

SECRETARIA  
DE  
PÓS GRADUAÇÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

*Este exemplar corresponde  
a redação final de Tese defendida pela  
candidata Silmara M. Allegretti e  
aprovada pela Comissão julgadora  
Campus, 2 de junho de 1991  
L. F. M. J. C.*

COMPORTAMENTO DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* VARIANTES ALBINA E

MELANICA FRENTE A INFECÇÃO POR SCHISTOSOMA MANSONI

Silmara M. Allegretti

9107160/3C

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE BIOLOGIA  
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS,  
NA ÁREA DE PARASITOLOGIA

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ AUGUSTO MAGALHÃES †

AL52c

14179/BC

JUNHO DE 1991

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

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

A execução deste trabalho contou com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.

### Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães, pela orientação e pelo convívio.

As Profas. Dras. Ana Maria Aparecida Guaraldo, Eliana Maria Zanotti-Magalhães e Marlene Tiduko Ueta, pela leitura atenta e comentários.

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares, pelo processamento do Anexo Estatístico.

A Verónica Sierpe Jeraldo, pela colaboração com uma máquina fotográfica "desobediente".

Aos professores do curso de pós-graduação em Parasitologia, de quem minha formação recebeu valiosa ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia.

A Júlio Mendes e Soely Reis, pela amizade e incentivos.  
A Simone Montedioca, pelos anos.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Avelino R. Oliveira, com quem aprendi a aprender.

Ao Lau e a meus pais.

Ao João, com carinho.

## Índice

|                                                                                                                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Lista de tabelas e figuras.....                                                                                                                                                      | 111 |
| 1) INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                                   | 1   |
| 1.1) HISTÓRICO .....                                                                                                                                                                 | 1   |
| 1.2) Aspectos gerais da Biologia do molusco.....                                                                                                                                     | 4   |
| 1.3) Considerações sobre as células da hemolinfa .....                                                                                                                               | 7   |
| 1.4) Fagocitose e degranulação.....                                                                                                                                                  | 16  |
| 1.5) Fatores que influenciam a susceptibilidade ou<br>resistência dos moluscos.....                                                                                                  | 19  |
| 1.6) Fatores humorais.....                                                                                                                                                           | 23  |
| 1.7) Objetivos.....                                                                                                                                                                  | 24  |
| 2) MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                                           | 26  |
| 2.1) Planejamento dos experimentos.....                                                                                                                                              | 26  |
| 2.2) Espécie do molusco e linhagem do parasita e manutenção<br>de ambos.....                                                                                                         | 28  |
| 2.3) Montagem dos grupos .....                                                                                                                                                       | 29  |
| 2.4) Obtenção de miracídios da linhagem BH de <u>Schistosoma</u><br><u>mansoni</u> para infecção dos moluscos.....                                                                   | 30  |
| 2.5) Determinação da susceptibilidade à infecção de moluscos<br><u>Biomphalaria glabrata</u> , variantes albina e<br>melânica.....                                                   | 30  |
| 2.6) Obtenção da hemolinfa de <u>B. glabrata</u> variantes albina e<br>melânica.....                                                                                                 | 32  |
| 2.7) Contagem de amebócitos circulantes na<br>hemolinfa.....                                                                                                                         | 32  |
| 2.8) Obtenção dos cortes histológicos.....                                                                                                                                           | 33  |
| 2.9) Análise estatística dos resultados.....                                                                                                                                         | 33  |
| 3) Resultados.....                                                                                                                                                                   | 35  |
| 3.1) Resultados relativos a susceptibilidade e mortalidade<br>do molusco <u>Biomphalaria glabrata</u> variantes albina e<br>melânica infectadas com <u>Schistosoma mansoni</u> ..... | 35  |
| 3.2) Avaliação do número de amebócitos na hemolinfa de<br>moluscos <u>Biomphalaria glabrata</u> , variantes albina e<br>melânica.....                                                | 50  |
| 3.3) Cortes Histológicos.....                                                                                                                                                        | 56  |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 4) DISCUSSÃO.....           | 69 |
| 5) RESUMO E CONCLUSOES..... | 76 |
| Bibliografia.....           | 79 |
| Anexo estatístico.....      | I  |

## Lista de Tabelas e Figuras

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1.....                                                                                                                               | 37 |
| Taxa de infecção de <u>B. glabrata</u> , variantes melânica e albina, expostas a 10 miracídios de <u>S. mansoni</u>                         |    |
| Tabela 2.....                                                                                                                               | 38 |
| Infectividade de molusco <u>B. glabrata</u> , variantes melânica e albina, infectadas por <u>S. mansoni</u>                                 |    |
| Figura 1.....                                                                                                                               | 39 |
| Moluscos albinos e melânicos eliminando cercárias                                                                                           |    |
| Figura 2.....                                                                                                                               | 40 |
| Moluscos albinos e melânicos não eliminando cercárias                                                                                       |    |
| Figura 3.....                                                                                                                               | 41 |
| Taxa de moluscos infectados                                                                                                                 |    |
| Tabela 3.....                                                                                                                               | 44 |
| Mortalidade (em números absolutos e percentuais) em <u>B. glabrata</u> variantes melânica e albina, infectadas por <u>S. mansoni</u> .      |    |
| Tabela 4.....                                                                                                                               | 45 |
| Mortalidade (em números absolutos e percentuais) em <u>B. glabrata</u> variantes melânica e albina - moluscos controles                     |    |
| Figura 4.....                                                                                                                               | 46 |
| Mortalidade de moluscos albinos e melânicos infectados                                                                                      |    |
| Figura 5.....                                                                                                                               | 47 |
| Mortalidade dos controles                                                                                                                   |    |
| Figura 6.....                                                                                                                               | 48 |
| Taxa de mortalidade dos melânicos                                                                                                           |    |
| Figura 7.....                                                                                                                               | 49 |
| Taxa de mortalidade dos albinos                                                                                                             |    |
| Tabela 5.....                                                                                                                               | 50 |
| Número médio de amebócitos estrelados em <u>Biomphalaria glabrata</u> variantes albina e melânica infectadas por <u>Schistosoma mansoni</u> |    |

|                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 6.....                                                                                                                                                         | 51 |
| Número médio de amebócitos não estrelados circulantes na hemolinfa de <u>Biomphalaria glabrata</u> variantes albina e melânica expostos ao <u>Schistosoma mansoni</u> |    |
| Figura 8.....                                                                                                                                                         | 54 |
| Contagem de amebócitos estrelados                                                                                                                                     |    |
| Figura 9.....                                                                                                                                                         | 55 |
| Contagem de amebócitos não estrelados                                                                                                                                 |    |
| Tabela 7.....                                                                                                                                                         | 56 |
| Número médio (em 3 caramujos) de larvas de <u>Schistosoma mansoni</u> observado em <u>Biomphalaria glabrata</u> , variante albina, exposta a 100 miracídeos           |    |
| Tabela 8.....                                                                                                                                                         | 57 |
| Número médio (em 3 caramujos) de larvas de <u>Schistosoma mansoni</u> observado em <u>Biomphalaria glabrata</u> , variante melânica, exposta a 100 miracídeos         |    |
| Figura 10.....                                                                                                                                                        | 59 |
| Esporocistos íntegros e degenerados - albinos                                                                                                                         |    |
| Figura 11.....                                                                                                                                                        | 60 |
| Esporocistos íntegros e degenerados - melânicos                                                                                                                       |    |
| Figura 12.....                                                                                                                                                        | 61 |
| Esporocistos íntegros                                                                                                                                                 |    |
| Figura 13.....                                                                                                                                                        | 62 |
| Esporocistos degenerados                                                                                                                                              |    |
| Figura 14.....                                                                                                                                                        | 63 |
| Fotomicrografia de amebócitos de <u>bionfalária</u> livres de infecção.                                                                                               |    |
| Figura 15.....                                                                                                                                                        | 64 |
| Fotomicrografia de amebócitos de <u>bionfalárias</u> livres de infecção.                                                                                              |    |
| Figura 16.....                                                                                                                                                        | 65 |
| Corte histológico da região céfalo-podal de <u>Biomphalaria glabrata</u> variante albina após 30 minutos de infecção por miracídio de <u>Schistosoma mansoni</u> .    |    |
| Figura 17.....                                                                                                                                                        | 66 |
| Corte histológico da região céfalo-podal de <u>Biomphalaria glabrata</u> após 2 horas de infecção por <u>Schistosoma mansoni</u> .                                    |    |

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 18.....                                                                                                                                         | 67 |
| Corte histológico da região céfalo-podal de <u>Biomphalaria glabrata</u> variantes melânica após 24 horas de infecção por <u>Schistosoma mansoni</u> . |    |
| Figura 19.....                                                                                                                                         | 68 |
| Corte histológico da região céfalo-podal de <u>Biomphalaria glabrata</u> albina após 72 horas de infecção por <u>Schistosoma mansoni</u> .             |    |

## 1) INTRODUÇÃO

### 1.1) Histórico

Parasitar é um verbo transitivo direto que exprime uma relação onde um ser vive às custas de outro(s) (Ferreira, 1975). A parasitologia, no Brasil, nasceu no século XIX, quando Leuckart, seguindo os passos de Rudolphi, fundou a helmintologia. Isto não significa que a parasitologia não existisse, porque havia observações realizadas por missionários, historiógrafos e viajantes estrangeiros durante o período colonial que relatavam esta associação de um ser vivendo às custas de outro (Barreto, 1963).

