

Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida pelo candidato  
José Valfrido Santana e aprovada pela comissão julgadora

Camp - 25/7/90

1 h 45 min

SANTANA

JOSÉ VALFRIDO DE SANTANA m. t.



MECANISMOS DE DEFESA EM MOLUSCOS BIOMPHALARIA TENAGOPHILA

E BIOMPHALARIA GLABRATA FREITE AO SHISTOSOMA MANSONI

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas como um  
dos requisitos para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências (área de Imunologia).

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ AUGUSTO MAGALHÃES m. t.

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

CAMPINAS - SÃO PAULO

1990

Sa59m

12276/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

MECANISMOS DE DEFESA EM MOLUSCOS BIOMPHALARIA TENAGOPHILA  
E BIOMPHALARIA GLABRATA FRENTE AO SCHISTOSOMA MANSONI

JOSÉ VALFRIDO DE SANTANA

MECANISMOS DE DEFESA EM MOLUSCOS BIOMPHALARIA TENAGOPHILA  
E BIOMPHALARIA GLABRATA FRENTE AO SCHISTOSOMA MANSONI

CAMPINAS, - SP

1 9 9 0

À meus pais

À Beth, Ricardo e Fernando



## AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e ao Departamento de Parasitologia da UNICAMP, pelos laboratórios e recursos fornecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de Pernambuco, em particular, ao Departamento de Biofísica e Radiobiologia pela concessão de afastamento.

Ao Prof. Luiz Augusto Magalhães, mestre e amigo pela orientação segura, apoio e incentivo.

Ao Prof. Humberto de Araújo Rangel, com quem muito aprendi, pela análise crítica e sugestões propostas.

Às Profas. Ana Maria A. Guaraldo e Marlene Tiduko Ueta, pela análise crítica, sugestões, ajuda técnica e pela grande amizade.

Ao Prof. Marcos Garcia Costa, Ex - Coordenador da Pós-Graduação em Imunologia da UNICAMP, pela compreensão, confiança e análise crítica deste trabalho.

Ao Prof. Paulo Ferreira de Araújo, Coordenador da Pós-Graduação em Imunologia, pela compreensão e valiosas críticas e sugestões.

Aos Profs. Luiz Cândido Souza Dias e Júlia K. Sakurada do IB- UNICAMP pela grande contribuição por ocasião da análise crítica do trabalho.

Aos colegas da UFPE, Luciano Montenegro e Mauricy Motta pela confecção de fotografias e gráficos, respectivamente.

À companheira e colega Elizabeth Malagueño pelo caminhar juntos nos últimos 15 anos.

Aos colegas do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE, que assumiram nossas atividades durante nossa ausência.

Ao Prof. José Antônio Cordeiro, do Departamento de Estatística da UNICAMP, pela análise dos resultados.

À Profa Eliana Maria Zanotti Magalhães, pelo fornecimento de bibliografia, apoio técnico e material.

À Profa Dária Repka que mesmo fora do convívio da UNICAMP, esteve sempre disposta a nos atender.

À Sra. Ana Gagliardi, Bibliotecária do IB-UNICAMP, pela revisão da bibliografia citada.

Aos técnicos do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, Ivo, João, Geraldo, Liliane, Cleuza e Inês sempre dispostos a colaborar com os alunos da Pós-Graduação.

À Sra. Sílvia Félix da Secretaria de Pós-Graduação do IB-UNICAMP, pela preocupação constante, mantendo nossa matrícula sempre atualizada.

A todos aqueles, aqui não relacionados, que fazem os Departamentos de Parasitologia e Microbiologia/Imunologia da UNICAMP, que estiveram direta ou indiretamente envolvidos neste trabalho.

Meus agradecimentos

A parte experimental deste trabalho foi realizada nos Departamentos de Parasitologia e de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP - Campinas, SP.

## RESUMO

Procurou-se analisar os mecanismos de defesa em Biomphalaria glabrata de gerações geneticamente selecionados e, de Biomphalaria tenagophila da geração parental frente ao Schistosoma mansoni de linhagens simpátricas.

Para atender os objetivos propostos, a hemolinfa destes moluscos foi estudada quanto à concentração de células granulocíticas e o envolvimento destas na fagocitose. Outros parâmetros como resposta do molusco a inoculação de extratos antigênicos diversos e análise imunoquímica da hemolinfa frente a anti-soros específicos, também foram avaliados.

Em ambas espécies de moluscos, o número de granulócitos aumentou significativamente 24 horas após exposição a miracídios, ocorrendo acentuado declínio do 79 ao 429 dia pós-infecção, mantendo-se perfis semelhantes em B. glabrata e B. tenagophila durante este período.

A capacidade fagocitária foi mais intensa em moluscos menos suscetíveis, como verificado para as gerações parentais.

A inoculação de extrato antigênico de cercárias em B. glabrata suscetível, induziu resistência parcial a infecção esquistossomótica. Análises imunoquímicas da hemolinfa, revelaram maior número de sistemas precipitantes em B. tenagophila infectada.

## I N D I C E

|                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 - INTRODUÇÃO .....                                                                                                        | 1  |
| 2 - MATERIAL E METODOS .....                                                                                                | 10 |
| 2.1 - Origem e seleção de moluscos .....                                                                                    | 10 |
| 2.2 - Obtenção de miracídios e infecção de moluscos.....                                                                    | 11 |
| 2.3 - Obtenção de hemolinfa .....                                                                                           | 11 |
| 2.4 - Contagem de células da hemolinfa .....                                                                                | 12 |
| 2.5 - Preparação de monocamadas de amebócitos .....                                                                         | 12 |
| 2.6 - Estocagem e liofilização de cercárias .....                                                                           | 13 |
| 2.7 - Formolização de eritrócitos de carneiro .....                                                                         | 13 |
| 2.8 - Sensibilização de eritrócitos de carneiro com extrato pro -<br>teico de cercárias .....                               | 14 |
| 2.8.1- Obtenção e dosagem do extrato proteico .....                                                                         | 14 |
| 2.8.2 - Taninagem dos eritrócitos .....                                                                                     | 14 |
| 2.8.3- Sensibilização dos eritrócitos .....                                                                                 | 15 |
| 2.8.4- Teste de hemaglutinação .....                                                                                        | 15 |
| 2.9 - Determinação do índice de fagocitose .....                                                                            | 15 |
| 2.9.1 - Com eritrócitos formolizados .....                                                                                  | 15 |
| 2.9.2 - Com eritrócitos sensibilizados .....                                                                                | 17 |
| 2.10 - Produção de antissoros anti-hemolinfa .....                                                                          | 17 |
| 2.10.1 - Produção de antissoros anti-hemolinfa de <u>B. glabra</u> -<br>ta e <u>B. tenagophila</u> livres de infecção ..... | 17 |
| 2.11 - Análise do soro anti-hemolinfa .....                                                                                 | 19 |

|                                                                                                                                                                                                 |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.12 - Análise comparativa de antígenos da hemolinfa de <u>B. glabrata</u> e <u>B. tenagophila</u> através da imunoeletroforese .....                                                           | 19     |
| 2.13 - Absorção de antissoro de coelho .....                                                                                                                                                    | 20     |
| 2.13.1 - Anti-hemolinfa de <u>B. glabrata</u> .....                                                                                                                                             | 20     |
| 2.13.2 - Anti-hemolinfa de <u>B. tenagophila</u> .....                                                                                                                                          | 21     |
| 2.14 - Dosagem de proteínas da hemolinfa .....                                                                                                                                                  | 21     |
| 2.15 - Exposição de <u>B. glabrata</u> de população parental a linhagem BH após inoculação com diferentes antígenos .....                                                                       | 22     |
| <br>3 - RESULTADOS .....                                                                                                                                                                        | <br>24 |
| 3.1 - Análise morfológica e contagem de células da hemolinfa de <u>B. glabrata</u> durante a infecção esquistossomótica.....                                                                    | 24     |
| 3.2 - Análise morfológica e contagem de células da hemolinfa de <u>B. tenagophila</u> durante a infecção esquistossomótica.....                                                                 | 25     |
| 3.3 - Quantificação da capacidade fagocitária de granulócitos de <u>B. glabrata</u> e <u>B. tenagophila</u> livres de infecção e infectados com as linhagens BH e SJ do <u>S. mansoni</u> ..... | 26     |
| 3.4 - Resultados da análise dos soros anti-hemolinfa através de "Ring Test", Imunodifusão e Imunoeletroforese .....                                                                             | 28     |
| 3.5 - Indução de resistência em <u>B. glabrata</u> suscetível ao <u>S. mansoni</u>                                                                                                              | 30     |
| 3.6 - Porcentagem de infecção em <u>B. glabrata</u> e em <u>B. tenagophila</u> expostos as linhagens BH e SJ do <u>S. mansoni</u> .....                                                         | 31     |
| 3.7 - Testes de hemaglutinação com eritrócitos sensibilizados com extrato de cercárias de <u>S. mansoni</u> .....                                                                               | 31     |
| 3.8 - Teor protéico da hemolinfa de <u>B. glabrata</u> e <u>B. tenagophila</u> normais e infectados .....                                                                                       | 31     |

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.9 - Teor protéico do extrato antigênico obtido de cercárias de<br><u>S. mansoni</u> da linhagem BH ..... | 32 |
| 4 - DISCUSSÃO .....                                                                                        | 63 |
| 5 - CONCLUSÕES.....                                                                                        | 74 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                           | 76 |

## 1 - INTRODUÇÃO

Os mecanismos de defesa nos invertebrados e particularmente, nos moluscos do gênero Biomphalaria, constitui área de estudos que vem recebendo maior atenção dos pesquisadores nos últimos anos, devido a importância do conhecimento das formas de transmissão e dos mecanismos de defesa dos moluscos hospedeiros, tendo em vista estudos da epidemiologia da Esquistossomo - se mansônica (WOLMARANS & YSSEL, 1988; YOSHINO, 1988; YOSHINO & GRANATH, 1985; GRANATH et alii., 1987; GRANATH & YOSHINO, 1984 e BAYNE et alii., 1986).

No nosso meio, são três as espécies conhecidas de moluscos que hospedam o parasita: Biomphalaria glabrata, Biomphalaria tenagophila e Biomphalaria straminea.

É importante observar nestes animais, aspectos relacionados à suscetibilidade ao Schistosoma mansoni. Sabe-se que, os moluscos hospedeiros deste trematódeo apresentam maior suscetibilidade às linhagens simpátricas do parasita, estando a suscetibilidade na dependência de fatores genéticos. Sabe-se também existir um ajuste fisiológico hospedeiro-parasita, isto é, moluscos de uma determinada região geográfica apresentam maior suscetibilidade ao Schistosoma daquela mesma região (NEWTON, 1953; PARAENSE & CORREA, 1963; RICHARDS & MERRITT, 1972; BASCH, 1976; BARBOSA, 1960 e SANTANA et alii., 1978). É possível a infecção alopátrica quando a carga parasitária é extremamente alterada (PARAENSE & CORREA, 1963) ou, quando utiliza-se populações de moluscos geneticamente selecionadas (SANTANA, 1976).



Mais recentemente, tem-se demonstrado a ocorrência de adaptação de linhagens do S. mansoni a diferentes espécies de moluscos (DIAS et alii., 1987; DIAS et alii., 1988). Estes autores, utilizaram em suas pesquisas B. glabrata, B. tenagophila e B. straminea dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. As linhagens do Schistosoma estudadas, foram oriundas destas regiões e de Porto Rico.

De maneira geral, quando moluscos são expostos a miracídios, ocorre a transformação destes últimos em esporocistos primários nas 48 horas após penetração. Esta transformação é caracterizada por modificações anatômicas e funcionais, evoluindo até a forma de cercárias (CUNHA, 1970).

Os miracídios que penetram em moluscos não adaptados a determinada linhagem, ativam processo de defesa aparentemente de natureza celular, com formação de reação granulomatosa, ocorrendo destruição e fagocitose das larvas por células semelhantes a macrófagos, poucas horas após penetração (PAN, 1965; GUARALDO et alii., 1981; LIE et alii., 1980 e BAYNE et alii., 1980 a e b).

Histologicamente não tem sido observadas reações teciduais em moluscos suscetíveis (GUARALDO et alii., 1981; BENEX & JACOBELLI, 1980).

Foi demonstrado que a fagocitose ou encapsulamento de esporocistos primários em B. glabrata refratária de linhagem 10-R2, envolve dois estágios: alargamento do granuloma ao redor do esporocisto intacto e desintegração do parasita com aumento do tamanho do granuloma, seguindo-se a eliminação do esporocisto (CHENG & GARRABRANT, 1977). Assim, em moluscos resistentes, os esporocistos são rapidamente encapsulados por amebócitos (granulócitos) e mor -

tos principalmente pela forte atividade fagocitária destas células.

Pelos achados descritos na literatura, não resta dúvida sobre a existência de uma forte resposta celular a penetração do S. mansonii em moluscos refratários.

Análise "in vitro", utilizando monocamadas de células da hemolinfa de B. glabrata suscetível, mostraram altos índices de fagocitose, mesmo quando os moluscos eram expostos a linhagens simpátricas do verme (TRIPP, 1970; ABDUL-SALAM & MICHELSON, 1980 a e b e SANTANA et alii., 1985).

A célula envolvida neste mecanismo de defesa, é denominada - granulócito: uma célula semelhante ao macrófago encontrado nos animais vertebrados. Possui atividade fagocitária e enzimática, aderindo à superfície de vidro, sendo o "spreading", dependente de algum fator humoral do molusco. Esta célula apresenta pseudópodos e representa a maior sub-população de células circulantes, perfazendo 90% do total (CHENG, 1975; CHENG & AULD, 1977 e JEONG et alii., 1976). Estes mesmos autores, descreveram outro tipo de célula na hemolinfa de B. glabrata, denominada de hialinócito, célula de menor tamanho, esférica, mesmo quando espreitada sobre superfície de vidro, não apresenta pseudópodos, existindo na hemolinfa na concentração de 10 a 15%. O papel de defesa dos hialinócitos ainda é desconhecido. Há evidências preliminares que esta célula representa um tipo primário de células que reagem contra antígenos solúveis (CHENG e GARRABRANT, 1977). Os hialinócitos de Crassostrea virginica e Mercenaria mercenaria são capazes de fagocitar bactérias (FOLEY & CHENG, 1975).

Poucos conhecimentos têm sido adicionados aos referidos por WAGGE, 1955 e READE & READE, 1976, com relação aos tipos de células existentes na hemolinfa de invertebrados, dentro do phylum Mollusca. Estas células são ti -

picamente eucarióticas, delimitadas por membrana única, núcleo com membrana dupla, nucléolo nem sempre presente, citoplasma granular ou agranular. Ao microscópio eletrônico, pode-se identificar grande variedade de organelas e inclusões, tais como: mitocôndria, retículo endoplasmático liso ou rugoso, corpos de Golgi livres ou ligados a ribossomos, grânulos de glicogênio e lisossomos.

Outros autores trabalhando com diferentes espécies de moluscos, consideram a existência de um único tipo de célula circulante na hemolingu, dando-se a denominação geral de amebócitos (SMINIA & BARENDSEN, 1980).

A origem dos amebócitos (granulócitos e hialinócitos) em B. glabrata, foi estudada por LIE et alii., (1975). Em seus experimentos, utilizando moluscos não infectados e infectados com Echinostoma lindoense, E. paraensei e E. lici, identificaram através de cortes de tecido, um órgão localizado entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto, na região reno-pericárdica, como órgão provavelmente responsável pela produção de células naqueles invertebrados. Os autores analisaram dois grupos de B. glabrata. O primeiro, constituído por moluscos não infectados, nos quais, o órgão apresenta um tamanho pequeno, as células são alongadas, com citoplasma basofílico e núcleo ovalado ou alongado. Nestes animais, as mitoses ocorrem com pouquíssima frequência. Nos moluscos submetidos a infecção e reinfecção com as diferentes espécies de trematódeos do gênero Echinostoma, foi observada intensa hiperplasia e multiplicação celular. Esta resposta é inespecífica, aumentando após a segunda ou terceira exposição ao mesmo parasito.

O órgão responsável pela produção de células que, nos moluscos não infectados, media de 25 a 40  $\mu$  de espessura, aumenta significativamente de tamanho, passando a medir entre 230 a 400  $\mu$  nos animais infectados e reinfec

tados (LIE et alii., 1975). Continuando os experimentos, estes autores trabalhando com o modelo experimental B. glabrata albina de Porto Rico infectada com Echinostoma caproni, confirmaram a existência deste órgão produtor de amebócitos (APO - amebocyte-producing-organ). Através de análise histopatológica nos primeiros sete dias após exposição, concluiu-se que: a) a produção de amebócitos era iniciada nos primeiros dois dias; b) esta produção tornava-se máxima dentro de três a quatro dias e c) a produção de células diminuía com o tempo e, dentro de seis a sete dias, o órgão retornava ao estado inicial.

Em animais não infectados, o APO contém pequenos grupos de células basofílicas espalhadas na parede, entre as cavidades palial e pericardial. Neste órgão, nunca foram encontrados parasitos (JOKY et alii., 1985).

As reações dos invertebrados à presença de material "non self", parecem não possuir apenas características celulares. Nenhuma substância comparável às imunoglobulinas dos vertebrados, tem sido demonstrada em invertebrados, porém, tem-se observado algumas reações "in vitro" e "in vivo" que apresentam ação semelhante àquelas demonstradas pelas imunoglobulinas, como por exemplo: transferência de resistência através da hemolinfa ou presença de fatores humorais ampliando a resposta celular. Com respeito a isso, podemos citar os experimentos de Mc KAY & JENKIN (1969). Estes autores, observaram proteção significativa contra bactérias em invertebrados que receberam vacinas oriundas de bactérias tratadas quimicamente.

O mecanismo de defesa celular, não é o único nos invertebrados. Observações mais antigas já demonstravam que a presença de fatores humorais não específicos, podem atuar diretamente sobre o material estranho, destruindo-o ou aumentando a fagocitose (TRIPP, 1970).

Em outros experimentos, verificou-se que em moluscos resistentes, os esporocistos de *S. mansoni* são rapidamente encapsulados por amebócitos e mortos, principalmente pela forte atividade fagocitária das células circulantes mediada por fatores humorais presentes na hemolinfa livre de células, confirmando os achados anteriores (BAYNE et alii., 1980b).

Utilizando *B. glabrata* altamente suscetível, foi demonstrado que a infectividade de miracídios de uma cêpa de Porto Rico de *Schistosoma mansoni* era reduzida em 40%, quando se fazia um pré-tratamento destas larvas com hemolinfa de moluscos da espécie *Helisoma caribaeum*. Como controle foram utilizados hemolinfa de *B. glabrata* infectada e não infectada, além de hemolinfa de uma cêpa resistente de *B. glabrata* e uma solução de albumina bovina na concentração de 0,1%. O fator ou fatores existentes na hemolinfa de *H. caribaeum*, responsável por este fenômeno, deve ser uma lectina associada com sítios de ligação para n-acetyl-D-glucosamina na superfície do miracídio (MICHELSON, 1986).

Tem-se sugerido que larvas de *Echinostoma paraensei* liberam fatores que poderão interferir na capacidade dos amebócitos de *B. glabrata* para matar esporocistos do *S. mansoni*. A capacidade citotóxica da hemolinfa de moluscos da linhagem 10-R2 (resistentes), torna-se reduzida quando os moluscos sofrem uma primo-infecção com *Echinostoma* (LOKER et alii., 1986). Estes resultados vieram confirmar os dados de LIE et alii., 1977) que observaram redução da resistência inata da hemolinfa de moluscos da linhagem 10-R2 de *B. glabrata*, quando previamente infectados com *Echinostoma*.

CHENG et alii., (1977), estudaram o envolvimento da lisozima nos mecanismos de defesa de *B. glabrata*. Os autores inocularam os planorbídeos com suspensão de *Bacillus megaterium* mortos pelo calor. Utilizaram como controle, grupos inoculados apenas com água destilada estéril. Foi encontrada maior

concentração enzimática nos grupos experimentais (inoculados), quando comparados com os grupos controles (não inoculados). Os autores não esclarecem se o fato ocorreu por multiplicação celular ou aumento da síntese da própria enzima.

