Aspectos de imunidade e resistência dos camundongos diante de infecções pelo *S. mansoni* foram estudados por OLIVIER e SCHNEIDERMANN (12), STIREWALT (13) e THOMPSON (14). Observações relacionadas à adaptação de cepas humanas a esses animais foram descritas

por MOORE e MELENEY (2) e por THOMPSON (14). Finalmente, aspectos relacionados à biologia dos vermes, nesse animal de laboratório, foram relatados, entre outros, por PARAENSE (15), PARAENSE e SANTOS (16) e RADKE (17).

No presente trabalho são apresentados alguns dados referentes ao comportamento da infecção experimental pelo *S. mansoni* no camundongo, principalmente no que se refere à distribuição de ovos e granulomas, dados de interesse nas experiências de terapêutica e na obtenção de material para estudos imunológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os camundongos foram inoculados com 200 cercárias cada um, usando-se a via transcutânea. A partir do 18.^o dia foram sacrificados, diariamente ou em dias alternados, um ou mais animais. Feita a exposição das vísceras, anotava-se o aspecto do fígado e do baço, procedendo-se, em seguida, às ligaduras da veia cava inferior (porção supra-diafragmática) e veia porta logo na sua origem, retirando-se o fígado juntamente com a veia porta. O fígado era pesado, retirando-se os vermes da veia porta e, em seguida, das veias mesentéricas. Fragmentos de fígado, baço, reto e delgado eram fixados em formol a 10%; fragmentos desses mesmos órgãos eram examinados por esmagamento entre lâmina e lamínula, anotando-se a relação entre o número de ovos livres e granulomas assim como o estado dos ovos. Em algumas ocasiões procedia-se à contagem de ovos ao longo do intestino, examinando-se, por esmagamento, fragmentos de 1 cm de comprimento retirados de 3/3 cm. Foram feitas, também, algumas vezes, preparações de várias vísceras para pesquisa de ovos e granulomas. Os vermes foram corados pelo carmim clorídrico e, quando necessário, examinados a fresco entre lâmina e lamínula. Fragmentos de tecido foram corados pela hematoxilina-eosina e, mais raramente, pelo Mallory. Dos animais sacrificados, as fezes do reto eram retiradas para exame após concentração.

RESULTADOS

Vermes — Foram assinaladas, desde os primeiros dias de observação, nítidas diferenças de tamanho entre os esquistossômulos encontrados, denotando um amadurecimento assincrônico dos vermes. Essas diferenças morfológicas acentuadas persistiram pelo menos até o 35.^o dia, quando passaram a ser menos pronunciadas. Esses aspectos já haviam sido assinalados por FAUST, JONES e HOFFMAN (18), que fazem referência ao encontro, em um mesmo animal, de vermes maduros e jovens. Pequenas massas testiculares, dificilmente visualizadas, foram encontradas, em apenas alguns vermes, aos 28 dias, sendo que testículos normais passaram a ser encontrados, em todos os machos, do 34.^o dia em diante. Aos 29 dias foram encontrados vermes acasalados, porém, o exame a fresco, entre lâmina e lamínula, das fêmeas, não revelou ovos no útero, que apareceram, em praticamente todas as fêmeas, a partir do 37.^o dia. Anomalias sexuais dos machos, já assinaladas por alguns autores, só foram encontradas após a 7.^a semana e estavam representadas por vermes hermafroditas. O número de vermes com tais alterações foi pequeno, representando 6,1% do total recolhido. As estruturas sexuais femininas presentes, em geral de tamanho pequeno e isoladas,

não provocaram alterações dos testículos, que se apresentaram normais quanto à forma e número. Em apenas um macho hermafrodita os testículos estavam constituídos por cerca de 15 pequenas massas isoladas.

Início da postura — O início da postura se deu, na série estudada, em torno do 34.º dia, quando foi encontrado, em preparações do fígado, obtidas por esmagamento, um único óvo imaturo com pequeno embrião e abundante vitelo. Aos 36 dias foi assinalada a presença do primeiro óvo com miracídio formado e vivo. Nesse mesmo dia foram encontrados no intestino ovos imaturos com embrião desenvolvido.

