

Este exemplar corresponde a redação final da Tese  
defendida pela candidata Soely Maria Pissini Machado Reis  
e aprovada pela Comissão Suplen.

L. P. M. J. C.  
12/12/90



SOELY MARIA PISSINI MACHADO REIS = 1.

REIS

ESTUDO DA AÇÃO DA HEMOLINFA NO MECANISMO DE DEFESA  
DE *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835)

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Mestre  
em Ciências na área de  
Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães = 1.

Campinas - SP  
1990

R277e

13156/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho foi realizado no laboratório de Helmintologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Os auxílios foram concedidos pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Grande é o Senhor e sumamente louvável,  
Insondável é a sua grandeza

(Salmo, 144:3)

Ao EDMYR, que durante esses longos meses de trabalho, soube se fazer presente em todos os momentos, proporcionando-me ajuda e incentivo com muito carinho, amor e dedicação.



Aos meus filhos por tudo  
que significam em minha  
vida.

## AGRADECIMENTOS

Minha gratidão aos meus pais e irmãos pelo amparo e exemplo de luta.

Meu reconhecimento ao Sr. Leocyr Rosa dos Reis e Sra. Nilse Rosa dos Reis, pelos seus incansáveis esforços de suprirem minha ausência na educação de meu filho.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães pela pronta colaboração e firme orientação deste trabalho. Pelo incentivo no desenvolvimento da minha conduta científica.

Aos Profs. Drs. José Ferreira Carvalho e Arécio Xavier Linhares pela contribuição prestada na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Paulo de Toledo Artigas pelo auxílio na identificação dos trematódeos.

Ao Prof. Dr. Nelson da Silva Cordeiro, pela confecção dos desenhos das cercárias.

As Profas. Dras. Ana Maria Aparecida Guaraldo, Eliana Maria Zanotti Magalhães e Marlene Tiduko Ueta, pela discussão do trabalho desenvolvido e pelas sugestões apresentadas.

A Sras. Cleusa dos Santos e Inês Angela Buso Adani, sempre prestativas na ajuda técnica, minha gratidão pela dedicação e paciência.

A Célia Cristina Borelli e Ana Maria Machado, que sempre estiveram dispostas a nos atender.

A colega Verónica Sierpe Jeraldo, pela orientação e paciência na utilização dos microcomputadores.

As colegas Ana Cristina e Silmara, pela convivência durante esses anos.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Meus agradecimentos

## Lista de Figuras

	página
Figura 1.....	47
Furcocercária longifurcada sem ocelo.	
Figura 2.....	48
Distomoxifideocercária.	
Figura 3.....	49
Variação do número de amebócitos circulantes em B. tenagophila livres de infecção.	
Figura 4.....	50
Variação do número de amebócitos circulantes em B. tenagophila, submetidas a anestesia com mentol.	
Figura 5.....	51
Variação do número de amebócitos em B. tenagophila expostas ao S. mansoni.	
Figura 6.....	52
Variação do número de amebócitos em B. tenagophila inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao S. mansoni.	
Figura 7.....	53
Variação do número de amebócitos em B. tenagophila inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por S. mansoni e posteriormente expostas ao S. mansoni.	
Figura 8.....	54
Variação do número de amebócitos em B. tenagophila inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercária e posteriormente expostas ao S. mansoni.	
Figura 9.....	55
Variação do número de amebócitos em B. tenagophila inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercária longifurcada sem ocelo e posteriormente expostas ao S. mansoni.	
Figura 10.....	56
Variação do número de amebócitos em B. tenagophila, expostas ao S. mansoni e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção.	

Figura 11.....	57
Variação do número de amebócitos em <i>B. tenagophila</i> , expostas ao <i>S. mansoni</i> e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxífideo cercária.	
Figura 12.....	58
Variação do número de amebócitos em <i>B. tenagophila</i> , expostas ao <i>S. mansoni</i> e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercária longifurcada sem ocelo.	
Figura 13.....	59
Corte histológico de <i>B. tenagophila</i> inoculada com hemolinfa de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Figura 14.....	60
Corte histológico de <i>B. tenagophila</i> inoculada com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercária longifurcada sem ocelo e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Figura 15.....	61
Corte histológico de <i>B. tenagophila</i> inoculada com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercária longifurcada sem ocelo e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Figura 16.....	62
Corte histológico de <i>B. tenagophila</i> inoculada com hemolinfa de moluscos infectados com <i>S. mansoni</i> e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> . Larvas de <i>S. mansoni</i> integras e degeneradas.	
Figura 17.....	63
Fotomicrografia de amebócitos de <i>B. tenagophila</i> livres de infecção.	

## Lista de tabelas

	página
Tabela I.....	32
Taxa de infecção natural em 1072 moluscos capturados.	
Tabela II.....	33
Distribuição das coletas por meses do ano.	
Tabela III.....	34
Taxas de infecção e mortalidade de <i>B. tenagophila</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> , quando anteriormente inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados não por digenéticos.	
Tabela IV.....	35
Taxa de infecção e mortalidade de <i>B. tenagophila</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> , quando primeiramente submetidos à infecção por <i>S. mansoni</i> e logo após inoculados com hemolinfa de moluscos infectados ou não infectados por digenéticos.	
Tabela V.....	36
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> livres de infecção.	
Tabela VI.....	37
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> , livres de infecção e submetidas ao anestésico.	
Tabela VII.....	38
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> submetidas à infecção experimental por <i>S. mansoni</i> .	
Tabela VIII.....	39
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção e posteriormente infectadas por <i>B. mansoni</i> .	
Tabela IX.....	40
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por <i>S. mansoni</i> e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> .	

Tabela X.....	41
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercária e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Tabela XI.....	42
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercária longifurcada sem ocelo e posteriormente expostas ao <i>S. mansoni</i> .	
Tabela XII.....	43
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> , expostas ao <i>S. mansoni</i> e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção.	
Tabela XIII.....	44
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> , e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercária.	
Tabela XIV.....	45
Número médio de amebócitos circulantes em <i>B. tenagophila</i> , expostas ao <i>S. mansoni</i> , e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercária longifurcada sem ocelo.	
Tabela XV.....	46
Taxas de penetração de miracídios e viabilidade dos esporocistos em <i>B. tenagophila</i> expostas à 100 miracídios de <i>S. mansoni</i> e inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção ou infectados por digenéticos, anteriormente ou após a exposição.	

## RESUMO

Estudou-se o comportamento dos amebócitos nos mecanismos de defesa de exemplares de *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de outros exemplares não infectados ou infectados por digenéticos, sendo posteriormente submetidas a infecção por *S. mansoni*. Outros exemplares de *B. tenagophila* foram expostos ao *S. mansoni* e logo após inoculados com hemolinfa de outros exemplares não infectados ou infectados por digenéticos.

*B. tenagophila* submetidas à inoculação de hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni*, apresentaram elevada resistência à infecção posterior ao *S. mansoni* (80%). Observamos que o número de esporocistos degenerados apresentou-se elevado (77.41%), sendo envolvidos por intensa reação amebocitária. Com relação ao número de amebócitos circulantes, observamos que estes sofreram um aumento aproximadamente 16 horas após a exposição ao *S. mansoni*, sendo que esse aumento foi devido aos amebócitos estrelados.

Em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo observou-se resistência a posterior exposição ao *S. mansoni* (75.75%). O número de esporocistos degenerados apresentou-se também elevado (70.96%). As reações amebocitárias apresentaram-se mais discretas do que aquelas observadas nas *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de



moluscos infectados com *S. mansoni*. O número de amebócitos elevou-se 12 horas após a exposição ao *S. mansoni*.

A inoculação de hemolinfa de *B. tenagophila* livres de infecção, antes ou após à exposição ao *S. mansoni* provocou, quando comparada ao grupo controle (grupo 3), um aumento da suscetibilidade dos moluscos à infecção pelo *S. mansoni*.

Nos exemplares de *B. tenagophila* submetidos a exposição ao *S. mansoni* e posteriormente inoculados com hemolinfa de outros exemplares infectados com distomoxifideocercárias ou furcocercárias longifurcadas sem ocelo, obtivemos taxas de infecção significativamente maiores do que as obtidas nos exemplares inoculados com hemolinfa anteriormente à infecção pelo *S. mansoni*.

## SUMÁRIO

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	iii
Resumo	v

	página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 Planejamento experimental.....	13
2.2 Coletas de moluscos no campo e identificação de cercárias de digenéticos.....	15
2.3 Manutenção dos moluscos.....	17
2.4 Obtenção de hemolinfa.....	17
2.6 Contagem de células da hemolinfa.....	18
2.7 Inoculação de hemolinfa total.....	19
2.8 Infecção experimental dos moluscos com miracídeos de <i>S. mansoni</i> (SJ).....	19
2.9 Obtenção de cortes histológicos.....	20
2.10 Análise estatística.....	21
3 RESULTADOS.....	22
3.1 Infecção natural por espécie de digenéticos.....	22
3.2 Período de desenvolvimento das cercárias de <i>S.</i> <i>mansoni</i> nos moluscos experimentalmente infectados.....	23

3.3	Verificação da taxa de infecção de <i>B. tenagophila</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> após inoculação de hemolinfa de moluscos livres de infecção e infectados.....	24
3.4	Verificação da taxa de infecção de <i>B. tenagophila</i> expostas ao <i>S. mansoni</i> e posteriormente inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção e infectados.....	25
3.5	Contagem de amebócitos na hemolinfa de <i>B. tenagophila</i> .....	25
3.6	Taxa de penetração dos miracídios de <i>S. mansoni</i> .....	29
3.7	Análise das reações teciduais dos cortes histológicos dos moluscos.....	29
4	DISCUSSÃO.....	64
5	CONCLUSÕES.....	81
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

## 1 - INTRODUÇÃO

A infecção de moluscos planorbídeos por trematódeos depende de vários fatores tais como a probabilidade de contato entre os miracídios e seus hospedeiros, a capacidade infectante destas larvas, fatores ambientais, interação fisiológica entre trematódeo e molusco e principalmente o estabelecimento da infecção resulta da interação de fatores genéticos presentes nas populações dos planorbídeos e trematódeos.

Mediante estudos efetuados em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), alguns autores têm demonstrado que a compatibilidade entre moluscos e trematódeos traduz-se pelo aumento do número de amebócitos circulantes (BASCH, LIE & HEYNEMAN, 1969; ABDUL-SALAM & MICHELSON, 1980). Neste caso, os amebócitos reconhecem o parasita, mas não conseguem eliminá-lo (BENEX & JACOBELLI, 1980), sendo que o desenvolvimento do parasita ocorre quase sem reação tecidual do molusco ( GUARALDO et alii., 1981). Em caramujos incompatíveis com o trematódeo, observa-se uma diminuição do número de amebócitos circulantes, e estes não reconhecem o parasita como um "corpo estranho", num primeiro momento, mas após algumas horas esses parasitas são rapidamente envolvidos por fibroblastos e células da

hemolinfa, produzindo uma reação celular e encapsulamento do parasita por amebócitos, sendo as larvas mortas principalmente pela forte atividade fagocitária destas células (FILES & CRAM, 1949; NEWTON, 1952, 1954; BROOKS, 1953; COELHO, 1954, 1957, 1962; PAN, 1963, 1965; TRIPP, 1961, 1970, 1974).

NEWTON (1953,1954) realizou, por autofecundação, seleção genética para o caráter suscetibilidade em caramujos *B. glabrata* de Salvador (BA) infectados com linhagem portorriquenha de *Schistosoma mansoni*, adotando um mutante albino como marcador. Nessa ocasião, o autor também referiu-se à influência da idade do hospedeiro sobre a suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni*.

RICHARDS, (1973) confirmou a hipótese de que caramujos jovens suscetíveis tornam-se resistentes quando adultos. Demonstrou ainda que o caráter resistência, adquirido na maturidade, é determinado por um único gene dominante, com herança mendeliana.

Em moluscos jovens a suscetibilidade é controlada por um complexo de quatro ou mais fatores, tendo sido constatada a presença de genes, que condicionam a resistência também nos exemplares suscetíveis (RICHARDS & MERRITT, 1972).

Por outro lado, os resultados de FILES & CRAM (1949), testando a suscetibilidade a diversas linhagens de

*S. mansoni* em caramujos provenientes da Libéria, Egito, Porto Rico e Brasil, ressaltaram a complexidade das inter-relações estabelecidas entre hospedeiro e parasita. Estes autores admitiram a existência de diferenças fisiológicas, intra e interespecíficas, entre os vermes de áreas endêmicas diferentes.

PARAENSE & CORREA (1963), demonstraram a necessidade de um ajuste fisiológico entre molusco e parasita, ao constatarem que *S. mansoni*, adaptado à *B. glabrata* de Minas Gerais, apresentava resistência à infecção quando colocada frente a *B. tenagophila* de São Paulo e vice-versa. Com isso, demonstraram a existência de duas linhagens de *S. mansoni*: uma de Belo Horizonte (BH) que requer *B. glabrata* como seu hospedeiro intermediário e outra de São José dos Campos (S.J) que requer *B. tenagophila* como seu hospedeiro. O Índice de infecção para cada espécie seria condicionado pela variação na frequência de genes responsáveis, presentes numa determinada população de moluscos.

Numa interpretação alternativa quanto à especificidade envolvida no complexo molusco-trematódeo, MAGALHÃES (1966, 1970) acredita que a suscetibilidade ao esquistossomo representa a aptidão de um molusco com genótipo pré-adaptado às suas condições. Neste caso, o mesmo exemplar de caramujo pode não ser suscetível a outro miracídio pertencente à mesma população. O mesmo autor

refere que "não só se deve levar em conta as variações do genótipo das populações do helminto, como também as eventuais variações intra-específicas do genótipo nas populações de molusco, variações estas que propiciariam condições de pré-adaptação ao parasitismo. Do confronto das condições fornecidas pelos genótipos do molusco e do helminto, resultaria a possibilidade ou não da infecção do molusco pelo *S. mansoni*".

Nas pesquisas experimentais da esquistossomose, adota-se a *B. glabrata* por ser este planorbídeo um modelo de agente transmissor bem ajustado e conhecido para a condição de laboratório. Utiliza-se muito pouco nessas investigações *B. straminea* e *B. tenagophila*. Esta última mostrou-se pouco suscetível à infecção esquistossômica (RUIZ, 1957; PIZZA et alii., 1959; PIZZA & RAMOS, 1960; COELHO, 1962; MAGALHÃES, 1969 e DIAS et alii., 1986), produzindo um número muito pequeno de cercárias, provavelmente devido a mecanismos de imunidade naturais (COELHO, 1957; PARAENSE & CORREA, 1963 e GUARALDO et alii., 1981).

Sabe-se hoje que insetos e moluscos desenvolveram mecanismos de defesa bastante eficientes (RATCLIFFE et alii., 1985). A espessa cutícula dos insetos e a concha

nos moluscos seriam a "primeira linha de defesa" contra a invasão de parasitas. Uma vez que o invasor obtenha sucesso e penetre, este será combatido por mecanismos de defesa celular e humoral.

A presença de material "não próprio", nos invertebrados parece não provocar apenas reações de característica celular. Nos invertebrados não têm sido demonstrado nenhuma estrutura análoga às imunoglobulinas dos vertebrados, no entanto, tem-se observado algumas reações "in vitro" e "in vivo" semelhantes àquelas provocadas pelas imunoglobulinas, tais como: transferência de resistência através da hemolinfa ou presença de fatores humorais ampliando a resposta celular. Com respeito a este fato, podemos citar os experimentos de MAC KAY & JENKIN (1969), que observaram proteção significativa contra bactérias em invertebrados que receberam vacinas produzidas com bactérias atenuadas quimicamente com o objetivo de retirar a patogenicidade.

TRIPP (1961, 1970), mostrou que exemplares de *B. glabrata* são capazes de rejeitar implante de tecido heterólogo, evidenciando a propriedade dos amebócitos de distinguirem entre material "próprio" e "não próprio". MACKIN (1961), TRIPP (1961) e MICHELSON (1963b), estudando os mecanismos humorais em moluscos, revelaram que há fatores biologicamente ativos na hemolinfa que



funcionalmente simulam anticorpos. Esses fatores foram identificados como opsoninas, que teriam o papel de iniciar o processo de fagocitose (TRIPP, 1966; LOKER & HERTEL, 1987).

Na hemolinfa dos planorbídeos, encontramos os amebócitos que são as células envolvidas no mecanismo de defesa dos moluscos, e cuja função é a de fagocitar, encapsular e eliminar corpos estranhos, além de realizar outras funções tais como: transporte de cálcio para o reparo de fraturas na concha, cicatrização de feridas e coagulação da hemolinfa. Já as lisinas, aglutininas, fatores antimicrobianos e substâncias semelhantes a linfocinas, participam do mecanismo de defesa humoral (WAGGE, 1955; CHENG & KENNETH, 1977; CHENG & SCHOENBERG, 1980). Os amebócitos possuem atividade enzimática, aderindo à superfície de vidro sendo o "espraiamento" dependente de algum fator humoral do molusco (TRIPP, 1974; CHENG & KENNETH, 1977, ABDUL-SALAM & MICHELSON, 1980).

Existem várias classificações para os tipos de amebócitos, sendo este aspecto ainda muito controverso. SMINIA (1972), reconheceu apenas um tipo de célula com diferentes funções. CHENG (1975); JEDNG et alii., 1976 e CHENG & AULD (1977), reconheceram dois tipos: granulócitos e hialinócitos. Os granulócitos são células que possuem granulos no citoplasma e emitem pseudópodos e representam a

maior sub-população de células circulantes, perfazendo 85 a 90% do total; os hialinócitos são células menores sem granulos no citoplasma e mesmo quando espreiadas sobre superfície de vidro, não apresentam pseudópodos. Existem na hemolinfa na concentração de 10 a 15%.

NODA & LOKER (1989), trabalhando com hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *Echinostoma paraensei*, observaram uma variação significativa na morfologia dos amebócitos sob condições padronizadas de temperatura e período de incubação. Baseando-se no espreiamento das células sobre o plástico, esses autores dividiram os granulócitos em duas categorias: granulócitos totalmente espreiados (fully spread granulocytes), onde o núcleo é central e envolvido por uma membrana espessa; granulócitos parcialmente espreiados (partially spread granulocytes), onde o núcleo está expandido na periferia da célula e a região do citoplasma espreiada é escassa. Outra categoria de célula é representada por células redondas (round cells), que são altamente refringentes em microscópio de contraste de fase porque não há espreiamento. Os autores referem também os hialinócitos, células com numerosos filópodes, pequenos, ao redor da periferia da célula bem espreiada.

Quanto ao local de produção dessas células também é

um assunto controvertido. MILLOT (1937a, 1937b) diz que a origem destas células é no epitélio do manto e no tecido conjuntivo. MÜLLER (1956), refere que os amebócitos são fornecidos continuamente pelo tecido conjuntivo. PAN (1958), sugeriu que os amebócitos são formados nos fibroblastos, nas trabéculas do manto na parede do nefrídeo, perto do pericárdio. Atualmente aceita-se a descrição de LIE et alii., 1975; que descreveram uma região na parede reno-pericárdica dos pulmonados chamado Órgão Produtor de Amebócitos (APO - amebocytes-producing-organ).