Ainda sob este aspecto, procurando analisar possíveis mecanismos de defesa humoral, foram desenvolvidos experimentos "in vitro" para demonstrar que a destruição das larvas de Schistosoma em moluscos resistentes da cepa 10-R2, deveria estar associada com mecanismos citotóxicos, mediados por amebócitos. Para isto, utilizaram esporocistos de cultura, verificando encapsulamento e destruição destas larvas quando incubadas com hemolinfa total de soro 10-R2 (soro e amebócitos ou apenas amebócitos). A viabilidade dos esporocistos não se alterava quando na presença apenas de soro (BAYNE et alii., 1980 b).

Por outro lado, tem sido demonstrado que hemócitos de moluscos suscetíveis PR-albino, quando incubados com soro de 10-R2, adquirem a capacidade de encapsular e destruir esporocistos de S. mansoni (BAYNE et alii, 1980 a e b).

Com base nos experimentos acima, GRANATH & YOSHINO (1984), desenvolveram modelo "in vivo" que comprova a existência de um fator termolábil presente na hemolinfa de moluscos 10-R2, capaz de inibir a infecção esquistossomótica em moluscos B. glabrata da população PR-albino. No experimento grupos de moluscos PR-albino, foram inoculados com hemolinfa de 10-R2 livre de células, tendo sido observado uma diminuição do Índice de infecção de aproximadamente 60% naqueles grupos de animais PR-albino que receberam a hemolinfa 10-R2. O fator de indução de resistência encontrado na hemolinfa de 10-R2, perdia sua habilidade quando submetido ao aquecimento a 70 C durante 30 minutos.

Em outro experimento, verificou-se que esporocistos de S. mansoni produzidos "in vitro", quando incubados uma hora com soro de PR-albino ou 10-R2 ,

se desenvolviam normalmente quando inoculados em B. glabrata suscetível. Porém, as larvas eram destruídas quando previamente incubadas com soro de B. glabrata suscetível e injetadas em moluscos resistentes (GRANATH & YOSHINO, 1984).

O efeito "in vitro" de granulócitos e componentes do plasma de cêpas suscetíveis "M line" e resistentes 10-R2 sobre esporocistos do S. mansoni de B. glabrata de Porto Rico, também foi analisado. Após 24 horas de incubação da hemolinfa de moluscos suscetíveis, com esporocistos, 94,4% destes mantinham a estrutura normal, enquanto que 91,6% dos esporocistos eram destruídos quando a incubação ocorria com hemolinfa de resistentes.

Esporocistos pré-incubados durante seis horas em plasma de molusco suscetível, eram destruídos quando posteriormente incubados com granulócitos de moluscos resistentes em plasma de molusco suscetível. Quando a pré-incubação era feita em plasma de moluscos resistentes, os esporocistos se mantinham intatos, mesmo quando a incubação posterior era realizada com plasma e amebócitos de moluscos suscetíveis.

Tendo em vista estes experimentos, foi sugerido que os esporocistos incorporam em sua superfície, substância do plasma do hospedeiro (LOKER & BAYNE, 1982), com isto, haveria um mascaramento do parasita, não sendo este reconhecido pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (STEIN & BASCH, 1979).

Resistência adquirida tem sido demonstrada em pesquisas que utilizaram miracídios irradiados. B. glabrata suscetível foi sensibilizada com miracídios do trematodeo Ribeiroia marini, que haviam sido submetidos a irradiação-X na dose de 631R/min. Estes animais receberam um "Challenge" com miracídios não irradiados em diferentes períodos de tempo após a primeira exposição (SULLIVAN et alii, 1982).

Como pode-se verificar pelos resumos dos experimentos expostos neste trabalho, estudos vem sendo realizados com molusco planorbídeo B. glabrata de populações PR-albino ou 10-R2. Apesar do razoável número de pesquisas, os mecanismos envolvidos na resposta destes invertebrados frente ao S. mansoni ou outros trematódeos, ainda não estão bem esclarecidos.

Por outro lado, além de B. glabrata, existem outras espécies de hospedeiros do Schistosoma, que comportam-se de maneira diferente à exposição ao parasito.

O objetivo do presente trabalho, é analisar os mecanismos de defesa em B. tenagophila naturalmente resistentes à infecção esquistossomótica e em B. glabrata suscetível.



## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Origem e seleção de moluscos

Desovas de moluscos albinos da espécie B. glabrata descendentes de animais capturados em Belo Horizonte, criados e mantidos no laboratório de Parasitologia da UNICAMP há vinte anos, originaram a geração parental "P". Partindo desta geração obtivemos as gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> por autofecundação, conforme critério esquematizado abaixo e adotado em experimentos anteriores (SANTANA et alii., 1978) (Fig. 1).

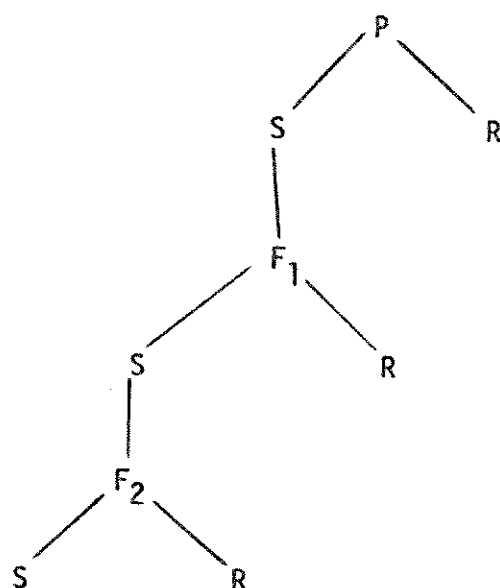


Fig. 1 - Esquema de seleção para obtenção de populações de moluscos B. glabrata suscetíveis (S) ao Schistosoma mansoni da linhagem BH.

Moluscos B. glabrata da geração parental "P" foram expostos individualmente a dez miracídios da linhagem BH (Belo Horizonte) de S. mansoni. Aquelas animais que até o 100º dia de observação, eliminaram cercárias, foram considerados suscetíveis e denominados de suscetíveis "S", enquanto aquelas pla -

norbídeos que não apresentaram cercárias, foram considerados como resistentes "R". Estes animais "S" ou "R", passaram a constituir a geração  $F_1$  (SANTANA, 1976).

Para obtenção da geração  $F_{2(S)}$ , adotamos procedimentos semelhante, partindo da geração  $F_1$  suscetível.

Moluscos B. tenagophila (melânicos), utilizados no trabalho, foram escolhidos ao acaso, entre a população mantida no laboratório e, descendentes de planorbídeos capturados no Vale do Rio Paraíba do Sul (São Paulo). Estes animais foram expostos a 10 miracídios da linhagem SJ. Foram utilizados apenas moluscos da geração parental.

## 2.2 - Obtenção de miracídios e infecção de moluscos

Miracídios das linhagens mineira BH e paulista SJ de S. mansoni, foram obtidos de fezes de camundongos swiss heterogênicos, previamente expostos a cercárias de S. mansoni.

O material fecal dos camundongos, coletado aos sessenta dias após infecção foi homogeneizado, filtrado em dupla camada de gaze e deixado sedimentar em geladeira. Em seguida, procedemos tratamento para eclosão dos miracídios e posterior exposição aos moluscos, conforme técnica de STANDEN (1951 e 1952).

## 2.3 - Obtenção de hemolinfa

A hemolinfa de moluscos B. glabrata era obtida da região cardíaca, através de orifício feito na concha do animal, coletando-se o material com pipeta Pasteur, conforme CHERNIN (1963). Todos os moluscos utilizados para sangria mediam entre 14 a 17 mm de diâmetro máximo.

Para coleta de hemolinfa de B. tenagophila, foi feita sangria através da região cefalo-podal do molusco (MICHELSON, 1966). Os animais utiliza

dos para sangria, apresentavam o mesmo diâmetro dos B. glabrata.

#### 2.4 - Contagem de células da hemolinfa

Da hemolinfa de cada animal, contou-se uma amostra de células utilizando câmara de contagem de Neubauer para obtenção do número total de células/mm<sup>3</sup> em cada molusco.

Constituiu-se 12 grupos de 15 animais cada para B. glabrata e, fez-se duas contagens para cada amostra de hemolinfa individualmente, resultando um número de 30 leituras por grupo. Deste total, considerou-se a média de células/mm<sup>3</sup> de hemolinfa sem diluição em cada grupo.

Foi determinado o número de células nas gerações P, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> para moluscos B. glabrata.

Para B. tenagophila, formou-se 6 grupos de 15 moluscos cada, utilizando-se apenas a geração parental "P".

A técnica utilizada para a contagem foi semelhante a descrita acima.

Para calcular o número de células amebocitárias (granulócitos) existentes na hemolinfa de cada molusco, procedeu-se de maneira análoga àquela classicamente empregada para contagem de leucócitos humanos, CARVALHO (1978). No caso particular, eliminando-se o fator diluição, adotou-se a expressão abaixo:

$$\text{cél/mm}^3 \text{ de hemolinfa} = \frac{\text{células contadas} \times 10}{4}$$

#### 2.5 - Preparação de monocamadas de amebócitos

De um "pool" de hemolinfa obtido de dez moluscos, tomou-se 25µL, in

cubando-se em lâmina de 25 x 50 mm durante 30 minutos e temperatura de 22 C  $\pm$  2 C em câmara úmida.

Terminando o período de incubação, o excesso de hemolinfa era removido por lavagens sucessivas em solução salina balanceada (Meio mínimo essencial - MEM), ficando uma camada de amebócitos firmemente aderida ao vidro. Esta preparação, foi posteriormente corada com solução de Giemsa diluída 1/5 em PBS a 2% durante 50 minutos.

Para a preparação de monocamadas de células da hemolinfa, tomou-se como base a técnica descrita por ABDUL-SALAM & MICHELSON, (1980 a e b).

## 2.6 - Estocagem e liofilização de cercárias

Um "pool" de cercárias eliminadas por B. glabrata experimentalmente infectadas com a linhagem BH de S. mansoni, era transferido com pipeta Pasteur para outro recipiente, ficando livre de fezes e outras impurezas. Em seguida, o material limpo era submetido em uma câmara de vapores de formol durante 30 minutos. Após este período, as cercárias eram deixadas durante a noite na geladeira. No dia seguinte, o material era centrifugado duas a três vezes com água destilada e, finalmente estocado em congelador a - 20 C para posteriormente ser liofilizado, visando obtenção dos extratos antigênicos.

## 2.7 - Formolização de eritrócitos de carneiro

Eritrócitos de carneiro suspensos em solução de Alsever, eram levados cinco vezes com PBS pH 7,2. Após este procedimento, foi adicionado a um volume de "papa" de eritrócitos, dez volumes de formol a 3%. A mistura era deixada durante 24 horas a 22 C, quando era feita mais cinco lavagens com PBS e mais cinco com solução salina balanceada (MME), conforme técnica de CSIZMAS (1960).

A suspensão de eritrócitos era ajustada para concentração de  $3 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup>.

## 2.8 - Sensibilização de eritrócitos de carneiro com extrato protéico de cercárias

### 2.8.1 - Obtenção e dosagem do extrato protéico

O antígeno protéico de cercárias de S. mansoni da linhagem BH, foi extraído a partir das cercárias liofilizadas, obtidas conforme descrição no item 2.6.

Aliquota de 6 mg/mL de pó seco de cercárias em SST pH 7,0 - 0,02M, foi incubado por uma hora a 4 C, e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante passou a constituir o antígeno "A" (Ag-A).

Para obtenção do antígeno "B" (Ag-B), incuba-se o precipitado da extração inicial com SST durante uma noite a 4 C.

O antígeno "C" (Ag-C), foi extraído do precipitado B (Ag-B) incubado por mais uma noite a 4 C.

Terminado o período de incubação, centrifuga-se a 3000 rpm por três minutos sob refrigeração. O sobrenadante constituiu o extrato antigênico, cujo teor de proteínas era dosado pela técnica de HARTREE (1972), tendo-se utilizado BSA na concentração de 50 µl/mL como proteína padrão.

A obtenção dos extratos antigênicos foi realizada, conforme técnica descrita por KRONMAN (1965).

### 2.8.2 - Taninagem dos eritrócitos

Misturou-se volumes iguais de suspensão de eritrócitos formalizados a 2,5% em SST pH 7,2 e solução de ácido tânico diluído 1:2000 no

mesmo tampão, conforme procedimento descrito por CZIMAS, modificado segundo STAVISTSKY (1964)

### 2.8.3 - Sensibilização dos eritrócitos

Para proceder a sensibilização dos eritrócitos, utilizou-se técnica de STAVISTSKY (1964). A 4 volumes de SST pH 6,4, adicionou-se 1 volume do antígeno "A" (Ag-A) na concentração de 500 µg /mL de proteínas, conforme obtenção descrita no item 2.8.1. A essa mistura, adicionou-se suspensão de eritrócitos a 2,5% taninizados. Incuba-se a temperatura ambiente por 20 a 30 minutos. Centrifuga-se a 1000 rpm durante 3 minutos, lava-se em SST, deixando na concentração final de 2,5%.

### 2.8.4 - Teste de hemaglutinação

Como controle para verificar se os eritrócitos estavam sensibilizados, foi feito teste de hemaglutinação em placas, utilizando um "pool" de soros de camundongos esquistossomóticos. Utilizou-se como controles: soro normal de camundongos e solução salina tamponada (SST).

O teste de hemaglutinação foi realizado conforme técnica de STAVISTSKY (1964).

## 2.9 - Determinação do Índice de fagocitose

### 2.9.1 - Com eritrócitos formolizados

Para a realização dos ensaios de fagocitose "in vitro", tomou-se como base, a técnica preconizada por ABUL-SALAM & MICHELSON (1980 a e b).

As monocamadas de células preparadas a partir de um "pool"

de hemolinfa de dez moluscos B. glabrata e dez moluscos B. tenagophila de cada grupo experimental, foram incubadas com 25  $\mu$ l de eritrócitos formolizados de carneiro, na concentração de  $3 \times 10^6$  cél/mm<sup>3</sup> durante 60 minutos em câmara úmida à temperatura de  $22\text{ C} \pm 2\text{ C}$ .

Terminado o período de incubação, retirava-se o excesso de eritrócitos. Em seguida, a preparação foi coberta com algumas gotas de (MME) para lavagem da lâmina e fixada com Metanol puro, corada com Giemsa diluída 1/5 em PBS a 2% durante 50 minutos e feita a montagem com bálsamo do Canadá.

Para avaliar o Índice de fagocitose, contava-se 200 células em duas preparações para cada experimento, expressando-se o valor final pela média aritmética, conforme fórmula abaixo utilizada por ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980 a).

$$\frac{\text{Nº de células fagocitando pelo} \\ \text{menos um eritrócito}}{\text{Nº total de células contadas} \\ (200)} \times 100$$

Foram utilizados no total 9 grupos de 10 moluscos B. glabrata das gerações P, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> e cinco grupos de 10 B. tenagophila da geração P, durante o curso da infecção até o 42º dia.

Foram feitas avaliações da fagocitose nos dias 1, 7, 28 e 42 pós-infecção para geração parental de B. glabrata e nos dias 7º e 42º para a geração F<sub>1</sub>. Para a geração F<sub>2</sub>, determinou-se a fagocitose somente da população de B. glabrata não infectada.

Para moluscos da espécie B. tenagophila, as avaliações foram feitas nos dias 1º, 14º, 28º e 42º pós-infecção para a geração parental.

O Índice de fagocitose foi analisado nos intervalos de tempo de 1, 7, 14, 28 e 42 dias pós-infecção, por coincidir com os estágios de desenvolvimento intra-molusco do parasito (PAN, 1965).

Dez moluscos livres de infecção (normais), foram utilizados como controle.

#### 2.9.2 - Com eritrócitos sensibilizados

Para avaliar a fagocitose empregando eritrócitos sensibilizados, foram utilizados 40 moluscos da espécie B. tenagophila, assim distribuídos:

- a) Grupo I - constituído por dois sub-grupos de 10 moluscos normais;
- b) Grupo II - constituído por dois sub-grupos de 10 moluscos no 7º dia de infecção.

O Índice de fagocitose foi avaliado através de metodologia descrita no item 2.9.1.

#### 2.10 - Produção de antissoros anti-hemolinfa

2.10.1 - Produção de antissoros anti-hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila livres de infecção.

ANTISSORO Ia-Para produção do antissoro, utilizamos um "pool" de hemolinfa de B. glabrata livres de infecção (HBGN), submetido a centrifugação a 12.000 rpm por dois minutos. O antígeno homogeneizado em adjuvante completo de Freund (volume /volume), foi inoculado em dois coelhos com aproximadamente três meses de idade conforme esquema de imunização apresentado na Tabela I.



T A B E L A I

Esquema de imunização para produção do antissoro Ia  
anti-hemolinfa em coelhos (\*)

| DIA | DOSE | ANTÍGENO<br>mg/mL | VIA DE<br>INOCULAÇÃO | VOLUME<br>mL |
|-----|------|-------------------|----------------------|--------------|
| 1º  | 1a   | 25,0              | GP                   | 1,0          |
| 25º | 2a   | 25,0              | GP                   | 1,0          |
| 40º | 3a   | 10,0              | SC                   | 0,5          |
| 47º | 4a   | 10,0              | SC                   | 0,5          |
| 54º | 5a   | 10,0              | SC                   | 0,5          |

GP = Gânglios Poplíteos

SC = Subcutânea (no dorso em vários pontos)

(\*) = Para a produção do antissoro Ib, modificou-se apenas a concentração do antígeno.

ANTISSIONO Ib - Os animais utilizados para a produção deste antissoro, foram dois coelhos com três meses de idade. O antígeno passou a ser hemolinfa de B. glabrata livres de infecção (HBGN), centrifugada a 12.000rpm durante dois minutos e posteriormente filtrada em milipore com malha de 0,65  $\mu$ .

As concentrações do antígeno foram 6 mg/mL nas duas primeiras inoculações e de 3 mg/mL nas inoculações seguintes. O esquema de inoculação foi realizado conforme aquele empregado para a produção do antissoro Ia.

ANTISSIONO II - Este antissoro foi produzido em dois coelhos com aproximadamente três meses de idade, através da inoculação de hemolinfa de B. tenagophila livres de infecção (HBTN). O antígeno era centrifugado a 12.000 rpm por dois minutos e homogeneizado em adjuvante completo de Freund (volume/volume). O esquema de imunização foi similar àquele empregado para a produção do antissoro Ia.

## 2.11 - Análise do soro anti-hemolinfa

Testou-se os antissoros Ia, Ib e II, obtidos a partir da 1a. semana após a 2a. inoculação do antígeno, através das técnicas de imunodifusão radial (OUCHTERLONY, 1958) e "Ring-Test". Como controle das reações, utilizou-se soro normal de coelho (SNC) frente a hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila.

Para realizar a imunodifusão, empregou-se os antígenos na concentração de 10 mg/mL e 6 mg/mL frente aos antissoros Ia, Ib e II, respectivamente.

## 2.12 - Análise comparativa de antígenos da hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila através de imunoeletroforese

Para análise da hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila, foi utilizada a técnica de imunoeletroforese unidimensional de GRABAR & BURTIN (1964).

Empregou-se como suporte agarose a 1% em tampão veronal tris-glicina (0,05 M - pH 8,5 -  $\mu$  0,02). As condições de forese e difusão, foram as

seguintes: tensão = 6v/cm; tempo = 1h e 50'; corrente = 2,5 mA; tempo de difusão = 30 horas; coloração com amido Schwartz a 0,1% por 15 minutos.

Os soros utilizados, foram antissoros anti-hemolinfa de moluscos normais produzidos em coelhos.

Na lâmina que originou a figura 19, após corrida eletroforética, o gel foi removido entre os orifícios 4 e 5. A parte inferior, onde foi aplicado o soro de coelho normal (orifício 5), foi imediatamente fixada em solução de ácido acético glacial a 2% durante 5 minutos. Este procedimento, impediu a difusão radial do soro aplicado naquele orifício.

O processo de coloração foi padrão para toda lâmina.

## 2.13 - Absorção de antissoro de coelho

### 2.13.1 - Anti-hemolinfa de B. glabrata

O soro obtido da sangria total, foi absorvido com hemolinfa de moluscos B. glabrata livres de infecção e infectados, conforme esquema a seguir:

TUBO A - 0,5 mL de soro anti-hemolinfa total foi adicionado a 0,5 mL de hemolinfa de B. glabrata livres de infecção (HBGN), constituindo o antissoro absorvido com hemolinfa normal.