GRANULOMAS E OVOS LIVRES MADUROS NO FIGADO DE CAMUNDONGOS
EXPERIMENTALMENTE INOCULADOS COM *S. mansoni*

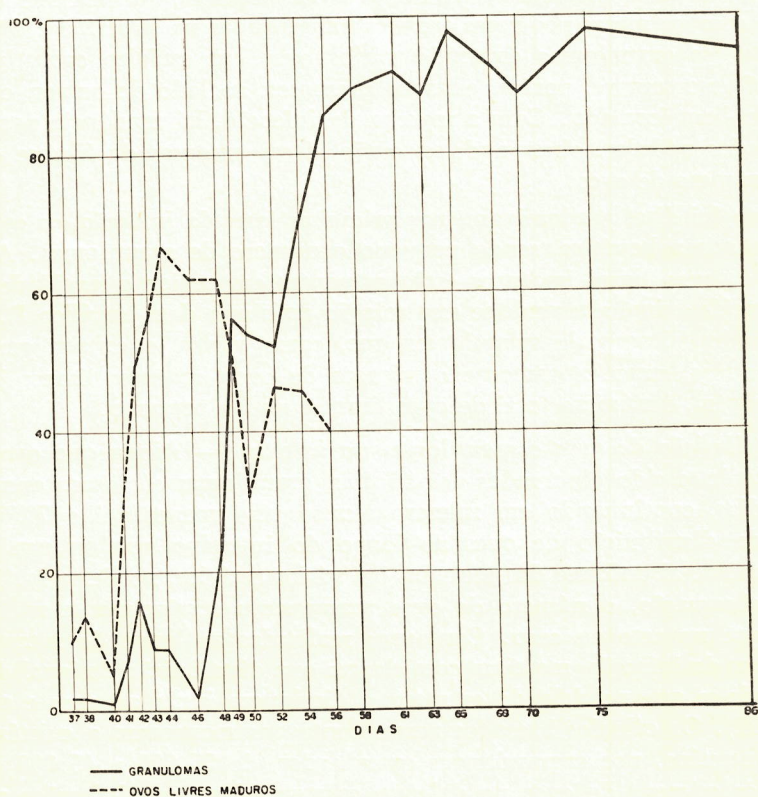


Gráfico 1

Distribuição de ovos e granulomas no fígado — A partir da data do aparecimento dos primeiros granulomas, que se dá em torno dos 40 dias, o número de ovos envolvidos por granulomas aumenta gradativamente com conseqüente diminuição dos ovos livres. A partir dos 50 dias o número de granulomas se manteve sempre muito alto, reduzindo-se enormemente o número de ovos livres (gráfico I). Quase todos os granulomas são bem formados, apresentando miracídio vivo. Mesmo os granulomas de aspecto celular, portanto recentes, envol-

vem ovos maduros viáveis, sendo muito mais raro o encontro dessa reação de defesa em torno de ovos imaturos. De 3.180 granulomas examinados, até o 85.^o dia, 2.565, ou seja, 80,6%, apresentavam ovos com miracídio formado, encerrando os demais ovos mortos, cascas, etc.

Após os 50 dias cresce o número de ovos mortos e, aos 120 dias, são muito freqüentes os granulomas contendo casca, encontrando-se, também, formações granulomatosas sem ovos ou restos ovulares. À medida que a infecção evolui, passam os granulomas a serem envolvidos por quantidade muito abundante de pigmento, que se dispõe em toda a periferia daquelas formações. Essa disposição peculiar aparentemente depende do crescimento expansivo do granuloma que rechassa para a sua periferia o pigmento. O aspecto macroscópico está em função desses dois elementos, pigmento e granulomas, tornando-se o fígado escuro e com inúmeras pequenas áreas esbranquiçadas na superfície. São muito freqüentes os granulomas contendo vários ovos em estágios evolutivos diferentes. Quase sempre, porém, estavam presentes, ao lado de outros, ovos com miracídio bem formado. Com a marcha da infecção, há tendência para a confluência dos nódulos, observando-se, então, áreas extensas de fibrose com um grande número de ovos.