A atividade do APO é resultante da interferência do organismo invasor com o sistema de defesa do molusco. Neste órgão, nunca foram encontrados parasitos (JOKY et alii., 1985).

Moluscos planorbídeos podem ser hospedeiros intermediários de mais de uma espécie de trematódeos digenéticos que parasitam mamíferos, aves, peixes, anfíbios e répteis na fase adulta. O parasitismo concomitante em moluscos pode levar a uma "incompatibilidade" entre os estágios larvares de certos trematódeos no mesmo molusco (LIM & HEYNEMAN, 1972). Os autores ao se referirem a este fenômeno, tem utilizado o termo antagonismo, cujo significado é o da rivalidade e incompatibilidade entre dois ou mais organismos.

Estudos sobre o antagonismo em diferentes grupos de animais revelaram a existência de dois tipos de antagonismo: direto e indireto.

Em microbiologia, o antagonismo direto é usado para explicar a ação direta de um microorganismo sobre a célula hospedeira. O antagonismo indireto é alusivo aos produtos metabólicos de efeito lesivo que os microorganismos possam produzir e que atuam sobre as células do hospedeiro, ou mesmo em outro microorganismo.

Para interações interespecíficas e intraespecíficas entre insetos parasitoides, tem sido usado o termo "ataque físico" para antagonismo direto e "supressão fisiológica" para antagonismo indireto (SALT, 1963; FISHER, 1961).

Essas interações no interior de moluscos planorbídeos podem manifestar-se através de "mecanismo direto" (LIE et alii., 1975a), termo usado para descrever a predação ou a atividade física exercida pelo estágio larval de rédia sobre outra larva de trematódeo dentro de um caramujo. Em contraste com esse termo, usa-se "mecanismo indireto", que representa uma variedade de respostas igualmente importantes. Entre esta modalidade de resposta destacam-se: 1- mecanismos citotóxicos, mediados pelas enzimas lisossomais cuja função é matar ou lisar as células de alguns parasitas. Não há evidência direta de que esse mecanismo seja uma resposta de um dos parasitas contra a

presença do outro, ou então que seja uma resposta do hospedeiro estimulado por um dos parasitas;

2- luta por espaço vital ou competição alimentar que é desencadeada pelo fato de uma das espécies de trematódeo já ter se "instalado" há algum tempo no hospedeiro. Na ocasião da instalação da segunda espécie, a primeira espécie instalada já se encontraria em estágio de desenvolvimento mais adiantado, o que colocaria a segunda espécie invasora em desvantagem. Além disso, a primeira espécie já teria realizado as migrações necessárias para os diversos órgãos do hospedeiro; 3- Mecanismos imunológicos podem estar envolvidos nos processos de incompatibilidade entre larvas de trematódeos no interior dos moluscos, previamente sensibilizados, o que provocaria, encapsulação, fagocitose e morte dos parasitos (LIE, 1975a, 1976a, 1976b, LIE et alii., 1980 e LIE, 1982).

Estudos realizados por nós em infecções concomitantes de trematódeos em *B. tenagophila*, permitiram, algumas considerações (MACHADO et alii, 1988). A infecção natural dos moluscos foi, em geral monoespecífica. Todavia, houve eventual presença concomitante de equinostomocercárias e de furcocercarias dotadas de ocelo. Verificamos também a presença concomitante de furcocercaria ocelada e de furcocercaria sem ocelos.

Moluscos naturalmente infectados com equinostomocercárias e distomocercárias com acúleo, apresentaram resistência parcial ao desenvolvimento de *S. mansoni*, nas tentativas de superinfecção, respectivamente 73% e 87%. Nossos resultados mostraram que as larvas de *S. mansoni* não se desenvolveram em moluscos naturalmente infectados com furcocercárias longifurcadas com ocelo e com furcocercárias longifurcadas sem ocelos, havendo portanto proteção total.

A ausência de reações amebocitárias em torno das larvas de *S. mansoni*, nos caramujos naturalmente infectados por outros digenéticos, parece indicar que, nesses casos, não há participação de amebócitos na resistência verificada ao desenvolvimento dos esporocistos.

Com base nesses dados, achamos oportuno esclarecer algumas indagações como estas: 1) Moluscos de laboratório não infectados, apresentariam resistência à infecção por *S. mansoni*, quando anteriormente inoculados com hemolinfa de moluscos infectados com outros trematódeos?

2) Como se comportariam moluscos infectados por *S. mansoni*, e logo após inoculados com hemolinfa de moluscos infectados com larvas de outros trematódeos?

3) Moluscos não infectados apresentariam resistência à infecção por *S. mansoni*, quando anteriormente inoculados com hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni*?

4) Qual seria o comportamento dos amebócitos frente às infecções, e as inoculações de hemolinfa de moluscos infectados?

No presente trabalho temos como objetivo avaliar a ação da hemolinfa no mecanismo de defesa de *B. tenagophila*.

## 2 - MATERIAL E METODOS

### 2.1 - Planejamento experimental.

Três grupos de 45 exemplares de *B. tenagophila*, criados e mantidos no laboratório de Parasitologia da UNICAMP, originaram os grupos controles.

GRUPO 1 - Moluscos livres de infecção (CONTROLE).

GRUPO 2 - Moluscos livres de infecção, anestesiados com mentol (CONTROLE ANESTESIADOS).

GRUPO 3 - Moluscos infectados experimentalmente por *S. mansoni* (CONTROLE INFECTADO POR *S. mansoni*).

Esses grupos foram constituídos com objetivo de avaliarmos o papel da ação da luz e do calor, o papel do anestésico e a ação da infecção sobre os amebócitos circulantes na hemolinfa dos referidos moluscos.

Para avaliarmos a ação da hemolinfa no mecanismo de defesa dos moluscos, anteriormente a infecção, formamos 4 grupos com 45 exemplares de *B. tenagophila* de laboratório.

GRUPO 4 - Moluscos livres de infecção, inoculados com hemolinfa de moluscos não portadores de larvas e posteriormente infectados experimentalmente por *S. mansoni*.

GRUPO 5 - Moluscos livres de infecção, inoculados com hemolinfa de moluscos portadores de larvas de *S. mansoni* e



posteriormente infectados experimentalmente por *S. mansoni*.

GRUPO 6 - Moluscos livres de infecção, inoculados com hemolinfa de moluscos portadores de larvas de distomoxifideocercárias e posteriormente infectados experimentalmente por *S. mansoni*.

GRUPO 7 - Moluscos livres de infecção, inoculados com hemolinfa de moluscos portadores de larvas de furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente infectados experimentalmente por *S. mansoni*.

Constituímos 3 grupos de *B. tenagophila* de laboratório com 45 exemplares cada, para avaliarmos a ação da hemolinfa nos mecanismos de defesa dos moluscos após à infecção por *S. mansoni*

GRUPO 8 - Moluscos livres de infecção, infectados experimentalmente por *S. mansoni*, e logo após inoculados com hemolinfa de moluscos seguramente não portadores de larvas.

GRUPO 9 - Moluscos livres de infecção, infectados experimentalmente por *S. mansoni*, e logo após inoculados com hemolinfa de moluscos portadores de larvas de distomoxifideocercárias.

GRUPO 10 - Moluscos livres de infecção, infectados experimentalmente por *S. mansoni*, e logo após inoculados

com hemolinfa de moluscos portadores de larvas de furcocercárias longifurcada sem ocelo.

Três exemplares dos GRUPOS 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, foram submetidos individualmente à infecção por 100 miracídios de *S. mansoni*, e sacrificados 2, 12, 16, 18 e 24 horas após a infecção ou inoculação de hemolinfa para verificação de reações teciduais.

Três exemplares dos GRUPOS 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 foram submetidos individualmente à infecção por 100 miracídios de *S. mansoni*, e sacrificados 24 horas após à infecção ou inoculação de hemolinfa. Estes moluscos foram utilizados para avaliarmos a penetração dos miracídios e o número de esporocistos integros ou degenerados, assim como a viabilidade dos miracídios.

## 2.2 - Coletas de moluscos no campo e identificação de cercárias de digenéticos.

As coletas dos moluscos *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), foram realizadas em um criadouro de peixes ornamentais, situado em Louveira, na região de Campinas, Estado de São Paulo.

O criadouro era constituído de 12 tanques escavados no terreno, abastecidos com água de um poço. Cada tanque tinha aproximadamente 600 metros quadrados. Sua localização é próxima a uma reserva florestal com características de mata virgem. A vegetação do tanque é constituída por algas, plantas submersas (*Elodea sp*), plantas emergentes e plantas natantes (*Eichhornia sp*, *Pistia sp* e *Lemna sp*), dentre outras não classificadas.

As coletas foram sempre realizadas no período da manhã em dias de sol, com temperatura média de 26 C. Foram feitas 8 coletas no transcorrer de um ano (setembro de 1988 à setembro de 1989).

Após a coleta, os moluscos eram trazidos ao laboratório e examinados, individualmente para verificação da infecção por trematódeos. Os moluscos foram submetidos à ação da luz e do calor por aproximadamente 2 horas e 30 minutos para a eliminação das cercárias e posteriormente observados em microscópio estereoscópico para pesquisa e classificação das cercárias. Este procedimento foi repetido a cada 7 dias por 3 meses.

A identificação das cercárias foi feita por observação microscópica e desenho em câmara clara (Figuras 1 e 2), com o auxílio do Prof. Dr. Paulo de Toledo Artigas.

### 2.3 - Manutenção dos moluscos

Os moluscos tanto de laboratório como os de campo foram mantidos em cristalizadores de vidro com capacidade aproximada, de 2500 ml para 20 moluscos e 3000 ml para 30 exemplares. Utilizou-se água previamente testada e considerada satisfatória para a criação dos planorbídeos.

Os moluscos foram alimentados com alface fresca lavada.

### 2.4 - Obtenção de hemolinfa.

A hemolinfa de *B. tenagophila* livres de infecção ou infectadas foi coletada mediante punção da região céfalo-podal com uma seringa tipo tuberculina de 1 ml, devidamente esterilizada.

Foram selecionados moluscos com diâmetro entre 13 à 18mm e sua hemolinfa usada imediatamente após a coleta (SANTANA et alii., 1985). A hemolinfa foi mantida, até o instante de uso, em tubo plástico, no gelo.

## 2.6 - Contagem de células da hemolinfa.

Uma vez obtida a hemolinfa dos moluscos nos diferentes grupos, esta foi colocada na câmara de Neubauer para contagem e cálculo do número total de células/ $0.1\text{mm}^3$  em cada molusco. A contagem foi feita em microscópio óptico sob um aumento de 40 vezes.

Fez-se a contagem dos amebócitos circulantes da hemolinfa individualmente em 7 exemplares para cada intervalo de tempo (de 30 minutos até 24 horas após a infecção com *S. mansoni* ou após a inoculação de hemolinfa a intervalos de 2 horas) perfazendo um total de 91 exemplares por grupo. Considerou-se a média de células/ $0.1\text{mm}^3$  de hemolinfa em 7 moluscos por intervalo de tempo em cada grupo. Cabe lembrar que os moluscos foram sacrificados após a retirada de hemolinfa.

A contagem de amebócitos no GRUPO 3 foi realizada pós a infecção dos moluscos. Nos GRUPOS 4, 5, 6 e 7 após os moluscos voltarem da anestesia (3 horas) e após a infecção (2 horas e trinta minutos). Nos GRUPOS 8, 9 e 10 após os moluscos voltarem da anestesia.

Adotamos o seguinte critério para a identificação dos amebócitos: amebócitos não estrelados (hialinócitos) (Fig.17A) amebócitos estrelados (granulócitos) (fig. 17B).

## 2.7 - Inoculação de hemolinfa Total

A inoculação foi realizada em moluscos previamente anestesiados com mentol 0,025% por 4 horas. A partir de um "pool" de hemolinfa de 3-5 caramujos de 7-10mm de diâmetro, aplicou-se 0,3mm<sup>3</sup> de hemolinfa em cada exemplar, na região céfalo-podal com uma seringa odontológica devidamente esterilizada. Para evitar a contaminação da hemolinfa, seu manuseio foi realizado sempre próximo da "chama".

Nos GRUPOS 4, 5, 6 e 7 a inoculação da hemolinfa foi realizada após a anestesia dos moluscos (4 horas) que precedeu à infecção por *S. mansoni* (2 horas e 30 minutos). Nos GRUPOS 8, 9 e 10 os moluscos foram infectados primeiramente por *S. mansoni* (2 horas e 30 minutos) e logo após anestesiados (4 horas) e então inoculados com hemolinfa.

## 2.8 - Infecção experimental dos moluscos com miracídios de *S. mansoni* (SJ).

Dito grupos de 45 moluscos com 7-10mm de diâmetro, foram expostos individualmente a 10 miracídios da linhagem SJ de *S. mansoni*, mantida em laboratório, através de passagens alternadas e sucessivas em camundongos heterogênicos Swiss (*Mus musculus*) e *B. tenagophila*.

As fezes dos camundongos foram coletadas aos sessenta dias após infecção, homogeneizadas, filtradas em dupla camada de gaze e deixadas sedimentar em geladeira. Em seguida, procedemos tratamento para eclosão dos miracídios (aproximadamente 2 hs ) e posterior exposição aos moluscos, conforme técnica de Standen (1951). Os moluscos foram examinados semanalmente, a partir de 30 dias, para a verificação da eliminação de cercárias. Aos 60 dias os moluscos foram esmagados entre duas placas de vidro para verificar a presença de esporocistos.

## 2.9 - Obtenção de cortes histológicos.

Obtivemos os cortes histológicos dos moluscos em 2 lotes:

LOTE 1 - Três moluscos dos GRUPOS 3 a 10 foram sacrificados 2, 12, 16, 18 e 24 horas após a inoculação de hemolinfa e posterior exposição por *S. mansoni* ou exposição por *S. mansoni* e posterior inoculação de hemolinfa. Estes moluscos foram processados para verificação de reações teciduais em torno das larvas de *S. mansoni*.

LOTE 2 - Três moluscos dos GRUPOS 3 a 8 foram

sacrificados após a inoculação de hemolinfa e posterior exposição ao *S. mansoni*. Três moluscos dos GRUPOS 8 a 10 foram sacrificados após exposição ao *S. mansoni* e posterior inoculação de hemolinfa. Estes moluscos foram utilizados para verificarmos o Índice de penetração dos miracídios, o número de esporocistos integros e degenerados de *S. mansoni* assim como a viabilidade dos esporocistos

Os moluscos dos LOTES 1 e 2, foram fixados em Bouin aquoso por 48 horas e posteriormente incluídos em parafina. Cortes com  $7\mu\text{m}$  de espessura, foram corados pelo Tricrômico de Gomori.

#### 2.10 - Análise Estatística.

Utilizamos estudos estatísticos para os valores obtidos nas contagens de células da hemolinfa, nos números de exemplares infectados quando da exposição ao *S. mansoni* e na avaliação quantitativa de esporocistos degenerados presentes nos cortes histológicos.

A análise desses valores foi efetuada através de Teste de Fisher e do Método de comparação de duas proporções independentes.



### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Infecção natural por espécies de digenéticos.

Em moluscos capturados no campo foram encontradas as seguintes cercárias:

a) *Furcocercária longifurcada* sem ocelo (Figura 1); de cauda relativamente curta e longas furcas. Estas cercárias se formam em esporocistos, contendo, cada um, até cerca de 20 cercárias.

b) *Distomoxífideocercária* (Figura 2).

Estas cercárias se formam em esporocistos brancacentos, contendo, individualmente até cerca de 25 cercárias. São cercárias muito móveis, libertando-se do esporocisto através de rompimento da parede pelo acúleo oral. A cercária uma vez livre, evolui para a forma encistada. Nossos resultados estão em concordância com os de RUIZ, 1952, 1953; NARUTO, 1984 e MACHADO et alii., 1987.

A taxa de infecção natural obtida em 1072 exemplares de *B. tenagophila* capturadas foi de 5.7%, sendo que 3.4% mostraram-se positivos para *furcocercária longifurcada* não ocelada e 2.3% positivos para *distomoxífideocercária* (Tabela I).

Verificamos que nos meses de abril/1989 e junho/1989

houve uma diminuição no número de caramujos coletados, sendo que não foi coletado qualquer exemplar infectado (Tabela II).

### 3.2 - Período de desenvolvimento das cercárias de *S. mansoni* nos moluscos experimentalmente infectados.

Foram considerados, apenas os moluscos que eliminaram cercárias e ou aqueles que apresentaram esporocistos no período de observação (60 dias).

Os moluscos dos grupos 4, 6, 8 e 10, começaram a eliminar cercárias a partir do 37 dia após à infecção, sendo este dado muito semelhante ao obtido no grupo 3.

Os moluscos pertencentes aos grupos 5, 7 e 9, iniciaram a eliminação de cercárias em um período mais longo, após 52 dias. Após 60 dias de infecção, os moluscos que não haviam eliminado cercárias foram esmagados entre duas placas de vidro para observação da presença de esporocistos, e aqueles exemplares portadores de esporocistos foram considerados infectados.

3.3 - Verificação da taxa de infecção de *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* após inoculação de hemolinfa de moluscos livres de infecção e infectados.

Na Tabela III encontram-se os resultados referentes as taxas de infecção e de mortalidade de *B. tenagophila*, expostas ao *S. mansoni* após a inoculação de hemolinfa de caramujos infectados ou não com digenéticos.

Foram encontradas taxas de 20% e 24,24% de infecção para os grupos 5 e 7, respectivamente. O grupo 3 apresentou taxa de infecção de 38,46%.

Estes dados apresentaram-se altamente significativos ( $p=0.005$  e  $p=0.005$ ), indicando que a inoculação de hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni* ou portadores de furcocercária longifurcada não ocelada, conferiu, respectivamente 80% e 75,75% de resistência à infecção pelo *S. mansoni*.

A inoculação de hemolinfa de caramujos infectados com distomoxifideocercárias (grupo 6), não conferiu proteção significativa aos moluscos expostos ao *S. mansoni* (56,70%), ( $p=0.174$ ).

No grupo 4, que foi constituído de moluscos inoculados com hemolinfa de exemplares de *B. tenagophila* seguramente não portadoras de larvas, também não se observou proteção dos moluscos à infecção pelo *S. mansoni*. Ao contrário, a taxa de infecção foi maior 48,71% com

relação ao grupo 3 onde a taxa de infecção foi de 38.46% ( $p=0.028$ ).

**3.4 - Verificação da taxa de infecção de *B. tenagophila* exposta ao *S. mansoni* e posteriormente inoculada com hemolinfa de moluscos livres de infecção e infectados.**

Nos grupos 8, 9 e 10 (Tabela IV), os caramujos foram experimentalmente infectados por *S. mansoni* e logo após inoculados com hemolinfa de caramujos, respectivamente, livres de infecção, portadores de distomoxifideocercária e portadores de furcocecárias longifurcadas sem ocelo. As taxas de infecção obtidas nestes grupos foram, respectivamente, 48.48%, 48.48% e 41.17%. Essas taxas de infecção foram maiores do que a dos moluscos apenas expostos ao *S. mansoni* (grupo 3, 38.46%), o grau de significancia foi  $p=0.025$ ,  $p=0.025$  e  $p=0.098$ .