Com relação às esquistossomoses, existe uma descrição de ovos do parasita em múmias no Egito que se parece muito com a sua descrição atual (os ovos descritos eram de S. haematobium). A esquistossomose mansônica não foi diferenciada da esquistossomose hematóbica até o fim do século XIX. No começo do século XX<sup>1</sup> a esquistossomose mansônica foi diferenciada da hematóbica e portanto foram observadas as diferenças entre as infecções porque até então os sintomas, os vermes e os ovos eram confundidos. Os relatos sobre a esquistossomose mansônica são mais difíceis de serem checados porque esta parasitose se confunde muito com outras parasitoses que atacam o sistema hepático.

---

1 O Schistosoma mansoni foi descrito como nova espécie em 1907 por Sambon.

Existem duas teorias a respeito da origem da esquistossomose mansônica. Uma diz que a parasitose teve sua origem na África e que teria se espalhado para a América através do tráfico de escravos; e a segunda hipótese seria que a esquistossomose teria tido um centro de evolução separado para cada uma das três espécies<sup>2</sup>. Neste caso, a esquistossomose mansônica teria evoluído na região neotropical (Paraense, 1959).

Para o desenvolvimento deste parasita são necessários dois hospedeiros, sendo um parasita heteroxeno. O primeiro hospedeiro do parasita é um invertebrado molusco, chamado hospedeiro intermediário, o segundo é um vertebrado, que é hospedeiro definitivo. Entre os hospedeiros definitivos estão os roedores, os marsupiais e o homem.

Como toda relação parasítica, esta pode trazer danos para os seus dois tipos de hospedeiros, embora seja possível que o parasita passe pelo organismo sem causar danos ao seu hospedeiro intermediário e que também pudesse passar impune das reações imunológicas do molusco. No caso do Schistosoma mansoni ele provoca danos nos seus dois hospedeiros.

O ciclo evolutivo do Schistosoma mansoni, que é um verme trematódeo pertencente à classe dos Digenea, inicia-se quando o hospedeiro definitivo elimina as suas fezes contendo ovos em ambiente onde possam existir os moluscos que são os seus hospedeiros intermediários. Os ovos do

---

<sup>2</sup> As três espécies são S. japonicum do oriente, S. haematobium da Etiópia e o Schistosoma mansoni na região neotropical.

parasita, ao entrarem em contato com a água, eclodem, liberando as formas embrionárias ciliadas denominadas miracídios. Os miracídios se locomovem até encontrarem o molusco e o penetram. Depois de 48 horas de sua penetração os miracídios perdem seus cílios e se transformam em esporocistos. Os esporocistos sofrem transformações anatômicas e funcionais e após aproximadamente 4 semanas começam a liberar cercárias, que é o segundo estágio de vida livre do parasita. As cercárias nadam ativamente à procura de um outro hospedeiro, que será o hospedeiro definitivo do parasita. Após a penetração no hospedeiro definitivo, as cercárias se transformam em esquistossomulos e a partir daí migram para os pulmões pela corrente sanguínea ou linfática. Após um período variável migram para o sistema porta, onde tornam-se adultos, acasalam-se e começam a postura dos ovos (Cunha, 1970).

Existem três espécies de hospedeiros intermediários do Schistosoma mansoni em nosso meio, que são a Biomphalaria glabrata (Say, 1818), a Biomphalaria tenagophila (Orbigny, 1835) e a Biomphalaria straminea (Dunker, 1848). A Biomphalaria glabrata é o hospedeiro melhor adaptado à infecção provavelmente por ter uma relação mais antiga em relação à adaptação com o parasita. A Biomphalaria glabrata comumente vive em habitats do peridomicílio onde a vegetação foi destruída, o que ocorre desde o Rio Grande do Norte até

a zona da mata de Minas Gerais<sup>3</sup>. Esta espécie de molusco gosta de viver na natureza em córregos, poços, açudes, lagoas, em água sem turbulência, rasa e, de preferência, limpa (Freitas, 1976).

Chama-se de linhagem simpátrica, aquela em que parasita e molusco são da mesma região; e a alopátrica, em que parasita e molusco são de regiões diferentes (Newton, 1953; Paraense e Correa, 1963; Richards e Merritt, 1972; Basch, 1976).

Em nosso trabalho o interesse é estudar o molusco hospedeiro intermediário do Schistosoma mansoni que pertence à classe Gastropoda, à ordem dos pulmonatas, à família Planorbidae e à espécie Biomphalaria glabrata, variantes albina e melânica, particularmente com relação aos aspectos que determinam a susceptibilidade do molusco à infecção.

## 1.2) Aspectos gerais da Biologia do molusco

Os moluscos, junto com os artrópodes, são os dois maiores filos dos invertebrados. Dentre os moluscos a classe Gastropoda é a que possui maior número de espécies. A classe Gastropoda sofreu uma drástica transformação em relação aos seus ancestrais. A principal transformação foi a torção do corpo em 180° graus mudando totalmente a sua conformação original (Morton, e Yonge, 1964). Entre os gastrópodes

---

<sup>3</sup> Em Minas Gerais a Biomphalaria glabrata ocupa área muito extensa.

estão os pulmonados em que há predominância da respiração atmosférica. Na evolução dos pulmonados houve diversas modificações, como a perda da função das brânquias e a conversão da cavidade do manto em pulmão. No caso dos Planorbídeos, sendo pulmonados aquáticos, é possível que tenham saído da vida terrestre e retornado para a vida aquática. Existem algumas características destes moluscos que mostram esta readaptação para a vida aquática, como a ausência de ctenídeos e a existência da cavidade do manto funcionando como pulmão e órgão hidrostático (Ghiretti, e Ghiretti, 1975).

Os Planorbídeos possuem, além da cavidade pulmonar, as pseudobrânquias, tendo função respiratória, mas sem provável relação com as brânquias dos moluscos aquáticos.

Entre os gastrópodes pulmonados estão as bionfalárias, que possuem uma concha plano-espiral com abertura da concha com forma variada, pé oblongo, cabeça com formato arredondado. A Biomphalaria glabrata<sup>4</sup> possui várias características morfológicas que as diferencia das outras, como linha renal pigmentada com uma crista que aparece em moluscos adultos (Paraense, 1975).

O sistema respiratório nas bionfalárias, como mencionado, sofreu uma adaptação ao meio aquático. As trocas gasosas são feitas na parede pulmonar por onde o sangue passa e é oxigenado, passando posteriormente para o coração.

4 Biomphalaria: do latim bis: duas vezes + do grego omphalos: umbigo; e glabrata, do latim glabers, que significa liso, com relação ao aspecto da concha.

O pulmão dos moluscos é constituído por uma cavidade, a cavidade pulmonar ou saco pulmonar. Existem também as pseudobrânquias que são órgãos altamente vascularizados. Há ainda trocas gasosas cutâneas. Tudo isto permite às bionfalárias ficarem por tempo longo submersas sem precisar respirar o ar atmosférico (Ghiretti, 1966 e Cunha, 1970).

O sistema digestivo das bionfalárias é composto por massa bucal, rádula, glândulas salivares, esôfago, hepatopâncreas e intestino. No caso das bionfalárias o hepatopâncreas é um órgão muito atacado pelo parasita, devido a seu teor de glicogênio. O hepatopâncreas fica totalmente deformado pelo desenvolvimento do parasita (Richards, 1980). O trato digestivo do molusco é totalmente revestido por cílios, exceto a moela e o estômago (Runham, 1975).

As bionfalárias são hermafroditas e seu aparelho genital é constituído de ovotestis, glândula de albumen, útero, oviduto, vagina, espermateca, próstata, glândula nidamental, vesícula seminal, canal deferente, pênis. A região do ovoteste também é uma região de preferência do parasita. Os moluscos, embora sendo hermafroditas, realizam, preferencialmente, a reprodução cruzada (Paraense, 1975; Cunha, 1970).

O sistema circulatório dos moluscos é aberto. A diferença entre sistema circulatório aberto em relação ao fechado é que no aberto o sangue circula através de grandes cavidades e no fechado existem capilares entre o sistema

venoso e o arterial. Existem várias funções no sistema circulatório do molusco, como o transporte de substâncias respiratórias, a sustentação do corpo<sup>5</sup>, a filtração do sangue. Os moluscos geralmente possuem movimentos lentos que influenciam o fluxo sanguíneo. O coração das bionfalárias é constituído de uma aurícula e um ventrículo. O sangue das bionfalárias possui hemoglobina dissolvida na hemolinfa. Este pigmento possui grande afinidade com o oxigênio, o que permite a utilização de oxigênio dissolvido a baixa tensão. A hemolinfa possui também soro com grande quantidade de água, cloreto de sódio, bicarbonato e células (Fisher, 1950 e Paraense in Cunha, 1970).

### 1.3) Considerações sobre as células da hemolinfa

Há alguns anos não se acreditava que os invertebrados possuíssem um sistema de defesa. Hoje sabe-se que os moluscos possuem um eficiente sistema de defesa com características semelhantes ao sistema de defesa dos vertebrados. Neste processo estão envolvidos diversos elementos, como células de defesa, o reconhecimento de corpos estranhos, resposta encapsuladora, fagocitose, reações citotóxicas, assim como fatores humorais. Além do sistema de defesa interno existem as barreiras físicas que impedem a entrada de corpos estranhos, como muco ao redor do

---

5 O sangue do molusco serve como agente de suporte do corpo.

corpo, concha nos moluscos, forte integumento no caso dos insetos.

Um dos aspectos mais surpreendentes a respeito da imunidade dos invertebrados com relação à dos vertebrados é que esta não é feita com imunoglobulinas, e sim com células e fatores humorais, sendo aparentemente simples, mas com uma eficiência análoga a dos vertebrados (Ratcliffe, 1985).

O mecanismo de defesa mediado por células tem sido classificado como sendo a maior linha de defesa dos invertebrados. Estas células, que participam do sistema de defesa, têm sido classificadas conforme a espécie e, dentro da mesma espécie, de acordo com seus diferentes estágios de desenvolvimento (Ratcliffe, 1985).