Como foi dito, predominam, nas primeiras fases da infecção, os ovos livres no parênquima hepático, sendo pequeno o número de granulomas. Até a 6.^a semana os ovos livres imaturos estão presentes em maior quantidade que os com miracídio vivo, alterando-se essa relação após essa data (gráfico I). Com o aumento do número de granulomas que, como vimos, encerram geralmente ovos maduros, cresce novamente o número de ovos imaturos livres; já a essa altura, porém, o número total de ovos livres é muito pequeno.

Distribuição de ovos e granulomas no intestino — Ainda que ovos no intestino tenham sido observados aos 36 dias, granulomas só foram encontrados aos 52 dias, continuando em número escasso pelo menos até o 70.^o dia. O estudo da distribuição de ovos ao longo do intestino revelou um número extremamente abundante dos mesmos, em vários estágios, no delgado. Durante toda a observação, o número de ovos permaneceu sensivelmente maior nessa porção que no reto ou ceco. Contagens realizadas ao longo do intestino, em várias fases da infecção, mostram com clareza essa distribuição desigual dos ovos, observando-se que no delgado os mesmos diminuem junto ao ceco e estômago (gráfico II). Os cálculos baseados nessas contagens mostraram a existência, em todo o intestino, nos camundongos examinados, de 25.000 a 45.000 ovos. A esse maior número de ovos no delgado correspondem, nas infecções mais antigas, alterações patológicas mais graves com a presença de grande número de granulomas, espessamente fibrosos e formação de estruturas nodulares, alterações que não foram encontradas ao nível do reto (figura 1). Quanto ao estágio dos ovos, observa-se que até o 60.^o dia predominam os ovos imaturos, porém, já entre o 60.^o e o 85.^o dia o número de ovos imaturos e maduros vivos é aproximadamente igual. Os ovos mortos e as cascas surgem igualmente em maior abundância após os 60 dias. É nossa impressão que os ovos enegrecidos surgidos nessa ocasião não dependem, como afirmam alguns, de deposição de

sais calcáreos, pois, em preparações feitas por esmagamento entre lâmina e lamínula e deixadas à temperatura ambiente, podem ser vistos, após alguns dias, inúmeros ovos enegrecidos. Os granulomas do intestino, a exemplo do fígado, encerravam, em sua grande maioria, ovos com miracídio formado. Assinale-se, finalmente, a muito discreta distribuição de pigmento ao nível do intestino.