TUBO B - 0,5 mL de soro anti-hemolinfa total foi adicionado a 0,5 mL de hemolinfa de B. glabrata infectadas (HBGI), constituindo o antissoro absorvido com hemolinfa de moluscos infectados.

Em seguida, os tubos A e B foram incubados a 37 C por uma hora e deixados em refrigerador durante a noite. Findo o período de incubação, o material foi centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos sob refrigeração. O

sobrenadante foi testado frente aos antissoros Ia e Ib.

#### 2.13.2 - Anti-hemolinfa de B. tenagophila

O soro obtido da sangria total de coelho, foi absorvido com hemolinfa de moluscos B. tenagophila normais e infectados de acordo com o esquema abaixo:

TUBO A - 0,5 mL de soro anti-hemolinfa total foi adicionado a 0,5 mL de hemolinfa de B. tenagophila livres de infecção (HBTN).

TUBO B - 0,5 mL de soro anti-hemolinfa total foi adicionado a 0,5 mL de hemolinfa de B. tenagophila infectadas (HBTI).

Cada tubo contendo o complexo soro-hemolinfa, foi incubado a 37 C por uma hora e deixados em refrigerador durante a noite. Terminado o período de incubação, centrifuga-se a 3000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante testado frente ao antissoro de B. tenagophila normal (antissoro II).

Após absorção, os antissoros Ia, Ib e II apresentaram reação negativa frente aos antígenos homólogos.

#### 2.14 - Dosagem de proteínas da hemolinfa

O teor de proteínas da hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila normais e infectados foi verificado através da técnica de Hartree (1972) (Lowry modificado).

Como proteína padrão, utilizou-se soro albumina bovina (BSA) liofilizada.

As leituras, foram realizadas em espectrofotômetro MICRONAL (B 242). Antes da dosagem, as amostras de hemolinfa eram centrifugadas a 12.000 rpm por

2 minutos a 5 C, ou submetidas a passagem em filtro de Milipore ( $0,65\mu$ ) com o objetivo de retirar os componentes celulares.

2.15 - Exposição de B. glabrata de população parental a linhagem BH após inoculação com diferentes antígenos.

Cinco grupos de 40 moluscos cada, foram expostos individualmente a dez miracídios da linhagem BH de S. mansoni, sendo, previamente anestesiados. Os antígenos utilizados foram: extrato de cercárias da linhagem BH; "pool" de hemolinfa de B. tenagophila normal sem células e BSA (soro albumina bovina).

A inoculação dos antígenos foi feita através da região céfalo-podal do molusco, aplicando-se 5  $\mu$ L do antígeno em cada animal.

O anestésico adotado foi solução aquosa de Mentol a 0,25 % . Após quatro horas de contato dos moluscos com o anestésico, eram considerados anestesiados, aqueles que não ofereciam reação a estímulo mínimo com agulha hipodérmica.

Quatro grupos, dois de 30 e dois de 20 exemplares de B. glabrata, foram utilizados como controles.

Os experimentos foram realizados conforme esquema a seguir:

GRUPO I - 40 moluscos foram inoculados com extrato de cercárias na concentração de 5 mg/mL de proteínas, infectados sete dias após aplicação do antígeno.

GRUPO II - 40 moluscos inoculados com extrato de cercárias com 0,5 mg/mL de proteínas, infectados um dia após aplicação do antígeno.

- GRUPO III - 40 moluscos inoculados com extrato de cercárias com 0,5 mg/mL de proteínas, infectadas sete dias após aplicação do antígeno.
- GRUPO IV - 40 moluscos inoculados com hemolinfa de B. tenagophila previamente filtrada em milipore com 25 mg/mL de proteínas, infectados um dia após inoculação do antígeno.
- GRUPO V - 40 moluscos inoculados com BSA na concentração de 5 mg/mL de proteínas, infectados um dia após inoculação do antígeno.
- GRUPO VI - 20 moluscos anestesiados e infectados (controle) no 1º dia após anestesia.
- GRUPOS - 30 moluscos/grupo, apenas submetidos a infecção VII e VIII (controle).
- GRUPO IX - 20 moluscos não infectados (controle).

### 3 - RESULTADOS

#### 3.1 - Análise morfológica e contagem de células da hemolinfa de B. glabrata durante a infecção esquistossomótica.

Na tabela II encontra-se os resultados da contagem de granulócitos da hemolinfa de B. glabrata das gerações P, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> durante o curso da infecção com S. mansoni da linhagem BH.

Na Figura 2, encontram-se os dados de estudo comparativo destas células, oriundas das gerações P e F<sub>1</sub>.

Como pode-se verificar, a partir de 24 horas após exposição, o número de células da geração parental está significativamente aumentado em relação ao número de células contado no decorrer do período de infecção até o 42º dia.

Para a geração parental, 24 horas após infecção, foi encontrado  $376,4 \pm 144,24$  células/mm<sup>3</sup> de hemolinfa e, para a geração F<sub>2</sub>, obteve-se  $146,3 \pm 32,8$  células/mm<sup>3</sup> de hemolinfa.

A partir do 3º dia, dados não tabelados, verifica-se um declínio no número de células granulocíticas na hemolinfa de B. glabrata da geração parental. Chegando-se a um número de células da ordem de  $114,6 \pm 49,3$  no 7º dia após infecção, mantendo-se praticamente constante até o 42º dia. Estando este número de células, um pouco abaixo daquele encontrado para os animais livres de infecção (controle).

Observa-se a existência de dois tipos de células na hemolinfa de B. glabrata - células espiroides, grandes, emitindo pseudópodos, as chamadas granulócitos (células envolvidas na fagocitose) e os chamados hialinócitos - células de tamanho inferior, sem pseudópodos, não aderentes a superfície

de vidro (Fig. 3).

Nas figuras 4, apresenta-se uma preparação corada, onde pode-se observar os granulócitos de B. glabrata, aderidos ao vidro. Estas células possuem núcleo excêntrico grande, arredondado, com poucos vacuolos e emitem grande número de pseudópodos.

Na tabela III, encontram-se os dados referentes a análise comparativa pelo teste (t), do número de células granulocíticas da hemolinfa de B. glabrata das gerações P, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> durante a infecção esquistossomótica.

Por esta análise, pode-se observar que, não existe diferença significativa entre os grupos controles (não infectados). Verifica-se valores estatisticamente significantes nos 7º e 42º dias de infecção nas gerações P e F<sub>1</sub> e no 1º dia pós-infecção entre as gerações P e F<sub>2</sub>.

### 3.2 - Análise morfológica e contagem de células da hemolinfa de B. tenagophila durante a infecção esquistossomótica.

Na tabela IV e figura 5, encontram-se os resultados da contagem de granulócitos da hemolinha de B. tenagophila da geração parental "P", durante o curso da infecção esquistossomótica.

Nas primeiras 24 horas após exposição, o número de células aumenta significativamente em relação aos demais períodos analisados, chegando a  $940 \pm 280,4$  cél./mm<sup>3</sup> de hemolinfa.

Efetivamente, o número de granulócitos da hemolinfa de B. tenagophila da geração parental, no decurso da infecção, mostra-se significativamente elevado, em relação às células circulantes, quando comparado com resultados do mesmo período em B. glabrata. (Tabela V ).

Como ocorre para B. glabrata, na B. tenagophila, também observa-se



um declínio do número de granulócitos circulantes a partir do 30º dia (dados não computados). Encontrando-se do 70º ao 420º dia pós-infecção, valores muito próximos, com comportamento semelhante aquele verificado para B. glabrata.

Na figura 6, é possível observar células grandes, possuindo pseudópodos, aderindo e espalhando-se sobre a superfície de vidro, correspondentes aos granulócitos. Células menores, sem pseudópodos, não aderente, são os hialinócitos.

Em monocamadas de células da hemolinfa de B. tenagophila, observa-se que os granulócitos apresentam grande número de vacúolos (Fig. 7 ).

Na tabela V, estão os dados da análise estatística pelo teste (t), do número de células granulocíticas entre B. glabrata e B. tenagophila no decurso da infecção pelo S. mansoni.

Por esta análise comparativa, o número de granulócitos em B. tenagophila, é significativamente maior do que em B. glabrata, durante todo período de infecção e também, na população de moluscos não infectados.

### 3.3 - Quantificação da capacidade fagocitária de granulócitos de B. glabrata e B. tenagophila livres de infecção e infectados com as linhagens BH e SJ do S. mansoni.

Os resultados referentes a avaliação quantitativa e qualitativa da fagocitose de granulócitos da hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila, estão expressos nas tabelas VI, VII, VIII, IX, X e XI, figuras 10, 11, 12, 13)

Analisando-se os dados da tabela IX pelo teste "t" (Student), verifica-se que, a capacidade de fagocitose dos granulócitos da hemolinfa de B. glabrata da geração "P" livres de infecção e no decorrer da infecção es -

quistossomótica, é superior a capacidade de fagocitose dos moluscos da geração  $F_{1(s)}$ , constituído por moluscos oriundos de animais da geração parental "P" que se apresentaram positivos até o 100º dia após exposição a miracídeos. Com relação a geração  $F_{2(s)}$  livres de infecção, que apresentou um índice de fagocitose da ordem de 33,5%, verifica-se capacidade fagocitária inferior a dos animais da geração parental, para os quais, encontrou-se 52,6% de fagocitose. Nos grupos  $F_{1(s)}$  e  $F_{2(s)}$  livres de infecção os granulócitos não apresentaram diferença significativa na capacidade fagocitária frente a hemácia de carneiro quando comparadas a geração P (Tab. IX).

Na Tabela VII, encontram-se os dados referentes a quantificação da capacidade fagocitária de moluscos da espécie B. tenagophila da geração parental "P".

Os granulócitos oriundos dos B. tenagophila livres de infecção, apresentaram 60,5% de fagocitose, estatisticamente significante, quando comparado com a capacidade de fagocitose das células de B. glabrata nas mesmas condições. Estas células apresentaram índice médio de fagocitose da ordem de 52,6% (Tabela VI).

Granulócitos coletados da hemolinfa de B. tenagophila no decorrer da infecção, forneceram índice que variaram de 35%, 49,8%, 41,2% e 44,5% para os 1º, 14º, 28º e 42º dias após exposição aos miracídeos, respectivamente. Estes índices foram significativamente menores em relação aqueles obtidos para B. glabrata dentro dos mesmos períodos de infecção. O teste de significância para todos os grupos, quando comparados dois-a-dois, mostraram valores de  $p < 0,005$  (Tabela X).

Na Tabela VIII, acham-se os resultados referentes a quantificação da capacidade fagocitária de granulócitos de B. tenagophila frente a eritrócitos sensibilizados de carneiro. Esta análise apresentou resultados abaixo daqueles observados para os grupos inoculados com eritrócitos apenas

formolizados.

Em dados não tabelados, verificou-se resultados semelhantes para B. glabrata. Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata e, os percentuais de fagocitose apresentados, são resultantes de uma média.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível definir um modelo de trabalho, passando-se a utilizar para os testes de atividade fagocítica dos granulócitos, eritrócitos formolizados de carneiro.

Na figura 14, pode-se observar a sequência do evento da fagocitose por células da hemolinfa de moluscos do gênero Biomphalaria. Em (A), os eritrócitos (partículas estranhas) entram em contato com a superfície da célula, aderindo à membrana. Iniciando-se em seguida, a ingestão da partícula (B) e, finalmente, a completa interiorização da mesma (C).

#### 3.4 - Resultados da análise dos soros anti-hemolinfa através de "Ring-Test", imunodifusão e imunoeletroforese.

Os antissoros Ia, Ib e II após a 2a. inoculação do antígeno, já apresentavam "Ring-Test" fortemente positivo para antígenos e antissoros totais.

Estes antissoros testados através da imunodifusão radial, revelaram banda de precipitação até a diluição de 1/32 para o imunossoro II e 1/64 para os imunossoros Ia e Ib após a 5a. inoculação dos antígenos.

Nas figuras 15, 16 e 17 encontram-se os resultados da análise imunoeletroforética da hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila livres de infecção e infectados com as linhagens simpátricas do S. mansoni.

O antissoro contra hemolinfa de B. glabrata mostrou título de 1/64 com o soro coletado após a 5a. inoculação do antígeno. O antissoro con

tra hemolinfa de B. tenagophila apresentou título de 1/32 após a 5a. inoculação do antígeno.

O antissoro homólogo reconheceu pelo menos seis sistemas precipitantes na hemolinfa de B. tenagophila infectada e, no mínimo quatro no molusco livre de infecção.

Na hemolinfa de B. glabrata identificamos 6 bandas de precipitação para os moluscos normais. Os animais infectados, apresentaram pelo menos cinco componentes.

Nas figuras 15 e 16, pode-se verificar a presença de antígenos comuns entre B. glabrata e B. tenagophila.

Após absorção do imunossoro anti-hemolinfa, verificou-se a permanência de dois componentes na hemolinfa dos moluscos B. tenagophila infectados (Figura 16).

Pode-se constatar ainda, a presença de um componente em concentração muito acentuada, com migração eletroforética anódica, para ambas as espécies de moluscos livres de infecção ou infectados. Possivelmente, este componente, corresponde a hemoglobina.

Observam-se também, componentes protéicos em concentrações mais baixas, com mobilidade catódica, estando nele menos, um deles, presente em ambos os moluscos.

Pelo perfil da Figura 17, poderíamos sugerir que vários componentes da hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila, apresentam uma mobilidade eletroforética semelhante à da gama globulina dos mamíferos (Figura 17), como pode ser verificado comparando-se com os perfis eletroforéticos do soro de coelho e hemolinfa.

### 3.5 - Indução de resistência em B. glabrata suscetível ao S. mansoni

Na Tabela XII encontram-se os resultados referentes a porcentagem de infecção e mortalidade de moluscos da espécie B. glabrata, após inoculação com extrato antigênico de cercárias da linhagem BH do S. mansoni, soro albumina bovina (BSA) e hemolinfa de B. tenagophila livre de infecção.

Na Tabela XIII encontram-se os resultados da análise estatística comparativa dois-a-dois realizado pelo teste "t" de Student. Foi encontrado 29% e 36% de infecção para os grupos I e III respectivamente, após sete dias de infecção, enquanto, os grupos controles, variaram de 66,7% a 80,0% de infecção. Estes dados apresentaram-se altamente significativos.

O grupo II que foi inoculado com extrato de cercárias BH, 24 horas após infecção, mostrou-se também altamente significativo em relação aos grupos controles.

Estes resultados, indicam que, o extrato antigênico de cercárias BH, conferiu aproximadamente 50% de resistência para os moluscos da espécie B. glabrata, independentemente da exposição aos miracídios ser realizada no primeiro ou no sétimo dia após inoculação do antígeno.

A hemolinfa de B. tenagophila (Grupo IV), não conferiu qualquer proteção aos moluscos B. glabrata suscetíveis. O grupo experimental e controles, apresentaram valores muito próximos, ou seja: 68,5% de infecção, contra 66,7%, 68,3% e 80,0%. Dados que quando comparados dois-a-dois, revelaram-se não significativos (Tabela XIII).

O soro albumina bovina (BSA), serviu apenas como controle do experimento.

A mortalidade dos animais, variou de 12,5% a 37,5% para os grupos experimentais e de 18,5% a 35,3% para os grupos controles (Tabela XII).

O grupo VII, com índice de infecção de 68,8%, teve como objetivo, descartar a influência da anestesia no índice de infecção dos animais sem qualquer tratamento prévio.

3.6 - Porcentagem de infecção em B. glabrata e em B. tenagophila expostos as linhagens BH e SJ do S. mansoni.

Moluscos B. glabrata das gerações P e F<sub>1</sub> e B. tenagophila da geração P, apresentaram índices de infecção de 80%, 83,3% e 70,8% respectivamente (Tabela XIV).

Foi considerado para efeito de cálculos, apenas os moluscos que eliminaram cercárias e/ou aqueles que permaneceram vivos até o final do experimento.

3.7 - Testes de hemaglutinação com eritrócitos sensibilizados com extrato de cercárias de S. mansoni.

Encontrou-se título correspondente a 1/16 para antissoro de camundongos esquistossomóticos. As reações controles apresentaram-se negativas.

3.8 - Teor protéico da hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila normais e infectados

Na Tabela XV acham-se os dados referentes a dosagem de proteínas da hemolinfa dos moluscos das espécies estudadas. Conforme os dados da tabela, os moluscos infectados B. glabrata ou B. tenagophila, sofrem uma significativa redução na concentração de proteínas da hemolinfa. Enquanto nos moluscos normais B. glabrata encontrou-se  $4,27 \pm 1,54$  g% de proteínas, nos animais infectados verificou-se  $1,30 \pm 0,56$  g%. Em B. tenagophila, passa-se de  $6,06 \pm 1,32$  g% de proteínas nos animais normais, para 3,39 g% nos moluscos infectados.

3.9 - Teor protéico do extrato antigênico obtido de cercárias de S. mansoni da linhagem BH.

Na Tabela XVI, estão os dados referentes ao teor de proteínas do sobrenadante obtido do extrato bruto de um liofilizado de cercárias.

Conforme os resultados, a segunda extração apresentou maior concentração protéica, com 1623  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto, as outras frações forneceram 1319 e 440  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

TABELA II

Número de granulócitos na hemolinfa de B. glabrata das gerações P, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> durante o curso da infecção por S. mansoni ( n = 15 moluscos/ensaio)

| GERAÇÕES           | DIA PÓS-INFECÇÃO | CÉLULAS/mm <sup>3</sup> DE HEMOLINFA |       |       |
|--------------------|------------------|--------------------------------------|-------|-------|
|                    |                  | $\bar{x}$                            | $\pm$ | SD    |
| P(N)               | -                | 173,4                                | $\pm$ | 56,3  |
| P                  | 1                | 376,4                                | $\pm$ | 144,2 |
| P                  | 7                | 114,6                                | $\pm$ | 49,3  |
| P                  | 28               | 139,2                                | $\pm$ | 59,2  |
| P                  | 42               | 148,5                                | $\pm$ | 30,9  |
| F <sub>1</sub> (N) | -                | 187,5                                | $\pm$ | 59,9  |
| F <sub>1</sub>     | 7                | 224,7                                | $\pm$ | 101,5 |
| F <sub>1</sub>     | 14               | 135,7                                | $\pm$ | 49,5  |
| F <sub>1</sub>     | 28               | 163,2                                | $\pm$ | 55,6  |
| F <sub>1</sub>     | 42               | 212,5                                | $\pm$ | 68,6  |
| F <sub>2</sub> (N) | -                | 164,0                                | $\pm$ | 52,9  |
| F <sub>2</sub>     | 1                | 146,3                                | $\pm$ | 32,8  |

N = Grupo controle (normal)

P = Geração parental.