Entre os moluscos estas células são chamadas hemócitos ou amebócitos. Elas têm um papel muito importante na fagocitose ou encapsulação; no processo do reparo da concha através do transporte de cálcio podem liberar substâncias citotóxicas; e podem atuar como fator coagulante da hemolinfa, já que os moluscos não possuem fibrinas como os vertebrados.

Os amebócitos parecem-se muito com os macrófagos humanos. Estas células estão presentes na hemolinfa e fluidos do corpo, possuindo capacidade de se movimentar independentemente. Portanto, a fagocitose de materiais estranhos é facilitada por esta característica (Cheng, 1975).

Os aspectos morfológicos dos amebócitos podem ser muito variados devido à sua capacidade de movimento, mas eles geralmente medem de 2.8 um a 14.1 um, possuem núcleo oval, heterocromatina espalhada no nucleoplasma, citoplasma que é dividido em duas regiões - uma é o endoplasma (ao redor do núcleo) e a outra o ectoplasma (região na periferia da célula) - e possuem ainda pseudópodes, que são estruturas largas sustentadas por uma estrutura semirígida chamada "rib"<sup>6</sup> (Jeong e Heyneman, 1976).

Os amebócitos têm sido classificados desde há muito tempo. Apesar disso, até os dias de hoje não se chegou a um consenso sobre sua classificação. Provavelmente pela sua movimentação, estas células adquirem vários formatos, prejudicando a elucidação através dos aspectos morfológicos.

Esta classificação, de acordo com Wagge (1955), começou em 1941, com George que as classificou em 3 tipos. A denominação dada por este pesquisador foi: tipo 1 - células não diferenciadas que têm a capacidade de diferenciar-se em outros tipos de células. Tipo 2 - células que possuem a capacidade de fagocitar. Tipo 3 - células que possuem grânulos, vacúolos e parecem fazer transporte de material nutritivo. Em 1945, Wilmer (in Wagge, 1955) fez uma nova classificação, mas mantendo três tipos de células. Wilmer as nomeou como epiteliócitos, mecanócitos e amebócitos. O primeiro tipo era formado na pele e não tinha a capacidade

---

<sup>6</sup> O "rib" é uma estrutura que dá sustentação aos pseudópodes dos amebócitos.

de fagocitar; o segundo tipo, também chamado de fibrócito, possuía pseudópodes mas não tinha a capacidade de fagocitar, e também eram consideradas células sustentadoras; e o terceiro tipo, os amebócitos ou leucócitos, com movimentos independentes através dos pseudópodes e com capacidade fagocítica. No ano seguinte, de acordo com Wagge (1955), Liebman dividiu os leucócitos em dois tipos de células, com nome de linfodócitos e os trefócitos. O primeiro trata do material excretor, o segundo do transporte de material nutritivo. Os dois tipos de células participariam da restauração da concha e do reparo tecidual. No ano seguinte, Liebman denominou os linfodócitos de linfócitos e manteve a denominação de trefócitos. Entre os linfócitos ele observou que existiam dois tipos e chamou-os de granulares e esféricos. Em 1953, Dundee achou que só havia um tipo de célula e a classificou como granulócito. Mais tarde, Pan, em 1958, chamou a célula de amebócito. Sminia, em 1972, concluiu que havia um tipo de célula com diferentes funções. Após todas estas classificações Cheng em 1975 observou que havia dois tipos de células na hemolinfa do molusco. Estas células foram chamadas de granulócitos e hialinócitos. Os granulócitos são células que possuem grânulos citoplasmáticos e pseudópodes, enquanto os hialinócitos não possuem grânulos nem pseudópodes. Em geral os granulócitos são encontrados em maior número na hemolinfa de moluscos (Cheng e Auld, 1977). Sminia, em 1981, demonstrou através de cortes histoquímicos que as células redondas, os

hialinócitos, têm menos enzimas e menor capacidade fagocítica. Neste trabalho Sminia também observou que os moluscos mais jovens possuem mais células redondas que os mais velhos, sugerindo que estes são mais susceptíveis à infecção devido ao pouco número de células fagocitárias. Em 1987, Sminia, observando que há grande quantidade de grânulos citoplasmáticos nos lisossomos de granulócitos, não aceitou esta denominação, possivelmente pela associação do nome com os granulócitos dos vertebrados. A classificação mais recente é a de Noda e Loker, em 1989, com a diferenciação destas células em 4 tipos: 1) granulócitos que se espriam muito, 2) granulócitos com espriamento parcial, 3) hialinócitos e 4) células redondas. A classificação desta células não está completamente definida até hoje, porque não se sabe se é apenas um tipo de célula que dependendo do estímulo se transformaria em outra, se são dois tipos de células ou ainda se são mais de dois tipos.

Existem dois tipos de células morfologicamente distintas na hemolinfa de Biomphalaria glabrata: os granulócitos, que inicialmente são redondos e depois, conforme o estímulo, se tornam espriados, e os hialinócitos que não se espriam, ficando com o seu formato esférico (Knaap e Loker, 1990).

Os amebócitos neste trabalho serão classificados em estrelados (granulócitos) e não estrelados (hialinócitos), enfatizando os aspectos morfológicos.

A origem do tecido ou órgão que produz os amebócitos também foi tema controvertido durante vários anos, porque a

maior dificuldade em determinar o local de formação das células é devido ao fato de ser o sistema circulatório aberto e portanto as células não estarem limitadas aos vasos sanguíneos, como nos vertebrados. Millott (1937), segundo Wagge (1955), observou que os amebócitos tinham origem nas glândulas salivares; Wagge (1955) sugeriu que nos moluscos os amebócitos teriam origem no epitélio do manto; Muller (1956) observou que os amebócitos eram formados continuamente nos tecidos conectivos particularmente no pulmão; Pan (1958) sugeriu que os amebócitos são formados nos fibroblastos das trabéculas do manto, na parede do nefrídeo perto do pericárdio; Lie e Heyneman (1975) descreveram uma região na parede pericardial dos pulmonados; Jeong et. al. (1983) chamaram a região renopericardial do molusco de APO (Amebocyte Producing Organ), que é formado por uma espécie de tecido conectivo localizado na região renopericardial do molusco. Neste órgão nunca foi observada a presença de parasitas (Joky et. al., 1985).

A produção quantitativa de amebócitos pode aumentar através de vários estímulos, como uma injeção de bactérias, ou após a penetração de um trematódeo (Sullivan et.al., 1984). Quando o trematódeo é incompatível, o número de amebócitos cai rapidamente na hemolinfa circulante, sendo que estes não reconhecem o parasita como corpo estranho nos primeiros instantes. Após algumas horas os parasitas são reconhecidos e envolvidos por fibroblastos e células da hemolinfa, produzindo uma reação de encapsulamento do

parasita pelos amebócitos. Quando há compatibilidade do trematódeo com o molusco vetor, verifica-se aumento no número de amebócitos circulantes, observando-se o reconhecimento do parasita, porém não se observa a sua eliminação. (Files e Cram, 1949; Newton, 1952; Pan, 1963; Abdul-Salam e Michelson, 1980). Quando ocorrem ferimentos, o número de amebócitos também aumenta, o mesmo ocorrendo durante o desenvolvimento do trematódeo no organismo do molusco. Em moluscos que vivem em locais poluídos há um maior número de amebócitos circulantes na hemolinfa em relação aos que vivem em locais limpos (Sminia, 1987). O aumento drástico dos amebócitos não é consequência apenas de mitoses, mas também da migração dos tecidos para a hemolinfa, ou ao contrário, da hemolinfa para os tecidos dependendo das suas necessidades (Matricón-Gondran et.al., 1986).

Yoshino e Granath, em 1983, estudaram a variação numérica dos amebócitos na hemolinfa, através de anticorpos monoclonais contra os amebócitos, a fim de identificar as diferenças funcionais das células. Yoshino et. al. (1985), identificou em epítopo (BGH-1) em amebócitos através do uso de anticorpos monoclonais e observou que células com este epítopo possuem menor capacidade fagocítica.

As bionfalárias, por serem susceptíveis ao Schistosoma mansoni, podem sofrer atrofia do APO. Entretanto o APO de moluscos infectados pode sofrer ação de produtos produzidos pelo parasita, induzindo a multiplicação celular. Observa-se

também que materiais sem vida, particulados, não provocam aumento mitótico (Sullivan et.al., 1984 e Joky et.al., 1985).

Sabemos que a morfologia e a atividade dos amebócitos são influenciadas por fatores químicos que estão presentes na hemolinfa, como substâncias estranhas. A composição do meio onde estas células se encontram também pode influenciar a sua atividade. Os fatores do plasma que provavelmente influenciam o comportamento dos amebócitos são as lectinas (Renwrandtz et.a., 1977; Schoenberg & Cheng, 1980 e Knaap & Loker, 1990).

As lectinas que estão presentes no plasma da hemolinfa e na superfície dos amebócitos, segundo Mullainadhan e Renwrandtz (1986), são responsáveis pela formação de pontes entre carboidratos<sup>7</sup> da célula ou de partícula estranha. Sabe-se que as lectinas podem se unir a diferentes carboidratos com variação no grau de afinidade, portanto há variações no grau de reconhecimento (Knaap e Loker, 1990). As lectinas, além de serem moléculas de reconhecimento no plasma, atuam como receptoras e também como opsoninas citofílicas, que aumentam a adesão de partículas estranhas para a fagocitose (Renwrandtz & Stamer, 1983; Knaap et.al. 1990).