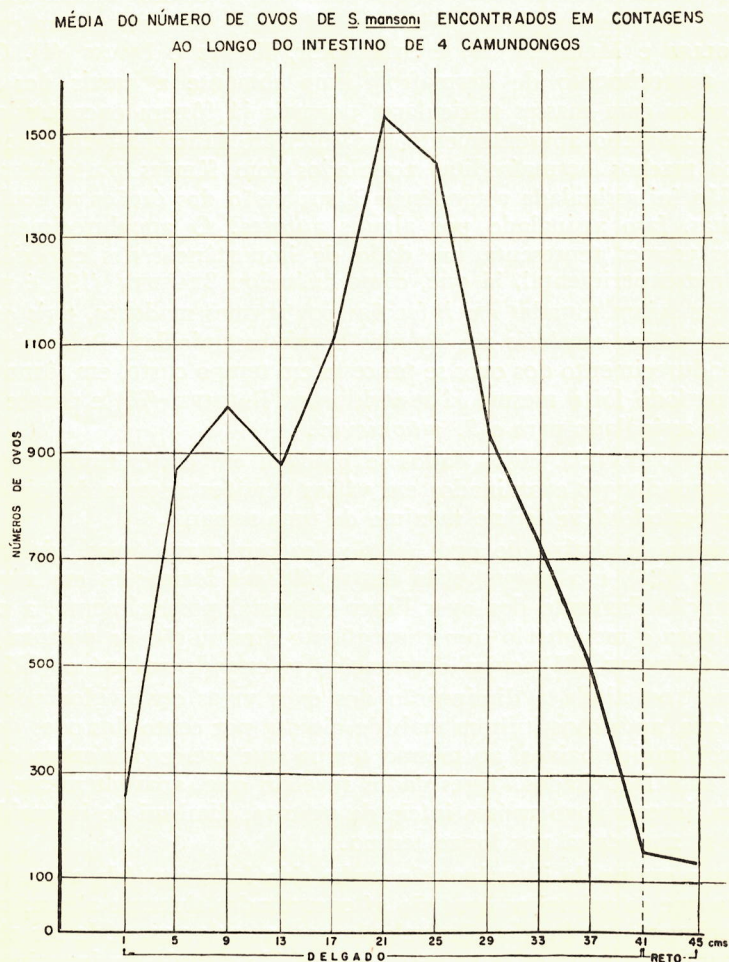


Gráfico 2

No baço os ovos são raros, só sendo encontrados, com irregularidade, neste órgão, após os 40 dias. Os granulomas foram assinalados em todos os animais sacrificados após os 56 dias, porém, sempre em número discreto.

Em algumas ocasiões foram examinados fragmentos de vários órgãos (estômago, esôfago, pulmões, coração, bexiga, medula, cérebro), sendo encontrados raros ovos apenas nos pulmões e na parede do estômago. O exame de fezes foi positivo aos 43 dias, tendo assim continuado, embora a eliminação de ovos tenha sido relativamente pequena.

DISCUSSÃO

As observações realizadas comprovam a utilidade do camundongo para as experiências de laboratório em relação ao *S. mansoni*. Apesar do pequeno porte do animal, os vermes atingem a maturidade em uma percentagem relativamente alta, apresentando desenvolvimento somático normal. Sem o uso dos métodos de perfusão foram recuperados, em várias ocasiões, vermes totalizando cerca de 20% do número de cercárias usadas, dados que concordam com os de MOORE, YOLLES e MELENEY (3) e STIREWALT, KUNTZ e EVANS (1). Chama a atenção o aparecimento de hermafroditismo somente a partir dos 50 dias, embora machos com massas testiculares normais já fossem encontrados muito antes. Esse fenômeno aparentemente não interfere funcionalmente, tendo sido encontrados machos hermafroditas acasalados com fêmeas portadoras de ovo uterino. Não foi assinalada a tendência à supressão dos órgãos masculinos nos hermafroditas, fato assinalado por alguns autores. O amadurecimento assíncrono dos vermes representa um dado de importância nas experiências de quimioterapia experimental, já que, como assinalou STANDEN (19), é necessário que as drogas sejam testadas em infecções por vermes maduros, pois os vermes imaturos são pouco sensíveis aos agentes esquistossomicidas. Pelas observações feitas, o amadurecimento dos ovos se processa em tempo curto, em torno de 3 a 4 dias. Esse período foi o mesmo já sugerido por BRUMPT (20) e parece ser bem menor que o assinalado para o *S. japonicum*.

Para GÖNNERT (21), cujos dados se baseiam em cortes histológicos de fígados de camundongos examinados em várias ocasiões antes e depois do tratamento, esse período deve ser no máximo de uma semana.

O aumento gradativo de ovos envolvidos por granulomas, visto também por GÖNNERT (21), e a manutenção dessas últimas formações em níveis altos com diminuição flagrante dos ovos livres expressa, possivelmente, a migração dos vermes para o mesentério com conseqüente diminuição da postura ao nível do fígado. GÖNNERT (21), cujas observações se estenderam até os 395 dias de infecção, mostrou ainda a diminuição dos ovos vivos envolvidos por pseudotubérculos que, após constituírem mais de oitenta por cento dos ovos do fígado, caem a níveis muito baixos, ao mesmo tempo que cresce o número de granulomas com ovos fagocitados. Esses dados revelam que, aparentemente, a agressão hepática, intensa logo após o início da postura, diminui de intensidade embora ainda se mantenha por longo tempo.