**3.5 - Contagem de amebócitos na hemolinfa de *B. tenagophila*.**

**A - *B. tenagophila* utilizadas como controle (grupos 1, 2 e 3).**

Nas tabelas V, VI e VII e figuras 3, 4 e 5 encontram-se os resultados da contagem de amebócitos na hemolinfa circulante de *B. tenagophila* pertencentes aos referidos grupos.

Os moluscos do grupo 1 e 2 foram também submetidos a ação da luz e do calor antes de realizarmos a contagem das células. No grupo 1 (Fig. 3) composto de moluscos livres de infecção, não houve, no decorrer do experimento, diferenças significativas no número de amebócitos estrelados e não estrelados ( $p=0.178$ ). No grupo 2 observamos, nas primeiras 10 horas após a anestesia, que os amebócitos encontram-se em um número mais elevado do que nos demais intervalos, (Fig. 4) sendo estatisticamente significativo ( $p=0.006$ ).

Na tabela VII e figura 5 (grupo 3), encontram-se os resultados da contagem de células da hemolinfa de *B. tenagophila*, submetidas apenas à infecção esquistossomica.

Dezoito horas após a exposição aos miracídios, o número de células aumentou significativamente em relação aos demais períodos analisados. Os amebócitos estrelados foram os responsáveis por este aumento, Fig. 5.

**B - *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por digenéticos e posteriormente expostas ao *S. mansoni*.**

Os resultados referentes a contagem de células da hemolinfa de *B. tenagophila*, anteriormente inoculadas com hemolinfa e posteriormente infectadas por *S. mansoni*, estão expressos nas tabelas VIII, IX, X e XI, figuras 6, 7, 8 e 9.

Os resultados apresentados na tabela VIII e figura 6 referem-se aos moluscos inoculados com hemolinfa de moluscos livres de infecção e posteriormente infectados por *S. mansoni* (grupo 4).

Observou-se nesse grupo que o número de amebócitos não estrelados, foi altamente significativo ( $p=0.005$ ) e maior do que os amebócitos estrelados, durante todo o período de observação, (Fig. 6).

Analisando-se os dados da tabela IX e figura 7 (grupo 5), verifica-se que, nos moluscos anteriormente inoculados com hemolinfa de moluscos portadores de larvas de *S. mansoni* e submetidos a exposição de *S. mansoni*, os amebócitos não estrelados permaneceram em número mais elevado do que os amebócitos estrelados. Após 16 horas de infecção o número de amebócitos circulantes aumentou significativamente em relação aos demais intervalos de observação. Deste aumento participaram os dois tipos de amebócitos, (Fig. 7).

Em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni*, após inoculação com hemolinfa de moluscos portadores de distomoxifideocercária, observou-se que a variação do número de amebócitos não estrelados e estrelados oscilou muito durante o período de observação, (Fig. 8). A variação foi nitidamente alternada, com 3 picos bem visíveis (8, 16 e 22 horas).

Analisados estatisticamente estes dados mostraram

variações muito significativas ( $p = 0.006$ ), (grupo 6).

Na tabela XI, encontram-se os dados referentes à contagem de amebócitos oriundos de *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos portadores de furcocercarias longifurcadas não oceladas e logo após infectadas com *S. mansoni*. Os amebócitos estrelados apresentaram uma elevação significativa, 12 horas após a infecção, sendo que essas células permaneceram em um patamar semelhante ao que ocorreu com amebócitos não estrelados (figura 9).

C - *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos portadores de larvas de digenéticos.

Nas tabelas XII e XIII, encontram-se os dados referentes ao número de amebócitos em *B. tenagophila*, expostas ao *S. mansoni*, e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos não portadores de larvas (grupo 8) e em *B. tenagophila*, expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos portadores distomoxifideocercária (grupo 9).

Observamos na figura 10 que a variação dos amebócitos não estrelados oscilou constantemente, sempre com médias altas. Verificamos um pico 20 horas após inoculação de hemolinfa devido ao aumento dos

amebócitos estrelados ( $p=0.030$ ).

Na tabela XIV, encontra-se o número de amebócitos circulantes em *B. tenagophila*, expostas ao *S. mansoni*, e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos portadores de furcocercarias longifurcadas sem ocelo (grupo 10). Na figura 12 observa-se uma elevação no número de amebócitos no referido grupo 12 horas após a inoculação de hemolinfa. Esse pico foi devido ao aumento de amebócitos estrelados, sendo estatisticamente muito significativo ( $p=0.006$ ).

### 3.6 - Taxa de penetração dos miracídios de *S. mansoni*.

Verificamos que a taxa de penetração dos miracídios variou entre 10.3 a 10.6%, nos diferentes grupos (tabela XV).

### 3.7 - Análise das reações teciduais dos cortes histológicos dos moluscos.

Na avaliação dos cortes histológicos dos moluscos expostos ao *S. mansoni* (Grupo 3), observamos que ocorreu reação amebocitária bastante intensa não havendo diferença nos intervalos. O número de esporocistos degenerados foi de 45.15%. Em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de



moluscos livres de infecção e posteriormente expostos ao *S. mansoni* (Grupo 4), verificamos que as reações amebocitárias apresentaram-se bastante discretas e o número de esporocistos degenerados foi 43.75%, taxa mais baixa do que a do o grupo controle 3, diferença não significativa ( $p=0.251$ )

Nas *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, ocorreu uma reação amebocitária intensa (Fig. 13) 12 horas após a exposição e uma reação menos intensa 24 horas após exposição (Fig. 14). O número de esporocistos degenerados foi altamente significativo ( $p=0.005$ ), atingindo índice de 77.41%.

Nas *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxífideoxercárias e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, observamos que ocorreu reação amebocitária modesta ao redor das larvas de *S. mansoni* em todos os intervalos. O número de esporocistos degenerados foi de 46.86%, não sendo significativo ( $p=0.289$ ).

Nas *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, as reações amebocitárias não foram tão intensas (Fig. 14) quanto as observadas no grupo 5, mas apresentaram como característica um isolamento da larva do tecido adjacente (Fig. 15). O

número de esporocistos degenerados no entanto foi muito significativo ( $p=0.006$ ), com uma taxa de 70.96%.

As *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção, apresentaram discreta reação amebocitária em todos os intervalos e o número de esporocistos degenerados foi de 50.0%.

Nas *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos portadores de distomoxifideocercária ocorreu reação amebocitária discreta e o número de esporocistos degenerados foi de 54.83%, sendo significativo ( $p=0.35$ ).

Nas *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa de moluscos portadores de furcocercárias longifurcadas sem ocelo, as reações amebocitárias foram discretas e o número de esporocistos degenerados foi de 51.61%, sendo que este resultados foi significativo ( $p=0.27$ ) quando comparado com o do grupo 3.

TABELA I

Taxa de infecção natural, por tipo de digenéticos, em 1072 moluscos capturados.

---

Tipo de cercárias	N. de exemplares infectados	Percentagem de infecção
<hr/>		
Furcocercária		
longifurcada	37	3.4
sem ocelo		
<hr/>		
Distomoxífideo		
cercária	25	2.3

---

TABELA II

Distribuição das coletas de *B. tenagophila* por meses do ano.

Meses	N. exemplares coletados	N. exemplares infectados	Tipo de cercária	
			F	D
set/88	148	6	4	2
out/88	132	6	5	1
dez/88	203	17	9	8
jan/89	201	19	11	8
mar/89	178	12	7	5
abr/89	67	-	-	-
jun/89	47	-	-	-
set/89	96	2	1	1

F - Furcocercária longifurcada sem ocelo

D - Distomoxifideocercária

TABELA III

Taxas de infecção e mortalidade de *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni*, quando anteriormente inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados ou não infectados por digenéticos, (45 exemplares por grupo).

<i>B. tenagophila</i> (GRUPOS)	Tipo de hemolinfa inoculada	N. de moluscos sobreviventes	Taxa de mortalidade	Taxa de infecção
GRUPO 1	-	39	(6) 13.3	-
GRUPO 2	-	36	(9) 20.0	-
GRUPO 3	-	39	(6) 13.3	(15) 38.46
GRUPO 4	sem larvas	39	(6) 13.3	(19) 48.71
GRUPO 5	c/ <i>S. mansoni</i>	40	(5) 11.1	(8) 20.0
GRUPO 6	c/ distomoxifideo cercária	37	(8) 17.7	(16) 43.24
GRUPO 7	c/ furcocercária	33	(12) 26.6	(8) 24.24

TABELA IV

Taxas de infecção e mortalidade de *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni*, quando primeiramente submetidas à infecção por *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados ou não infectados por digenéticos, (45 exemplares por grupo).

<i>B. tenagophila</i> (GRUPOS)	Tipo de hemolinfa inoculada	N. de moluscos sobreviventes	Taxa de mortalidade	Taxa de infecção
GRUPO 8	sem larvas	33	(12) 26.6	(16) 48.48
GRUPO 9	c/ distomoxifideo cercária	33	(12) 26.6	(16) 48.48
GRUPO 10	c/ furcocercária	34	(11) 24.4	(14) 41.17

TABELA V

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* livres de infecção (GRUPO CONTROLE).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	5.6	11.6	17.2	23.3	15.9	71.8	4.8	3.9	8.5
2	6.3	8.6	14.9	26.6	17.3	77.8	5.2	4.2	8.8
4	3.3	7.9	11.2	3.9	16.5	24.5	1.9	4.0	4.9
6	4.7	6.7	11.4	8.6	9.2	20.9	2.9	3.0	4.6
8	6.1	12.4	18.5	60.8	51.3	199.9	7.7	7.2	14.1
10	4.0	6.3	10.3	15.3	13.3	19.6	3.9	3.6	4.2
12	6.6	6.4	13.0	26.6	6.9	26.9	5.2	2.6	5.2
14	5.6	9.3	14.9	35.9	65.2	189.1	5.9	8.0	13.7
16	2.8	5.2	8.0	2.1	5.8	9.6	1.5	2.4	3.1
18	6.3	9.6	15.9	7.6	19.1	41.8	2.8	4.4	6.5
20	2.4	10.7	13.1	8.3	38.6	79.8	2.9	6.2	8.9
22	5.3	9.6	15.9	8.6	4.8	17.1	2.9	2.2	4.1
24	4.0	10.1	14.1	10.3	13.1	12.8	3.2	3.6	3.6

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebócitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados

TABELA VI

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila*,  
livres de infecção e submetidas ao anestésico (GRUPO 2).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	25.7	12.0	37.7	84.2	33.3	53.6	9.2	5.8	7.3
2	21.1	15.1	36.2	107.8	84.1	88.6	10.4	9.2	9.4
4	17.9	15.4	33.3	9.1	25.0	20.2	3.0	5.0	4.5
6	19.1	11.8	30.9	50.1	43.1	118.7	7.1	6.6	10.9
8	16.7	16.2	32.9	57.5	25.4	83.4	7.6	5.0	9.1
10	13.4	9.0	22.4	44.3	57.7	146.0	6.7	7.6	12.1
12	4.3	16.4	20.7	6.6	6.3	23.6	2.6	2.5	4.9
14	7.1	13.3	20.4	42.1	27.9	112.6	6.5	5.3	10.6
16	7.3	14.9	22.2	4.2	3.1	2.5	2.1	1.8	1.6
18	5.4	12.9	18.3	4.3	6.5	14.9	2.1	2.5	3.9
20	5.7	13.7	19.4	4.2	5.2	6.0	2.1	2.3	2.4
22	10.1	14.7	24.9	25.8	7.6	32.5	5.1	2.8	5.7
24	4.3	11.6	15.9	4.6	4.0	4.8	2.1	2.0	2.2

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebócitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados



TABELA VII

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* criadas em laboratório, e submetidos à infecção experimental por *S. mansoni*. (GRUPO 3).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	3.3	7.9	11.2	3.9	6.5	4.5	1.9	4.0	4.9
2	6.3	8.6	14.9	26.6	17.3	77.8	5.1	4.2	8.8
4	5.7	5.9	11.6	12.9	4.5	26.9	3.6	2.1	5.2
6	5.6	9.3	14.9	35.9	65.2	189.1	5.9	8.0	13.8
8	4.0	6.3	10.3	15.3	13.2	19.6	3.9	3.6	4.4
10	4.7	6.7	11.4	8.6	9.2	20.9	2.9	3.0	4.6
12	3.6	4.2	7.8	5.9	4.6	9.6	2.3	2.1	3.1
14	10.4	8.1	18.5	66.6	65.5	199.9	8.1	8.0	14.1
16	6.9	9.3	16.2	6.5	24.2	41.8	2.5	4.9	6.5
18	15.8	11.0	26.8	182.5	63.0	429.8	13.5	7.9	20.7
20	3.7	8.9	12.6	7.9	24.1	15.9	2.8	4.9	3.9
22	5.0	6.6	11.6	5.3	14.6	25.9	2.3	3.8	5.1
24	6.1	6.4	12.5	8.5	10.6	21.3	2.9	3.3	4.6

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebócitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados

TABELA VIII

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (GRUPO 4).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	6.7	21.6	28.3	93.9	30.9	103.9	9.7	5.6	10.2
2	6.6	31.7	38.3	112.6	131.9	202.9	10.6	11.5	14.2
4	2.1	34.1	36.2	5.1	207.5	162.6	2.3	14.4	12.8
6	15.1	33.1	48.2	273.1	50.8	249.6	16.5	7.1	15.8
8	5.3	32.4	37.7	33.9	27.6	91.2	5.8	5.3	9.6
10	9.3	19.1	28.4	70.2	70.1	60.6	8.4	8.4	7.8
12	9.1	18.1	27.2	22.5	59.1	73.9	4.7	7.7	8.6
14	2.4	29.2	31.6	5.3	299.2	318.2	2.3	17.3	17.8
16	2.6	36.4	39.0	3.6	82.9	63.7	1.9	9.1	7.9
18	2.4	21.4	23.8	0.6	129.3	121.8	0.7	11.4	11.0
20	5.1	14.4	19.6	15.1	17.2	15.9	3.9	4.1	3.9
22	6.3	14.9	21.2	35.9	38.1	69.1	5.9	6.2	8.3
24	10.3	20.6	30.9	18.9	170.3	100.5	4.3	13.0	10.0

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebócitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados

TABELA IX

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por *S. mansoni* e posteriormente expostos ao *S. mansoni* (GRUPO 5).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	0.9	10.9	11.8	0.5	20.1	25.9	0.7	4.5	5.1
2	2.4	10.7	13.1	8.3	38.6	79.8	2.9	6.2	8.9
4	1.9	8.4	10.3	1.8	16.9	24.6	1.3	4.1	4.9
6	3.9	15.4	19.3	13.1	33.3	70.2	3.6	5.8	8.4
8	2.4	7.3	9.7	4.3	8.9	21.2	2.1	2.9	4.6
10	4.6	7.1	11.7	8.6	7.8	20.6	2.9	2.8	4.5
12	7.4	16.6	24.0	12.6	17.6	16.3	3.6	4.2	4.0
14	17.0	15.9	32.9	11.0	46.1	17.8	3.3	6.8	4.2
16	30.9	33.1	64.0	96.8	12.1	17.2	9.8	3.5	4.1
18	10.3	15.6	25.9	20.6	30.9	88.8	4.5	5.6	9.4
20	4.9	15.7	20.6	11.5	15.6	25.9	3.4	3.8	5.1
22	6.1	14.0	20.1	5.5	23.0	16.5	2.3	4.8	4.1
24	2.3	13.6	15.9	4.6	24.6	31.8	2.1	4.9	5.6

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebocitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados

TABELA X

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercária e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (GRUPO 6).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	6.4	8.7	15.1	10.9	11.6	17.1	3.3	3.4	4.1
2	4.0	10.1	14.1	10.3	13.1	12.8	3.2	3.6	3.6
4	7.6	16.3	23.9	28.9	20.2	5.5	5.4	4.5	2.3
6	11.1	11.6	22.7	2.1	14.1	16.3	1.5	3.8	4.0
8	16.3	15.7	32.0	5.2	31.9	42.7	2.3	5.6	6.5
10	7.0	9.0	16.0	16.3	25.3	15.7	4.0	5.0	3.9
12	7.7	7.4	15.1	5.2	14.3	12.5	2.3	3.8	3.5
14	14.7	10.9	25.6	19.2	27.5	21.9	4.4	5.2	4.7
16	22.0	11.6	33.6	10.3	18.6	13.9	3.2	4.3	3.7
18	7.7	24.3	32.0	18.2	22.2	15.7	4.3	4.7	3.9
20	1.4	22.9	24.3	2.6	12.8	20.2	1.6	3.6	4.5
22	31.9	11.4	43.3	13.5	14.9	22.2	3.7	3.9	4.7
24	20.3	13.7	34.0	7.2	12.2	17.0	2.7	3.5	4.1

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebócitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados

TABELA XI

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (GRUPO 7).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	2.6	11.0	13.6	2.3	10.3	8.6	1.5	3.2	2.9
2	2.6	14.4	17.0	4.9	19.3	15.7	2.2	4.4	3.1
4	2.0	12.3	14.3	0.6	9.6	10.6	0.8	3.1	3.3
6	6.9	9.7	16.6	13.1	11.9	7.3	3.6	3.5	2.7
8	10.0	13.4	23.4	16.0	7.9	11.9	4.0	2.8	3.5
10	13.7	26.3	40.0	14.6	17.2	4.7	3.8	4.2	2.2
12	49.1	27.4	76.5	157.1	153.6	527.9	12.5	12.4	22.9
14	25.4	23.9	49.3	22.3	24.5	2.9	4.7	4.9	1.7
16	33.7	24.4	58.1	50.9	34.3	6.8	7.1	5.9	2.6
18	30.0	20.7	50.7	5.3	17.9	9.6	2.3	4.2	3.1
20	29.4	23.1	52.5	42.3	25.8	9.3	6.5	5.1	3.0
22	25.6	24.4	50.0	52.6	60.3	2.0	7.3	7.8	1.4
24	30.4	22.1	52.5	63.6	27.1	12.6	7.9	5.2	3.6

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebócitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados

TABELA XII

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila*, expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção (GRUPO 8).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	4.3	11.6	15.9	4.6	3.9	4.8	2.1	1.9	2.1
2	5.7	13.7	19.4	4.2	5.2	5.9	2.1	2.3	2.4
4	5.4	12.9	18.3	4.3	6.5	14.9	2.1	2.5	3.9
6	7.3	14.9	22.2	4.2	3.1	2.5	2.1	1.8	1.6
8	7.1	13.3	20.4	42.1	27.9	112.6	6.5	5.3	10.6
10	4.3	16.4	20.7	6.6	6.3	23.6	2.6	2.5	4.9
12	10.1	14.7	24.8	25.8	7.6	32.5	5.1	2.8	5.7
14	13.4	9.0	22.4	44.2	57.7	145.9	6.7	7.6	12.1
16	16.1	14.0	30.1	49.8	54.0	120.1	7.1	7.3	10.9
18	21.1	15.1	36.2	107.8	84.1	88.6	10.4	9.1	9.4
20	25.7	12.0	37.7	84.2	33.3	53.6	9.1	5.8	7.3
22	17.9	15.4	33.3	9.1	24.9	20.2	3.0	4.9	4.5
24	20.0	13.3	33.3	51.3	28.2	84.2	7.1	5.3	9.2

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebócitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados

TABELA XIII

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni*, e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercária (GRUPO 9).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	2.9	8.7	11.6	26.1	31.6	107.3	5.1	5.6	10.4
2	2.4	7.1	9.5	3.6	14.1	17.9	1.9	3.7	4.2
4	2.9	7.3	10.2	8.1	7.1	14.1	2.9	2.7	3.8
6	3.4	7.6	11.0	16.6	8.6	42.0	4.1	2.9	6.5
8	3.1	5.4	8.5	5.5	7.6	20.6	2.3	2.8	4.5
10	6.1	13.0	19.1	20.1	51.0	119.8	4.5	7.1	10.9
12	5.3	11.0	16.3	8.9	21.3	22.2	2.9	4.6	4.7
14	18.6	8.3	26.9	110.9	83.6	326.1	10.5	9.1	18.1
16	6.7	6.7	13.4	6.2	13.9	17.6	2.5	3.7	4.2
18	12.3	12.6	24.9	21.2	15.3	34.1	4.6	3.9	5.8
20	10.4	22.6	33.0	19.6	19.6	52.0	4.4	4.4	7.2
22	27.6	15.9	43.5	24.6	31.1	78.6	4.9	5.6	8.9
24	13.7	11.9	25.6	53.6	14.8	23.6	7.3	3.8	4.9

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebócitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados

TABELA XIV

Número médio de amebócitos circulantes em *B. tenagophila*, expostas ao *S. mansoni*, e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercarias longifurcadas sem ocelo, (GRUPO 10).