Os amebócitos dos moluscos, entre as suas diversas funções, participam do reparo de concha através do transporte de cálcio para as áreas lesadas (Wagge, 1955). Os

7 Os carboidratos se encontram na superfície da célula

amebócitos atuam como "tampão" quando há lesão dos tecidos para evitar o extravasamento da hemolinfa e a consequente morte do molusco. Quando o molusco é ferido ou a concha é quebrada os amebócitos retiram da concha ou dos tecidos subjacentes o cálcio necessário para reparar o ferimento. Existem dois tipos de sais cálcio nas células dos moluscos: um que é solúvel em água e outro que é cristalino, insolúvel. Possivelmente estes dois tipos atuam diferentemente conforme o tipo de lesão. No trabalho de Wagge (1955) foi estabelecido que as reservas de cálcio estão dentro dos amebócitos de uma forma inativa e quando são requeridos passam o conteúdo para a área danificada. Quando os moluscos são alimentados com uma dieta rica em cálcio há um espessamento da concha, parecendo ser uma forma adicional de reserva deste material. Este processo de cicatrização acontece em vários outros invertebrados com ou sem coagulação da hemolinfa, mas sabe-se que o processo principal é feito pelos amebócitos que migram para a região danificada. Os amebócitos se agregam de forma a tampar a lesão e através da contração muscular fecham a ferida. Este processo de regeneração de tecidos é muito importante em outros invertebrados, parecendo ser, basicamente, o mesmo processo observado nos moluscos com transporte de cálcio para a recuperação de tecidos.

Diversas investigações têm sido feitas sobre as células da hemolinfa, mas uma das principais é a pesquisa, através de antígenos de superfície dos amebócitos, mediante a

aplicação de anticorpos monoclonais, e lectinas para estudo de subpopulações destas células (Renwrandtz e Stahmer, 1983; Knaap et. al., 1983 e Yoshino et.al., 1985).

#### 1.4) Fagocitose e degranulação

Há muito tempo tem se estudado este tipo de mecanismo de defesa nos invertebrados. Inicialmente, como relata Ratcliffe (1985), a fagocitose nos invertebrados inferiores tem como função a alimentação, através da ingestão de partículas estranhas que são digeridas. Hoje reconhece-se que ela tem também a função de defender os invertebrados superiores e os vertebrados de parasitas e outros agentes agressores. A fagocitose, junto com fatores humorais, é responsável pela eficiência do sistema de defesa dos invertebrados. O processo fagocítico é feito primeiramente através do reconhecimento do material estranho, sendo que somente depois da invasão há o englobamento da partícula que foi identificada como estranha. Quando se pensa na exposição de algum ser a microorganismos, logo se associa a imunidade mediada por anticorpos, mas isto foi descartado por Cheng (1969), quando expôs o molusco Helisoma duryi normale a vários tipos de bactérias e concluiu que os moluscos não sintetizam imunoglobulinas<sup>8</sup>. Nas bionfalárias existem 2 tipos de células, como já foi descrito, sendo os

8 "O conceito geral entre os imunologistas é que nenhum invertebrado é capaz de sintetizar anticorpos verdadeiros (Cheng, 1975)."

granulócitos as células responsáveis pela fagocitose. O fato dos granulócitos serem considerados células fagocíticas foi contestado por Ruddel (1971), quando estudou células amebocitárias de Crassostrea gigas. Ele observou que as células responsáveis pela fagocitose eram as células agranulares. Depois de alguns anos Foley e Cheng (1975), estudando células de Crassostrea virginica e Mercenaria mercenaria, observaram que os granulócitos estavam sempre próximos a bactérias. Os granulócitos são as células encontradas em maior número na hemolinfa de Australorbis glabratus. Os amebócitos têm a capacidade de distinguir materiais do seu próprio corpo dos materiais estranhos. Este processo foi verificado por Tripp (1961) que também verificou que os moluscos aceitam tecidos homólogos quando transplantados e não aceitam tecidos heterólogos.

Uma grande indagação com relação a fagocitose está no processo de reconhecimento e de diferenciação do material que faz parte do seu próprio organismo, daquele que não o faz. Através do processo de fagocitose "in vitro" Prowse e Tait (1969) observaram que existem fatores no soro do molusco que são adsorvidos na superfície da partícula estranha, tornando-a susceptível à fagocitose. Os amebócitos, além de discriminar materiais estranhos dos não estranhos, podem também discriminar os componentes de seu próprio corpo quando estes estão com problemas. Existem fatores solúveis de reconhecimento nos invertebrados, que são as transferases específicas para o fator de

reconhecimento. As transferases que estão presentes na hemolinfa dos moluscos. Se a ligação da transferase com os amebócitos falhar pode haver o reconhecimento dos componentes do organismo do molusco como estranho, provocando necrose local (LoVerde, et. al., 1982).

Após o processo do reconhecimento do material que penetrou no organismo do molusco como estranho há uma infiltração celular, que é feita primeiramente pelos amebócitos com total encapsulação do material estranho. Esta encapsulação feita pelos amebócitos foi observada ao redor de vários materiais como grãos de pólen, esferas de poliésteres, tecidos heterólogos transplantados, tecidos homólogos fixados em formalina, bactérias, miracídios, esporocistos e cercárias que não conseguiram sair dos tecidos do molusco. As reações de encapsulação nos moluscos podem ser consideradas como análogas às que acontecem nos hospedeiros vertebrados, quando há formação de granulomas no fígado para isolar o parasita e impedir que haja danos mais extensos ao hospedeiro. A reação de encapsulação no molusco ajuda a manter a integridade interna dos tecidos do molusco em defesa ao parasitismo, provavelmente devido à ingestão de produtos tóxicos vindos do parasita, prolongando a vida do hospedeiro (Harris, 1975 e Carter, & Bogitsh, 1975).

A destruição do material estranho provavelmente é feita pelas enzimas lisossomais que estão presentes nos granulócitos. A produção destas enzimas é aumentada com a presença do material estranho. Para a liberação destas

enzimas não é necessário que as células entrem em contato direto com o material estranho. A morte e lise pode ser feita a distância através de reações citotóxicas. O processo de degranulação é portanto a liberação das enzimas lisossomais que estão dentro do lisossomo através de estímulos. Estas enzimas matam e lisam o material estranho (Cheng & Yoshino, 1976; Foley & Cheng, 1977).

Estudos têm sido feitos sobre a produção de metabólitos de oxigênio pelos amebócitos. O contato entre a membrana dos amebócitos e o esporocisto de Schistosoma mansoni atua na produção intracelular de peróxido de oxigênio, que é altamente tóxico para o parasita. O processo de liberação de radicais de oxigênio não é bem conhecido, mas aventa-se a possibilidade disto acontecer através de receptores da membrana e através de fatores do plasma (Dikeboon et.al., 1988).

#### 1.5) Fatores que influenciam a susceptibilidade ou resistência dos moluscos

A susceptibilidade dos moluscos à trematódeos é influenciada por fatores genéticos. Outros fatores interagindo com os fatores genéticos podem influenciar a susceptibilidade dos moluscos a infecções parasitárias, como o ambiente, a adaptação fisiológica entre parasita e hospedeiro, idade do hospedeiro intermediário e mecanismos imunológicos.

A susceptibilidade e resistência a infecção, por dependerem da constituição genética, podem ser transferidas para as gerações seguintes (fatores hereditários).

Richards (1973) e Richards e Merritt (1975) observaram que a susceptibilidade ou resistência à infecção é regulada por quatro ou mais fatores, sendo a resistência do molusco a infecção expressa por um único gene dominante. Portanto o caráter da susceptibilidade pode estar presente em moluscos refratários a infecção por Schistosoma mansoni e vice versa. O caráter da susceptibilidade é considerado recessivo.

A susceptibilidade à infecção não depende apenas do hospedeiro intermediário mas também da linhagem do parasita. Isto explica diferenças na susceptibilidade tanto do molusco como do parasita pertencentes a diferentes áreas geográficas, havendo necessidade de um longo período de adaptação entre hospedeiro e parasita. Os moluscos que servem de hospedeiros ao S. mansoni são mais susceptíveis às linhagens simpátricas do parasita. As infecções de moluscos susceptíveis com esquistossomos de linhagem alopátrica só são possíveis quando os moluscos são submetidos a exposição de grande número de miracídios (Paraense, 1963; Dias, et.al., 1987).

Paraense & Corrêa (1963) estudaram a adaptação fisiológica através da exposição de molusco Biomphalaria glabrata a miracídios da cepa de São José dos Campos (SJ) e a exposição de Biomphalaria tenagophila a miracídios da

linhagem de Minas Gerais (MG). Foi verificado que havia resistência à infecção cruzada. Este experimento serviu para constatar a existência de duas linhagens de Schistosoma mansonii, uma de São José dos Campos, que tem a Biomphalaria tenagophila como seu hospedeiro intermediário e outra de Minas Gerais, que tem a Biomphalaria glabrata como hospedeiro intermediário.

A presença de infecções concomitantes, ou seja, aquelas que ocorrem quando um molusco é parasitado por mais de uma espécie de parasita, também pode alterar a relação parasita-hospedeiro, pela competição por nutrientes, luta por espaço no corpo do hospedeiro, alterações fisiológicas e imunológicas. Estas alterações poderiam aumentar e diminuir a susceptibilidade do molusco quando uma segunda espécie de trematódeo entra em contato, porque há alterações no órgão protutor de amebócitos e nos próprios amebócitos (Lie et.al., 1977, 1981 e Machado, 1990).

A dieta do molusco é importante para o estabelecimento da infecção, porque o parasita consome boa parte dos nutrientes existentes no organismo do hospedeiro, principalmente o glicogênio (Carter e Bogitsh, 1975). A idade é importante porque os moluscos jovens são mais susceptíveis a infecção, possivelmente pelo menor número de células fagocíticas em sua hemolinfa, em relação aos mais velhos (Richards, 1973; Niemann e Lewis, 1990).