TABELA III

Análise comparativa pelo teste (t) do número de granulócitos entre diferentes gerações de *B. glabrata* durante a infecção esquistossomótica (n = 15 moluscos/ensaios)

| MOLUSCOS<br>(tratamento) | DIAS PÓS-<br>INFECÇÃO                   | $\bar{x}_p$ | SD <sub>p</sub>                         | $\bar{x}_{F_1}$ | SD <sub>F<sub>1</sub></sub> | P                  |
|--------------------------|-----------------------------------------|-------------|-----------------------------------------|-----------------|-----------------------------|--------------------|
| Normais (controle)       | -                                       | 173,4       | ± 56,3                                  | 187,5           | ± 59,9                      | 0,20 <sup>NS</sup> |
| Infectados               | 7                                       | 114,6       | ± 49,3                                  | 224,7           | ± 101,5                     | 0,005***           |
| Infectados               | 28                                      | 139,2       | ± 59,2                                  | 163,2           | ± 55,6                      | 0,20 <sup>NS</sup> |
| Infectados               | 42                                      | 148,5       | ± 30,9                                  | 212,5           | ± 68,6                      | 0,005***           |
|                          |                                         |             |                                         |                 |                             |                    |
|                          |                                         | $\bar{x}_p$ | SD <sub>p</sub>                         | $\bar{x}_{F_2}$ | SD <sub>F<sub>2</sub></sub> |                    |
| Normais                  | -                                       | 173,4       | ± 56,33                                 | 164,0           | ± 52,9                      | 0,50 <sup>NS</sup> |
| Infectados               | 1                                       | 376,4       | ± 144,24                                | 146,3           | ± 32,8                      | 0,005***           |
|                          |                                         |             |                                         |                 |                             |                    |
| P = geração parental     | F <sub>1</sub> = geração F <sub>1</sub> |             | F <sub>2</sub> = geração F <sub>2</sub> |                 |                             |                    |
| NS = não significativo   | *** = altamente significativo           |             |                                         |                 |                             |                    |

TABELA IV

Número de granulócitos na hemolinfa de B. tenagophila  
da geração parental durante o curso da infecção  
(n = 15 moluscos/ensaio)

| DIAS PÓS-INFEÇÃO | CÉLULAS/mm <sup>3</sup> DE HEMOLINFA |       |       |
|------------------|--------------------------------------|-------|-------|
|                  | $\bar{x}$                            |       | SD    |
| - (controle)     | 288,0                                | $\pm$ | 66,8  |
| 1                | 940,0                                | $\pm$ | 280,4 |
| 7                | 468,5                                | $\pm$ | 182,3 |
| 14               | 400,3                                | $\pm$ | 86,5  |
| 28               | 369,0                                | $\pm$ | 123,0 |
| 42               | 470,1                                | $\pm$ | 115,6 |

TABELA V

Análise comparativa pelo teste (t) do número de granulócitos entre  
B. glabrata e B. tenagophila no decurso da infecção pelo S. mansoni  
 (n = 15 moluscos/ensaio) - Geração parental (P)

| MOLUSCOS<br>(tratamento) | DIAS PÓS-<br>INFECÇÃO | $\bar{x}_{BG}$ | $SD_{BG}$ | $\bar{x}_{BT}$ | $SD_{BT}$ | p***  |
|--------------------------|-----------------------|----------------|-----------|----------------|-----------|-------|
| Normais                  | -                     | 173,4          | 56,3      | 288,0          | 66,8      | 0,005 |
| Infectados               | 1                     | 376,4          | 144,2     | 940,0          | 280,4     | 0,005 |
| Infectados               | 7                     | 114,6          | 49,3      | 468,5          | 182,3     | 0,005 |
| Infectados               | 28                    | 139,2          | 59,2      | 369,0          | 123,0     | 0,005 |
| Infectados               | 42                    | 148,5          | 30,9      | 470,1          | 115,6     | 0,005 |

\*\*\* altamente significativo

BG = Biomphalaria glabrata

BT = Biomphalaria tenagophila

T A B E L A VI

Atividade fagocitária de granulócitos de B. glabrata  
frente a eritrócitos formolizados de carneiro durante  
o curso da infecção esquistossomótica  
( n = 10 moluscos/ensaio )

| MOLUSCOS<br>(tratamento) | GERAÇÕES       | DIAS PÓS-<br>INFECÇÃO | FAGOCITOSE (%) |       |      |
|--------------------------|----------------|-----------------------|----------------|-------|------|
|                          |                |                       | $\bar{x}$      |       | SD   |
| Normais                  | P              | -                     | 52,6           | $\pm$ | 4,15 |
| Infectados               | P              | 1                     | 66,5           | $\pm$ | 1,47 |
| Infectados               | P              | 7                     | 49,0           | $\pm$ | 2,86 |
| Infectados               | P              | 28                    | 62,2           | $\pm$ | 4,00 |
| Infectados               | P              | 42                    | 56,6           | $\pm$ | 3,75 |
| Normais                  | F <sub>1</sub> | -                     | 32,2           | $\pm$ | 1,64 |
| Infectados               | F <sub>1</sub> | 7                     | 42,2           | $\pm$ | 2,46 |
| Infectados               | F <sub>1</sub> | 42                    | 37,9           | $\pm$ | 3,28 |
| Normais                  | F <sub>2</sub> | -                     | 33,5           | $\pm$ | 3,00 |

P = geração parental.

T A B E L A VII

Atividade Fagocitária de granulócitos de *B. tenagophila* da geração parental "P" frente a eritrócitos formolizados de carneiro durante a infecção esquistossomótica (n = 10 moluscos/ensaio)

| MOLUSCOS<br>(tratamento) | DIAS PÓS-<br>INFECÇÃO | FAGOCITOSE (%) |       |      |
|--------------------------|-----------------------|----------------|-------|------|
|                          |                       | $\bar{x}$      | $\pm$ | SD   |
| Normais                  | -                     | 60,5           | $\pm$ | 3,24 |
| Infectados               | 1                     | 35,0           | $\pm$ | 4,60 |
| Infectados               | 14                    | 49,8           | $\pm$ | 4,55 |
| Infectados               | 28                    | 41,2           | $\pm$ | 4,84 |
| Infectados               | 42                    | 44,5           | $\pm$ | 1,11 |

T A B E L A VIII

Atividade fagocitária de granulócitos de B. tenagophila da geração parental "P" frente a eritrócitos sensibilizados de carneiro durante a infecção esquistossomótica  
(n = 10 moluscos/ensaio)

| MOLUSCOS<br>(tratamento) | DIAS PÓS-<br>INFECÇÃO | FAGOCITOSE (%) |       |      |
|--------------------------|-----------------------|----------------|-------|------|
|                          |                       | $\bar{x}$      | $\pm$ | SD   |
| Normais                  | -                     | 51,7           | $\pm$ | 1,31 |
| Infectados               | 7                     | 33,2           | $\pm$ | 7,11 |

TABELA IX

Análise comparativa pelo teste (t) da atividade fagocitária de granulócitos de B. glabrata durante a infecção esquistossomótica

| MOLUSCOS<br>(tratamento) | GERAÇÕES       | DIAS PÓS-<br>INFECÇÃO | FOGOCITOSE (%) |            |                    |
|--------------------------|----------------|-----------------------|----------------|------------|--------------------|
|                          |                |                       | $\bar{x}$      | SD         | p                  |
| Normais                  | P              | -                     | 52,6           | $\pm$ 4,15 | 0,005***           |
| Normais                  | F <sub>1</sub> | -                     | 32,2           | $\pm$ 1,64 |                    |
| Infectedados             | P              | 7                     | 49,0           | $\pm$ 2,86 | 0,005***           |
| Infectedados             | F <sub>1</sub> | 7                     | 42,2           | $\pm$ 2,46 |                    |
| Infectedados             | P              | 42                    | 56,6           | $\pm$ 3,75 | 0,005***           |
| Infectedados             | F <sub>1</sub> | 42                    | 37,9           | $\pm$ 3,28 |                    |
| Normais                  | P              | -                     | 52,6           | $\pm$ 4,15 | 0,005***           |
| Normais                  | F <sub>2</sub> | -                     | 33,5           | $\pm$ 3,00 |                    |
| Normais                  | F <sub>1</sub> | -                     | 32,2           | $\pm$ 1,64 | 0,50 <sup>NS</sup> |
| Normais                  | F <sub>2</sub> | -                     | 33,5           | $\pm$ 3,00 |                    |

NS = não significativo

\*\*\* = altamente significativo

T A B E L A X

Análise comparativa pelo teste (t) da atividade fagocitária de granulócitos de *B. tenagophila* da geração parental durante a infecção esquistossomótica

| MOLUSCOS<br>(tratamento) | DIAS PÓS-<br>INFECÇÃO | FAGOCITOSE (%) |       |      |          |
|--------------------------|-----------------------|----------------|-------|------|----------|
|                          |                       | -<br>x         |       | SD   | p        |
| Normais                  | -                     | 60,5           | $\pm$ | 3,24 | 0,005*** |
| Infectados               | 1                     | 35,0           | $\pm$ | 4,60 |          |
| Normais                  | -                     | 60,5           | $\pm$ | 3,24 | 0,005*** |
| Infectados               | 14                    | 49,8           | $\pm$ | 4,55 |          |
| Normais                  | -                     | 60,5           | $\pm$ | 3,24 | 0,005*** |
| Infectados               | 28                    | 41,2           | $\pm$ | 4,84 |          |
| Normais                  | -                     | 60,5           | $\pm$ | 3,24 | 0,005*** |
| Infectados               | 42                    | 44,5           | $\pm$ | 1,11 |          |

\*\*\* = altamente significativo



T A B E L A X I

Análise comparativa pelo teste (t) da atividade fagocitária de granulócitos de B. glabrata e B. tenagophila da geração parental (P) durante a infecção esquistossomótica (n = 10 moluscos/ensaio)

| MOLUSCOS<br>(tratamento) | DIAS PÓS-<br>INFECÇÃO | F A G O C I T O S E (%) |       |           |                |       |           |          |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------|-------|-----------|----------------|-------|-----------|----------|
|                          |                       | $\bar{x}_{BG}$          | $\pm$ | $SD_{BG}$ | $\bar{x}_{BT}$ | $\pm$ | $SD_{BT}$ | p        |
| Normais                  | -                     | 52,6                    | $\pm$ | 4,15      | 60,5           | $\pm$ | 3,24      | 0,005*** |
| Infectados               | 1                     | 66,6                    | $\pm$ | 1,47      | 35,0           | $\pm$ | 4,60      | 0,005*** |
| Infectados               | 28                    | 62,2                    | $\pm$ | 4,00      | 41,2           | $\pm$ | 4,84      | 0,005*** |
| Infectados               | 42                    | 56,6                    | $\pm$ | 3,75      | 44,5           | $\pm$ | 1,11      | 0,005*** |

\*\*\* = altamente significativo

BG = Biomphalaria glabrata

BT = Biomphalaria tenagophila

T A B E L A    XII

Porcentagem de infecção e mortalidade em B. glabrata suscetível infectada com S. mansoni da linhagem BH após inoculação com diferentes antígenos (observações até o 60º dia pós- infecção )

| GRUPOS ANIMAIS<br>(Nº) |       | TRATAMENTO<br>ANTÍGENO INOCULADO      DIAS ANTES DA EXPOSIÇÃO |   | INFECÇÃO<br>(%) | MORTALIDADE<br>(%) |
|------------------------|-------|---------------------------------------------------------------|---|-----------------|--------------------|
| I                      | 24/40 | Extrato de cercárias BH                                       | 7 | 29,0            | 37,5               |
| II                     | 32/40 | Extrato de cercárias BH                                       | 1 | 31,0            | 12,5               |
| III                    | 25/40 | Extrato de cercárias BH                                       | 7 | 36,0            | 20,0               |
| IV                     | 35/40 | Hemolinfa<br>BTN (Cél-)                                       | 1 | 68,5            | 23,0               |
| V                      | 22/40 | BSA                                                           | 1 | 59,0            | 23,0               |
| <u>CONTROLES</u>       |       |                                                               |   |                 |                    |
| VI*                    | 17/20 | -                                                             | - | 68,8            | 35,3               |
| VII**                  | 30/30 | -                                                             | - | 80,0            | -                  |
| VIII***                | 27/30 | -                                                             | - | 66,7            | 18,5               |
| IX****                 | 20/20 | -                                                             | - | -               | 30,0               |

\* = anestesia/infecção

\*\* = infecção

\*\*\* = infecção

\*\*\*\* = mortalidade

T A B E L A XIII

Porcentagem de infecção em B. glabrata suscetível após inoculação com diferentes antígenos (análise comparativa entre os grupos experimentais e controles pelo teste "t")

| GRUPOS | TRATAMENTO<br>ANTÍGENO<br>INOCULADO | DIAS ANTES<br>DA EXPOSIÇÃO | INFECÇÃO<br>(%) | n  | p                   |
|--------|-------------------------------------|----------------------------|-----------------|----|---------------------|
| I      | Extrato de<br>cercárias             | 7                          | 29,0            | 24 | 0,005***            |
| VII    | Controle                            | -                          | 80,0            | 30 |                     |
| V      | BSA                                 | 1                          | 59,0            | 22 | 0,236 <sup>NS</sup> |
| II     | Extrato de<br>cercárias             | 1                          | 31,0            | 32 |                     |
| VI     | Controle                            | -                          | 68,8            | 17 | 0,601 <sup>NS</sup> |
| VII    | Controle                            | -                          | 80,0            | 30 |                     |
| VI     | Controle                            | -                          | 68,8            | 17 | 0,006**             |
| II     | Extrato de<br>cercárias             | 1                          | 31,0            | 32 |                     |
| VII    | Controle                            | -                          | 80,0            | 30 | 0,254 <sup>NS</sup> |
| VIII   | Controle                            | -                          | 66,7            | 27 |                     |
| VIII   | Controle                            | -                          | 66,7            | 27 | 0,005***            |
| II     | Extrato de<br>cercárias             | 1                          | 31,0            | 32 |                     |
| VII    | Controle                            | -                          | 80,0            | 30 | 0,005***            |
| III    | Extrato de<br>cercárias             | 7                          | 36,0            | 25 |                     |

T A B E L A XIII - continuação

| GRUPOS | TRATAMENTO<br>ANTÍGENO<br>INOCULADO | DIAS ANTES<br>DA EXPOSIÇÃO | INFECÇÃO<br>(%) | n  | p        |
|--------|-------------------------------------|----------------------------|-----------------|----|----------|
| III    | Extrato de<br>cercárias             | 7                          | 36,0            | 25 | 0,020*   |
| VIII   | Controle                            | -                          | 66,7            | 27 |          |
| II     | Extrato de<br>cercárias             | 1                          | 31,0            | 32 | 0,005*** |
| VII    | Controle                            | -                          | 80,0            | 30 |          |
| VIII   | Controle                            | -                          | 66,7            | 27 | 0,005*** |
| I      | Extrato de<br>cercárias             | 7                          | 29,0            | 24 |          |
| V      | Hemolinfa<br>(BTN)                  | 1                          | 68,5            | 35 | 0,005*** |
| II     | Extrato de<br>cercárias             | 1                          | 31,0            | 32 |          |

NS = não significativo

\* = significativo

\*\* = muito significativo

\*\*\* = altamente significativo

BTN = B. tenagophila normal

T A B E L A XIV

Porcentagem de infecção das gerações P e F<sub>1</sub> de B. glabrata e da geração P de B. tenagophila até o 60º dia após exposição a miracídeos das linhagens simpátricas (BH e SJ)

| GERAÇÕES<br>(espécie) | MOLUSCOS EXPOSTOS<br>(nº) | MOLUSCOS ELIMINANDO CERCÁRIAS |      |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------------|------|
|                       |                           | nº                            | %    |
| P (BG)                | 30                        | 24                            | 80,0 |
| F <sub>1</sub> (BG)   | 30                        | 25                            | 83,3 |
| P (BT)                | 24                        | 17                            | 70,8 |

P (BG) = B. glabrata da geração parental

F<sub>1</sub>(BG) = B. glabrata da geração F<sub>1</sub>

P (BT) = B. tenagophila da geração parental

T A B E L A XV

Dosagem de proteínas da hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila  
da geração parental ("pool" de 10 animais/grupo)

| MOLUSCO<br>(espécie) | TAMANHO<br>(mm) | INFECÇÃO<br>(cêpa) | PROTEÍNAS<br>g% |   |      |
|----------------------|-----------------|--------------------|-----------------|---|------|
| BGPN                 | 14,4            | -                  | 4,27            | ± | 1,54 |
| BGPI                 | 16,0            | BH                 | 1,30            | ± | 0,56 |
| BTPN                 | 14,6            | -                  | 6,06            | ± | 1,32 |
| BTPI*                | -               | SJ                 | 3,39            |   | -    |

\* Resultados obtidos por BALAN, D. (1990)

BGPN = B. glabrata normal da geração parental

BGPI = B. glabrata infectado da geração parental

BTPN = B. tenagophila normal da geração parental

BTPI = B. tenagophila infectado da geração parental

T A B E L A XVI

Concentração protéica do extrato antigênico de cercárias da  
linhagem BH de S. mansoni

| EXTRAÇÃO              | CONCENTRAÇÃO PROTÉICA<br>( µg/mL) |
|-----------------------|-----------------------------------|
| 1 <sup>a</sup> (Ag-A) | 1.319                             |
| 2 <sup>a</sup> (Ag-B) | 1.623                             |
| 3 <sup>a</sup> (Ag-C) | 440                               |

Ag = antígeno

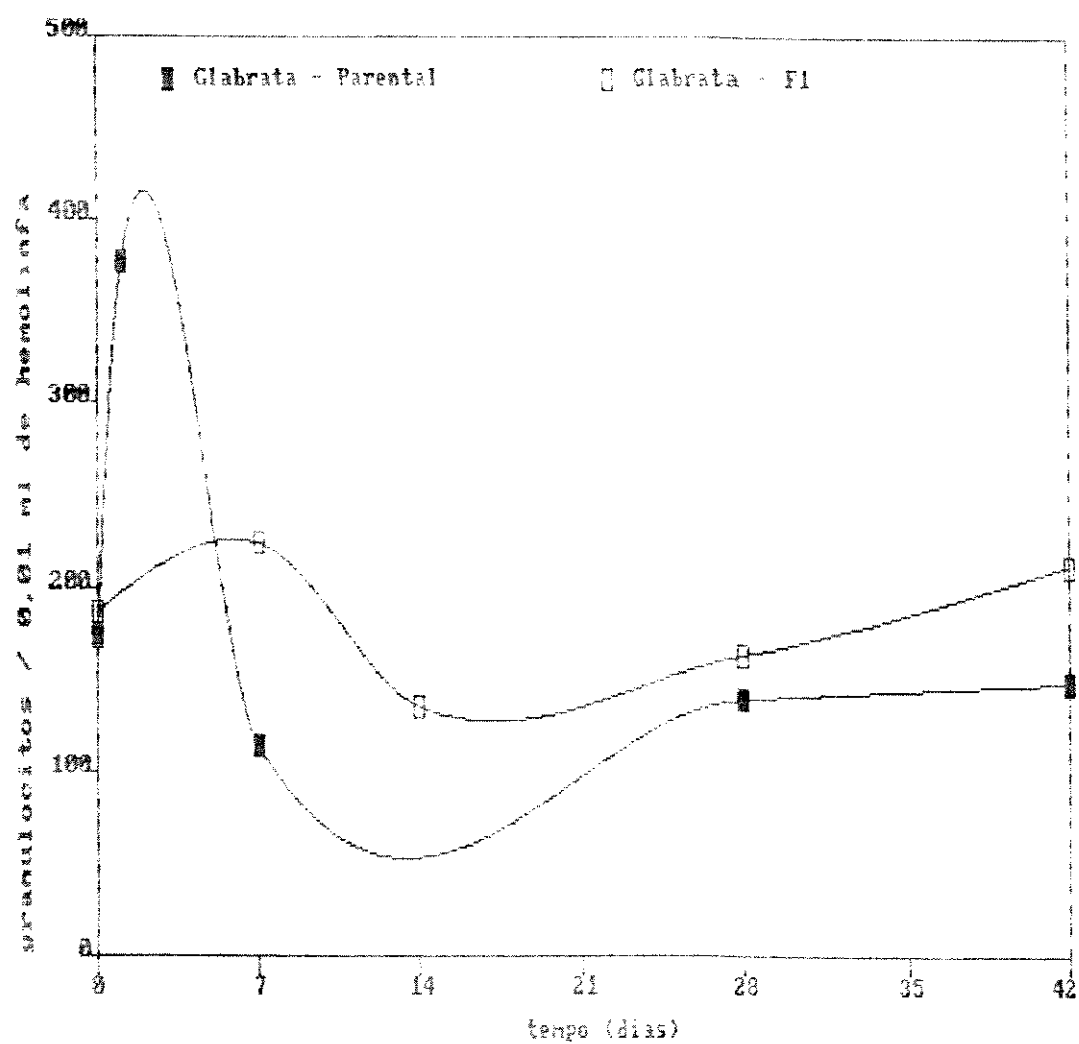


Fig. 2 - Avaliação do número de células granulocíticas da hemo - linfa de B. glabrata das gerações parental e F<sub>1</sub> durante a infecção esquistossomótica.