Intervalo (horas)	Média			Variância			Desvio Padrão		
	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT	AE	ANE	AT
1/2	3.4	7.1	10.5	4.9	8.5	21.3	2.2	2.9	4.6
2	4.6	10.1	14.7	20.6	40.1	105.9	4.5	6.3	10.3
4	3.1	9.0	12.1	4.5	5.3	18.1	2.1	2.3	4.3
6	3.4	11.1	14.5	2.9	22.5	24.3	1.7	4.7	4.9
8	1.7	6.3	8.0	1.9	9.9	9.7	1.4	3.1	3.1
10	10.0	8.6	18.6	11.0	107.9	115.6	3.3	10.4	10.8
12	62.1	13.7	75.8	311.1	45.2	440.8	17.6	6.7	20.9
14	46.0	23.9	69.9	305.3	169.1	589.9	17.5	13.0	24.3
16	27.7	19.3	47.0	112.6	141.2	354.6	10.6	11.9	18.8
18	19.4	11.9	31.3	82.9	36.1	143.2	9.1	6.0	11.9
20	12.4	4.6	17.0	47.6	19.9	110.6	6.9	4.5	10.5
22	6.7	4.6	11.3	10.6	6.3	21.9	3.3	2.5	4.7
24	7.0	4.9	11.9	6.3	13.8	21.8	2.5	3.7	4.7

AE - Amebócitos Estrelados

AT - Amebócitos Totais

ANE - Amebócitos não Estrelados



TABELA XV

Taxa de penetração de miracídios e viabilidade dos esporocistos em *B. tenagophila* expostas à 100 miracídios de *S. mansoni* e inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção ou portadores de larvas de digenéticos.

Grupos experimentais	Taxa percentual de penetração de miracídios	N. de esporocistos		Porcentagem de esporocistos degenerados
		Integros	Degenerados	
GRUPO 3	10.3	17	14	45.15
GRUPO 4	10.6	18	14	43.75
GRUPO 5	10.3	7	24	77.41
GRUPO 6	10.6	17	15	46.86
GRUPO 7	10.3	9	22	70.96
GRUPO 8	10.6	16	16	50.00
GRUPO 9	10.3	14	17	54.83
GRUPO 10	10.3	15	16	51.61

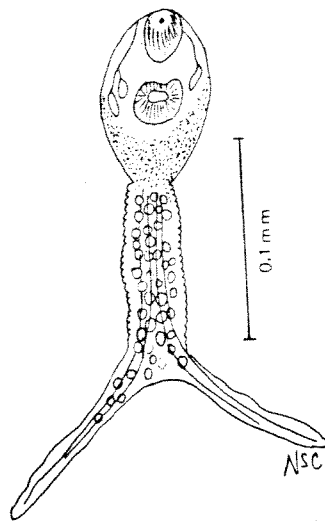


Figura 1 - Furcocercária longifurcada sem ocelo.

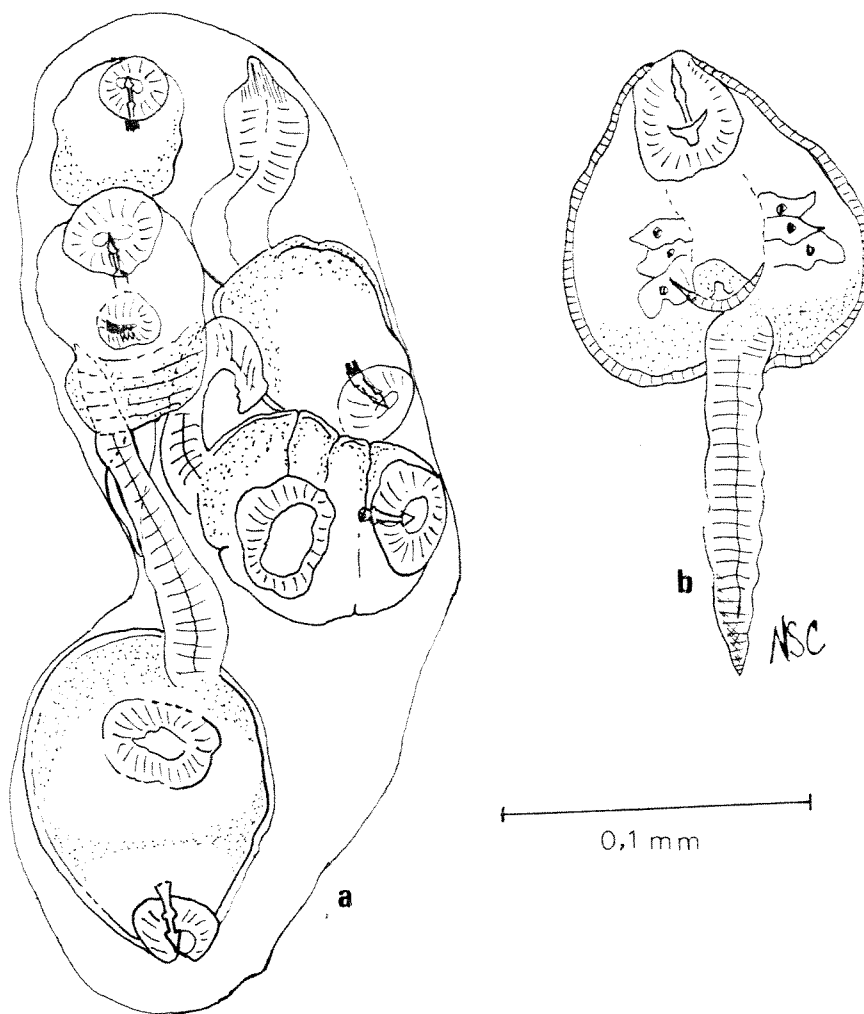


FIGURA 2 - a) Esporocisto contendo cercárias em diferentes fases de desenvolvimento.

b) Distomoxifiedocercária com acúleo oral.

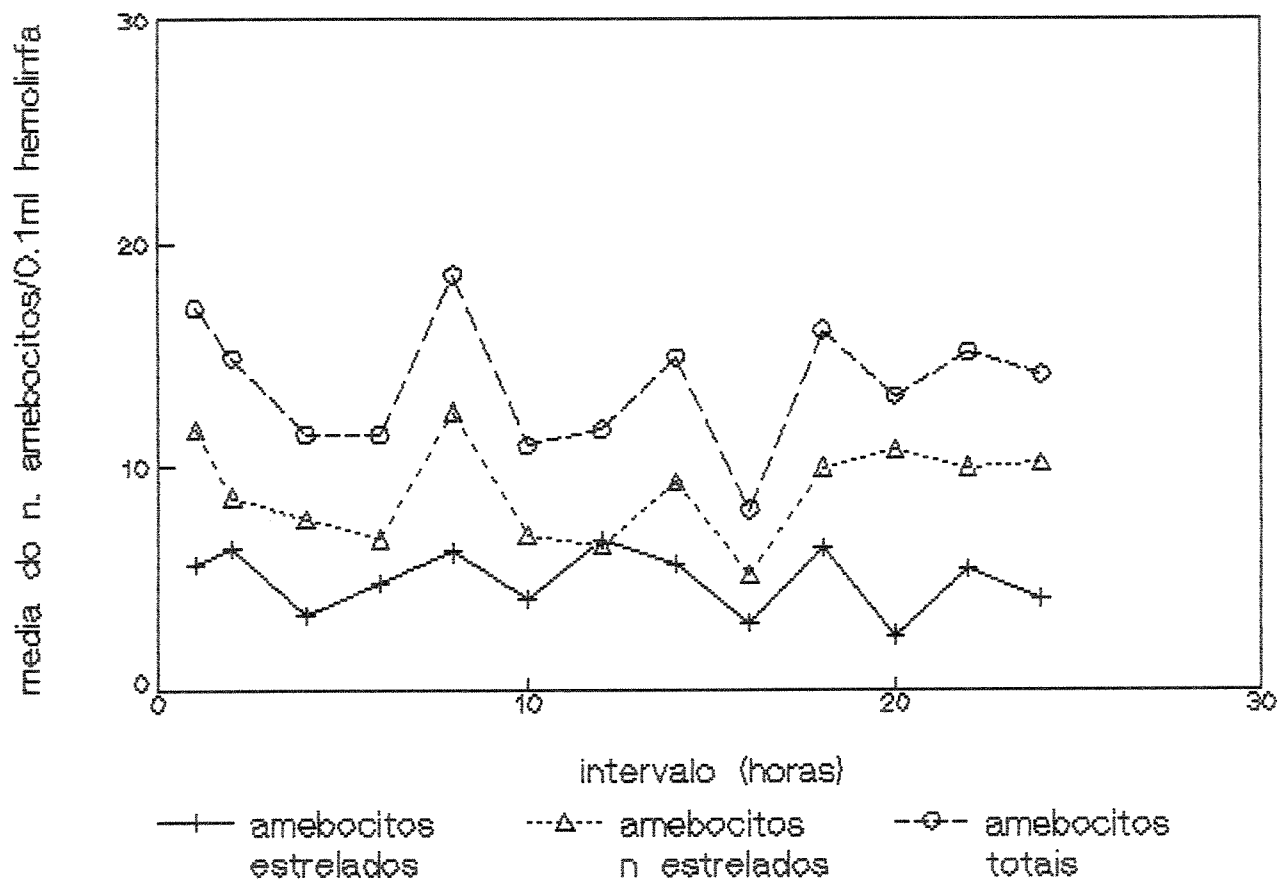


FIGURA 3 - Variação do número de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* livres de infecção (GRUPO 1).

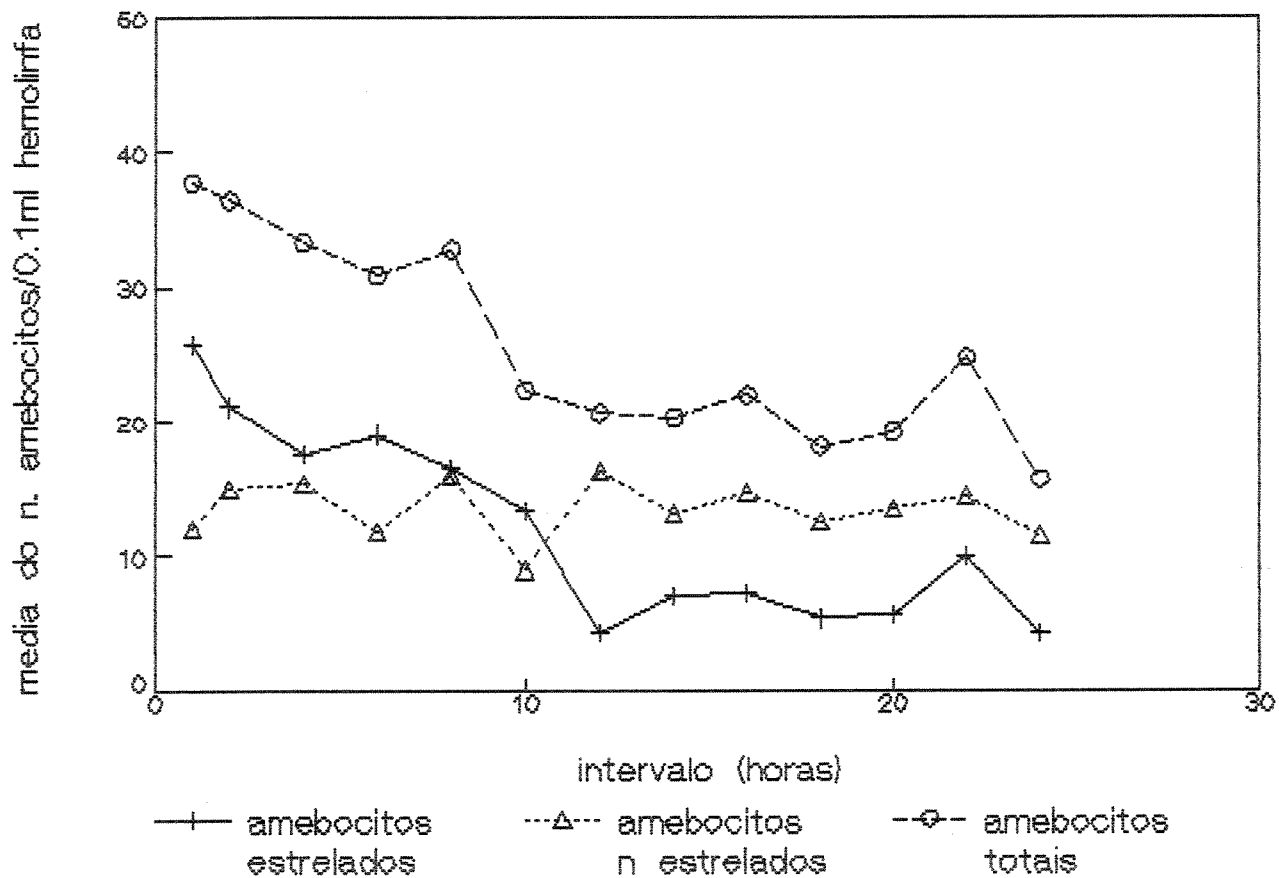


FIGURA 4 - Variação do número de amebócitos circulantes em *B. tenagophila*, submetidas a anestesia com mentol (GRUPO 2).

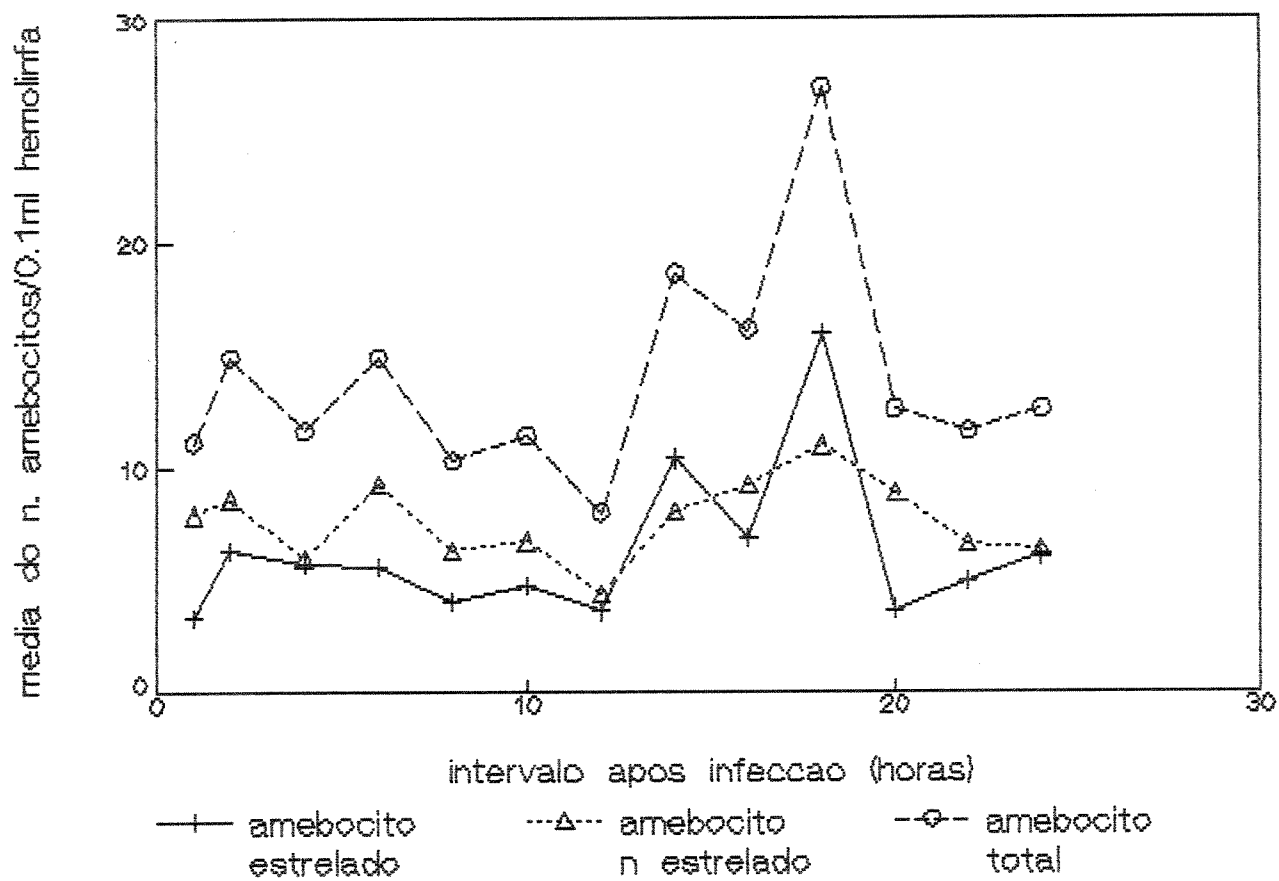


FIGURA 5 - Variação do número de amebócitos em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* (GRUPO 3).