No estudo de Loker & Bayne (1982) os esporocistos incubados em plasma de molusco susceptível e depois

incubados com amebócitos de cepa resistente eram destruídos em sua grande maioria. Quando os esporocistos eram incubados em plasma resistente e depois incubados com amebócitos susceptíveis não havia destruição do esporocisto. Os resultados obtidos nestes estudos fazem pensar que apenas as células estão envolvidas na susceptibilidade e resistência do molusco. Entretanto, foi verificado que fatores do plasma poderiam alterar esta resposta. Foi observado que os esporocistos podem se revestir de componentes do plasma do hospedeiro mascarando o seu reconhecimento pelo sistema de defesa do molusco.

Granath e Yoshino (1984), quando inocularam hemolinfa de molusco resistente (10 r-2) em molusco susceptível albino PR, notaram que houve proteção do molusco quando este era exposto à infecção por Schistosoma mansoni 24 horas após a inoculação de hemolinfa. Este estudo leva a crer que pode haver transferência passiva de resistência ao Schistosoma mansoni, através da inoculação do soro de moluscos.

Em estudos feitos por Zanotti-Magalhães et. al. (1987) foi observado que as infecções produzidas por cercárias oriundas de hospedeiros intermediários mais susceptíveis provocam maior patogenicidade no hospedeiro vertebrado do que aquela observada quando os vertebrados foram infectados por cercárias oriundas de moluscos menos susceptíveis. Estas observações foram feitas através da seleção genética de moluscos susceptíveis ao Schistosoma mansoni, por autofecundação, sendo que o molusco usado foi a Biomphalaria

tenagophila e Biomphalaria glabrata. O parasita também foi selecionado através de diversas passagens no molusco intermediário. Os resultados observados levaram a conclusão de que a patogenecidade do parasita está diretamente relacionada à susceptibilidade do hospedeiro intermediário. As lesões observadas em humanos que foram infectados com a linhagem BH do parasita proveniente do desenvolvimento em moluscos Biomphalaria glabrata são muito mais intensas que as lesões observadas em humanos infectados pela linhagem SJ desenvolvida em Biomphalaria tenagophila. Casos de esquistossomose na forma hepatoesplênica descompensada em pessoas infectadas com a linhagem SJ desenvolvida em Biomphalaria tenagophila são pouco frequentes.

#### 1.6) Fatores humorais

Os moluscos, como já foi dito, têm como a sua principal linha de defesa as células, mas também possuem fatores humorais que atuam conjuntamente às células. Esta interação tem sido muito estudada com a intenção principal de se observar se a destruição de materiais estranhos pode ocorrer com ou sem a presença de células, ou seja, apenas com fatores existentes no plasma.

Existem diversos fatores no plasma. Entre os observados estão as lectinas, lisinas, aglutininas, substâncias semelhantes a linfocinas. Também estão presentes fatores

antimicrobiais no plasma dos moluscos, fazendo parte do mecanismo de defesa humoral (Lie et.al., 1980).

Várias observações têm sido feitas com relação a interações celulares e humorais. Foi observado no trabalho de Granath e Yoshino (1982) que esporocistos são destruídos, quando incubados em hemolinfa contendo amebócitos e plasma, ou quando incubados apenas com amebócitos, e quando incubados apenas com plasma não são destruídos. Nas observações feitas por Balan (1990) foi verificado que não havia reações amebocitárias ao redor de esporocistos degenerados, sugerindo, ao contrário de Granath e Yoshino, que fatores do plasma estariam envolvidos nesta destruição.

A capacidade dos granulócitos de aderirem ao vidro e se espraíarem depende de fatores existentes no plasma (Tripp, 1974; Abdul-Salam & Michelson, 1980).

Bayne et.al. (1986) verificaram que esporocistos expostos a plasma de moluscos resistentes tiveram uma alteração da sua antigenicidade.

Os mecanismos pelos quais fatores do plasma atuam em relação ao reconhecimento e posterior destruição do parasita são pouco conhecidos.

### 1.7) Objetivos

Este trabalho tem como intenção observar se há diferença em relação à susceptibilidade do moluscos

Biomphalaria glabrata entre as variantes albina e melânica infectadas pelo Schistosoma mansoni da linhagem BH. O comportamento foi estudado através de observações semanais da evolução da infecção nos moluscos avaliando-se a eliminação de cercárias que caracteriza a porcentagem de moluscos susceptíveis a infecção e a porcentagem de moluscos mortos, a contagem das células da hemolinfa em diferentes horas de infecção, para observar o comportamento destas células frente à infecção e se há diferença entre as duas variantes e observar as alterações morfológicas nos tecidos do moluscos também em diferentes períodos da infecção.

Concretamente este estudo utilizou a Biomphalaria glabrata variante albina existente em nosso laboratório para a manutenção da linhagem BH, enquanto na natureza predomina a variante melânica. Quais seriam as principais diferenças desta manutenção? Será que realmente reproduzimos condições semelhantes às da natureza mantendo a linhagem do parasita na variante albiana?

## 2) MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1) Planejamento dos experimentos

Os experimentos deste trabalho foram planejados para desenvolvimento em três etapas. A primeira etapa foi feita com 50 moluscos da variante albina e 50 moluscos da variante melânica da espécie Biomphalaria glabrata, expostas individualmente a 10 miracídios de Schistosoma mansoni. Para controle utilizamos o mesmo número de moluscos para cada variante, mas sem exposição ao parasita, embora com as mesmas condições experimentais.

A segunda etapa do trabalho foi concebida com o intuito de permitir avaliar a alteração do número de amebócitos na hemolinfa circulante de Biomphalaria glabrata infectada por Schistosoma mansoni em diferentes horas de infecção. A hemolinfa foi retirada de 7 moluscos a cada hora. Os períodos avaliados após a infecção foram desde os 30 minutos até 72 horas pós infecção por Schistosoma mansoni. O grupo controle foi considerado "hora 0" da infecção.

A terceira etapa do trabalho foi feita para verificarmos as alterações morfológicas existentes nos tecidos do molusco. Foram avaliados 3 moluscos expostos a 100 miracídios de Schistosoma mansoni depois de 30 minutos, 2, 24, 48, 72 horas de exposição.

O trabalho consistiu, em síntese, na avaliação da susceptibilidade e mortalidade de B. glabrata variantes albina e melânica frente a infecção esquistossomótica, do comportamento dos amebócitos e da observação da viabilidade das larvas nos tecidos.

I) Observação da taxa de infecção em:

Moluscos albinos infectados

Moluscos melânicos infectados

II) Observação do período pré patente e período de eliminação de cercárias em:

Moluscos albinos infectados

Moluscos melânicos infectados

III) Observação da taxa de mortalidade em:

Moluscos albinos infectados e controles

Moluscos melânicos infectados e controles

IV) Observação da taxa de mortalidade no período de eliminação de cercárias em:

Moluscos albino infectados

Moluscos melânicos infectados

V) Observação do número de amebócitos circulantes em:

Moluscos albinos infectados e controles

Moluscos melânicos infectados e controles

VI) Observação da viabilidade das larvas de S. mansoni nos tecidos do molusco

2.2) Espécie do molusco e linhagem do parasita e manutenção de ambos.

Os moluscos utilizados foram da espécie Biomphalaria glabrata, variantes albina e melânica. Os espécimes nasceram e foram criados no Laboratório de Parasitologia da Unicamp e eram descendentes de exemplares coletados em Belo Horizonte, MG, cedidos pelo professor Wladimir Lobato Paraense.

Os moluscos foram criados em tanques com água declorada. A alimentação consistiu de folhas de alface fresca ad libitum e 1 vez por semana adicionou-se carbonato de cálcio à água.

A linhagem de S. mansoni utilizada para infecção dos caramujos foi a BH ( Belo Horizonte, MG ) também mantida em laboratório com sucessivas passagens em camundongos Swiss.

### 2.3) Montagem dos grupos

Moluscos albinos e melânicos expostos a 10 miracídios de Schistosoma mansoni para observação da taxa de infecção, no período pré-patente, no período de eliminação de cercárias.

Moluscos albinos e melânicos expostos a 10 miracídios de Schistosoma mansoni para observação da taxa de mortalidade no período pré-patente e período de eliminação de cercárias.

Moluscos albinos e melânicos sem exposição ao Schistosoma mansoni (controles) para observação da taxa de mortalidade.

Moluscos albinos e melânicos expostos a 10 miracídios de S. mansoni para observação do número de amebócitos circulantes na hemolinfa.

Moluscos albinos melânicos sem exposição ao S. mansoni para observação dos amebócitos circulantes na hemolinfa.

Moluscos albinos melânicos expostos a 100 miracídios de S. mansoni para visualização das larvas nos tecidos dos moluscos.

#### 2.4) Obtenção de miracídios da linhagem BH de Schistosoma mansoni para infecção dos moluscos.

Miracídios da linhagem BH de Schistosoma mansoni foram obtidos das fezes de camundongos albinos Swiss anteriormente infectados. As fezes foram colhidas aproximadamente 60 dias após a infecção dos camundongos. As fezes colhidas foram homogeneizadas e filtradas com gaze em cálice de sedimentação e colocada em geladeira (Hoffman et. al. 1934). Após o período de sedimentação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se novamente água<sup>9</sup> para lavagem do sedimento. Após a lavagem o sedimento foi colocado em placa de Petri e exposto à luz para eclosão dos miracídios. Após a eclosão, os miracídios foram colocados junto aos moluscos a serem infectados.