Embora o exame do intestino não tenha sido feito em toda a sua extensão, parece certo que os primeiros ovos são aí encontrados somente alguns dias após o seu aparecimento no fígado. Em relação aos granulomas, pôde ser observado que a formação dos mesmos se processa com nítido retardo no intestino, só surgindo em número abundante quando já era notória a fibrose hepática. Não nos pareceu clara a particularidade anatômica ou biológica responsável pelo número nitidamente superior de ovos no delgado. Chama a atenção também a relativamente escassa eliminação de ovos no camundongo, que se explica, ao que parece, pela retenção de um grande número deles ao nível da serosa, da camada muscular do intestino e da sub-mucosa (figura 1). A acumulação de ovos em grande número nesta parte do delgado e o aparecimento da reação tissular explicam o aspecto desse segmento do tubo digestivo que, nas infecções mais antigas, se apresenta espessado e com formações nodulares na sua superfície.

Esses dois fatos descritos, isto é, praticamente a ausência de reação tissular até quase os 70 dias e o acúmulo de ovos tornam o intestino o órgão de escolha para a obtenção de material para estudos imunológicos — ovos e miracídios — sobretudo entre os 60 e os 75 dias, quando aumentam os ovos maduros. Assinale-se que já a essa altura o fígado não se presta para essa finalidade em virtude do grande número de granulomas que dificulta a obtenção daquele material.

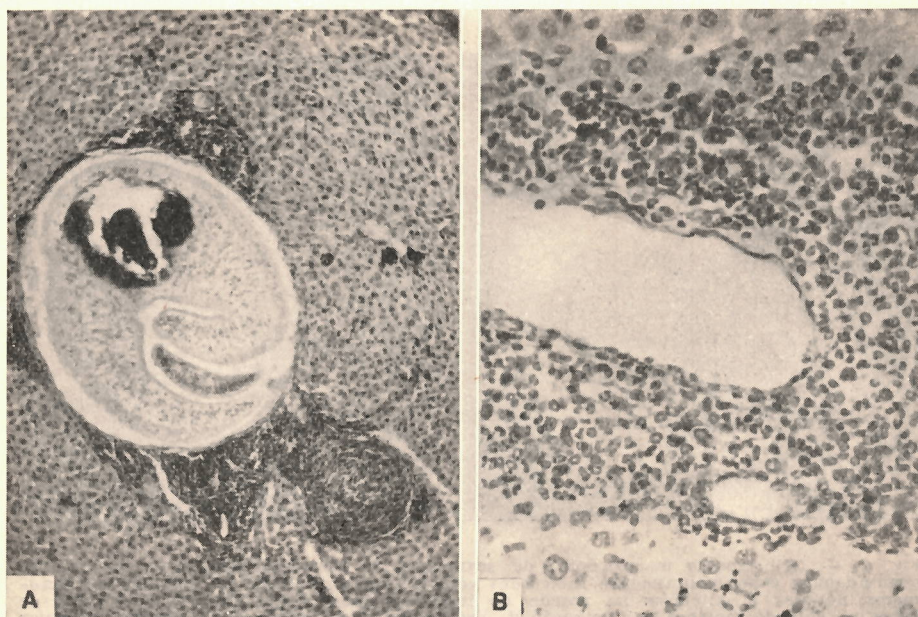


Fig. 1 — (A) Infiltrado em torno de vaso portal contendo verme adulto. (B) Intensa infiltração peri-portal em torno de vaso no qual não se observa a presença de verme.

A escassez de pigmento ao nível do intestino, contrastando com sua abundância ao nível do fígado, pode ser explicada pela direção do fluxo portal, que se dirige para esse último órgão, arrastando o pigmento depositado ao nível das mesentéricas e, pela presença, no fígado, de um maior número de elementos fagocitários.

O encontro de ovos e granulomas no baço, embora constante após determinado período da infecção, nunca foi significativo, mostrando a pouca importância da agressão direta a esse órgão.