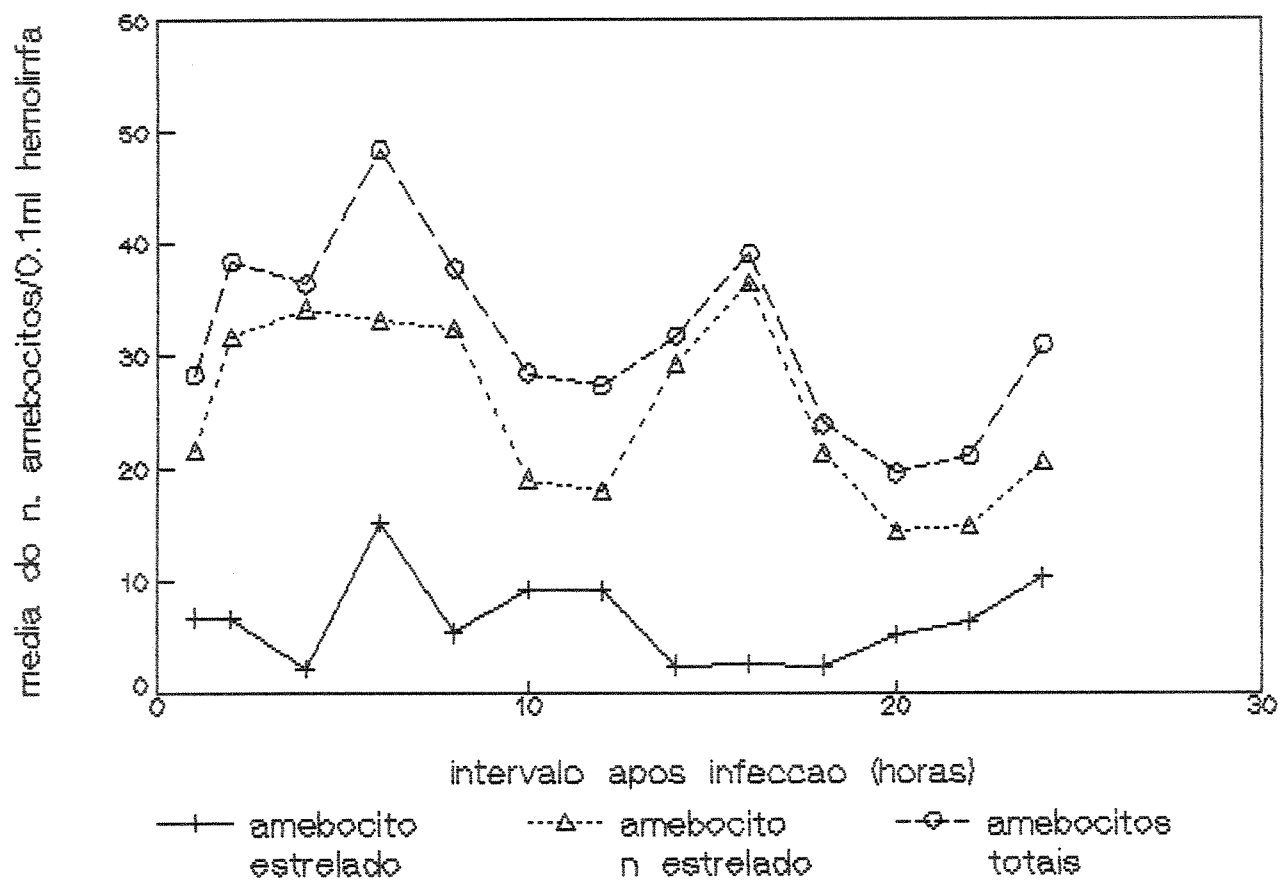


FIGURA 6 - Variação do número de amebócitos em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (GRUPO 4).

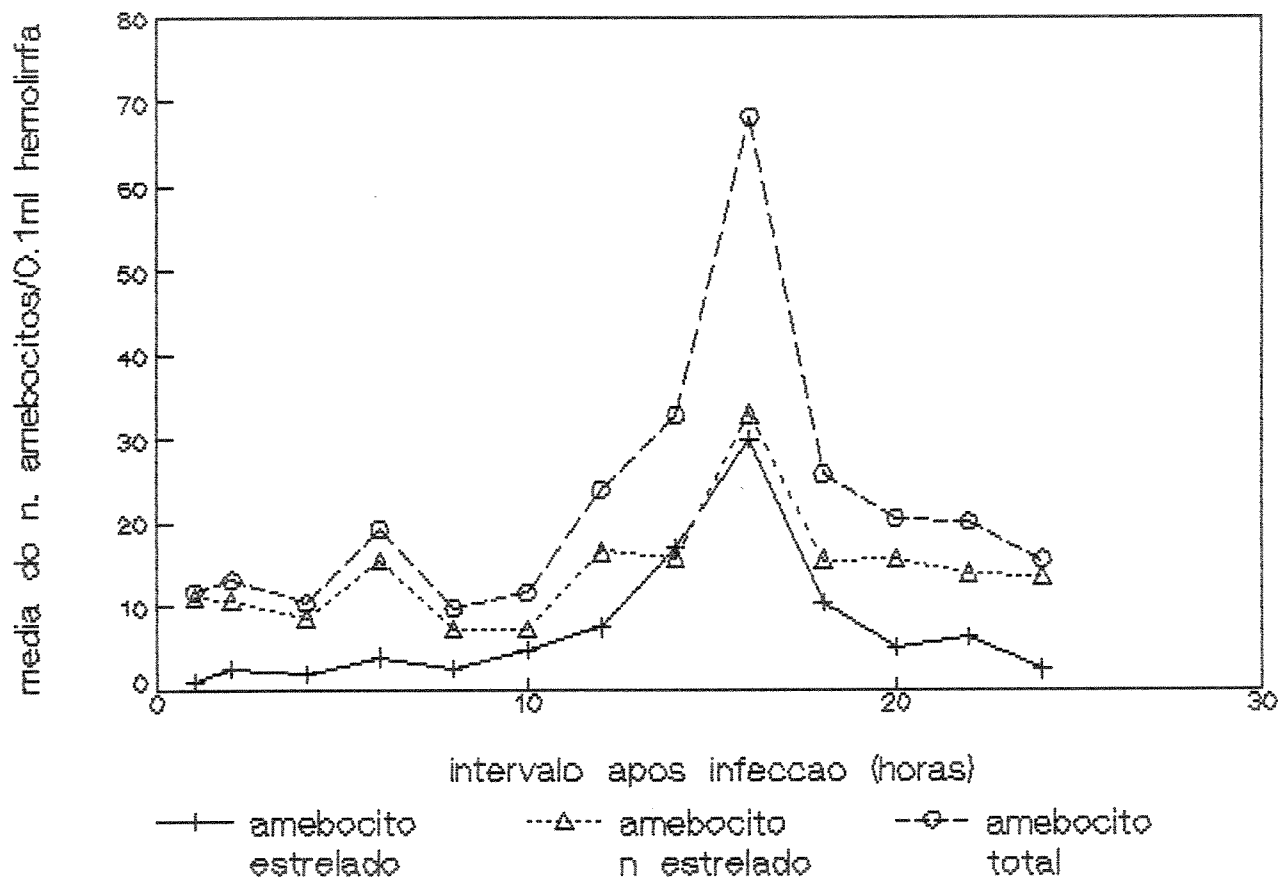


FIGURA 7 - Variação do número de amebócitos em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (GRUPO 5).



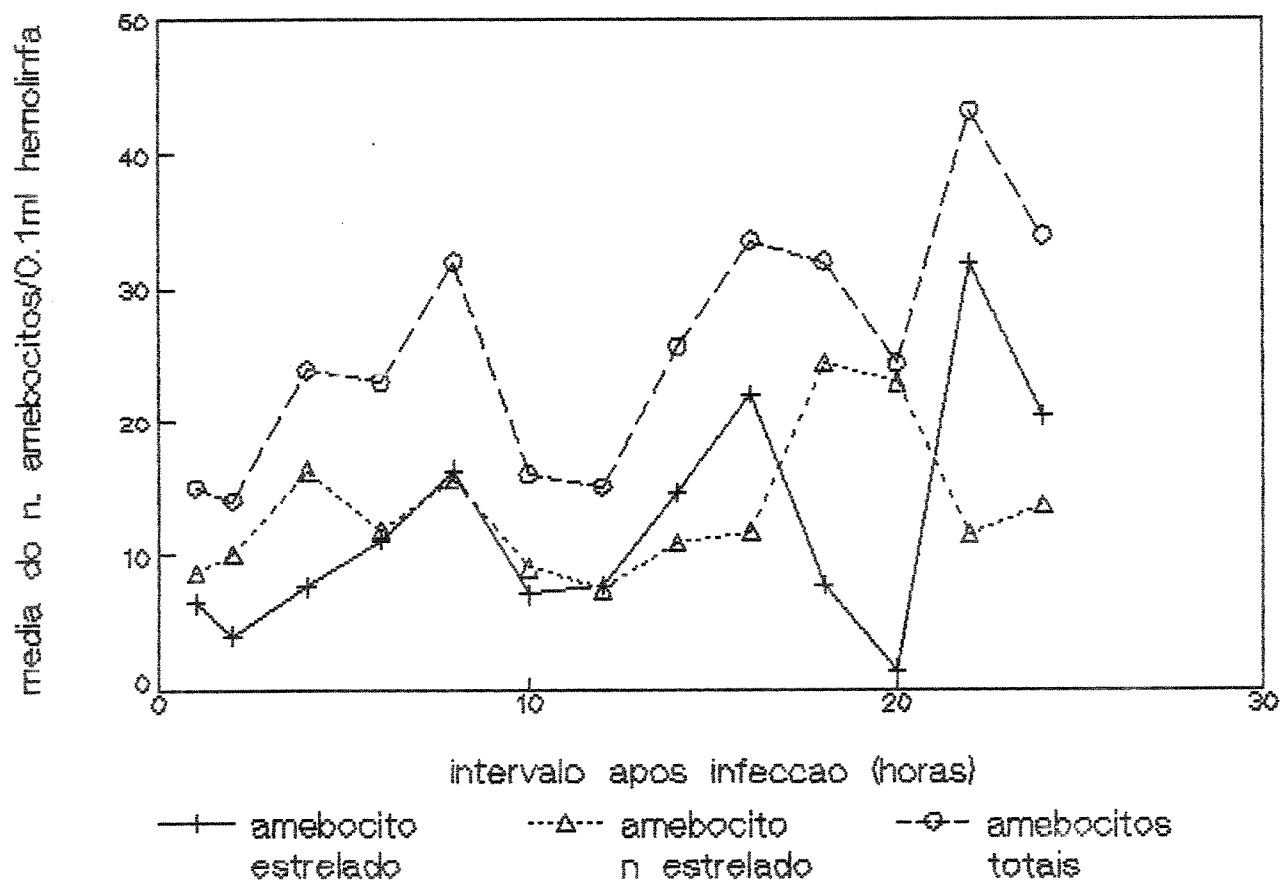


FIGURA 8 - Variação do número de amebócitos em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercárias e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (GRUPO 6).

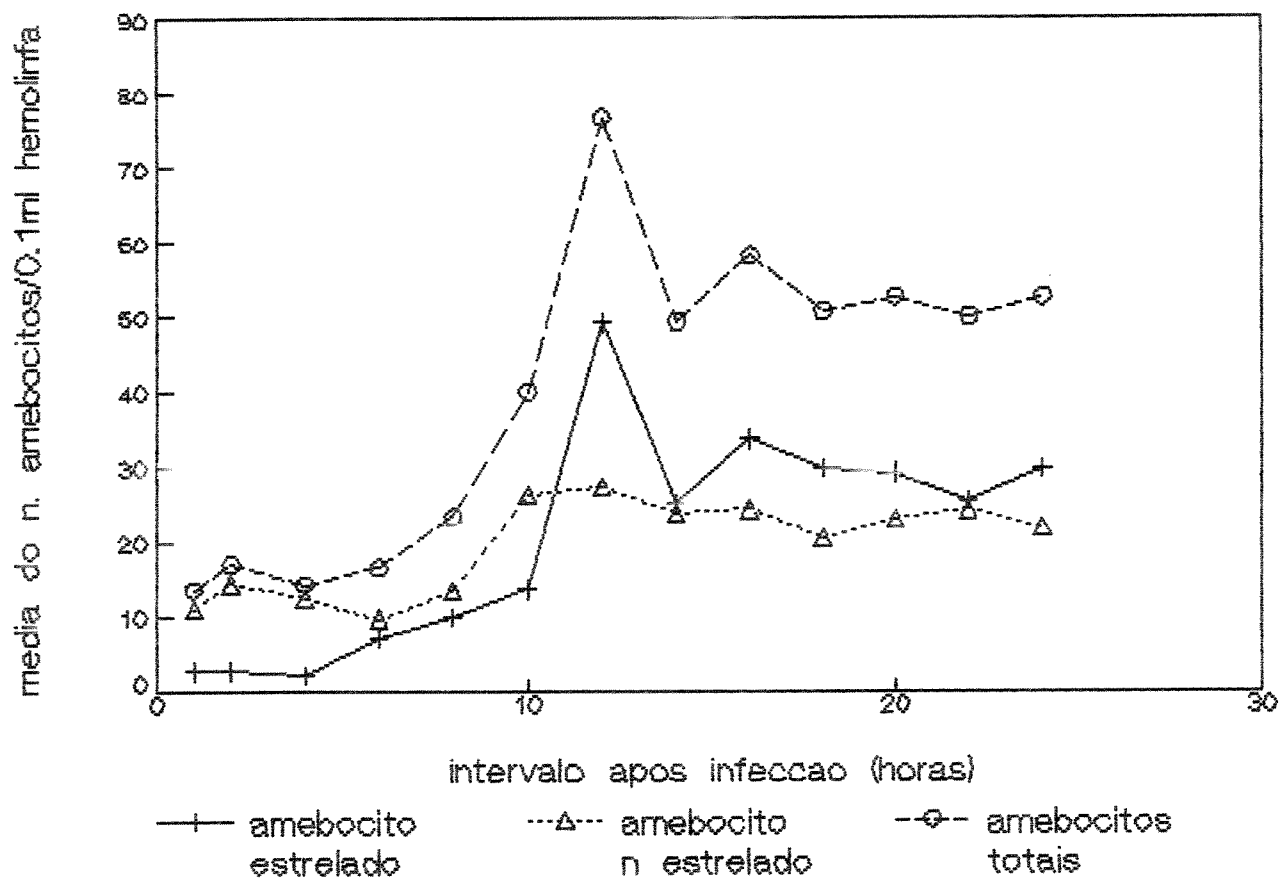


FIGURA 9 - Variação do número de amebócitos em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (GRUPO 7).

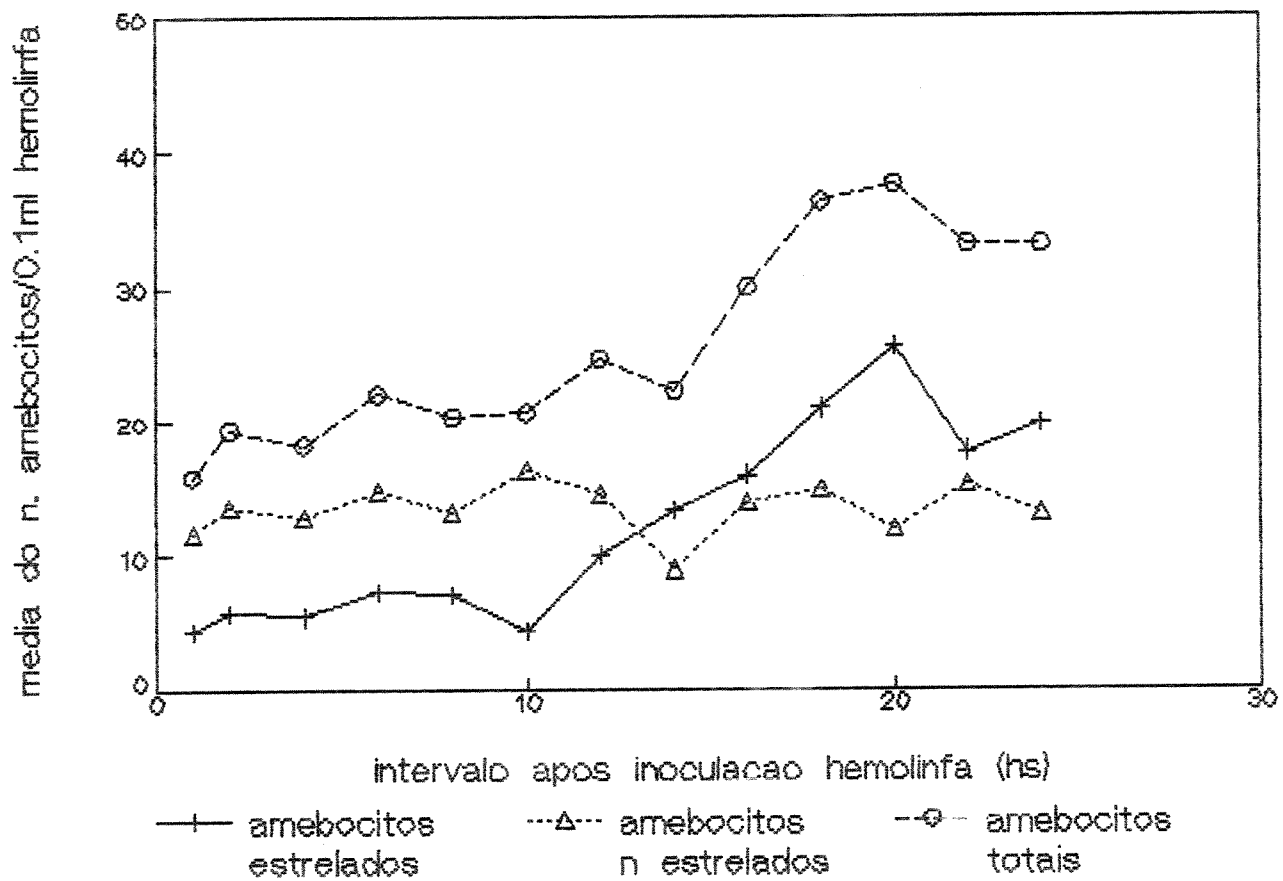


FIGURA 10 - Variação do número de amebócitos em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção (GRUPO 8).