#### 2.5) Determinação da susceptibilidade à infecção de moluscos Biomphalaria glabrata, variantes albina e melânica

Cinquenta caramujos albinos e cinquenta melânicos foram submetidos individualmente à infecção por Schistosoma mansoni em frascos contendo 2 ml de água dechlorada e colocados sob luz e calor durante duas horas para propiciar a penetração dos miracídios. Os caramujos utilizados tinham aproximadamente 7mm de diâmetro e foram expostos a 10

---

<sup>9</sup> Este processo foi repetido por 3 vezes para lavagem completa do sedimento.

miracídeos da linhagem de Belo Horizonte de Schistosoma mansonii que é mantida em camundongos experimentalmente infectados. A técnica utilizada para a infecção dos moluscos foi a de Standen, 1951.

Os moluscos do grupo controle foram colocados em frascos e expostos à luz, da mesma forma que o grupo dos infectados, para que fossem submetidos ao mesmo tipo de tratamento que os infectados.

Os moluscos, tendo sido mantidos durante esse período, foram observados semanalmente por um período de 3 meses. Foram mantidos em cristalizadores de vidro, com volume de 2500 ml de água. Os cristalizadores possuíam até 20 caramujos.

Considerou-se o critério da presença de esporocistos observados em microscópio esterioscópico para classificação de moluscos susceptíveis, desde a primeira semana de infecção.

Após 3 semanas de infecção os moluscos foram expostos à luz e calor por duas horas, quando foi observada a liberação de cercárias com a finalidade de se determinar a taxa de susceptibilidade dos dois grupos de moluscos. Depois da primeira exposição os moluscos foram expostos semanalmente à luz para liberação de cercárias. Ao final do experimento foi determinada a taxa de mortalidade e de infecção nos dois grupos de moluscos. A técnica utilizada para a liberação de cercárias foi a de Pellegrino et al., 1955.

## 2.6) Obtenção da hemolinfa de B. glabrata variantes albina e melânica

Moluscos das variantes albina e melânica de 5 a 9 mm de diâmetro foram submetidos individualmente à infecção por 10 miracídios de Schistosoma mansoni da linhagem BH. Destes moluscos foi retirada a hemolinfa por punção da região céfalo-podal com o auxílio de uma seringa de 1 ml. Os moluscos utilizados para a sangria mediam de 5 a 9 mm de diâmetro.

## 2.7) Contagem de amebócitos circulantes na hemolinfa:

Imediatamente após a sangria dos moluscos, a hemolinfa foi colocada em câmara de Neubauer e os amebócitos circulantes foram observados, em microscópio de contraste e fase com objetiva de 40 vezes. A contagem foi feita de modo a diferenciar os amebócitos estrelados dos não estrelados, chamados na literatura de granulócitos e hialinócitos. O cálculo do número total de células da hemolinfa foi expresso em células/ $0.1\text{mm}^3$  em cada molusco.

As contagens de amebócitos foram feitas aos 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 e 72 horas após período de exposição do molusco aos miracídios. Para cada período, determinou-se o número de amebócitos da hemolinfa de 7

moluscos. Como controle foram utilizados moluscos não expostos ao S. mansoni.

## 2.8) Obtenção dos cortes histológicos

Para obtenção de cortes histológicos foram infectados individualmente 15 moluscos de cada grupo (albino e melânico) com 100 miracídios. Foram formados então, de cada grupo, 6 subgrupos com 3 moluscos cada. Os três moluscos de cada subgrupo foram sacrificados aos 30 minutos, 2, 24, 48 e 72 horas após a infecção e posteriormente fixados em Bouin aquoso. Após um período de 48 horas de fixação, a concha do molusco foi removida e foi separada a região céfalo-podal até as proximidades do colar do manto, para realização de cortes histológicos. Esta região foi escolhida porque as larvas de S.mansoni podem permanecer por várias semanas neste local após a sua penetração. As peças histológicas foram incluídas em parafina e cortes de 7 um de espessura foram obtidos.

Posteriormente as preparações foram coradas com Hematoxilina-Eósina e tricômico de Gomori (Guaraldo et.al., 1981).

## 2.9) Análise estatística dos resultados

A análise estatística foi feita através do programa SAS (Statistical Analysis System). A análise foi feita para

avaliarmos as diferenças de susceptibilidade e mortalidade nas várias semanas de observação através do método Catmod.

O estudo estatístico para os valores obtidos na contagem das células da hemolinfa foi feito através da análise de variância com o fatorial tratamento x tempo, para cada espécie de molusco, segundo o método de Ryan-Einot-Gabriel-Welsch.

A análise feita para a avaliação quantitativa de esporocistos degenerados e íntegros nos tecidos dos moluscos foi feita através do método de comparação de duas proporções independentes.

### 3) Resultados

#### 3.1) Resultados relativos a susceptibilidade e mortalidade do molusco Biomphalaria glabrata variantes albina e melânica infectadas com Schistosoma mansoni

As observações começaram a partir da primeira semana após a exposição dos moluscos aos miracídios, quando pudemos constatar, ao exame macroscópico dos moluscos, esporocistos, que estavam aparentes na região céfalo-podal. Nesta primeira semana observamos mais esporocistos na variante melânica do que na variante albina. Esta observação teve como intuito verificar os moluscos que se infectaram e que poderiam morrer no decorrer do experimento e aqueles em que poderia não haver desenvolvimento completo do esporocisto. No caso dos melânicos foram observados 22 moluscos com esporocistos visíveis na região céfalo-podal e nos albinos apenas 18 na mesma região. Esta diferença não foi considerada significativamente diferente pela análise estatística (ver o Anexo).

Os moluscos melânicos começaram a eliminar cercárias na 4ª semana após a exposição aos miracídios de Schistosoma mansoni.

Nesta ocasião 36% dos moluscos expostos aos miracídios apresentaram-se eliminando cercárias. Esta taxa de infecção na 4ª semana correspondeu a 72% dos moluscos sobreviventes (Tabela 1 e 2 e Figura 1). No período da 4ª à 6ª semana o

número de moluscos que eliminavam cercárias permaneceu constante (Figura 1). Na 7ª semana o número de moluscos que eliminaram cercárias diminuiu, para 18% do número total de moluscos expostos, correspondendo a 60% dos moluscos susceptíveis vivos (Figura 1 e Tabela 2).

Nas últimas 3 semanas o número de moluscos que eliminavam cercárias era de 8% do número total de expostos, correspondendo a 44% dos moluscos sobreviventes (Figura 1 e 3).

Em relação aos moluscos da variante albina expostos aos miracídios de S. mansoni observou-se na 5ª semana que 24% apresentavam-se eliminando cercárias, ou seja, 44% dos moluscos sobreviventes (Tabela 2 e Figuras 1 e 3).

Até a 6ª semana o número de moluscos que eliminavam cercárias permaneceu constante. Na 7ª semana o número de moluscos que eliminavam cercárias diminuiu de 44% para 31.82%, não se verificando mortes entre os moluscos que não apresentavam eliminação de cercárias (Figuras 1 e 3 e Tabela 2). Na 9ª semana o número de moluscos que eliminavam cercárias diminuiu de 33% para 15%, enquanto o número dos que não eliminavam aumentou, porque alguns dos moluscos que estavam eliminando cercárias, deixaram de o fazer, sem que tivessem morrido (Figuras 1 e 2). Na 10ª semana o número de moluscos que eliminavam cercárias diminuiu mais ainda e o número dos que não as eliminavam permaneceu constante. Na 11ª semana nenhum molusco eliminou cercárias. Estas observações permaneceram inalteradas até o final do experimento.

Tabela 1. Taxa de infecção de B. glabrata, variantes melânica e albina, expostas a 10 miracídios de S. mansoni. Número total de moluscos (total), Número de moluscos eliminando cercárias (EC), Taxa de infecção em relação ao total exposto ( $TxI_1$ ), Taxa de infecção em relação ao número de moluscos vivos ( $TxI_2$ )

| ! Tipo de<br>! molusco | ! Total | ! EC | ! $TxI_1$ | ! $TxI_2$ | ! |
|------------------------|---------|------|-----------|-----------|---|
| ! Albinos              | ! 50    | ! 12 | ! 24      | ! 44,4    | ! |
| ! Melânicos            | ! 50    | ! 18 | ! 36      | ! 72,0    | ! |

Os moluscos da variante melânica infectados por S. mansoni tiveram um período pré-patente menor do que os moluscos da variante albina, sendo este período foi de 4 semanas para a variante melânica e 5 semanas para a variante albina (Figura 1 e Tabela 2).