Em relação ao aspecto dos ovos envolvidos por granulomas, os nossos dados parecem concordar com os de KOPPISCH (22) no sentido de que o embrião é essencial no desenvolvimento dessa estrutura fibrosa, já que a grande maioria dos mesmos encerra ovos com embrião formado. Aliás, já MELENEY e cols. (7) chamavam a atenção para o fato de que cascas vasias provocam pequena ou nenhuma reação celular. Ainda no que se relaciona a esses aspectos, deve ser salientado o valor do exame das preparações por esmagamento que permitem o exame mais detalhado do ovo e do miracídio, pois, como assinalam MELENEY e cols. (7), é impossível a determinação da viabilidade do miracídio em cortes

histológicos, já que a sua estrutura se conserva intacta mesmo em lesões fibróticas antigas.

O quadro histopatológico não difere essencialmente daquele descrito por MELENEY e cols. (7). No fígado, antes da postura, são observados, já mesmo aos 21 dias, infiltrados peri-portais constituídos por linfócitos polimorfonucleares e eosinófilos. Esses infiltrados não parecem ser mais abundantes em vasos que contêm vermes (figura 2). São encontradas também células parenquimatosas de

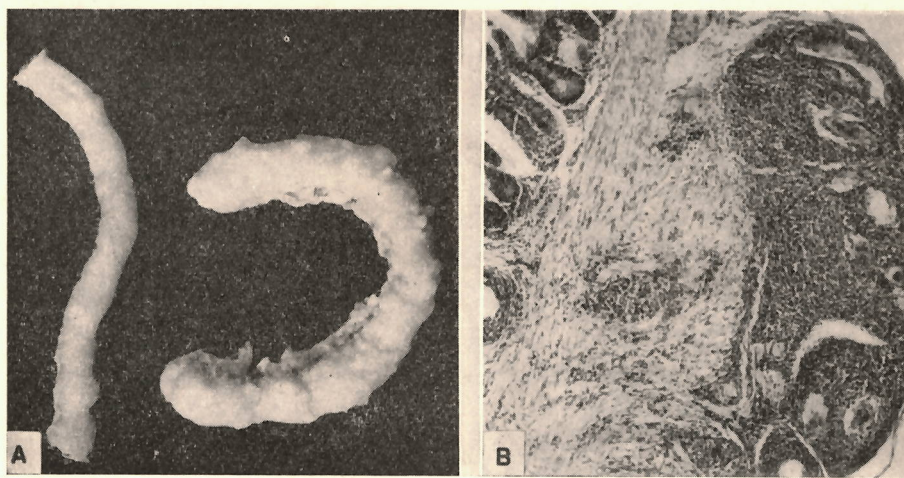


Fig. 2 — (A) Aspecto macroscópico de segmentos do intestino delgado e do reto de camundongos experimentalmente infectados com *S. mansoni*. Notar a presença de inúmeros nódulos e saliências na parede do intestino delgado (à direita). (B) Corte de intestino delgado mostrando a retenção de ovos ao nível da serosa e da camada muscular com formação de verdadeira nodulosidade.

citoplasma intensamente granuloso, que se distribuem focalmente e, às vezes, em tórno de vasos com vermes. O pigmento está presente em forma de pequenos grânulos isolados. Há discreta congestão passiva de distribuição focal. Após o início da postura, passa o quadro histológico a ser dominado pela presença dos ovos e pela reação tissular que os envolve. Os granulomas são constituídos inicialmente por linfócitos, polimorfonucleares e eosinófilos, com raras células epitelióides que, posteriormente, aumentam muito em número situando-se em tórno do ovo. Os fibroblastos, que surgem mais tarde, se situam, em geral, para fora da camada de células epitelióides, mas mostram tendência para penetrarem entre essas últimas células. Permanece, em muitos granulomas, na periferia, o infiltrado inflamatório. São encontradas, embora com irregularidade, células gigantes. Nas infecções mais antigas, o número de granulomas é extremamente abundante e provoca nítida redução do parênquima hepático. Nessas infecções, a infiltração peri-portal se acentua, formando, em muitos vasos, verdadeiro manguito constituído por células plasmáticas, polimorfonucleares e eosinófilos.