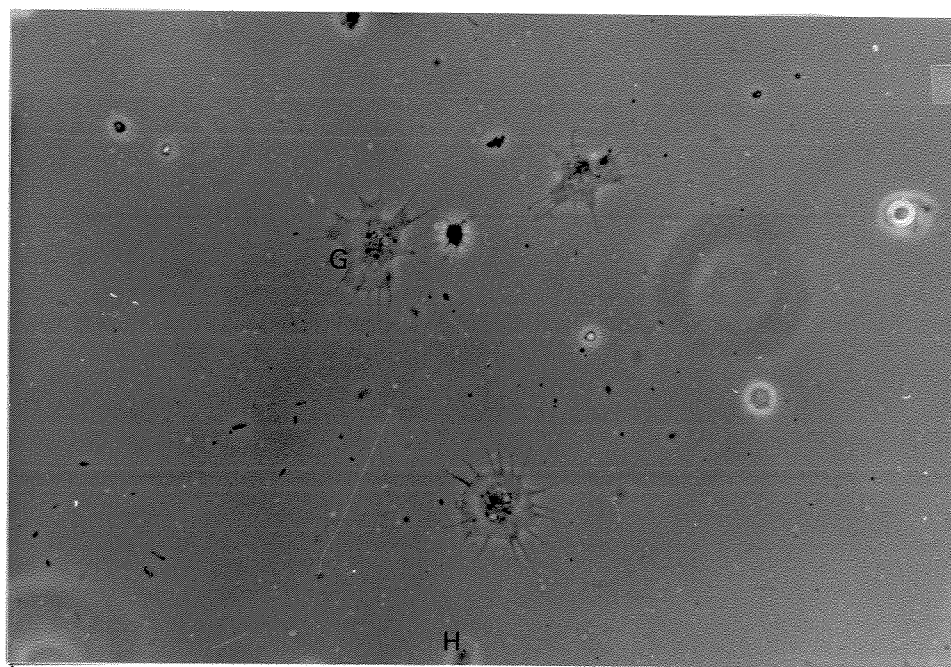


Fig. 3 - Fotomicrografia de amebócitos: granulócitos (G) e hialinócitos (H) de B. glabrata normais. Material fresco observado em microscopia de fase.

X 130

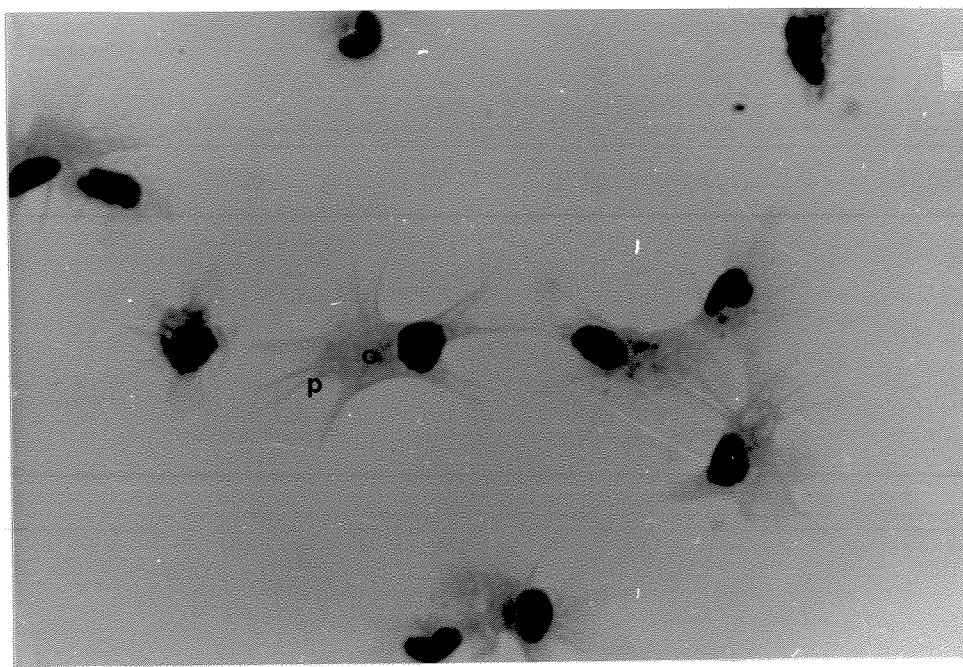


Fig. 4 - Fotomicrografia de monocamadas de granulócitos de *B. glabrata* livres de infecção.

X 330

n = núcleo; p = pseudópodos; c = citoplasma

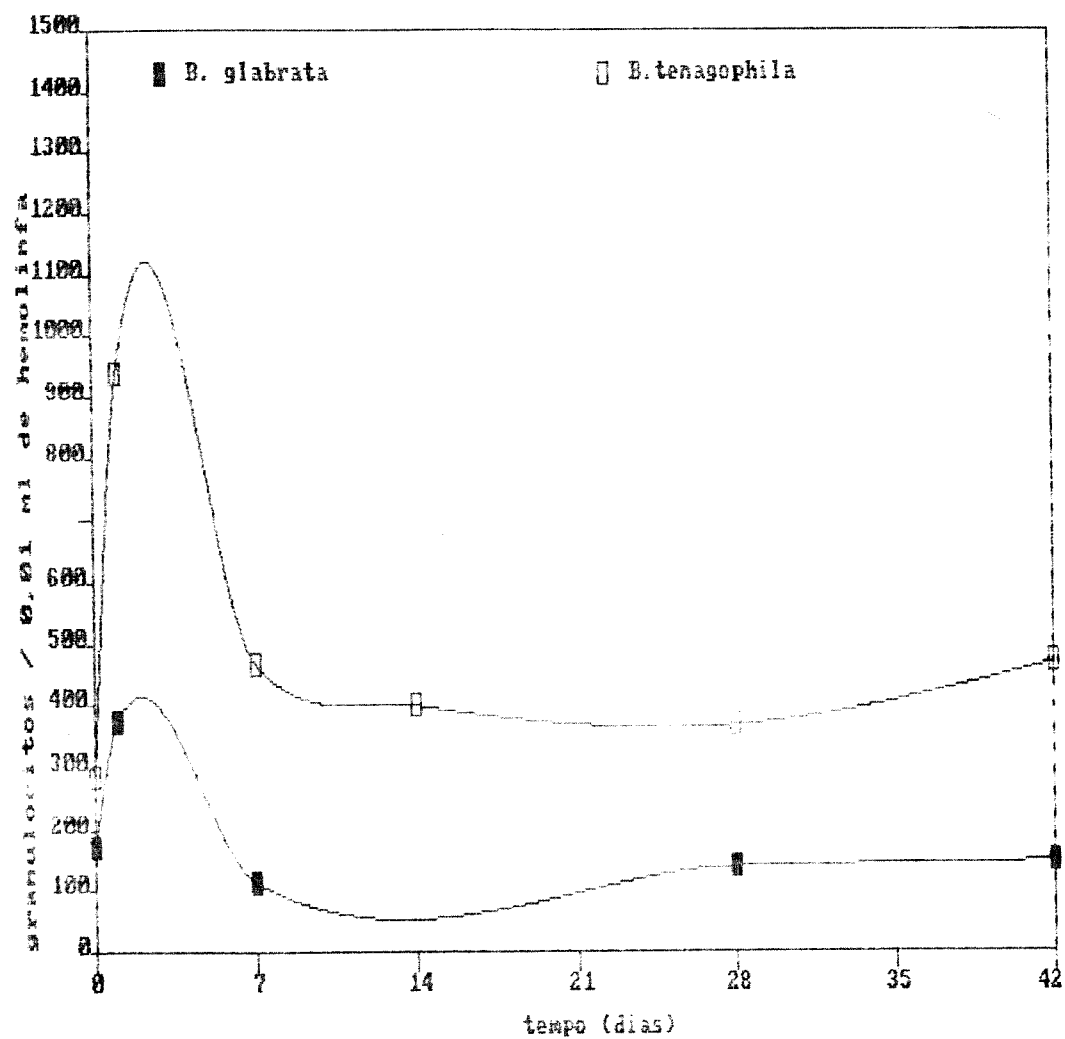


Fig. 5 - Avaliação do número de células granulocíticas da hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* da geração parental durante a infecção esquistossomótica.

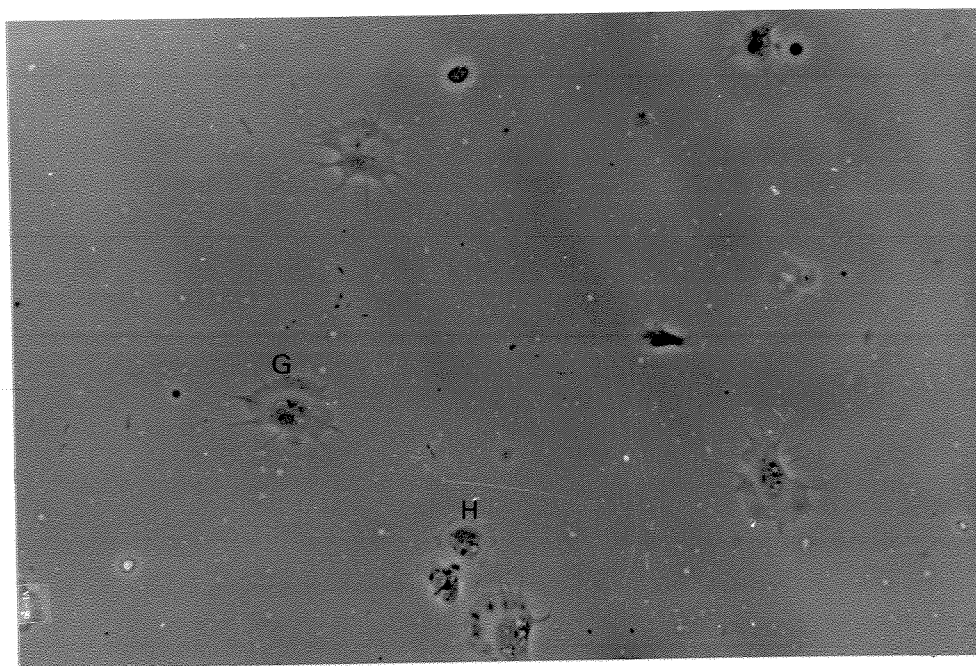


Fig. 6 - Fotomicrografia de amebócitos: granulócitos (G) e hialinócitos (H) de B. tenagophila normais. Material fresco observado em microscopia de fase.

X 130

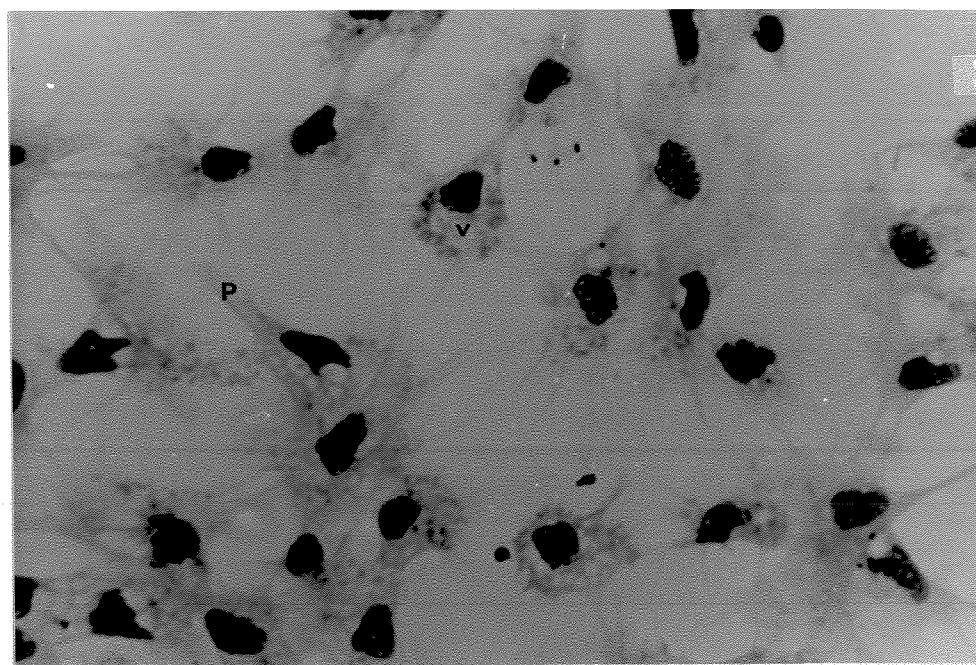


Fig. 7 - Fotomicrografia de monocamada de granulócitos de B. tenagophila livres de infecção. X 330  
n = núcleo; v = vacúolo; p = pseudópodos.

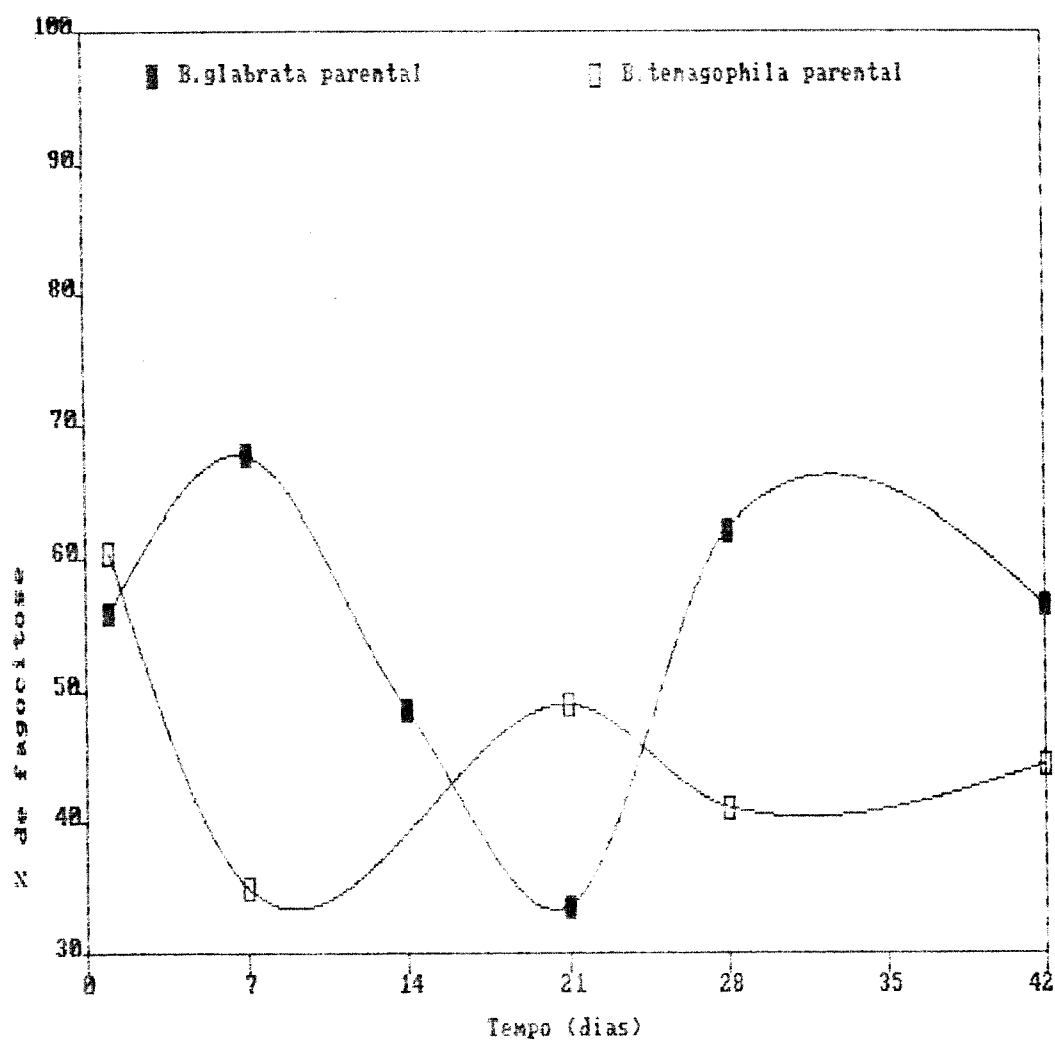


Fig. 8 - Atividade fagocitária de granulócitos de hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* durante a infecção esquistossomótica.

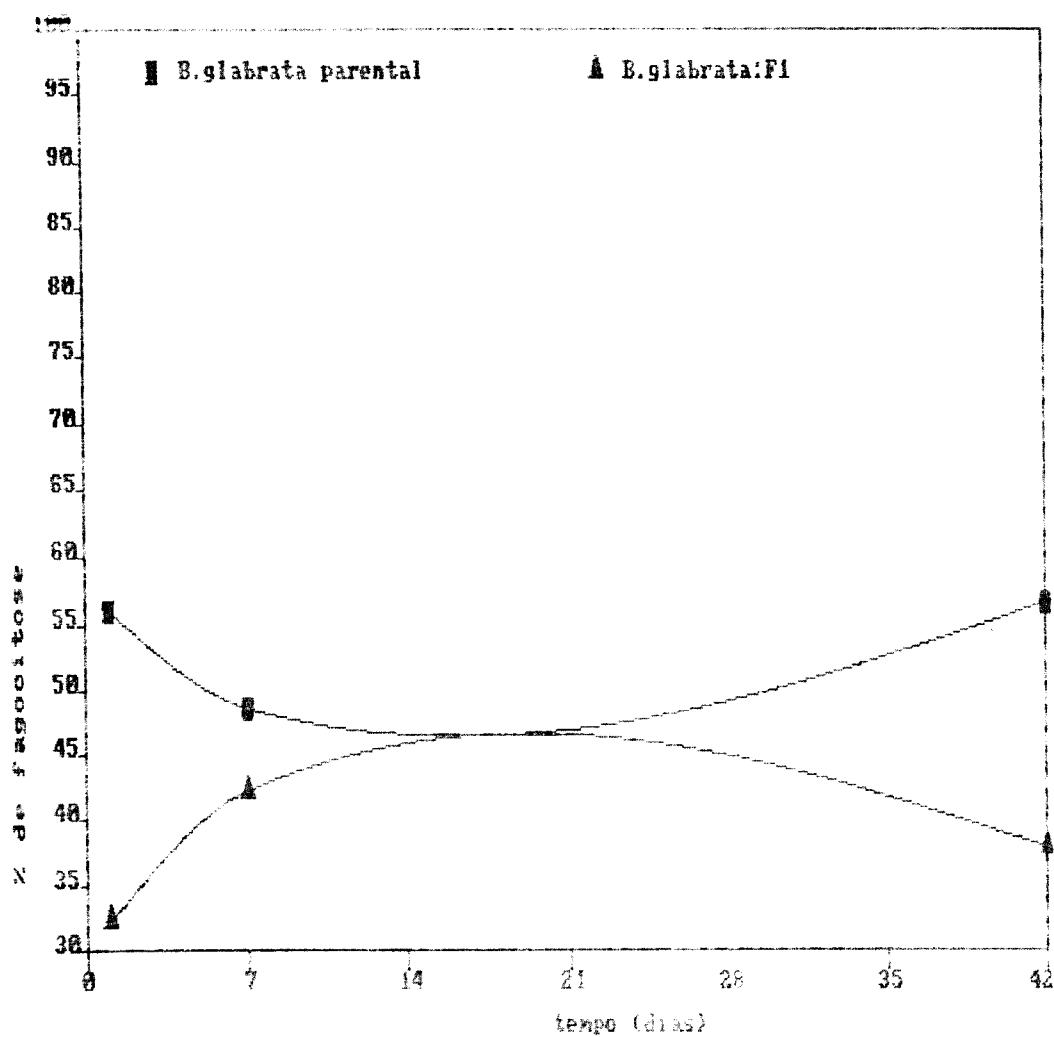


Fig. 9 - Atividade fagocitária de granulócitos da hemolinfa de *B. glabrata* das gerações parental e F<sub>1</sub> durante a infecção esquistossomótica.