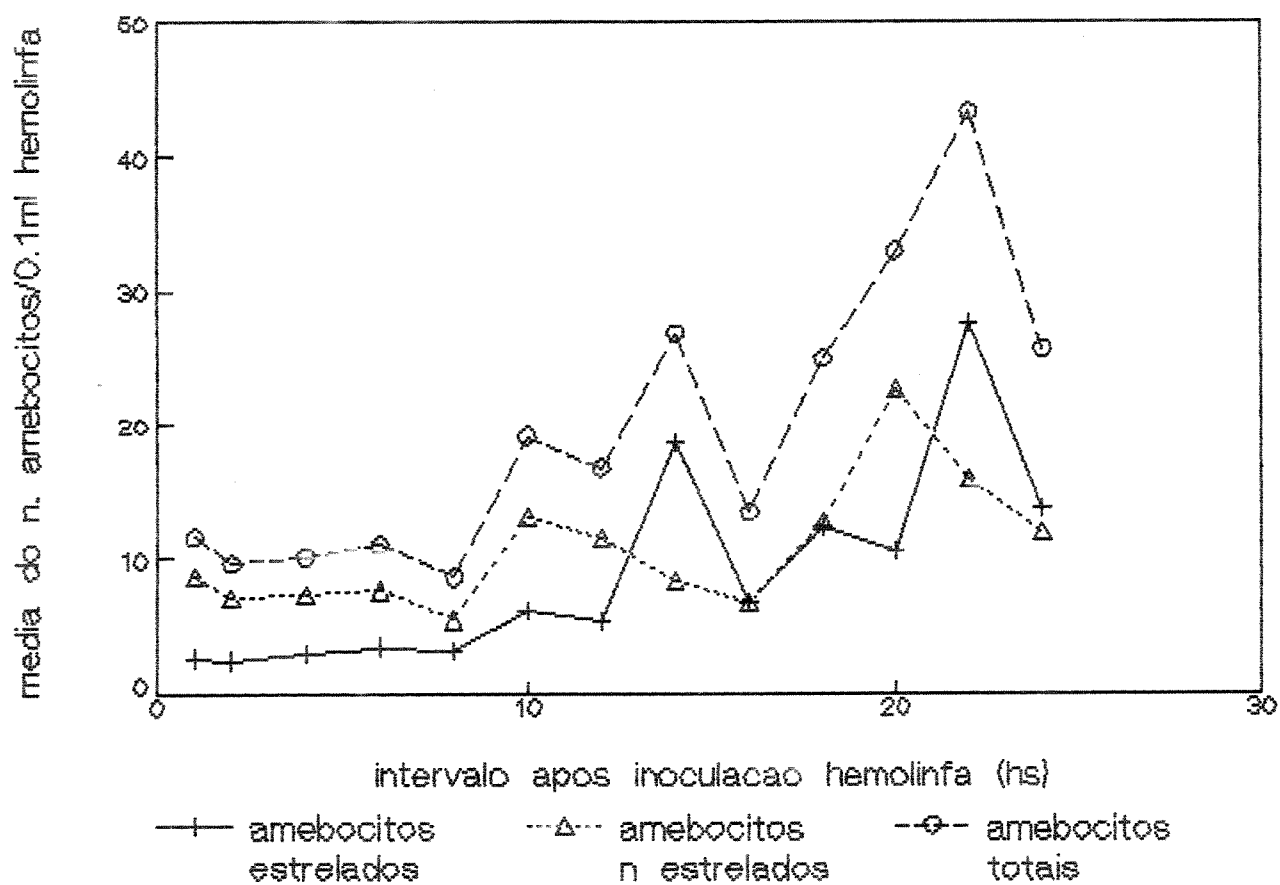


FIGURA 11 - Variação do número de amebócitos em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxífideocercárias (GRUPO 9).

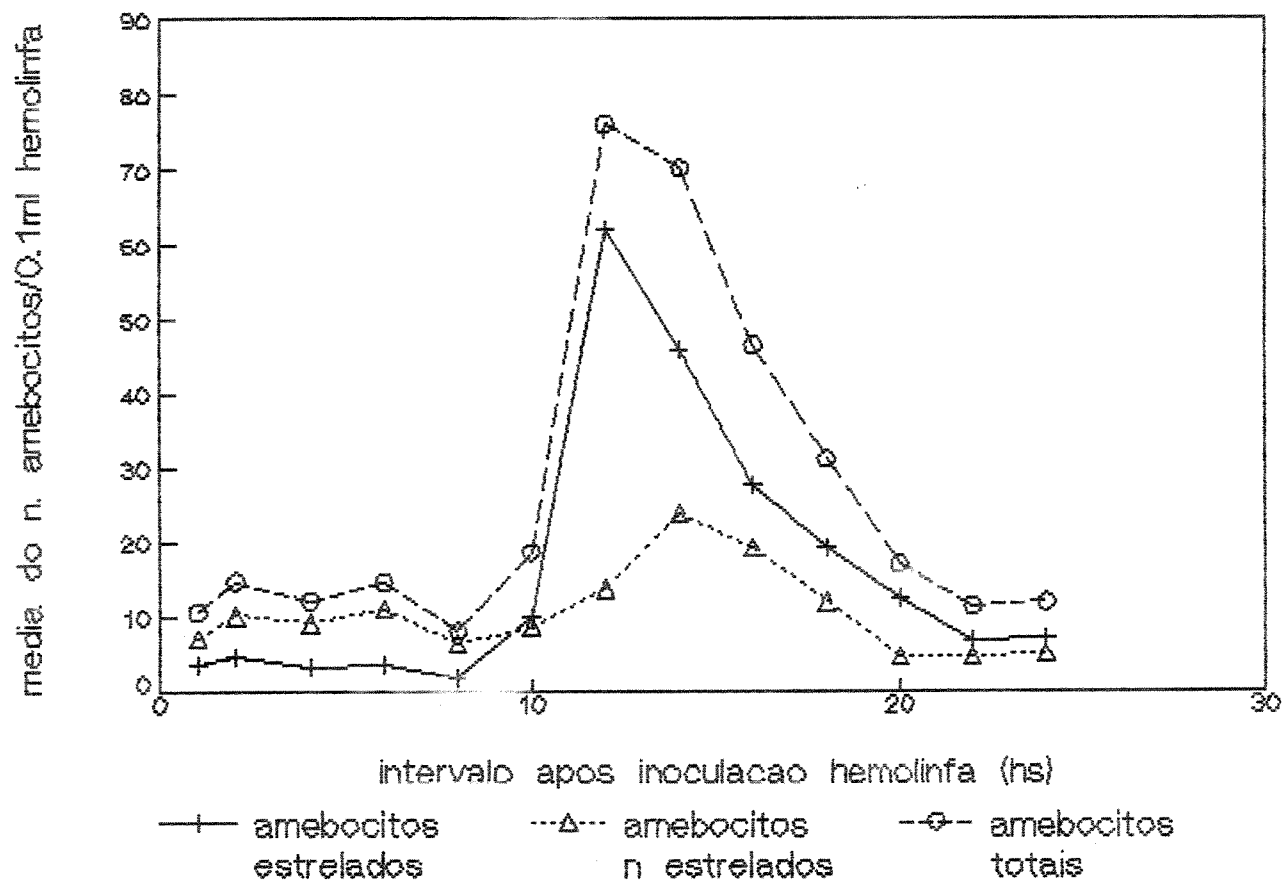


FIGURA 12 - Variação do número de amebócitos em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo (GRUPO 10).

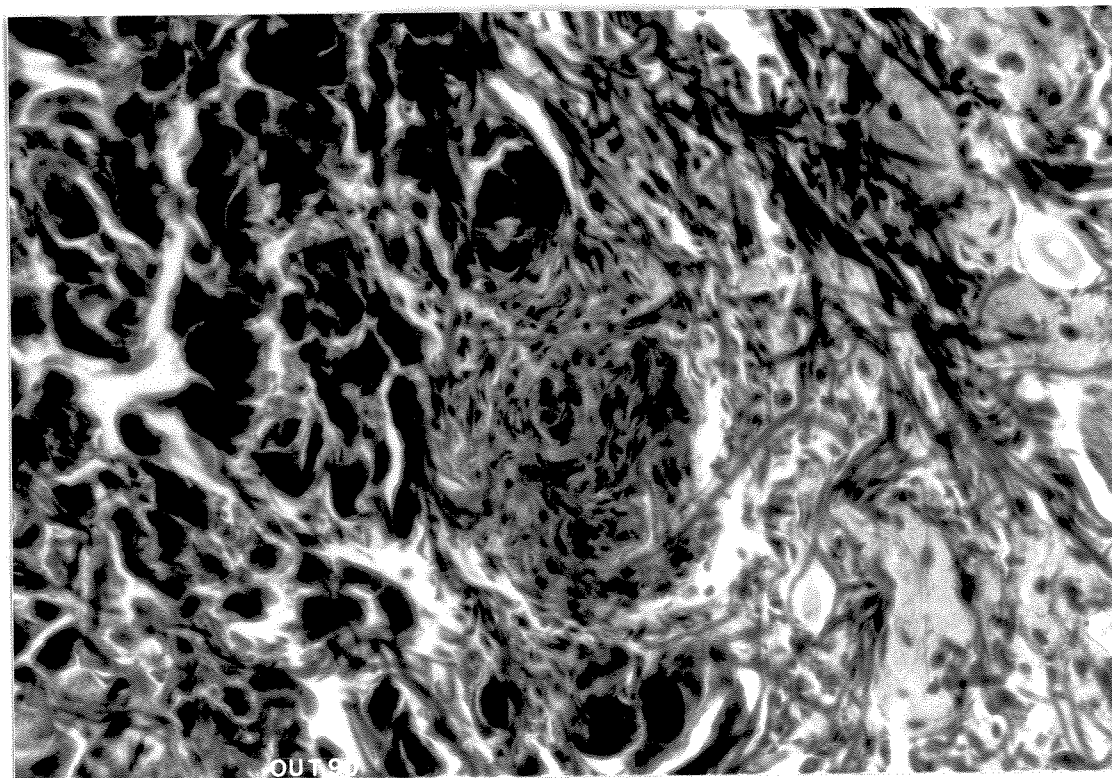


FIGURA 13 - Corte histológico de *B. tenagophila* inoculada com hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, 12 horas após à exposição. Infiltrado amebocitário em disposição concentrica ao redor da larva de *S. mansoni*. Tricrômico de Gomori, X 312.50.

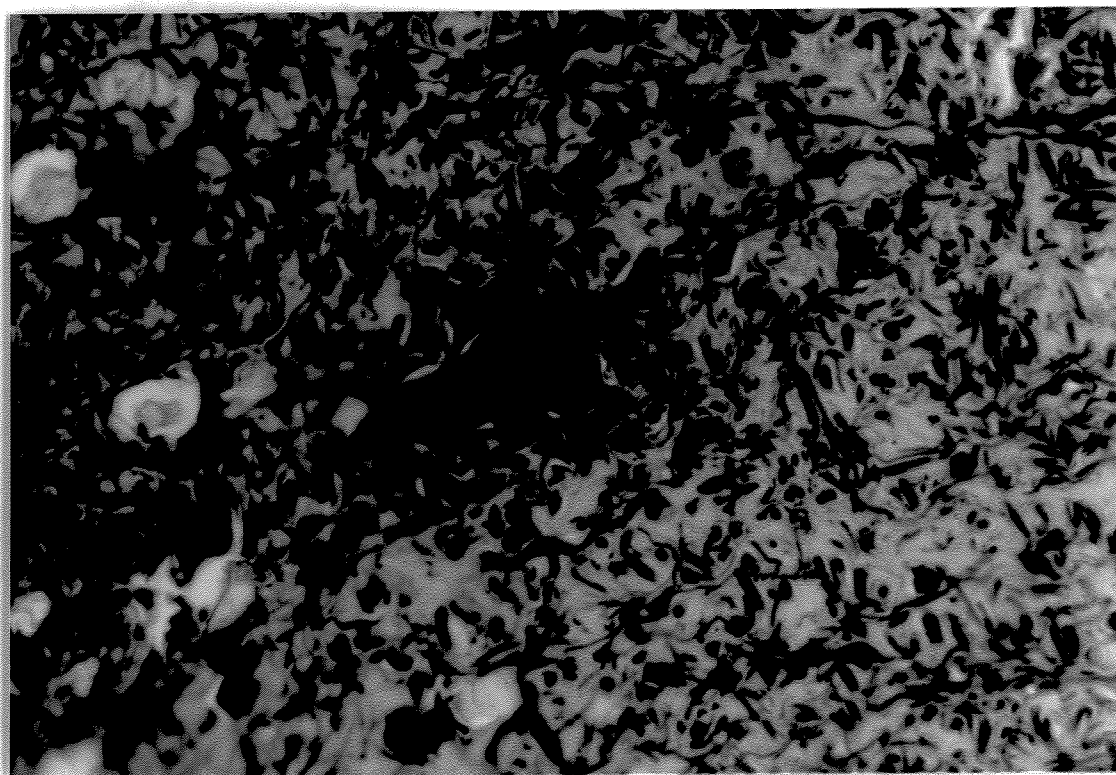


FIGURA 14 - Corte histológico de *B. tenagophila* inoculada com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, 24 horas após à exposição. Reação amebocitária moderada ao redor da larva de *S. mansoni*. Tricrômico de Gomori, X 312.50.

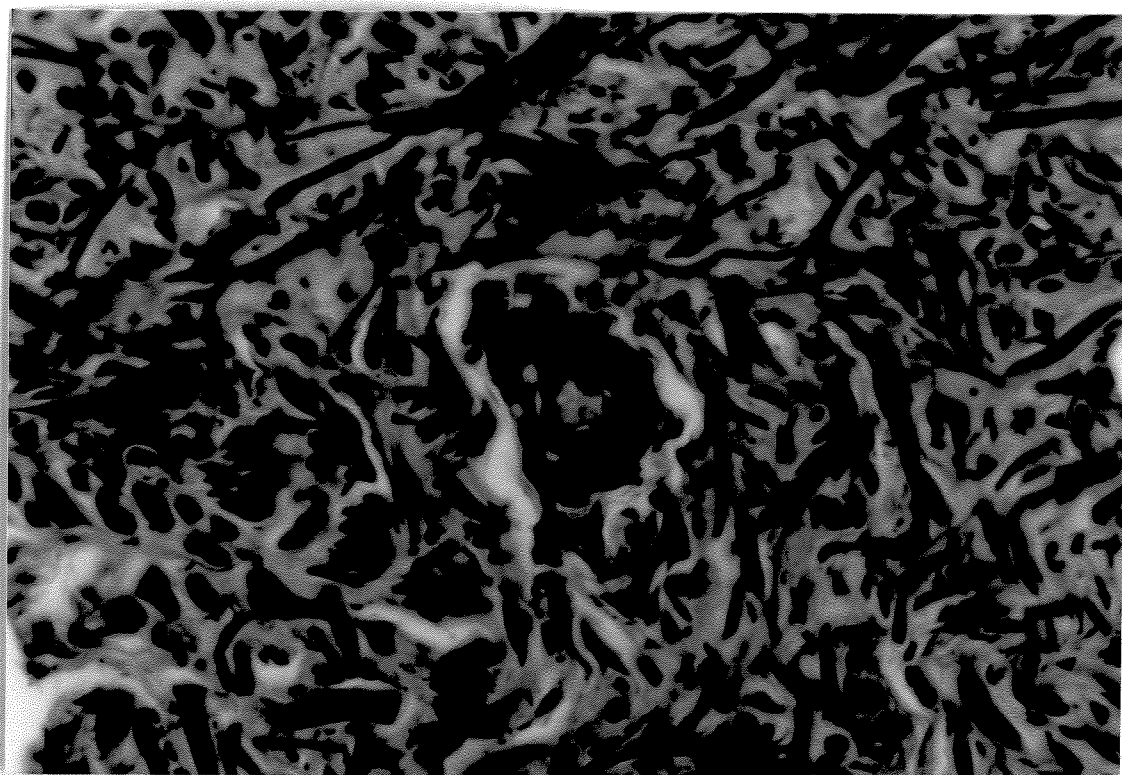


FIGURA 15 - Corte histológico de *B. tenagophila* inoculada com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, 24 horas após a exposição. Reação amebocitária ao redor da larva de *S. mansoni*. A larva aparentemente isolada do tecido adjacente. Tricrômico de Gomori, X 500.00.



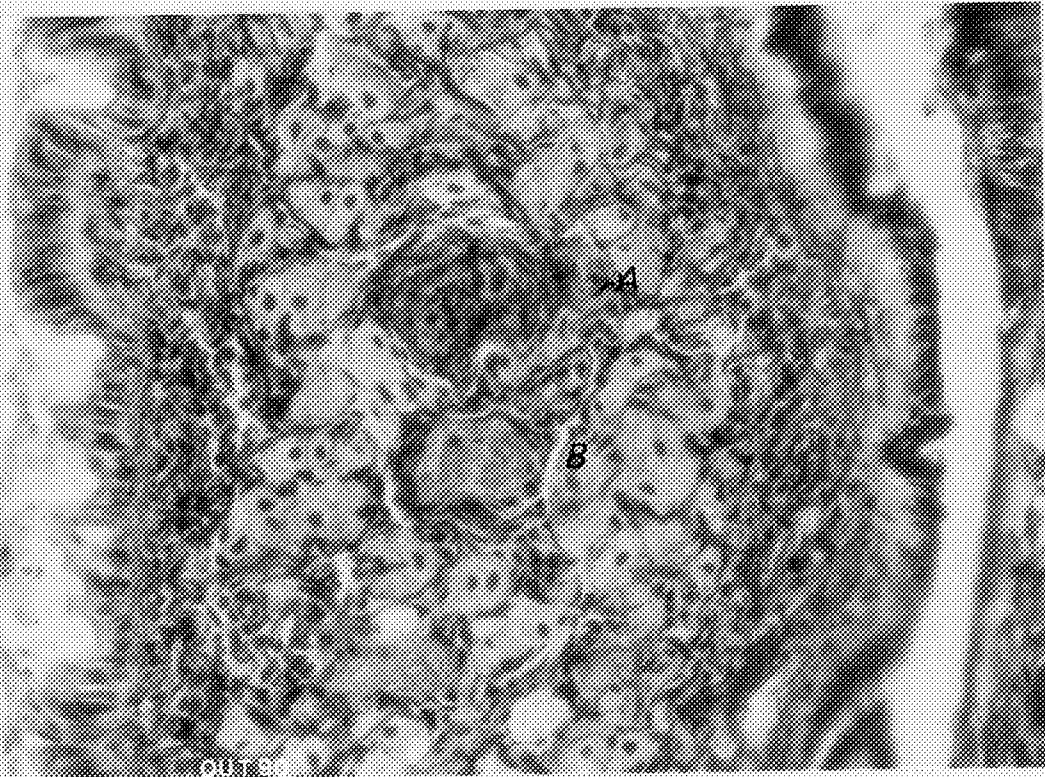


FIGURA 16 - Corte histológico de *B. tenagophila* inoculada com hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, 24 horas após a exposição

A - Larva de *S. mansoni*, íntegra com moderada reação amebocitária em disposição concêntrica.

B - Larva de *S. mansoni*, em degeneração com moderada reação amebocitária ao redor.

Tricrômico de Gomori, X 312.50.