Tabela 2. Infectividade de molusco B. glabrata, variantes melânica e albina, infectadas por S. mansoni. Número de moluscos eliminando cercárias (EC), número de moluscos não eliminando cercárias (NEC) e taxa de infecção (TxI) em sucessivas semanas de observação

| Sem. | Melânicos |     |       | Albinos |     |       |
|------|-----------|-----|-------|---------|-----|-------|
|      | EC        | NEC | TxI   | EC      | NEC | TxI   |
| 1    | 0         | 45  | 0,00  | 0       | 50  | 0,00  |
| 2    | 0         | 45  | 0,00  | 0       | 50  | 0,00  |
| 3    | 0         | 40  | 0,00  | 0       | 50  | 0,00  |
| 4    | 18        | 7   | 72,00 | 0       | 40  | 0,00  |
| 5    | 18        | 7   | 72,00 | 12      | 15  | 44,44 |
| 6    | 18        | 7   | 72,00 | 12      | 15  | 44,44 |
| 7    | 9         | 6   | 60,00 | 7       | 15  | 31,82 |
| 8    | 9         | 6   | 60,00 | 7       | 14  | 33,33 |
| 9    | 6         | 6   | 50,00 | 3       | 17  | 15,00 |
| 10   | 5         | 5   | 50,00 | 1       | 17  | 5,56  |
| 11   | 4         | 5   | 44,44 | 0       | 16  | 0,00  |
| 12   | 4         | 5   | 44,44 | 0       | 16  | 0,00  |
| 13   | 4         | 5   | 44,44 | 0       | 14  | 0,00  |

Figura 1:  
**Moluscos eliminando cercarias**

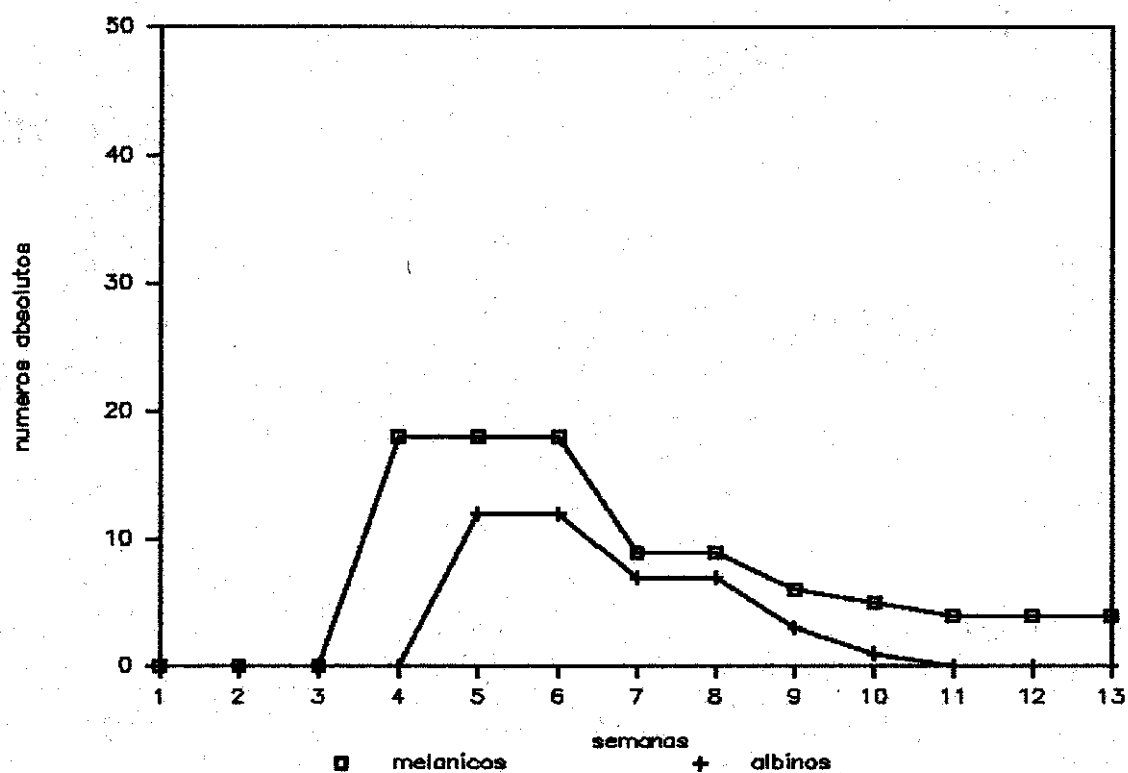


Figura 2:  
**Moluscos não eliminado cercarias**

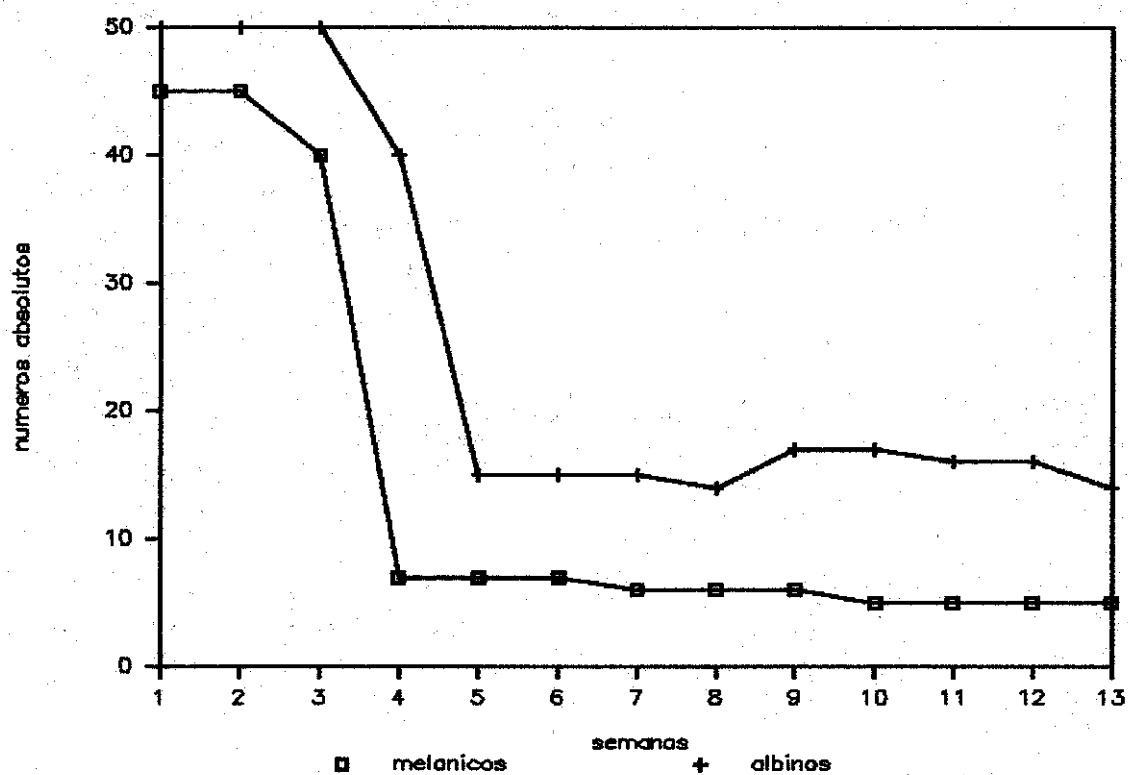
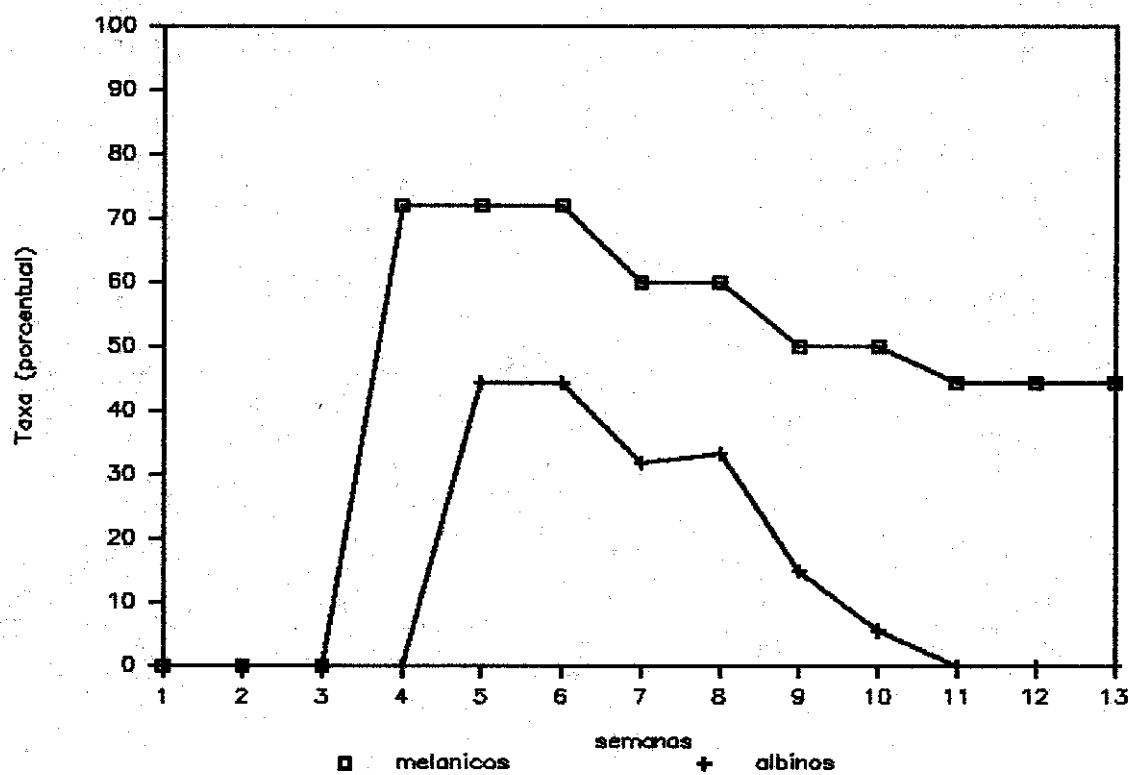


Figura 3:  
**Taxa de moluscos infectados**



A mortalidade dos moluscos expostos ao S. mansonii pode ser observada na Figura 4 e na tabela 3 que mostram, já na primeira semana após a exposição aos miracídios, mortalidade de 10% entre os moluscos melânicos. Nos moluscos albinos as primeiras mortes foram observadas na 4ª semana após a exposição, sendo a taxa de 20%. O número de moluscos mortos para a variante melânica aumentou até a 4ª semana (50%), observando-se um período de estabilização até a 6ª semana (Figura 4 e Tabela 3). Para os albinos esta estabilização aconteceu por um período mais curto e posterior, entre a 5ª e 6ª semanas. A taxa de mortalidade das duas variantes foi semelhante (50% e 46%) no período compreendido entre a 5ª e 6ª semanas, após o qual a taxa de mortalidade dos moluscos melânicos aumentou. No final do período de observação maior número de moluscos melânicos do que albinos haviam morrido, (Figura 4 e Tabela 3).