No intestino delgado chama a atenção a tendência à retenção de ovos na serosa e na túnica muscular, que se apresenta freqüentemente com suas fibras

dissociadas e com extensa neo-formação conjuntiva. Também ao nível da sub-mucosa são encontrados muitos ovos provocando reação celular e aparentemente retidos. São encontrados ovos nas formações glandulares intestinais com pouca reação tissular. Esse quadro histológico intestinal, incluindo a abundância de ovos no delgado e a sua raridade no reto, se assemelha, em muitos aspectos àquele descrito por COELHO (23) na infecção natural em *Rattus rattus frugivorus*.

SUMÁRIO

Foram estudados alguns aspectos da infecção experimental do camundongo pelo *S. mansoni*, sobretudo no que se refere à distribuição de ovos e granulomas. As observações foram realizadas em preparações obtidas por esmagamento entre lâmina e lamínula e, em menor grau, por cortes histológicos, sacrificando-se camundongos diariamente ou em dias alternados. Pelos dados obtidos a postura teve início aos 34 dias de infecção, surgindo os primeiros granulomas de aspecto celular aos 40 dias. O desenvolvimento embrionário do miracídio nos tecidos durou ao todo 4 dias, sendo, portanto, muito curto. O estudo, no fígado, da relação ovos livres/granulomas revelou que essas últimas formações aumentam gradativamente de número, passando a predominar de modo absoluto a partir do 60.º dia. A grande maioria dos granulomas envolvia ovos maduros com miracídio vivo. No intestino os ovos se localizam, na sua grande maioria, na parte média do delgado, sendo muito menos abundante a localização no reto. Contagens feitas ao longo do intestino revelaram a existência, nessa parte do tubo digestivo, de 25.000 a 40.000 ovos. O aparecimento de granulomas intestinais é tardio, só aparecendo em grande número após os 70 dias. A retenção de ovos é grande ao nível da serosa, da camada muscular e da sub-mucosa do intestino.

SUMMARY

Some aspects of schistosomiasis — specially those regarding the distribution of eggs and granulomas in the tissues — have been studied on mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. Researches have been carried out on tissue fragments crushed between slides and cover-glasses or, occasionally, on histological sections. For such purposes mice have been killed every other day and, when necessary, daily. Data thus available have shown that the laying of eggs has begun at 34 days' infection and, also, that the first cellular granulomas may be observed at 40 days. The embryonary development of miracidia is completed in the short period of four days.

As to the relationship between free eggs and those surrounded by cellular and fibrous tissue (granulomas), studies performed on the liver have shown that the latter increase gradually in number and become highly predominant from the 60th day on. Most granulomas were found to be surrounding mature living eggs. In the intestines, the great majority of eggs are lodged in the