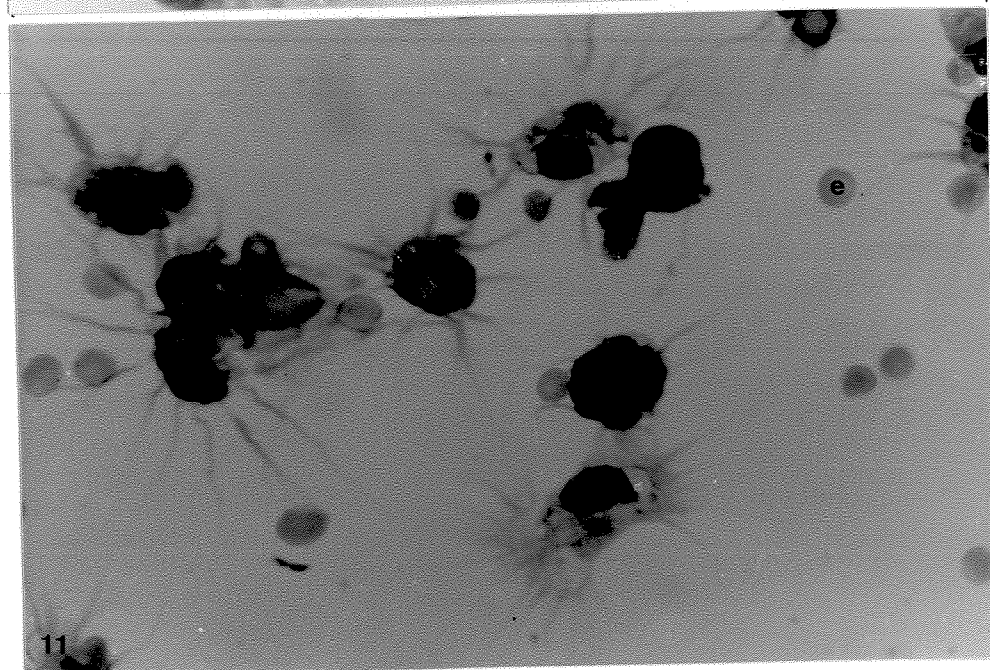
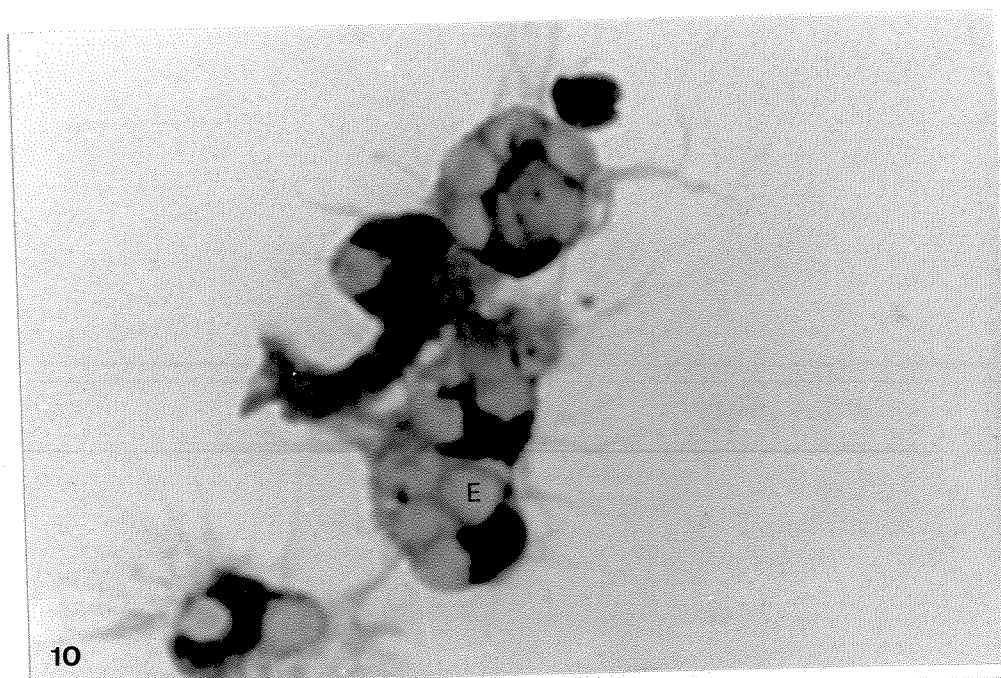


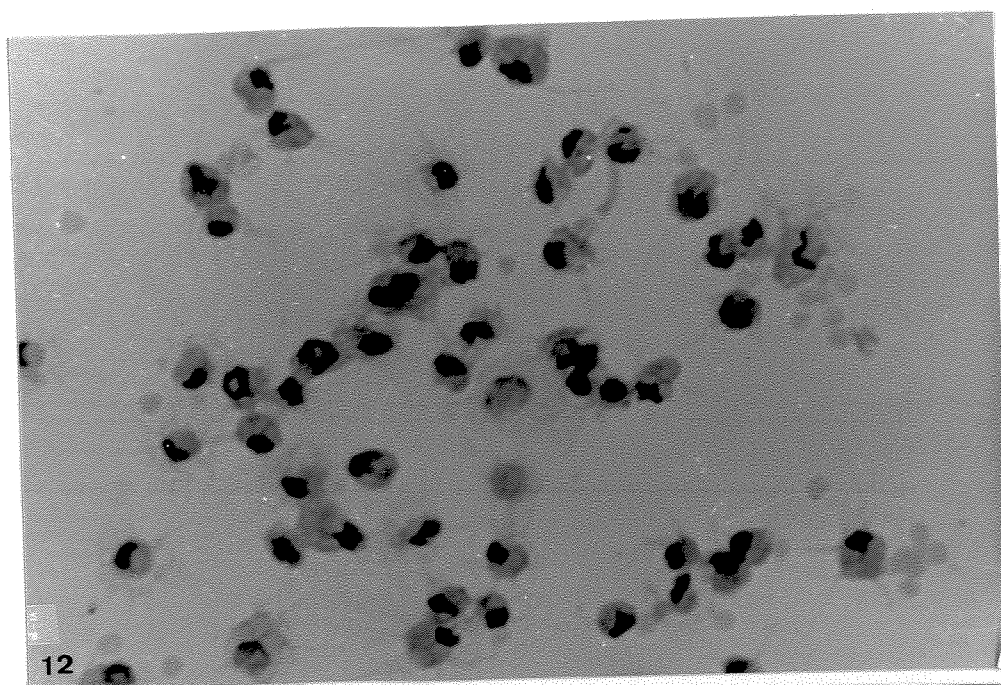
Fig. 10 - Fotomicrografia de granulócitos de B. tenagophila livres de infecção, fagocitando eritrócitos formolizados de carneiro. X 330

E = eritrócitos fagocitados  
e = eritrócitos livres

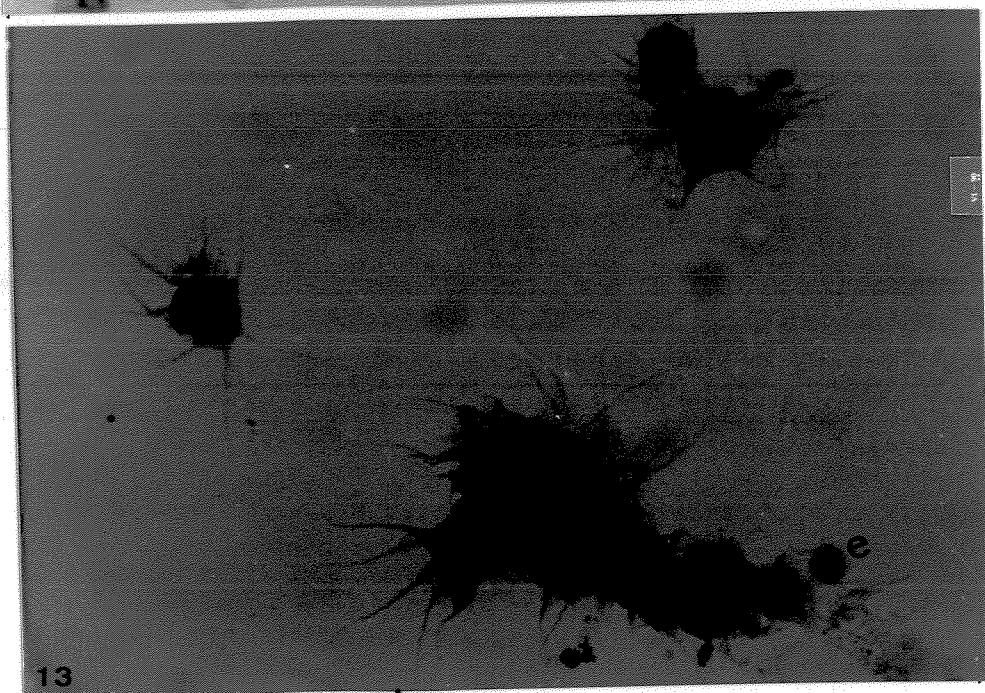
Fig. 11 - Fotomicrografia de granulócitos de B. tenagophila na 6a. semana de infecção, fagocitando eritrócitos formolizados de carneiro.

X 330





12



13

Fig. 12 - Fotomicrografia de granulócitos de B. glabrata livres de infecção, fagocitando eritrócitos de carneiro.

X 130

Fig. 13 - Fotomicrografia de granulócitos de B. glabrata infectada (6<sup>a</sup> semana), fagocitando eritrócitos formalizados de carneiro.

X 330

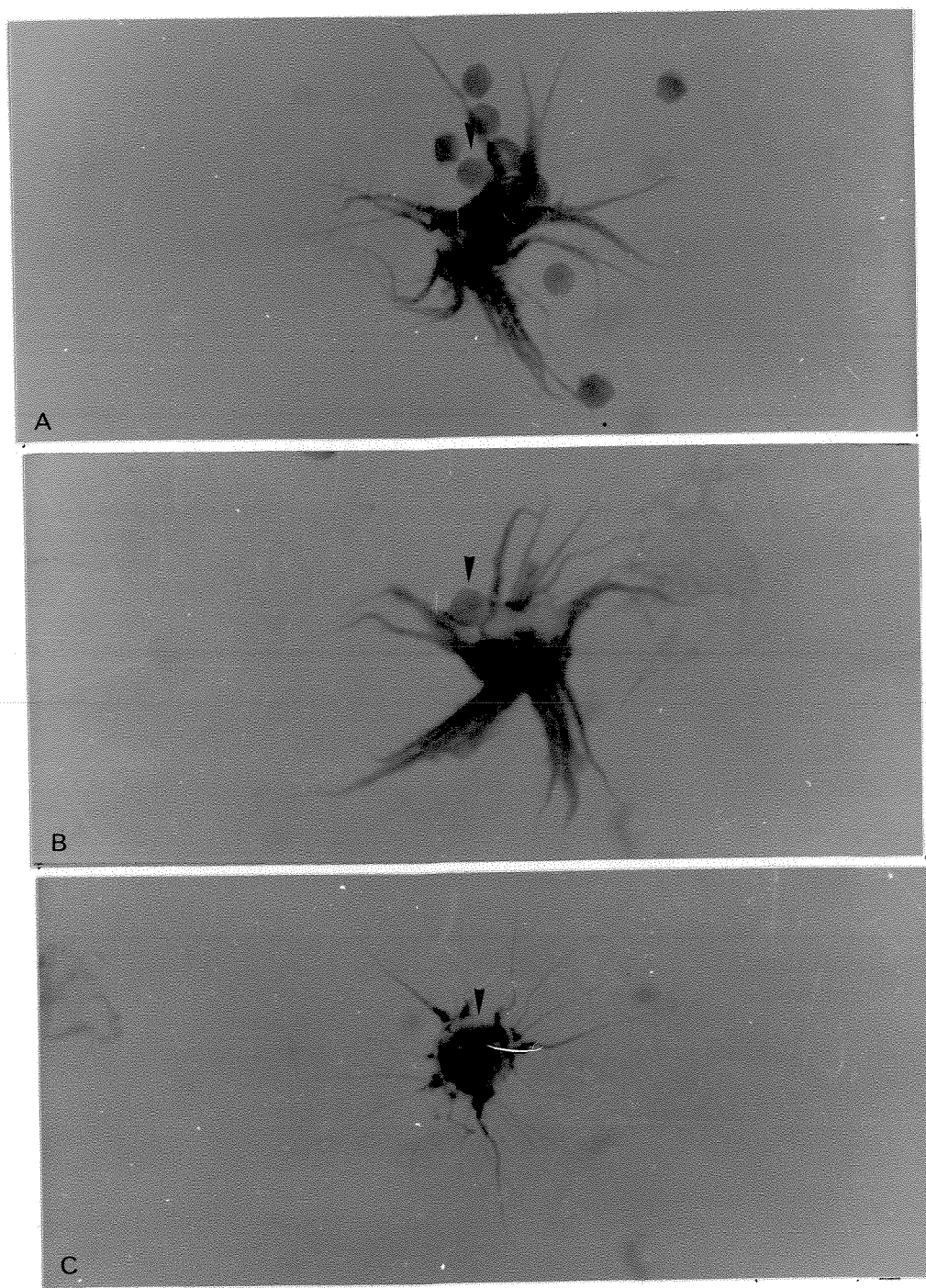


Fig. 14 - Fotomicrografia da sequência do englobamento pelo granulócito de molusco do gênero Biomphalaria.

X 330

A = eritrócitos aderindo à superfície da célula

B = início da ingestão

C = interiorização do eritrócito.

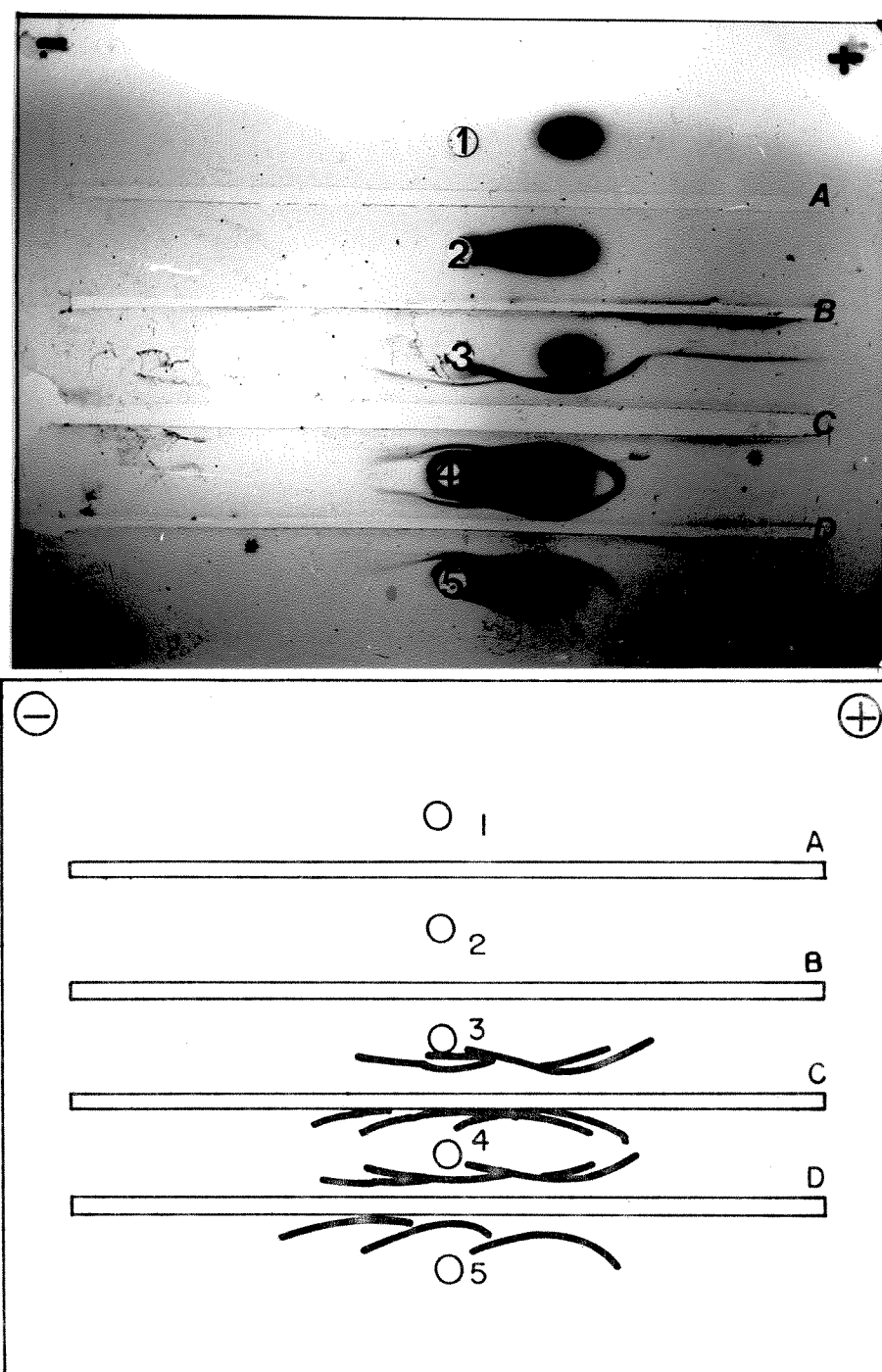


Fig. 15 - Análise de hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila não infectadas e infectadas com o S. mansoni frente a antissoro produzido em coelhos.

1. HBGI; 2. HBGN; 3. HBGI; 4. HBGN; 5. HBTN

A. imunessoro anti HBGN absorvido com HBGI

B. imunessoro anti HBGN absorvido com HBGN

C,D. imunessoro anti HBGN (não absorvido)

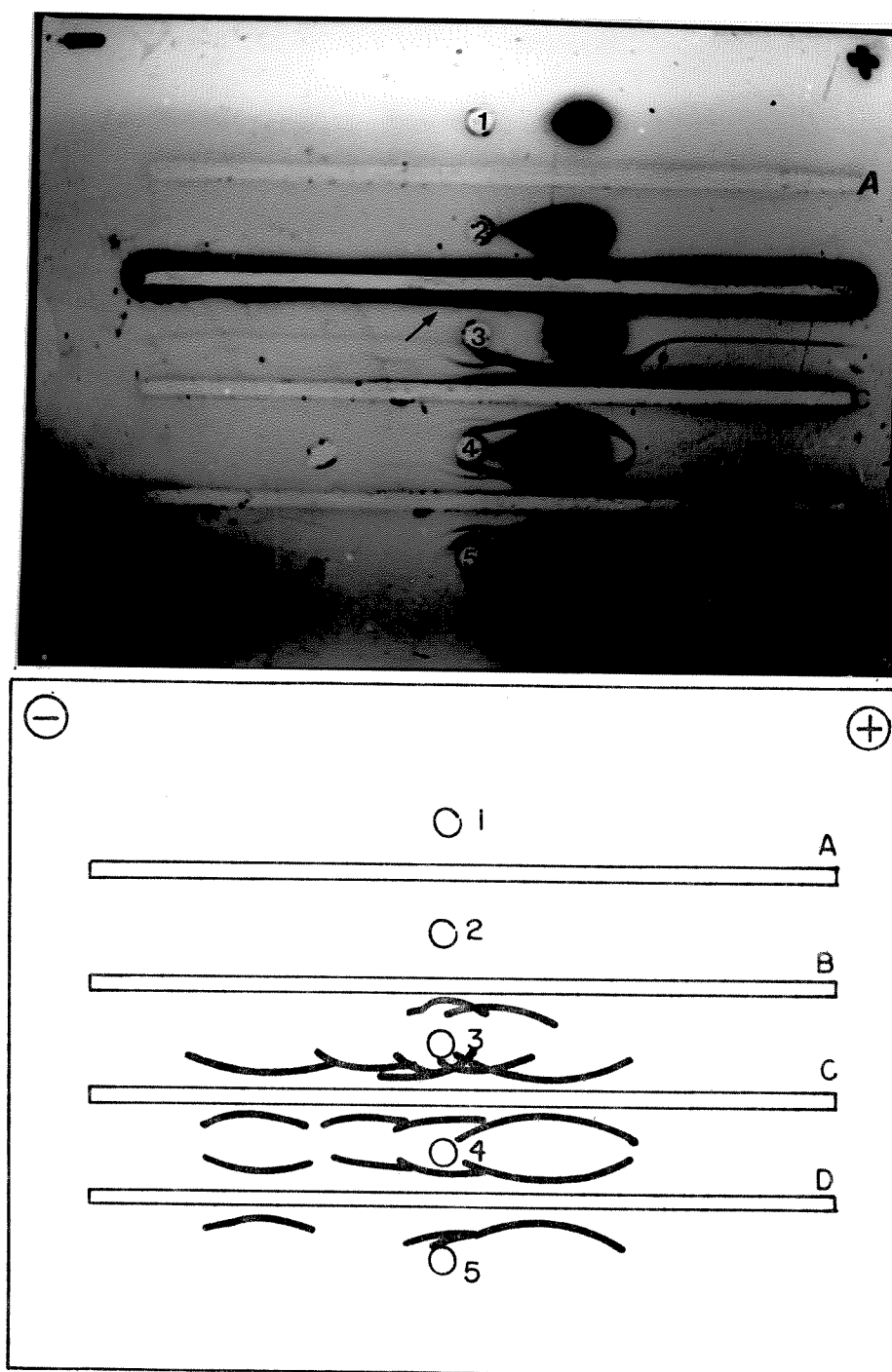


Fig. 16 - Análise de hemolinfa de B. tenagophila e B. glabrata não infectadas e infectadas com o S. mansoni frente a antissoro produzido em coelhos.