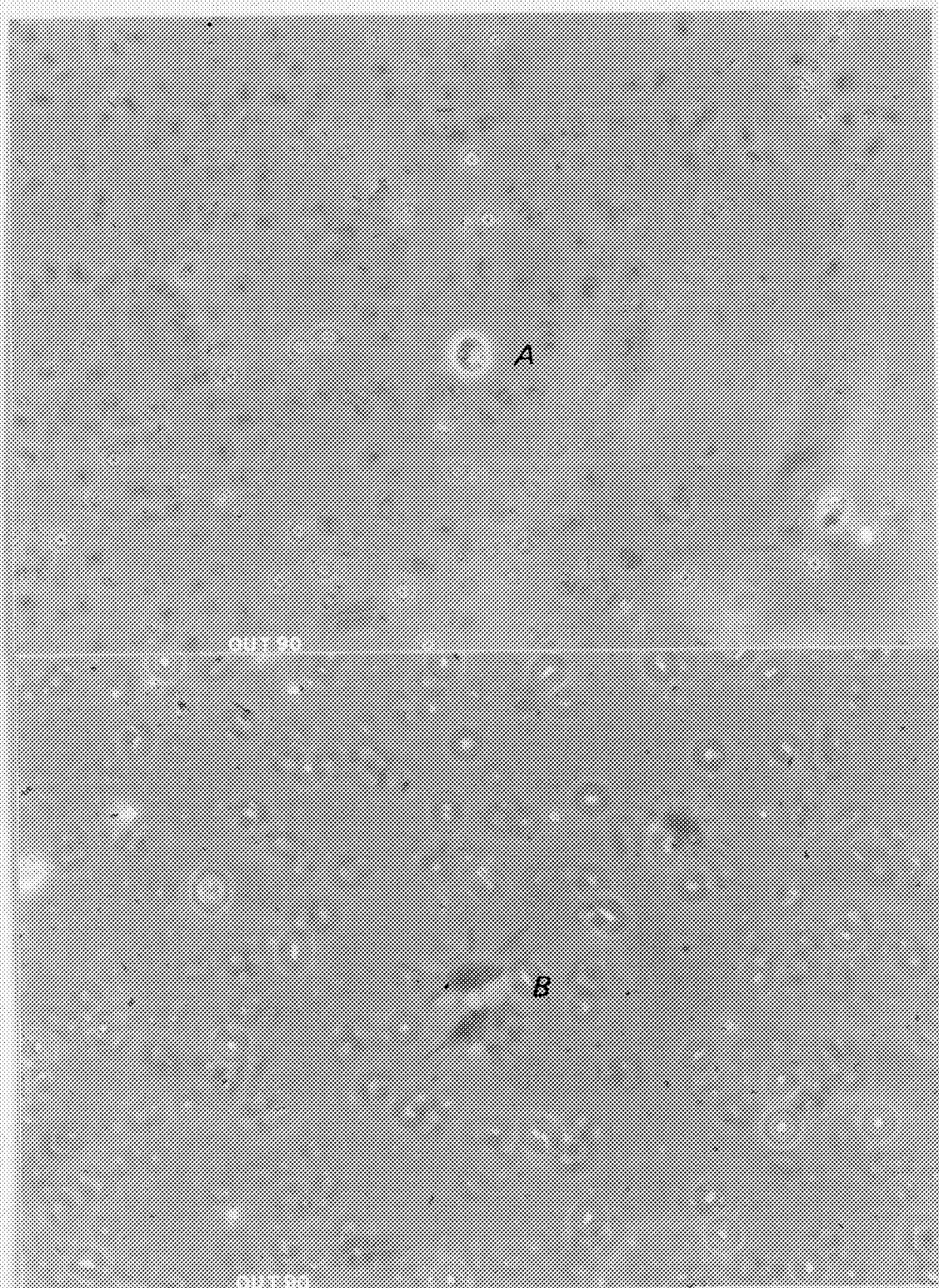


FIGURA 17 - Fotomicrografia de amebócitos de *B. tenagophila* livres de infecção.  
A - Amebócito não estrelado (Hialinócito)  
B - Amebócito estrelado (Granulócito)  
Material fresco observado em microscopia de fase, X 500.00.

## 5 - DISCUSSÃO

Nosso trabalho consistiu na análise da ação da hemolinfa (comportamento dos amebócitos) nos mecanismos de defesa de *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados ou não infectados por digenéticos e expostos ao *S. mansoni* antes ou depois da inoculação de hemolinfa. A análise dos resultados do nosso trabalho pode ser subdividida em partes.

Inicialmente, verificamos a taxa de infecção natural dos moluscos capturados no criadouro. Em seguida, passamos a uma avaliação da resistência ou não à infecção por *S. mansoni*, em *B. tenagophila*. Esta avaliação foi efetuada através da inoculação de hemolinfa de moluscos infectados por diferentes digenéticos. Quantificamos os amebócitos presentes na hemolinfa desses planorbídeos. Finalmente, observamos as reações teciduais presentes nos cortes histológicos e quantificamos esporocistos integros e degenerados.

A taxa de infecção natural dos moluscos capturados no criadouro foi de 5.8%. Essa taxa apresentou-se mais baixa do que aquela anteriormente observada por nós (MACHADO et alii., 1988). A queda percentual da infecção natural, provavelmente foi devido ao fato de estar

ocorrendo um loteamento imobiliário próximo ao local, levando ao desmatamento de uma reserva nativa e com isso alterando toda a fauna frequentadora do criadouro. Certamente a fauna frequentadora de um criadouro de moluscos vetores de *S. mansoni* influi no grau e no tipo de infecção desses moluscos podendo propiciar o desenvolvimento de larvas de espécies diferentes de digenéticos. Verificamos também que a diversidade de espécies de trematódeos foi menor do que a observada por nós anteriormente (MACHADO et alii., 1988). Apenas dois tipos de cercárias foram encontradas: furcocercária longifurcada sem ocelo (Fig. 1) e distomoxifideocercária (Fig.2), sendo que a taxa de infecção natural nos planorbídeos foi de 3.4% e 2.3%, respectivamente. A infecção natural dos moluscos foi monoespecífica. Vale salientar que em nosso trabalho anterior (MACHADO et alii., 1988) encontramos infecção concomitante com percentual baixo de equinostomocercária e de furcocercária dotada de ocelo, assim como de furcocercária oceladas com furcocercária longifurcada sem ocelo. No presente trabalho ocorreu uma diminuição no número de exemplares coletados nos meses de abril e junho de 1989 (Tabela II), sendo que não houve moluscos naturalmente infectados nas referidas coletas.

Analisando a contagem de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* livres de infecção (Grupo 1), observamos que

o número médio de amebócitos não estrelados e estrelados oscilou nos diferentes intervalos (fig. 3), sendo esta oscilação não significativa nos diferentes horários ( $p=0.282$ ).

Em *B. tenagophila* livres de infecção e submetidas apenas a anestesia, os amebócitos não estrelados permaneceram em uma média elevada e os amebócitos estrelados apresentaram-se nas primeiras 10 horas bastante elevados (Fig. 4). Acreditamos que os moluscos uma vez anestesiados, se encontrem mais "relaxados" e isso facilite a migração dos amebócitos fluírem para a região céfalo-podal, acarretando uma concentração maior dessas células nesse local. Apesar de verificarmos que o mentol utilizado como anestésico aumentou o número de amebócitos circulantes, esta foi a substância utilizada como anestésico que menos interferiu nos moluscos (SETA, L comunicação pessoal).

Nas *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* (Grupo3), o número de amebócitos não estrelados não variou significativamente. No entanto os amebócitos estrelados sofreram um aumento na circulação entre 14 e 18 horas após a exposição. O aumento das 18 horas foi muito significativo ( $p=0.006$ ) em relação as demais horas (fig.5). Estas variações do número de amebócitos foram precoces se



comparadas às observadas por SANTANA (1990), que verificou que o "pico" máximo dos amebócitos não estrelados e estrelados foi em torno de 24 horas após exposição ao *S. mansoni*. No entanto, o aumento de amebócitos, por nós verificado, está dentro do período de intensa atividade mitótica do APO. JOKY & MATRICON-GONDRAN (1985) verificaram que, nas primeiras 48 horas, após a infecção, observa-se intensa atividade mitótica do APO, quando estimularam *B. glabrata* com *Echinostoma caproni*.

A taxa de infecção nos moluscos expostos ao *S. mansoni* foi de 38.46% em 60 dias pós-exposição. Essa taxa foi bem mais baixa do que a observada anteriormente (61%) por nós (MACHADO et alii., 1988). Na avaliação das reações amebocitárias destes moluscos, observamos que ocorreu uma intensa reação ao redor das larvas de *S. mansoni*, não havendo diferença nos intervalos observados, sendo que o número de esporocistos degenerados foi de 45.15%. Estes resultados podem explicar a baixa taxa de infecção, pelo fato de que os moluscos paulistas, mais resistentes à infecção, seriam capazes de produzir um maior número de amebócitos, ou que estas células possuam, neste moluscos maior capacidade de agressão (GUARALDO et alii., 1981). Não se pode, também excluir a possibilidade da larva de *S. mansoni* da linhagem SJ atrair maior número de células de defesa do hospedeiro.

Em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (Grupo 4), verificamos uma taxa de infecção de 48.71%, sendo esta percentagem maior do que a observada nos moluscos não submetidos a inoculação de hemolinfa (Grupo 3) 38.46%, diferença essa significativa ( $p=0.37$ ). As reações amebocitárias apresentaram-se discretas e a taxa de esporocistos degenerados foi de 43.75%, sendo esta taxa ligeiramente mais baixa do que a observada nos moluscos não submetidos a inoculação de hemolinfa (Grupo 3 - 45,15%), diferença não significativa ( $p=0.251$ ). Os amebócitos não estrelados nas *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (Grupo 4), apresentaram média elevada na circulação (Fig.6), o mesmo não ocorrendo com os amebócitos estrelados que apresentaram média bem abaixo da apresentada pelos amebócitos não estrelados; com diferença muito significativa ( $p=0.045$ ). Por esses resultados, acreditamos que a inoculação de hemolinfa de moluscos livres de infecção aja como imunossupressora nas *B. tenagophila* que, após a inoculação de hemolinfa, foram expostas ao *S. mansoni* (Grupo 4).

Em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de

infecção (Grupo 8), obtivemos uma taxa de infecção semelhante (48.48%) a da que obtivemos nas *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas à infecção pelo *S. mansoni* (Grupo 4), 48.71%. Este resultados fortalecem a nossa hipótese de que a inoculação de hemolinfa de moluscos livres de infecção atue como imunossupressora em *B. tenagophila*. Verificamos que os esporocistos degenerados em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção (Grupo 8) foi maior (50.0%) do que nas *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (Grupo 4) 43.75%, diferença significativa ( $p=0.37$ ). Este fato provavelmente ocorreu devido ao aumento do número de amebócitos estrelados a partir das 12 horas, atingindo um pico 20 horas após a inoculação de hemolinfa de moluscos livres de infecção em *B. tenagophila*, anteriormente expostas ao *S. mansoni* (Grupo 8).

Em exemplares de *B. tenagophila* inoculados com hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente expostos ao *S. mansoni* (Grupo 5), verificou-se que 20.0% dos exemplares tornaram-se infectados. Estes dados foram altamente significativos ( $p=0.005$ ) com relação a *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* (Grupo 3). O que



nos leva a afirmar que houve forte proteção à infecção por *S. mansoni* em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, 80%. Acreditamos que este elevado grau de proteção se deva ao fato de que quando os moluscos foram submetidos à infecção, os amebócitos já se encontravam sensibilizados, devido a prévia inoculação de hemolinfa de moluscos infectados. Segundo SULLIVAN et alii., 1982, em *B. glabrata* sensibilizadas por miracídios irradiados de *Ribeiroia* marinha, há um aumento do número de amebócitos, sendo que as larvas de *S. mansoni* são destruídas. Esse autor chamou esse processo de "indução adquirida". Ressaltamos que na avaliação dos cortes histológicos de *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, constatou-se uma percentagem de esporocistos degenerados muito elevada 77.41%. Em estudos realizados por LOKER et alii., 1986, com hemolinfa de *B. glabrata* infectada com *Echinostoma paraensei*, "in vitro", houve destruição de esporocistos de *S. mansoni*. Esta observação levou esses pesquisadores a acreditar que componentes da hemolinfa (fatores humorais ou fatores do soro) de exemplares resistentes, destruiriam esporocistos de *S. mansoni* em inoculações conjuntas. Em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni*, os esporocistos apresentaram-se envolvidos por

intensa reação amebocitária (Fig. 13). Esses resultados estão em concordância com os dados de varios autores que verificaram resistência à infecção em moluscos sensibilizados por infecções prévias (LIE et alii., 1976; LIE & HEYNEMAN, 1976A e JOKY & MATRICON-GONDRAN, 1985).

Pelos dados disponíveis na literatura e pelos nossos resultados, confirma-se mais uma vez que, um dos processos de defesa em moluscos do gênero *Biomphalaria*, é de natureza celular, ou seja, células da hemolinfa reconhecem e reagem à invasão de materiais estranhos, mediante fagocitose ou encapsulamento.

Como em nossas inoculações utilizamos hemolinfa total, resta a dúvida se a resistência induzida ocorreu por conta da ação de amebócitos sensibilizados pela presença de larvas de *S. mansoni*, ou então se ocorreu por conta de alguma substância indutiva de reação nociva às larvas, presente na parte líquida da hemolinfa (YOSHINO et alii., 1977; SANTANA et alii., 1985).

Com relação ao aumento do número de amebócitos circulantes na hemolinfa, observamos que o número de amebócitos estrelados permaneceu sempre em um nível abaixo do número de amebócitos não estrelados, na maioria do período de observação (24 horas). O número de amebócitos estrelados atingiu um pico, aproximadamente, 16 horas após à exposição ao *S. mansoni*. Esta observação nos leva a acreditar que os amebócitos estrelados, na maior parte do

tempo, estavam nos tecidos, daí a grande quantidade de esporocistos degenerados (Tabela XV).

**B. tenagophila**, inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxífideocercárias e posteriormente expostas ao **S. mansoni** (Grupo 6), apresentaram uma taxa de infecção 43.24%, maior do que os moluscos não submetidos a inoculação de hemolinfa (Grupo 3, 38.46%). Esta diferença foi significativa ( $p=0.47$ ). No entanto não foi significativa ( $p=0.273$ ) a diferença entre a percentagem de esporocistos degenerados encontrados nos moluscos não submetidos à inoculação de hemolinfa (Grupo 3, 45.15%) e a percentagem de esporocistos degenerados encontrados em **B. tenagophila** inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxífideocercárias e posteriormente expostas ao **S. mansoni** (Grupo 9, 46.87%). Com relação ao número de células amebocitárias circulantes na hemolinfa, observamos uma oscilação acentuada com três pequenos picos, 8, 16 e 22 horas após a exposição ao **S. mansoni** (Fig. 8), sendo que esses picos foram devidos ao aumento de amebócitos estrelados. Como estes aumentos foram significativos com relação aos demais intervalos, acreditamos ter havido uma intensa produção destas células, (que estão na circulação e nos tecidos vice-versa). Talvez esse fato explique o número de esporocistos degenerados ser um pouco maior neste grupo do que no grupo de moluscos não

submetidos a inoculação de hemolinfa.

Em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercárias (Grupo 9) verificou-se maior taxa de infecção (48.48%) se comparada com a taxa obtida em moluscos não submetidos a inoculação de hemolinfa (Grupo 3, 38.46%) e com a taxa obtida em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercárias e logo após expostas ao *S. mansoni* (Grupo 6, 43.24%). Estas diferenças foram significativas, respectivamente aos níveis de  $p=0.006$  e  $0.003$ . Nas *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de distomoxifideocercária (Grupo 9) os amebócitos apresentaram dois picos, 14 e 22 horas (Fig. 11) após inoculação, sendo esse aumento devido aos amebócitos estrelados. Os esporocistos degenerados observados neste grupo apresentaram-se com uma percentagem de 54.83%, taxa maior do que a obtida nos moluscos não submetidos à inoculação de hemolinfa (Grupo 3 - 45.15% e também maior do que a taxa obtida em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercária e logo após expostas ao *S. mansoni* (46.86%).

Observamos que tanto em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por

distomoxifideocercária e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (Grupo 6) e *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercária (Grupo 9), as taxas de infecção ao *S. mansoni* foram bem maiores (43.24% e 48.48%) do que a anteriormente por nós obtida em *B. tenagophila* capturadas no campo com infecção concomitante de distomoxifideocercária e *S. mansoni* 12% (MACHADO et alii., 1988). Podemos supor que a presença de distomoxifideocercária no interior dos moluscos interfere mais no desenvolvimento do *S. mansoni* do que a inoculação de hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercária anteriormente ou após a exposição ao *S. mansoni*, talvez pelo fato das distomoxifideocercárias já estarem "instaladas" no interior dos diversos órgãos dos moluscos, quando se deu a exposição ao *S. mansoni*. Não observamos reação amebocitária ao redor dos esporocistos de *S. mansoni* em moluscos com dupla infecção (MACHADO et alii., 1988). Parece que nesses moluscos com infecção dupla, a resistência apresentada esteja relacionada com algum outro fator de defesa do moluscos e não por ativação de amebócitos. Não se pode, também, excluir a possibilidade de inibição dos amebócitos frente a uma infecção dupla.

Em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem

ocelo e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (Grupo 7), houve 24.24% de moluscos infectados por *S. mansoni*, resultados altamente significativos quando comparados com os moluscos não submetidos a inoculação de hemolinfa (grupo 3, 38.46%,  $p=0.005$ ). Neste grupo verificamos um aumento significativo no número de células circulantes da hemolinfa nas primeiras 12 horas após a exposição de *S. mansoni* (Fig. 9). O número de amebócitos estrelados permaneceu abaixo do número de amebócitos não estrelados até o momento em que se observou o pico de amebócitos totais. Nesta ocasião o número de amebócitos estrelados era bem maior, assim permanecendo até o fim da observação. Isso nos faz acreditar que antes das 12 horas os amebócitos estrelados estariam nos tecidos sendo que, posteriormente, eles teriam sido solicitados para a circulação hemolinfática. A precocidade da elevação do número de amebócitos estrelados na circulação (Fig. 9) pode explicar a diminuição da reação amebocitária presente nos cortes histológicos (Fig. 15). Segundo GUARALDO et alii., 1981 nas primeiras horas após à infecção as células estariam em plena atividade nos tecidos, procurando encapsular o "corpo estranho" .

Na avaliação dos cortes histológicos de *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente expostas ao *S. mansoni* observamos um número de esporocistos

degenerados muito elevado (70.96%). Os esporocistos apresentaram-se envolvidos por uma reação amebocitária não tão intensa (Fig. 14) quanto aquela observada em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (Grupo 5, Fig. 13).

LIE et alii., (1980) descreveram reações teciduais induzidas pela infecção de *S. mansoni* em *B. tenagophila* suscetíveis, expostas previamente a miracidios irradiados de *E. paraensei*. Esses autores notaram que os esporocistos de *S. mansoni* degenerados apresentavam um número muito reduzido de amebócitos ao seu redor. No entanto BAYNE et alii., 1985; assinalaram que os componentes do "plasma" que induzem a defesa celular em *B. glabrata*, são aglutininas com conformação molecular específica e que reconhecem diferenças entre espécies distintas de caramujos. Esses mesmos autores (1986) demonstraram que essas aglutininas desempenham papel de "anticorpos" específicos que atuam sobre células (corpos estranhos), fazendo com que essas se tornem suscetíveis à fagocitose. Dados obtidos por nós (MACHADO et alii., 1988) mostraram que em infecções concomitantes de furcocercárias longifurcadas sem ocelo e esporocistos de *S. mansoni*, não se desenvolveram as larvas de *S. mansoni* (proteção total), assim como não se observou reação amebocitária ao redor dessas larvas. Parece que nesses moluscos, a presença de furcocercárias

longifurcadas sem ocelo, induziu uma proteção à infecção pelo *S. mansoni*. Deve ter havido nesse caso, uma possível ação de fatores "humorais" desencadeando algum tipo de atuação, por nós desconhecida, provocando a degeneração dos esporocistos.