median part of the small intestine; a smaller number is deposited in the rectum. Counts performed along the intestines have demonstrated the existence of 25,000 to 40,000 eggs in that part of the digestive tract. Intestinal granulomas are observed at later stages of the disease. In fact, a large number of them may be found only after 70 days' infection. It has been recorded a great retention of eggs in the following parts of the intestinal wall: serosa, muscular layer and submucosa.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Dr. ROBERTO JUNQUEIRA ALVARENGA o auxílio que nos prestou durante a realização desse trabalho, sobretudo no que toca à sua documentação.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — STIREWALT, M. A., KUNTZ, R. E. & EVANS, A. S. — 1951. The relative susceptibilities of the commonly used laboratory mammals to infection by *Schistosoma mansoni*. Am. J. Trop. Med., 31 (7): 57.
- 2 — MOORE, D. V. & MELENEY, H. E. — 1952. Adaptability of *Schistosoma mansoni* of Human Origin to Mice and Hamsters. Exper. Parasitol., 1 (2): 157.
- 3 — MOORE, D. V., YOLLES, T. K. & MELENEY, H. — 1949. A comparison of common laboratory animals as experimental hosts for *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol., 35: 156.
- 4 — KUNTZ, R. E. — 1953. Susceptibility of laboratory animals to infection by the egyptian strain of *Schistosoma mansoni* with emphasis on the albino mouse. Comptes Rendus V Cong. Intern. Med. Trop. et Palud., 2: 374.
- 5 — OLIVIER, O. — 1952. A comparison of infections in mice with three species of schistosomes, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma douthitti*. Am. J. Hyg., 55 (1): 22.
- 6 — MELENEY, H. E. & cols. — 1952. The histopathology of experimental schistosomiasis. I — The hepatic lesions in mice infected with *S. mansoni*, *S. japonicum*, and *S. haematobium*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1 (2): 263.
- 7 — MELENEY, H. E. & cols. — 1953. The histopathology of experimental schistosomiasis. II — Bisexual infections with *S. mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2 (5): 883.
- 8 — LUTERMOSER, G. W. — 1954. Studies on the Chemotherapy of Experimental Schistosomiasis. I — A Method of Detectif Schistosomacidal Activity Based on Response of *Schistosoma mansoni* Infections in Mice to Fuadin therapy. J. Parasitol., 40 (2): 130.
- 9 — SCHUBERT, M. — 1948. Conditions for drug testing in experimental schistosomiasis mansoni in mice. Am. J. Trop. Med., 28 (1): 121.
- 10 — STANDEN, O. D. — 1953. Experimental Schistosomiasis. III — Chemotherapy and mode of drug action. Ann. Trop. Med. Parasitol., 47 (1): 26.
- 11 — STANDEN, O. D. — 1953. The relationship of sex in *Schistosoma mansoni* to migration within the hepatic portal system of experimental infected mice. Ann. Trop. Med. Parasitol., 47 (2): 139.
- 12 — OLIVIER, L. & SCHNEIDERMAN, M. A. — 1953. Acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection in laboratory animals. Am. J. Trop. Med., 2: 298.
- 13 — STIREWALT, M. A. — 1953. Influence of previous infection of mice with *Schistosoma mansoni* on a challenging infection with the homologous parasite. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2 (5): 867.
- 14 — THOMPSON, J. H. — 1954. Host parasite relationships of *Schistosoma mansoni*. Exper. Parasitol., 3 (2): 140.

- 15 — PARAENSE, W. L. — 1949. Observações adicionais sobre o sexo do *Schistosoma mansoni* nas infestações por cercárias de um único molusco. Mem. Inst. Osw. Cruz, 47 (3-4): 535.
- 16 — PARAENSE, W. L. & SANTOS, J. M. — 1949. O sexo do *Schistosoma mansoni* nas infestações produzidas por cercárias de um único molusco. Mem. Inst. Osw. Cruz, 47 (1-2): 35.
- 17 — RADKE, M. G. & cols. — 1955. Growth and development of *Schistosoma mansoni* in mice. J. Parasitol., 41 (2): 22.
- 18 — FAUST, E. C., JONES, C. A. & HOFFMAN, W. A. — 1934. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. III — Biological studies. 2. The mammalian phase of the life cycle. Puerto Rico J. Publ. Health Trop. Med., 10 (2): 133.
- 19 — STANDEN, O. D. — 1955. The treatment of experimental schistosomiasis in mice: sexual maturity and drug response. Ann. Trop. Med. Parasitol., 49 (2): 183.
- 20 — BRUMPT, E. — 1930. La ponte des schistosomes. Ann. Parasitol., 8: 263.
- 21 — GÖNNERT, R. — 1955. Schistosomiasis — Studien. II — Über die Eibildung bei *Schistosoma mansoni* und das schicksal der Eier im Wirtsorganismus. Ztschr. f. Tropenmed. u. Parasit., 6 (1): 33-52.
- 22 — KOPPISCH, E. — 1937. Studies on Schistosomiasis Mansoni in Puerto Rico: The Pathological Anatomy of Experimental Schistosomiasis Mansoni in the Rabbitt and Albino Rat. Puerto Rico J. Publ. Health Trop. Med., 13 (1): 1-54.
- 23 — COELHO, B. — 1954. Histopatologia da esquistossomose mansônica natural em *Rattus rattus frugivorus*. Publ. avulsas Inst. Aggeu Magalhães, 3: 5.