1. HBTI; 2. HBTN; 3. HBTI; 4. HBTN; 5. HBTN

A. imunossoro anti HBTN absorvido com HBTI

B. imunossoro anti HBTN absorvido com HBTN

C.D. imunossoro anti HBTN (não absorvido)

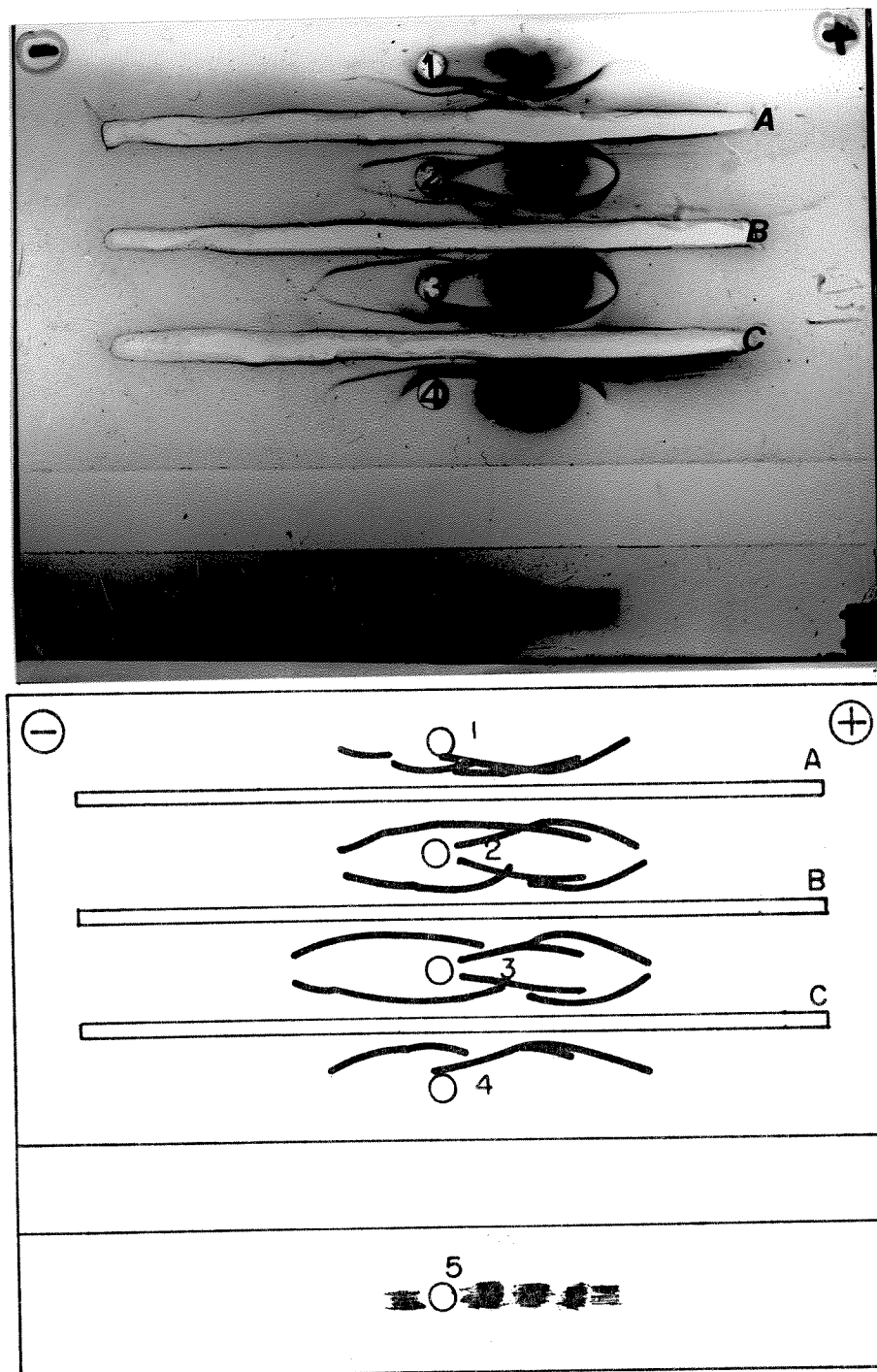


Fig. 17 - Análise de hemolinfa de *B. tenagophila* e *B. glabrata* não infectadas e infectadas com o *S. mansoni* frente ao imunossoro não absorvido. Comparação com soro normal de coelho.

1. HBGN (total); 2 HBGI (total); 3. HBTN (total); 4. HBTI (total); 5. SNC; A, B, C - imunossoro anti HBGN (antissoro ib).



#### 4 - DISCUSSÃO

No presente trabalho, analisamos os mecanismos de defesa em moluscos planorbídeos Biomphalaria glabrata e Biomphalaria tenagophila frente ao Schistosoma mansoni. B. tenagophila até o momento tem sido pouco estudada em relação a análise fagocitária das células e a outros aspectos do seu mecanismo de defesa por ser de difícil manutenção em laboratório e apresentar elevada resistência a infecção pelo Schistosoma, tanto na natureza como em condições experimentais. Entretanto, é possível aumentar o índice de infecção nestes moluscos, através da seleção genética, utilizando o critério da autofecundação (SANTANA, 1976).

O trabalho foi subdividido em quatro partes. Inicialmente, procuramos quantificar os amebócitos da hemolinfa das duas espécies de moluscos estudadas, durante a infecção esquistossomótica até o 42º dia, fazendo observações morfológicas e descrevendo os tipos de células circulantes.

Em seguida, passamos a uma avaliação quantitativa da atividade fagocitária dos granulócitos em B. glabrata das gerações P, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, livres de infecção e infectados com a linhagem simpátrica do trematódeo. Repetimos o experimento para B. tenagophila utilizando apenas moluscos da geração parental (P), devido as dificuldades encontradas na ocasião para se obter populações selecionadas destes moluscos. Estes caramujos, foram expostos à linhagem simpátrica do parasito.

Procuramos fazer uma caracterização dos antígenos destes planorbídeos, através de análise da hemolinfa livre de células, antes e após infecção, por meio da técnica de imunoeletroforese, utilizando soro anti-hemolinfa produzido em coelhos.

Finalmente, observamos a perda parcial de suscetibilidade em B. gla-

brata após inoculação de extrato antigênico de cercárias da linhagem BH do trematódeo.

Em moluscos da espécie B. glabrata, existem dois tipos morfológicamente distintos de células circulantes na hemolinfa, denominadas de granulócitos e hialinócitos. Estas células foram analisadas pela microscopia de fase.

O tipo celular mais comum, denominado granulócito, é aderente ao substrato vitreo e apresenta tamanho três a quatro vezes superior aos hialinócitos. Quando espreado, varia de  $16,10 \pm 3,70 \mu$  a  $44,50 \pm 4,40 \mu$  de diâmetro, quando não espreado, apresenta diâmetro entre  $9,45 \mu \pm 1,78 \mu$  a  $14,10 \pm 2,80 \mu$ .

Os granulócitos emitem pseudopodos e apresentam capacidade fagocitária, existindo na hemolinfa em concentrações que variam de  $86,6 \pm 12,80\%$  a  $93,32 \pm 4,04\%$ . Representam o principal mecanismo de defesa apresentado pelos moluscos planorbídeos (CHENG & AULD, 1977; JEONG & HEYNEMAN, 1976).

Em nossos experimentos, confirmamos a existência destes tipos celulares, não apenas em B. glabrata, como em B. tenagophila.

Com relação ao número de células circulantes em B. glabrata, nossos achados estão compatíveis com aqueles encontrados por STEWART & Cols. (1985) que, utilizaram em suas pesquisas moluscos medindo 16 a 18 mm de diâmetro máximo de concha, exatamente a mesma variação de tamanho por nós escolhida para coleta de hemolinfa para contagem de células.

Outros autores, têm relacionado número de células um pouco acima daquele por nós encontrado (JEONG & HEYNEMAN, 1976; CHENG & AULD, 1977).

Realizamos também a contagem de células da hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila no curso de infecção esquistossomótica. Os experimentos foram sempre feitos utilizando as linhagens simpátricas do parasito.

Nossos estudos demonstraram que a exposição de B. glabrata à linhagem BH e B. tenagophila à linhagem SJ é seguida de significativo aumento do número de amebócitos, durante as primeiras 72 horas após infecção, estando o "pico" máximo destas células em torno de 24 horas para ambas espécies de moluscos. Estes resultados confirmam as observações de JOKY & MATRICON-GONDRAN (1985) que, demonstraram intensa atividade mitótica nas primeiras quarenta e oito horas após infecção, quando estimulavam caramujos B. glabrata com Echinostoma caproni.

Em experimento com B. glabrata, STUMPF & GILBERTSON (1978), verificaram que o número de hemocitos duplica dentro de duas horas após exposição a miracídeos de S. mansoni. Estes mesmos autores, observaram que o aumento da temperatura induz a um aumento do número de células da hemolinfa.

Anteriormente, havia sido observado um aumento de tamanho do órgão produtor de amebócitos, associado com a destruição de esporocistos em B. glabrata. O órgão mostrava-se em intensa atividade mitótica (SULLIVAN et alii, 1982).

Em nossos resultados, podemos observar que, enquanto em B. tenagophila exposto a miracídeos da linhagem simpátrica, encontramos aproximadamente 1000 células/mm<sup>3</sup> de hemolinfa nos primeiros dias pós-exposição, em B. glabrata nas mesmas condições, o número de células/mm<sup>3</sup> de hemolinfa estava em torno de 400.

É fácil entender estes achados, pois, sabe-se que moluscos B. tenagophila são menos suscetíveis a infecção esquistossomótica. A intensa proliferação celular ocorre após estímulo, provavelmente para neutralizar o miracídio nestes animais.

Os resultados relacionados ao número de células circulantes, poderiam parecer estar em contradição com os dados obtidos para a atividade fago-



citária "in vitro". Conforme as tabelas VI e VII, o índice de fagocitose das células da hemolinfa de B. tenagophila após exposição ao parasita, são significativamente inferiores àqueles apresentados por B. glabrata (Tabela XI).

Poderíamos tentar explicar esta acentuada diminuição da atividade fagocitária das células dos moluscos menos suscetíveis, pela precocidade com que ocorre a reação granulomatosa nestes hospedeiros do S. mansoni. As células estariam em plena atividade, procurando encapsular o corpo estranho a nível do tecido, poucas horas após exposição (GUARALDO et alii, 1981).

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. Estas células, a princípio, parecem representar populações homogêneas, contudo, resultados de estudos mostrando a existência de receptores de superfície em B. glabrata e em outros invertebrados, sugerem que estas populações de células devem ser compostas de subpopulações molecularmente distintas, capazes de algum grau de compartimentalização funcional (RENWRANTZ & CHENG, 1977 a e b); SCHOENBERG & CHENG, 1980; YOSHINO, 1981; JOKY et alii., 1983).

A aplicação de anticorpos monoclonais produzidos contra hemócitos, tem revelado que estas células circulantes e aderentes a substrato de vidro, existentes na hemolinfa de B. glabrata, constituem uma população antigenicamente heterogênea, confirmando a existência de várias subpopulações de células (YOSHINO & GRANATH, 1983).

Outra investigação foi realizada com B. glabrata, no sentido de verificar se subpopulações de hemócitos antigenicamente distintos, estariam associados com diferenças observadas na função celular. Para isso, foram utilizados anticorpos monoclonais derivados de três clones. Os autores identificaram

marcadores de superfície de membrana específicos para células da hemolinfa de moluscos suscetíveis PR-albino (M-line), que foram denominados  $BGH_1^+$ . Este epítipo estava presente em 40% das células circulantes destes animais. Enquanto, em moluscos resistentes da cepa 10-R<sub>2</sub>, o epítipo  $BGH_1^+$  estava presente em apenas 10% das células (YOSHINO & GRANATH, 1985).

Populações PR-ALBINO possuem uma proporção maior de hemócitos  $BGH_1^+$  e concentração mais baixa de células circulantes do que o 10-R<sub>2</sub>. Moluscos PR-albino, tem portanto, potencialmente reduzida sua capacidade de reagir contra corpos estranhos (YOSHINO & GRANATH, 1985).

Estes resultados, foram confirmados no presente trabalho, utilizando outra espécie de molusco, B. tenagophila que apresenta menor suscetibilidade a linhagem simpátrica e alopátrica do S. mansoni.

Analisando nossos resultados, verifica-se um aumento significativo no número de células circulantes, nas primeiras 24 horas após exposição ao S. mansoni, para ambas espécies de moluscos.

Mais recentemente, tem-se demonstrado que a tensão de oxigênio na água é muito importante na hemocitose. À medida que a concentração de oxigênio aumenta, o número de amebócitos cresce significativamente. Após 120 minutos, contidos em recipiente com apenas 1 mL de água, o número de amebócitos em B. glabrata passa a ser muito mais elevado, em relação aos controles (WOLMARANS & YSSEL, 1988).

Em nossas pesquisas, não levamos em consideração estas observações, por termos realizado leituras do número de células, utilizando pequenos grupos de moluscos que permaneciam fora d'água durante o período de tempo antes da sangria. Procedemos de maneira similar para os grupos controles e experimentais. Além disso, outros parâmetros, como tamanho de molusco e temperatura da água foram padronizados.

Pelas características morfo-fisiológicas apresentadas, poderíamos pensar que, as células da hemolinfa de invertebrados, principalmente, as chamadas granulócitos, tenham sido precursoras das células de defesa dos organismos vertebrados (os macrofagos).

Quanto aos hialinócitos, devido a baixa concentração na hemolinfa, suas funções permanecem pouco esclarecidas.

Desde as observações de TRIPP (1961) é conhecida a habilidade de amebócitos de B. glabrata para fagocitar ou encapsular partículas estranhas, inclusive, distinguir entre "self" e "non self", na medida que os enxertos de tecido homólogo eram aceitos e os heterólogos não tinham sucesso. Estes resultados foram confirmados mais recentemente em B. glabrata (CHENG & JOURDANE, 1987; JOURDANE & CHENG, 1987).

Outros trabalhos estudaram o comportamento e a morfologia dos granulócitos isolados da hemolinfa de B. glabrata, confirmando a capacidade fagocítica destas células, quer seja através do englobamento ou encapsulamento do corpo estranho.

Avaliamos a capacidade fagocitária de granulócitos isolados da hemolinfa de B. glabrata das gerações P, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> e B. tenagophila da geração P, no decurso da infecção pelo S. mansoni. Os controles eram constituídos por moluscos normais (não infectados) de ambas as espécies.

Pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que houve maior variação de resposta em B. glabrata da geração parental.

Comparando-se os índices de fagocitose entre a geração P, F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, verifica-se redução significativa da capacidade fagocitária dos granulócitos das gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>. Estes resultados estão dentro da resposta esperada, pois, as populações de moluscos foram selecionadas para o caráter suscetibilidade. E como já citado neste trabalho, em planorbídeos adaptados ao trematódeo, a res-

posta por encapsulamento e fagocitose é praticamente inexistente (GUARALDO et alii, 1981 e BENEX & JACOBELLI, 1980).

ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980 b), estudaram vários aspectos relacionados com a atividade de fagocitose "in vitro" dos granulócitos de B. glabrata de populações suscetíveis ao S. mansoni da linhagem NIH, isolada por NEWTON (1955), portanto, moluscos muito bem adaptados ao trematódeo.

Os autores acima, não observaram diferença significativa nos índices de fagocitose nos períodos de 24 horas e duas semanas pós-infecção, em relação as taxas de fagocitose apresentadas pelos moluscos normais. Enquanto, nas 4a. e 6a. semanas, estes índices eram reduzidos de 30% e 50% respectivamente.

Em nossos experimentos, pudemos confirmar em parte, os dados observados acima, quando comparamos os índices de fagocitose encontrados em B. glabrata da geração parental normal e moluscos da geração F<sub>1</sub> infectados. O mesmo não pode ser confirmado dentro das gerações P ou F<sub>1</sub>. Porém, os resultados discordantes daqueles descritos por ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980 b), são perfeitamente lógicos, pois, nossa população parental e F<sub>1</sub>, ainda é bastante heterogênea, apresentando índices de infecção em torno de 80% apenas.

Em B. tenagophila, praticamente não verificamos variação de resposta fagocitária entre os grupos infectados. Apenas no 1º dia pós-exposição a miracídios, obtivemos índices de fagocitose mais reduzidos. A partir do 7º dia, estes índices mantiveram-se dentro de um patamar. Como observado pelos dados do presente trabalho, B. tenagophila apresentaram comportamento diferente de B. glabrata com relação a capacidade fagocitária de células de hemolinfa.

Na tentativa de aproximar nossos experimentos de um modelo mais natural, já que os modelos descritos na literatura, utilizam sempre eritrócitos formolizados de carneiro como partícula fagocitável, passamos a trabalhar tam

bém, com eritrócitos sensibilizados com extrato antigênico de cercárias. Pelos resultados obtidos, não houve diferença quando comparamos a capacidade fagocitária entre células da hemolinfa de B. glabrata incubada com eritrócitos formolizados e células da hemolinfa de B. tenagophila incubadas com eritrócitos sensibilizados. Isto poderia significar que estamos diante de uma resposta inespecífica, apesar da capacidade que possuem os moluscos para rejeitar enxertos heterólogos.

Além dos mecanismos de defesa celular em invertebrados do gênero Biomphalaria, outros sistemas de reconhecimento "non self" estariam presentes nestes animais. Evidências para estas suspeitas, estão descritas em experimentos "in vivo" e "in vitro" (BAYNE et alii., 1980 a e b e GRANATH & YOSHINO, 1984).

Entre os mecanismos celulares, pode-se sugerir que receptores de membrana em células circulantes da hemolinfa de B. glabrata, poderia ter um importante papel na mediação da reatividade celular contra o reconhecimento de materiais estranhos e/ou processos de ativação celular (CHORNEY & CHENG, 1980; LACKIE, 1980 e YOSHINO & GRANATH, 1985).

Entre os fatores opsônicos, poderiam ser citados as lectinas (RENWANTZ & STAHLER, 1983; VAN DER KNAAP et alii., 1983; BAYNE, 1983) e fatores semelhantes ao complemento como visto em Helix pomatia (KOCH & NIELSEN, 1984).

GRANATH & YOSHINO (1984), foram capazes de transferir resistência em B. glabrata suscetível por inoculação de hemolinfa isolada de moluscos resistentes. Estes autores mostraram que o fator de transferência era termolábil. Porém, como foi executado o experimento, onde a hemolinfa foi submetida a temperatura de 70 C durante 30 minutos, não pudemos confirmar este resultado, desde que, foi impossível repetir estes experimentos nas condições propostas. Em temperatura tão alta, a hemolinfa coagula completamente, sendo impossível tor -

nã-la solúvel para inocular.

É possível que fatores "humorais" envolvidos nos mecanismos de defesa dos invertebrados, estimulem os granulócitos, aumentando sua capacidade de fagocitose, pois, conseguimos reduzir a 50% índices de infecção em B. glabrata suscetível, pela inoculação de extrato antigênico de cercárias, ou talvez, este antígeno tenha desencadeado alguma reação por nós desconhecida.

Há necessidade de aprofundar estes estudos, visando análise de atividade mitótica pelo órgão produtor de amebócitos, após inoculação de diferentes antígenos.

No que se refere a dosagem de proteínas da hemolinfa de B. glabrata e de B. tenagophila, encontramos valores significativamente mais elevados para moluscos normais de ambas espécies estudadas. Sendo que, a hemolinfa de B. tenagophila apresenta um nível muito elevado de proteínas, tanto para os animais livres de infecção, como para aqueles infectados com a linhagem simpátrica do S. mansoni.

Os dados acima, não nos surpreende, pois, trabalhamos com B. tenagophila melânicos, que possuem possivelmente, maior quantidade de hemoglobina na sua hemolinfa. Sabe-se dos trabalhos de RICHARDS (1970), que moluscos albinos possuem níveis mais baixos de hemoglobina e, os moluscos jovens, praticamente não apresentam esta proteína. Apesar de baixa concentração em moluscos albinos jovens, a hemoglobina é a principal proteína nestes animais (LEE & CHENG, 1972; FIGUEIREDO et alii, 1973; TARGELL, 1963 e BAILEY et alii, 1986). A hemoglobina constitui em muitas espécies de moluscos, 40 a 65% da concentração proteica total (MICHELSON & DUBOIS, 1975).