Em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo, verificamos que a taxa de infecção foi de 41.17% e maior do que a obtida em moluscos não submetidos a inoculação de hemolinfa (Grupo 3, 38.46%). Além disso, observamos que o número de esporocistos degenerados nos moluscos submetidos a inoculação de hemolinfa apresentou uma taxa maior (51.61%) do que nos moluscos não submetidos a inoculação de hemolinfa (45.15%). Esta diferença foi significativa ( $p=0.038\%$ ). As reações amebocitárias observadas neste grupo ao redor das larvas de *S. mansoni* mostraram-se discretas, o que nos levou a acreditar que a inoculação de hemolinfa após a exposição ao *S. mansoni* pouco interferiu na reação amebocitária. As *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (Grupo 7) apresentaram uma taxa de infecção menor (24.24%) do que as *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com



furcocercária longifurcada sem ocelo (Grupo 10, 41.17%). Esta diferença foi altamente significativa ( $p=0.001$ ). Os esporocistos degenerados nas *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e logo após inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo (Grupo 10), foram menos frequentes (51.61%) e com reações teciduais mais discretas, do que nas *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente expostas ao *S. mansoni* (Grupo 7, 70.96%).

No estudo da ação da hemolinfa no mecanismo de defesa de *B. tenagophila*, observamos que nos grupos de moluscos inoculados com hemolinfa de moluscos infectados com *S. mansoni* ou com furcocercárias longifurcadas sem ocelo e posteriormente expostos ao *S. mansoni*, ocorreu uma resistência à infecção esquistossomótica eficiente (80% e 75.75%, respectivamente). Essa resistência não foi tão eficiente quanto aquela obtida por nós, anteriormente, em infecções concomitantes de furcocercárias longifurcadas sem ocelo e *S. mansoni* (MACHADO et alii., 1988). Nos moluscos em que a inoculação de hemolinfa de *B. tenagophila* infectadas com *S. mansoni* ou infectadas com furcocercárias longifurcadas sem ocelo precedeu a exposição ao *S. mansoni*, verificamos um aumento significativo no número de amebócitos estrelados as 16 horas e as 12 horas após a

exposição ao *S. mansoni* (Figs. 7 e 9, respectivamente). Estes resultados parecem interferir no número de esporocistos de *S. mansoni* degenerados observados 24 horas depois da exposição ao *S. mansoni*.

A respeito dos amebócitos não estrelados, observamos que estes aumentaram nas *B. tenagophila* que receberam hemolinfa de moluscos livres de infecção ou infectados com *S. mansoni*, distomoxifideocercária ou furcocercárias longifurcadas sem ocelo, anteriormente a exposição ao *S. mansoni*. Se considerarmos que os amebócitos não estrelados seriam precursores dos amebócitos estrelados (ou um estágio mais precoce de desenvolvimento), poderíamos pensar que o APO seria ativado quando da inoculação de hemolinfa dos moluscos, o que não aconteceria quando a exposição de *B. tenagophila* ao *S. mansoni* é anterior a inoculação de hemolinfa.

A inoculação de hemolinfa de *B. tenagophila* livres de infecção, antes ou após à exposição ao *S. mansoni* provocou, quando comparada ao grupo controle (grupo 3), um aumento da suscetibilidade dos moluscos à infecção pelo *S. mansoni*.

A suscetibilidade dos moluscos que receberam hemolinfa de *B. tenagophila* portadoras de distomoxifideocercárias e furcocercárias longifurcadas sem ocelo, posteriormente a exposição ao *S. mansoni*, foi maior do que aquela observada nos moluscos que receberam

anteriormente a hemolinfa.

Avantamos duas hipóteses para explicar a maior facilidade com que os moluscos que receberam hemolinfa posteriormente se infectaram por *S. mansoni*:

1 - Ao se inocular hemolinfa de moluscos contendo substâncias de ação antigenica oriundas de larvas de digenéticos poderia ter havido uma imunotolerância.

2 - A ação dos amebócitos do molusco receptor poderia ter sido desviada para combater os amebócitos inoculados com a hemolinfa dos moluscos parasitados pois estes poderiam estar recobertos por lectinas ou outros fatores humorais.

## 5 - CONCLUSÕES

1) Exemplos de *B. tenagophila* submetidos à inoculação de hemolinfa de moluscos infectados por *S. mansoni*, apresentaram elevada resistência à infecção posterior por *S. mansoni* (80%).

2) *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por *S. mansoni* e posteriormente expostas ao *S. mansoni*, apresentaram número elevado de esporocistos degenerados (77.41%), e com intensa reação amebocitária.

3) *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados por furcocercarias longifurcadas sem ocelo, apresentaram elevada resistência à infecção posterior por *S. mansoni* (75.75%).

4) *B. tenagophila* que recebeu hemolinfa de moluscos livres de infecção, antes ou após a exposição ao *S. mansoni*, quando comparada com *B. tenagophila* expostas apenas ao *S. mansoni* apresentou aumento da suscetibilidade dos moluscos à infecção pelo *S. mansoni*.

5) Em *B. tenagophila* expostas ao *S. mansoni* e posteriormente inoculadas com hemolinfa de moluscos infectados com distomoxifideocercárias, ou com furcocercárias longifurcadas sem ocelo, houve um aumento significativo da suscetibilidade à infecção esquistossomótica quando comparado com os grupos nos quais os moluscos foram inoculados previamente à infecção com *S. mansoni*.

6) A taxa de penetração dos miracidios foi semelhante em todos os grupos experimentais de maneira que a penetração não foi alterada devido a inoculação de hemolinfa.

## 6 - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABUDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. *Biomphalaria Glabrata* Amebocytes: Effect of *Schistosoma mansonii* infectio on in Vitro phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, 35:241-48, 1980.
- ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. *Biomphalaria glabrata* amebocytes assay of factors influencing in vitro phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, 36:52-59, 1980.
- BASCH, P.F.; LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. Antagonistic interaction between strigeid and *Schistosome* sporocysts within a snail host. *J. Parasitology*, 55:753-758, 1969.
- BAYNE, C.J.; BOSWELL, C.A.; LOKER, E.S. & YUI, M.A. Plasma components which mediate cellular defences in the gastropod mollusc *B. glabrata*. *Develp. Compar. Immunol.*, 2(3):523-30, 1985.
- BAYNE, C.J.; LOKER, E.S. & YUI, M.A. Interactions between the plasma proteins of *B. glabrata* an the sporocysts tegument of *S. mansonii*. *Parasitology*, 92:653-64, 1986.
- BENEX, J. & JACOBELLI, G. Cellular immunity in molluscan hosts of *Schistosoma*: Preliminary results relating to *Biomphalaria glabrata*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 73(2):206-13, 1980.
- BROOKS, C.P. A comparative study of *Schistosoma mansonii* in *Tropicorbis havanensis* and *Australorbis glabratus*. *J. Parasitology*, 39:159-65, 1953.
- CHENG, T.C. Funtional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 266:343-379, 1975.
- CHENG, T.C. & KENNETH, R.A. Hemocyts of the Pulmonate Gastropod *Biomphalaria glabrata*. *J. Invert. Pathol.*, 30:199-122, 1977.
- CHENG, T.C. & AULD, K.R. Hemocytes of the Pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. *J. Invert. Pathol.*, 30:170-4, 1977.
- CHENG, T.C. & SCHOENBERG, D.A. Phagocytic funnel-like pseudopodia in lectin-treated gastropod hemocytes. *J. Invert. Pathol.*, 36:141-43, 1980.

- COELHO, M.V. Ação das formas larvárias de *S. mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. *Avulso Inst. Aggeu Magalhães*, 3:39-53, 1954.
- COELHO, M.V. Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de *S. mansoni* em *Australorbis nigricans*. *Rev. Bras. Biol.*, 17:325-37, 1957.
- COELHO, M. V. Susceptibilidade de *Australorbis tenagophilus* à infecção por *S. mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 4:289-95, 1962.
- DIAS, L.C.S.; UETA, M.T. & GUARALDO, A.M.A. Susceptibilidade de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *S. mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 29:205-12, 1986.
- FILES, V.S. & CRAM, E.B. A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *S. mansoni*. *J. Parasitology*, 35:555-60, 1949.
- FISHER, R.C. A study in insect multiparasitism. II. The mechanism and control of competition for possession of the host. *J. Exp. Biol.*, 38:605-628, 1961.
- GRANATH, W.O. & YOSHINO, T.P. *Schistosoma mansoni*: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *B. glabrata*. *Exp. Parasitol.*, 58:188-93, 1984.
- GUARALDO, A.M.A.; MAGALHÃES, L.A.; RANGEL, H.A. & PAREJA, G. Evolução dos esporocistos de *S. mansoni* Sambon, 1907 em *B. glabrata* (Say, 1818) e *B. tenagophila* (D'Orbigny, 1835). *Rev. Saúde Públ.*, S. Paulo, 15:436-48, 1981.
- JEONG, K.H. & HEYNEMAN, D. Leucocytosis of *B. glabrata*: Morphology and behavior of granulocytic cells in vitro. *J. Invert. Pathol.*, 28:357-62, 1976.
- JOKY, A. & MATRICON-GONDRAN, M. Response to the amebocyte-producing organ of sensitized *B. glabrata* after exposure to *Echinostoma caproni* miracidia. *J. Invert. Pathol.*, 45:28-33, 1985.
- LIE, K.J.; HEYNEMAN, D. & YAU, P. The origin of amebocytes in *B. glabrata*. *J. Parasitology*, 61:574-76, 1975.
- LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *B. glabrata* snail. *International Journal for Parasitology*, 5:621-26, 1975a.

- LIE, K.J.; HEYNEMAN, D. & JEONG, K.H. Studies on resistance in snail.7. Evidence of interference with the defence reaction in *B. glabrata* by trematode larvae. *J. Parasitology*, 62:608-815, 1976.
- LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. Studies on resistance in snails.5. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* in naturally resistance *B. glabrata*. *J. Parasitology*, 62:292-97, 1976a.
- LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. Studies on resistance in snails.6. Escape of *Echinostoma lindoense* sporocysts from encapsulation in the snails heart and subsequent loss of the host's ability to resist infection by same parasity. *J. Parasitology*, 62:298-303, 1976b.
- LIE, K.J.; JEONG, K.H. & HEYNEMAN, D. Tissue reactions induced by *Schistosoma mansoni* in *B. glabrata*. *Annals. of Trop. Med. Parasitol.*, 74:157-66, 1980.
- LIE, K.J. Survival of *S. mansoni* and other trematode larvae in *B. glabrata*. A discussion of interference theory. *Trop. Geog. Med.*, 34:111-122, 1982.
- LIM, H. & HEYNEMAN, D. Intramolluscan inter-trematode antagonism: a review of factors influencing the host-parasite sistem and its possible role in biological control. *Adv. in Parasitol.*, 10:191-268,1972.
- LOKER, E.S.; BAYNE, C.J. & YUI, M.A. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *B.glabrata* as targets of *Echinostome* mediated interference with host snails resistance to *S. mansoni*. *Exp. Parasitol.*, 62:149-154, 1986.
- LOKER, E.S. & HERTEL, L.A. Alterations in *B. glabrata* plasma induced by infection with the Digenetic Trematode *E. parensi*. *J. Parasitol.*, 73:503-13, 1987.
- MACHADO, S.M.P.; CORDEIRO, N.S.; MAGALHÃES, L.A. & ARTIGAS, P.T. Algumas considerações sobre cercárias naturalmente encontradas em *B. tenagophila* capturadas em Louveira, SP. *Mem. Inst. Butantan*, 49:79-86, 1987.
- MACHADO, S.M.P.; MAGALHÃES, L.A.; ARTIGAS, P.T.; CORDEIRO, N.S. & CARVALHO, J.F. Verificação de antagonismo entre larvas de *S. mansoni* e larvas de outro Digenea em *B. tenagophila* molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP. *Rev. Saúde Publ.*, S. Paulo, 22(6):484-8, 1988.



- MACKIN, J.G. Oyster leukocytes in infection disease. *Am. Zool.*, 1:371, 1961.
- MAGALHÃES, L.A. Moluscos planorbídeos do Distrito Federal, Brasília. Campinas 1966. Tese (Doutoramento)- UNICAMP. Faculdade de Ciências Médicas.
- MAGALHÃES, L.A. Estudo dos dados obtidos de uma população de *B. glabrata* de Belo Horizonte infectada por *S. mansoni* da mesma cidade, e de uma população de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* de São José dos Campos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 3(4):195-96, 1969.
- MAGALHÃES, L.A. Estudo do comportamento da cepa de *S. mansoni* de Brasília. *O hospital*, 77(2)-fevereiro-1970
- MAC KAY, D. & JENKIN, C.R. Immunity in the invertebrates. II. Adaptative immunity in the crayfish (*Parachaeraps bicarinatus*) *J. Immunol.*, 17:127, 1969.
- MICHELSON, E.H. *Plistophora husseyi* a microsporidian parasite of aquatic pulmonate snail. *J. Insect Pathol.*, 5, 1963b.
- MILLOT, N. *J. Exptl. Biol.*, 14:405, 1937a apud WAGGE, L.E. Amebocytes. *International Review of Citology*, 4:31-78, 1955.
- MILLOT, N. *Phil. Trans. Roy. Soc.*, B228:173, 1937b apud WAGGE, L.E. Amebocytes. *International Review of Citology* 4:31-78, 1955.
- MÜLLER, W.E.G. *Int. Rev. Cytol.*, 1956 apud RATCHIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F.; FITZGRALD, S.W. & RHODES, C.P. Invertebrate Immunity: Basic concepts and recent advances *International Review of Citology*, 97:183-351, 1985.
- NARUTO, T. Guia para identificação de cercárias (Trabalho do laboratório de Malacologia da Superintendencia de Controle de Endemias - SUCEM), S. Paulo, 1984, 61p.
- NODA, S. & LOKER, E.S. Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the host snail *B. glabrata*. *Parasitology*, 98:35-41, 1989.
- NEWTON, W.L. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *S. mansoni*. *J. Parasitology*, 38:362-6, 1952.

- NEWTON, W.L. The inheritance of susceptibility to infection with *S. mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasitol.*, 2:242-57, 1953.
- NEWTON, W.L. Tissue responses to *S. mansoni* in second generation snail from a cross between two strains of *Australorbis glabratus*. *J. Parasitology*, 40:352-5, 1954.
- PAN, C.T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. *Bull. Mus. Comp. Zool.*, 199:238-99, 1958 apud LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. Studies on resistance in snails a specific tissue reaction to *E. lindoense* in *B. glabrata* snail. *Internatinal Journal for Parasitology*, 5:621-26, 1975a.
- PAN, C.T. Generalized and focal tissue response in the snail *Australorbis glabratus*, infected with *S. mansoni*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 133:475-85, 1963.
- PAN, C.T. Studies on the host-parasite relationship between *S. mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Americ. J. Trop. Med. Hyg.*, 14:931-76, 1965.
- PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *S. mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 5:23-9, 1963.
- PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. Sobre a ocorrência de duas raças biológicas de *S. mansoni* no Brasil. XV Reunião SBBC, Campinas, 1963.
- PIZZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H. & FIGUEIREDO, S.G. A esquistossomose no Vale do Paraíba (Estado de São Paulo - Brasil) Observações sobre a doença em alguns municípios e a fauna planorbídica da região. *Rev. Saúde Adolf Lutz*, 19:97-143, 1959.
- PIZZA, J.T. & RAMOS, A.S. Os focos autoctenes de esquistossomose no Estado de São Paulo. *Arq. de Hyg. Saúde Pública, São Paulo*, 25(86):261-71, 1960.
- RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F.; FITZGRALD, S.W. & RHODES, C.P. Invertebrate immunity: basic concepts and advances. *International Review Citology*, 97:183-350, 1985.
- RICHARDS, C.S. & MERRITT Jr., J.W. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *B. glabrata* to *S. mansoni* infection. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 21:425-34, 1972.

- RICHARDS, C.S. Suscetibility of adult *B. glabrata* to *S. mansoni* infection. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 22:748-56, 1973.
- RUIZ, J.M. Contribuição ao conhecimento dos planorbídeos da cidade de São Paulo. *Rev. Bras. Malar. Doenc. Trop.*, 2(1):56-65, 1957.
- RUIZ, J.M. Contribuição ao estudo das forma larvarias de trematóides brasileiros.3. Fauna de Belo Horizonte e Jaboticatubas, Estado de Minas Gerais. *Mem. Inst. Butantan*, 24:45-62, 1952.
- RUIZ, J.M. Contribuição ao estudo das formas larvárias de trematódeos brasileiros.5. Descrição de três furcocercárias que ocorrem em planorbídeos hospedieiros de *S. mansoni*. *Mem. Inst. Butantan*, 25:77-89, 1953.
- SALT, G. The defense reactions of insects to metazoan parasites. *Parasitology* 53:527-642, 1963.
- SANTANA, J.V.; MAGALHÃES, L.A. & RANGEL, H.A. Nota sobre a quantificação da atividade fagocitária de amebócitos de molusco *B. glabrata* livres de infecção e infectados por *S. mansoni*. XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo, 1985, p.63.
- SANTANA, J.V. Mecanismo de defesa em moluscos *B. tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* frente ao *S. mansoni*. Campinas 1990. Tese (Doutoramento) - UNICAMP - Instituto de Biologia.
- SMINIA, T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh-water pulmonate *Lymnaea stagnates* studied by eletrons microscopy and enzyme histochemistry. *Z. Zellforsch.*, 134:97-526, 1972.
- STANDEN, O.D. The effect of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova of *S. mansoni* *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 45:255-341, 1951
- SULLIVAN, J.T.; RICHARDS, C.; LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. *Ribeiroia marini*: irradiated miracidia and induction of acquired resistance in *B. glabrata*. *Exp. Parasitol.*, 53:17-25. 1982.
- TRIPP, M.R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, 47:747-51, 1961.

- TRIPP, M.R. Hemagglutinin in the blood of the Oyster *Crassostrea virginica*. *J. Invert. Pathol.*, 8:478-84, 1966.
- TRIPP, M.R. Defense mechanism of moluscs. *J. Ret. Soc.*, 7:173-82, 1970.
- TRIPP, M.R. Molluscan Immunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 234-37, 1974.
- WAGGE, L.E. Amebocytes. *International Review of Cytology*, 4:31-78, 1955.
- YOSHINO, T.P.; CHENG, T.C. & RENWRANTZ, L.R. Lectin and human blood group determinants of *S. mansoni*: alteration following in vitro transformation of miracidium to mother sporocyst. *The J. of Parasitol.*, 63:818-24, 1977.