Confirmamos em nosso experimento, a presença marcante da hemoglobina, apresentando migração anódica, estando presente em ambos os moluscos estudados.

Nossos resultados estão compatíveis com aqueles descritos na literatura, em experimentos com B. glabrata, onde tem-se constatado níveis de proteínas no plasma, significativamente reduzidos em moluscos infectados (LEE & CHENG, 1972; GRESS & CHENG, 1972; MICHELSON & DUBOIS, 1975 e STANISLAWSKI & BECKER, 1979). A redução da concentração de proteínas totais em moluscos infectados, pode ocorrer por perda dessas moléculas no ambiente pela eclosão de cercárias ou, podem simplesmente ser utilizadas pelas rēdias envolvidas na produção destas larvas (LOKER & HERTEL, 1987).

A análise da hemolinfa frente ao antissoro anti-hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila normais e infectados, foi feita através da técnica de imunoeletroforese. Como pode-se observar pelos resultados obtidos, encontramos praticamente o mesmo número de sistemas precipitantes, tanto para B. glabrata normais como para os infectados. Tendo-se absorvido totalmente os anticorpos após tratamento com hemolinfa de moluscos normais ou infectados (Fig. 15).

Para os B. tenagophila, dos seis sistemas precipitantes reconhecidos pelo antissoro anti-hemolinfa normal frente a hemolinfa de moluscos infectados, dois componentes não foram absorvidos. Estas frações, poderiam representar produtos metabólicos do parasita, presentes na hemolinfa de moluscos infectados. Estes achados, poderiam ser compatíveis com aqueles descritos por LOKER & HERTEL (1987) que analisando hemolinfa de B. glabrata infectado com Echinostoma paraensei, confirmaram a presença de dois polipeptídeos principais: um de 190 a 200 KDa e outro de 80 a 120 KDa. Estas moléculas estavam ausentes em animais controles (normais).

Nós não realizamos estudos Bioquímicos dos componentes que permaneceram após absorção do antissoro anti-hemolinfa de B. tenagophila.

Pelas Figuras 15 e 16, pode-se afirmar que além da hemoglobina, outros dois componentes são comuns na hemolinfa de B. glabrata e B. tenagophila.

Outro dado que chama atenção, está relacionado com a migração eletroforética mais rápida da hemolinfa de moluscos infectados de ambas espécies. Provavelmente, este fato seja devido a redução da concentração proteica nestes animais.



## 5 - CONCLUSÕES

- a) O número de granulócitos em B. tenagophila foi três vezes maior nas primeiras 24 horas após exposição a miracídios em relação ao controle (constituído por moluscos não expostos). Esta diferença diminuiu a partir do 7º dia, mantendo-se constante.
- b) Em B. glabrata, o número de granulócitos aumentou em 50% nas primeiras 24 horas, mantendo-se constante a partir do 7º dia de exposição.
- c) A atividade fagocitária dos granulócitos diminuiu em B. glabrata relacionada para o caráter suscetibilidade das gerações F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>.
- d) Em B. tenagophila da geração parental a atividade fagocitária dos granulócitos mostrou-se mais baixa do que em moluscos B. glabrata da geração parental (P).
- e) O extrato protéico de cercárias BH conferiu uma proteção parcial (aproximadamente igual a 50%), quando inoculado em B. glabrata suscetível.
- f) Hemolinfa sem células de B. tenagophila não induziu resistência quando inoculado em B. glabrata.

- g) Na hemolinfa de moluscos infectados B. glabrata e B. tenagophila, encontramos maior número de linhas de precipitação em relação a hemolinfa dos moluscos não infectados.
- h) Após absorção, o soro anti-hemolinfa de B. tenagophila apresentou duas linhas de precipitação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. Biomphalaria glabrata amoebocytes: assay of factors influencing "in vitro" phagocytosis. J INVERTEBR PATHOL, 36, 56-9, 1980a.
- ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. Biomphalaria glabrata amoebocytes : Effects of Schistosoma mansoni infection on "in vitro" phagocytosis. J INVERTEBR PATHOL., 35 (3):241-48, 1980b.
- BAILEY, J.B, MICHELSON, E.H. & PARAENSE, W.P. Differentiation of the sibling species Biomphalaria occidentalis and Biomphalaria tenagophila by the electrophoretic patterns of their hemoglobin. MEM. INST. OSWALDO CRUZ, 81 (3):319-22, 1986.
- BARBOSA, F.S. & BARRETO, A.C. Differences in susceptibility of Brazilian strains of Australorbis glabratus to Schistosoma mansoni. EXPL PARASIT., 9, 137-40, 1960.
- BASCH, P.F. Parasitological review - Intermediate host specificity in Schistosoma mansoni. EXPL PARASIT., 39, 150-60, 1976.
- BAYNE, C.J.; LOKER, E.S. & YUI, M.A. Interactions between the plasma proteins of Biomphalaria glabrata (Gastropoda) and sporocyst tegument of Schistosoma mansoni (Trematoda). PARASITOL, 92, 653-64, 1986.
- BAYNE, C.J. & STEPHENS, J.A. Schistosoma mansoni and Biomphalaria glabrata share epitopes: antibodies to sporocysts bind host snail hemocytes. J INVERTEBR PATHOL., 42, 221-3, 1983.

- BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M. & DEWAN, P.C. Schistosoma mansoni: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant Biomphalaria glabrata. EXPL PARASIT., 50, 409-16, 1980b.
- BAYNE, C.J., BUCKLEY, P.M. & DEWAN, P.C. Macrophage-like hemocytes of resistant Biomphalaria glabrata are citotoxic for sporocysts of Schistosoma mansoni "in vitro". J PARASITOL., 66 (3): 413-19, 1980a.
- 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.
- CARVALHO, W. de F. Técnicas Médicas de Hematologia e Imuno-Hematologia. Cooperativa Editora e de Cultura Médica Ltda. Belo Horizonte, 1978.
- CHENG, T.C. & JOURDANE, J. Transient cellular reaction in Biomphalaria glabrata (Mollusca) to heterotopic isografts. J. INVERTEBR PATHOL., 49, 273-78, 1987.
- CHENG, T.C. & AULD, K.R. Hemocytes of the Pulmonate gastropod Biomphalaria glabrata. J INVERTEBR PATHOL., 30, 119-22, 1977.
- CHENG, T.C.; CHORNEY, M.J. & YOSHINO, T.P. Lysozymelike activity in the hemolymph of Biomphalaria glabrata challenged with bacteria. J INVERTEBR PATHOL., 29, 170-4, 1977.
- CHENG, T.C. & GARRABRANT, T.A. Acid Phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of Biomphalaria glabrata totally and partially resistant to Schistosoma mansoni. INT. J PARASIT., 77, 467-72, 1977.

CHENG, T.C. Funtional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes.

ANN. N.Y. ACAD. SCI., 266, 343-79, 1975.

CHERNIN, E. Observations on hearts explanted "in vitro" from the snail

Australorbis glabratus. J PARASIT., 49 (3): 353-64, 1963.

CHORNEY, M.J. & CHENG, T.C. Discrimination of self and non self in inverte-

brates. Contemp. Top. Immunobiol., 9, 37-54, 1980.

CSIZMAS, L. Preparation of formalinized erythrocytes. PROC. SOC. EXP. BIOL.

MED., 103: 157, 1960.

CUNHA, A.S. da Esquistossomose mansonii. Editora da Universidade de São Pau-

lo, p. 1-12, S.Paulo, 1970.

DIAS, L.C. de S.; BRUCE, J.I. & COLES, G.C. Strain variation in the infecti-

vity of Schistosoma mansonii for Biomphalaria glabrata. REVTA. INST. MED.

TROP. S PAULO, 30 (2): 86-90, 1988.

DIAS, L.C. de S.; UETA, M.T. & GUARALDO, A.M.A. Suscetibilidade de Biompha-

laria glabrata, B. straminea e B. tenagophila de diferentes cêpas de

Schistosoma mansonii. REVTA. INST. MED. TROP. S PAULO, 29 (4): 205-12, 1987.

FIGUEIREDO, E.A.; GOMEZ, M.V.; HEYNEMAN, I.F.; SANTOS, I.O. & HARGREAVES,

F.B. Isolation and physiochemical properties of the hemoglobin of Biompha-

laria glabrata (Mollusca, Planorbidae). COMP. BIOCHEM. PHYSIOL. B, 44, 481-

91, 1973.

FOLEY, D. A. & CHENG, T.C. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelocypods Crassostrea virginica and Mercenaria mercenaria. J INVERTEBR PATHOL, 25, 189-97, 1975.

GRABAR, P. & BURTIN, P. Immuno-electrophoretic analysis. Amsterdam, London, New York. Elsevier Publishing Company, 1964.

GRANATH Jr., W.O.; SPRAY, F.J. & JUDD, R.C. Analysis of Biomphalaria glabrata (Gastropoda) Hemolymph by sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, high-performance liquid chromatography, and immunoblotting. J. INVERTEBR PATHOL., 49, 198-208, 1987.

GRANATH Jr., W.O. & YOSHINO, T.P. Schistosoma mansoni: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, Biomphalaria glabrata. EXPL PARASIT., 58, 188-93, 1984.

GRESS, F.M. & CHENG, T.C. Alterations in total serum proteins and protein fractions in Biomphalaria glabrata parasitized by Schistosoma mansoni. J INVERTEBR PATHOL., 22, 382-90, 1973.

GUARALDO, A.M.A.; MAGALHÃES, L.A.; RANGEL, H.A. & PAREJA, G. Evolução dos esporocistos de Schistosoma mansoni SAMBON, 1907 em Biomphalaria glabrata (SAY, 1818) e Biomphalaria tenagophila (D'ORBIGNY, 1835). REVTA SAÚDE PÚBL S PAULO, 15: 436-48, 1981.

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. ANALYT BIOCHEM., 48, 422-7, 1972.

- JEONG, K.H. & HEYNEMAN, D. Leukocytes of Biomphalaria glabrata: Morphology and behavior of granulocytic cells in vitro. J INVERTEBR PATHOL., (28): 357-62, 1976.
- JOKY, A. & MATRICON-GONDRAN, M. Response to the amoebocyte- producing organ of sensitized Biomphalaria glabrata after exposure to Echinostoma caproni miracidia. J INVERTEBR PATHOL., 45, 28-33, 1985.
- JOKY, A.; MATRICON-GONDRAN, M. & BENEX, J. Fine structural differences in the amoebocytes of Biomphalaria glabrata. DEV COMP IMMUNOL., 7, 669-72, 1983
- JOURDANE, J. & CHENG, T.C. The two-phase recognition process of allografts in a Brazilian strain of Biomphalaria glabrata. J INVERTEBR PATHOL., 49, 145-58, 1987.
- KOCH, C. & NIELSEN, H.E. Activation of vertebrate complement by Helix pomatia haemolymph. DEV COMP IMMUNOL., 8, 15-22, 1984
- KRONMAN, B.S. Immunochemistry of Schistosoma mansoni cercariae. J. IMMUNOL., 95(1) : 13-8, 1965.
- LACKIE, A.M. Invertebrate immunity. PARASITOLOGY, 80, 393-412, 1980.
- LEE, F.O. & CHENG, T.C. Schistosoma mansoni: Alterations in total protein and hemoglobin in the hemolymph of infected Biomphalaria glabrata. EXPL PARASIT., 31, 203-16, 1972.
- LIE, K.J.; JEONG, K.J. & HEYNEMAN, D. Tissue reactions induced by Schistosoma mansoni in Biomphalaria glabrata. ANN. TROP. MED. PARASIT., 74 (2):157-66, 1980.

- LIE, K.J.; HEYNEMAN, D. & RICHARDS, C.S. Studies on resistance in snails : interference by nonirradiated echinostome larvae with natural resistance to Schistosoma mansoni in Biomphalaria glabrata. J INVERTEBR PATHOL., 29, 118-25, 1977.
- LIE, K.J.; HEYNEMAN, D. & YAU, P. The origin of amoebocytes in Biomphalaria glabrata. J PARASIT., 63(3): 574-6, 1975.
- LOKER, E.S. & HERTEL, L.A. Alterations in Biomphalaria glabrata plasma induced by infection with the digenetic trematode Echinostoma paraensei. J PARASIT., 73(3): 505-13, 1987.
- LOKER, E.S.; BAYNE, C.J. & YUI, M.A. Echinostoma paraensei: Hemocytes of Biomphalaria glabrata as targets of Echinostome mediated interference with host snail resistance to Schistosoma mansoni. EXPL PARASIT., 62, 149-54, 1986.
- LOKER, E.S. & BAYNE, C.J. In vitro encounters between Schistosoma mansoni primary sporocysts and hemolymph-components of susceptible and resistant strains of Biomphalaria glabrata. AM. J TROP MED HYG., 31, 999-1005, 1982.
- LOKER, E.S.; BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M. & KRUSE, K.T. Ultrastructure of encapsulation of Schistosoma mansoni mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of Biomphalaria glabrata. J. PARASIT., 68 (1): 84-94, 1982.
- MC KAY, D. & JENKIN, C.R. Immunity in the invertebrates. II. Adaptive immunity in the Crayfish (Parachanna bicarinatus). J. IMMUNOL., 17, 127, 1969.



- MICHELSON, E.H. Preliminary observations on a hemolymph factor influencing the infectivity of Schistosoma mansonii miracidia. ACTA TROPICA, 43, 63-8, 1986.
- MICHELSON, E.H. & DUBOIS, L. Intraspecific variations in hemolymph of Biomphalaria glabrata, a snail host of Schistosoma mansonii. MALACOLOGIA, 15: 105-11, 1975.
- MICHELSON, E.H. Specificity of hemolymph antigens in taxonomic discrimination of medically important snails. J PARASIT., 52, 466-72, 1966.
- NEWTON, W.L. The establishment of a strain of Australorbis glabratus which combines albinism and high susceptibility to infection with Schistosoma mansonii. J PARASITOL., 41, 526-28, 1955.
- NEWTON, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with Schistosoma mansonii in Australorbis glabratus. EXPL PARASIT., 2: 242-57, 1953.
- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel method for immunological analysis. PROGR ALLERG., 5:1, 1958.
- PAN, C.T. Studies on the host-parasite relationship between Schistosoma mansonii and the snail Australorbis glabratus. AM. J TROP MED HYG., 14, 931-76, 1965.
- PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. Susceptibility of Australorbis tenagophila to infection with Schistosoma mansonii. REVTA. INST. MED TROP S PAULO, 5:23-9, 1963.

- READE, P. & READE, E. Phagocytosis in invertebrates: Studies on the hemocytes of the Clamtridacna maxima. J INVERTEBR PATHOL., 28:281-90, 1976.
- RENWRANTZ, L. & STAHER, A. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from Mytilus edulis. J COMP PHYSIOL., 149, 535-46, 1983.
- RENWRANTZ, L.R. & CHENG, T.C. Agglutinin-mediated attachment of erythrocytes to hemocytes of Helix pomatia. J INVERTEBR PATHOL., 29, 97-100, 1977b
- RENWRANTZ, L.R. & CHENG T.C. Identification of agglutinin receptors on hemocytes of Helix pomatia. J INVERTEBR PATHOL., 29, 86-96, 1977a.
- RICHARDS, C.S. Susceptibility of adult Biomphalaria glabrata to Schistosoma mansoni infection. AM J TROP MED HYG., 22:748-56, 1973.
- RICHARDS, C.S. & MERRITT, Jr., J.W. Genetic factors in the susceptibility of juvenile Biomphalaria glabrata to Schistosoma mansoni infection. AM J TROP MED HYG., 21 : 425-34, 1972.
- RICHARDS, C.S. Genetics of a molluscan vector of Schistosomiasis. NATURE, 277, 806-10, 1970.
- SANTANA, J.V.; MAGALHÃES, L.A. & RANGEL, H.A. Quantificação da atividade fagocitária de amebócitos de moluscos Biomphalaria glabrata livres de infecção e infectados por Schistosoma mansoni. XXI CONG SOC BRAS MED TROPICAL S PAULO, 1985 (Resumos).

SANTANA, J.V.; MAGALHÃES, L.A. & RANGEL, H.A. Seleção de linhagens de Biomphalaria tenagophila e Biomphalaria glabrata visando maior suscetibilidade ao Schistosoma mansoni. REVTA SAÚDE PÚBL S PAULO, 12:67-77, 1978.

SANTANA, J.V. Seleção de populações de Biomphalaria glabrata (SAY, 1818) e Biomphalaria tenagophila (D'ORBIGNY, 1835) suscetíveis a diferentes linhagens do Schistosoma mansoni (SAMBOM, 1907) Campinas, 1976. Tese (Mestrado) UNICAMP, Instituto de Biologia. p. 70.

SCHOENBERG, D.A. & CHENG, T.C. Lectin binding specificities of hemocytes from two strains of Biomphalaria glabrata as determined by microhemadsorption assays. DEV COMP IMMUNOL., 4, 617-28, 1980

SMINIA, T. & BARENDSEN, L. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails Lymnea stagnalis, Biomphalaria glabrata, and Bulinus truncatus. J MORPHOL., 165, 31-9, 1980.

STANDEN, O.D. Experimental infection of Australorbis glabratus with Schistosoma mansoni. I. Individual and mass infection of snail and the relationship of infection to temperature and season. ANN TROP MED PARASIT., 46:48-52, 1952.

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 :255-241, 1951.

STANISLAWSKI, E. & BECKER, W. Influences of semi-synthetic diets, starvation and infection with Schistosoma mansoni (Trematoda) on the metabolism of Biomphalaria glabrata (Gastropoda). COM BIOQ PHYS, 63A, 527-33, 1979.

- STAVISTSKY, A.B. Hemmagglutination and hemmagglutination-inhibition reactions with tannic acid and bis-diazotized benzidine protein conjugate erythrocytes. In: ACKROYD, J.F. Immunological Methods. Oxford Blackwell, 1964.
- STEIN, P.C. & BASCH, P.F. Purification and binding properties of hemagglutinin from Biomphalaria glabrata. J INVERTEBR PATHOL., 33, 10-18, 1979.
- STEWART, G.L.; UBELAKER, J.E. & CURTIS, D. Pathophysiologic alterations in Biomphalaria glabrata infected with Antiostrongylus costaricensis. J INVERTEBR PATHOL., 45, 152-57, 1985.
- STUMPF, J.L. & GILBERTSON, D.F. Hemocytes of Biomphalaria glabrata: Factors affecting variability. J INVERTEBR PATHOL., 32, 177-81, 1978.
- SULLIVAN, J.T.; RICHARDS, C.S.; LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. Ribeiroia marini: Irradiated miracidia and induction of acquired resistance in Biomphalaria glabrata. EXPL PARASIT., 53, 17-25, 1982.
- TARGELL, G.A.T. Electrophoresis of blood from intermediate and non-intermediate snail hosts of Schistosomes. EXPL PARASIT., 14, 143-51, 1963.
- TRIPP, M.R. Defense mechanisms of mollusks. J RETICULOENDOTH SOC., 7, 173-82, 1970.
- TRIPP, M.R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail Australorbis glabratus. J PARASIT., 47, 745-51, 1961.
- VAN DER KNAAP, W.P.W.; BOOTS, A.M.H. & SMINIA, T. Immunorecognition in Lymnaea stagnalis. DEV COMP IMMUNOL., 7, 645-8, 1983.

- YOSHINO, T.P. Phospholipase C-like Activity in Phagocytic Cell of the Asian Clam. Corbicula fluminea, and its possible role in cell mediated cytolytic reactions. J INVERTEBR PATHOL., 51, 32-40, 1988.
- YOSHINO, T.P. & GRANATH, Jr., W.O. Surface antigens of Biomphalaria glabrata (Gastropoda) Hemocytes: Functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. J INVERTEBR PATHOL., 45, 174-86 , 1985.
- YOSHINO, T.P.; GRANATH, Jr., W.O. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in Biomphalaria glabrata (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. CELL TISSUE RES., 232, 553-64, 1983.
- YOSHINO, T.P. Comparison of concanavalin A - Reactive determinants on hemocytes of Biomphalaria glabrata snail stock: Receptor binding and redistribution. DEV COMP IMMUNOL., 5, 229-40, 1981.
- WAGGE, L. E. Amoebocytes. INT REV CYTOL., 4, 31-78, 1955.
- WOLMARANS, C.T. & YSSEL, E. Biomphalaria glabrata: Influence of Selected abiotic factors on leukocytosis. J INVERTEBR PATHOL., 51, 10-14, 1988.