Os moluscos do grupo controle da variante melânica começaram a morrer já na primeira semana de observação, enquanto nos albinos o início da morte ocorreu a partir da quarta semana (Figura 5). A taxa de mortalidade dos moluscos melânicos ficou estável (10%) da 3ª à 6ª semana, enquanto a dos albinos assim permaneceu por um período mais prolongado (da 5ª à 9ª semana). Durante todo o período de observação o número de moluscos mortos da variante melânica foi maior do que na variante albina (Figura 5 e Tabela 3 e 4). A mortalidade aumentou de 14% na 8ª semana para 46% na 13ª

semana para a variante melânica, enquanto para a variante albina a mortalidade variou de 10% na 9ª semana para 28% na 13ª semana (Figura 5 e Tabela 4).

Comparando-se a mortalidade nos grupos dos infectados e não infectados observou-se resultados semelhantes. Esta semelhança pode ser verificada no período entre as semanas 5 e 6, quando em ambos os casos verificamos valores iguais entre as taxas de mortalidade dos grupos albino e melânico, com valores muito inferiores no grupo dos moluscos controles (Figuras 5, 6 e 7). A mortalidade mais acentuada foi observada após a 3ª semana para os moluscos infectados da variante melânica, estabilizando-se a partir da 4ª semana. A taxa de mortalidade dos moluscos controles, após um período intermediário de relativa estabilidade, aumentou no período final, após a 9ª semana para as variantes albina e melânica, sendo que a mortalidade tanto dos infectados como dos controles foi mais alta para a variante melânica (Figura 6).

Tabela 3. Mortalidade (em números absolutos e percentuais) em B. glabrata variantes melânica e albina, infectadas por S. mansoni.

| Sem. | Melânicos |      | Albinos |      |
|------|-----------|------|---------|------|
|      | Núm.      | %    | Núm.    | %    |
| 1    | 5         | 10,0 | 0       | 0,0  |
| 2    | 5         | 10,0 | 0       | 0,0  |
| 3    | 10        | 20,0 | 0       | 0,0  |
| 4    | 25        | 50,0 | 10      | 20,0 |
| 5    | 25        | 50,0 | 23      | 46,0 |
| 6    | 25        | 50,0 | 23      | 46,0 |
| 7    | 35        | 70,0 | 28      | 56,0 |
| 8    | 35        | 70,0 | 29      | 58,0 |
| 9    | 38        | 76,0 | 30      | 60,0 |
| 10   | 40        | 80,0 | 32      | 64,0 |
| 11   | 41        | 82,0 | 34      | 68,0 |
| 12   | 41        | 82,0 | 34      | 68,0 |
| 13   | 41        | 82,0 | 36      | 72,0 |

Tabela 4. Mortalidade (em números absolutos e percentuais) em B. glabrata variantes melânica e albina - moluscos controles

| Sem. | Melânicos |      | Albinos |      |
|------|-----------|------|---------|------|
|      | Núm.      | %    | Núm.    | %    |
| 1    | 1         | 2,0  | 0       | 0,0  |
| 2    | 2         | 4,0  | 0       | 0,0  |
| 3    | 5         | 10,0 | 0       | 0,0  |
| 4    | 5         | 10,0 | 3       | 6,0  |
| 5    | 5         | 10,0 | 5       | 10,0 |
| 6    | 5         | 10,0 | 5       | 10,0 |
| 7    | 7         | 14,0 | 5       | 10,0 |
| 8    | 7         | 14,0 | 5       | 10,0 |
| 9    | 16        | 32,0 | 5       | 10,0 |
| 10   | 20        | 40,0 | 8       | 16,0 |
| 11   | 22        | 44,0 | 8       | 16,0 |
| 12   | 23        | 46,0 | 14      | 28,0 |
| 13   | 23        | 46,0 | 14      | 28,0 |

Figura 4

**Mortalidade dos moluscos infectados**

em 50 moluscos

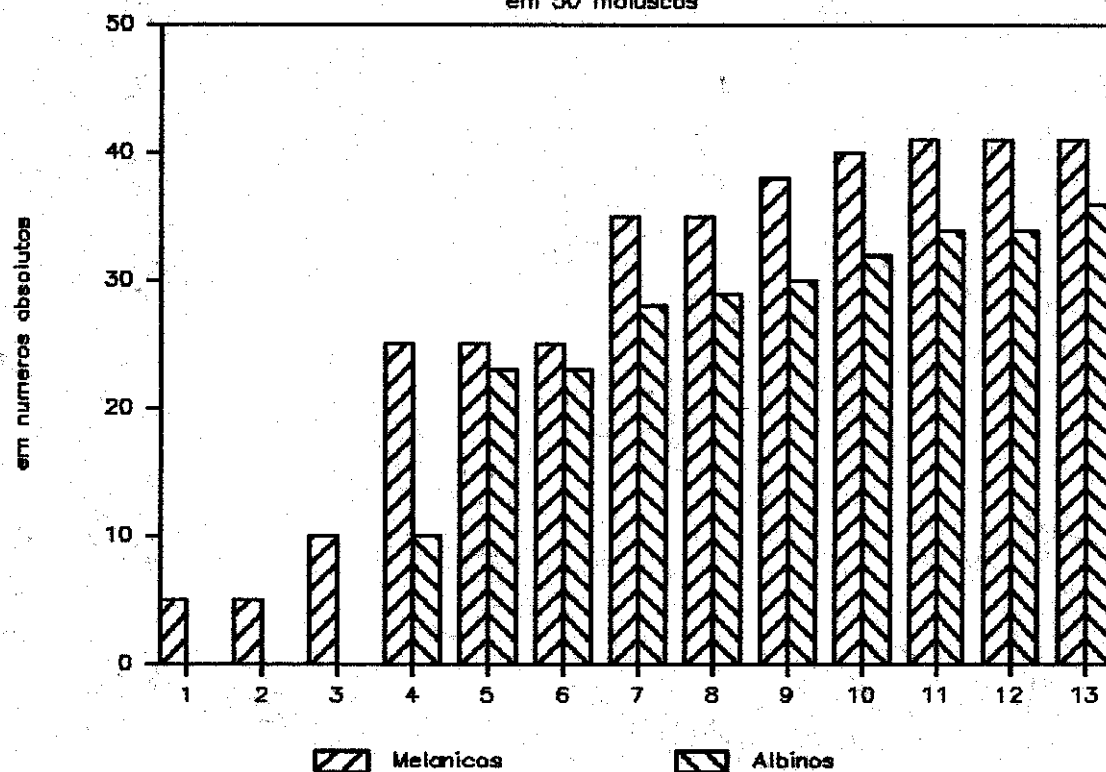


Figura 5

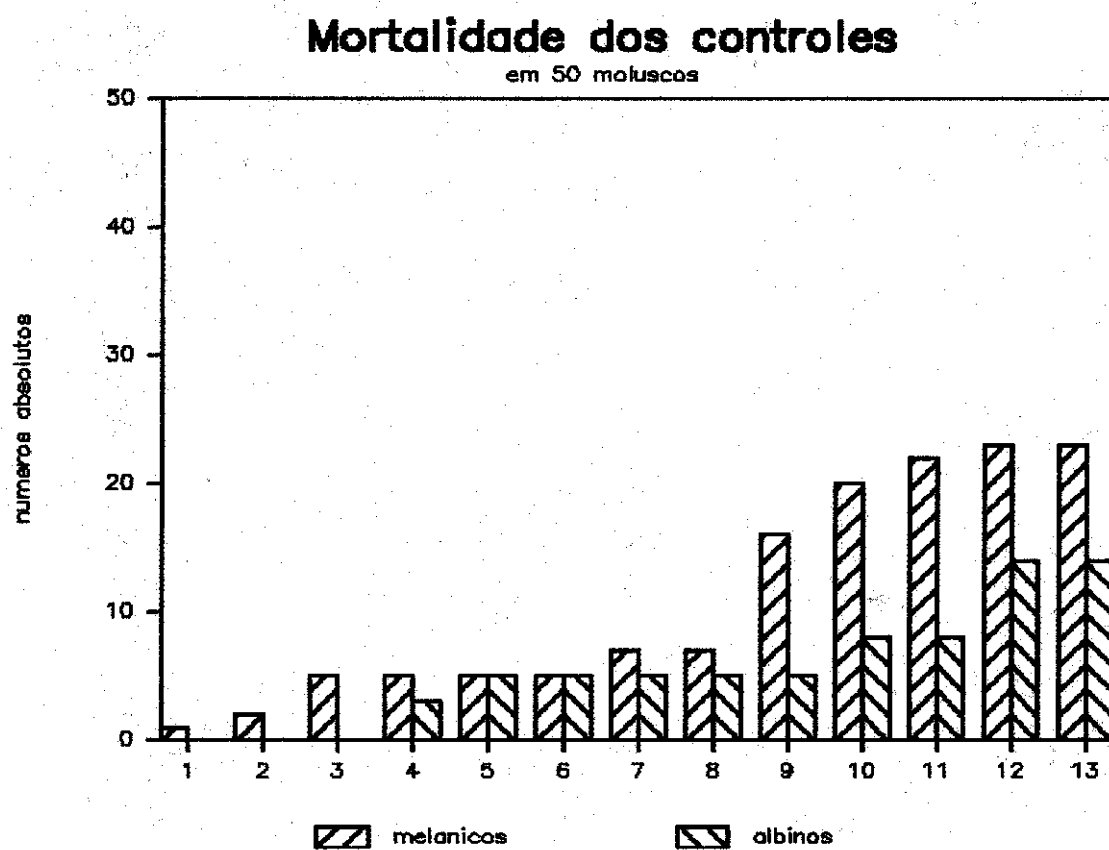


Figura 6

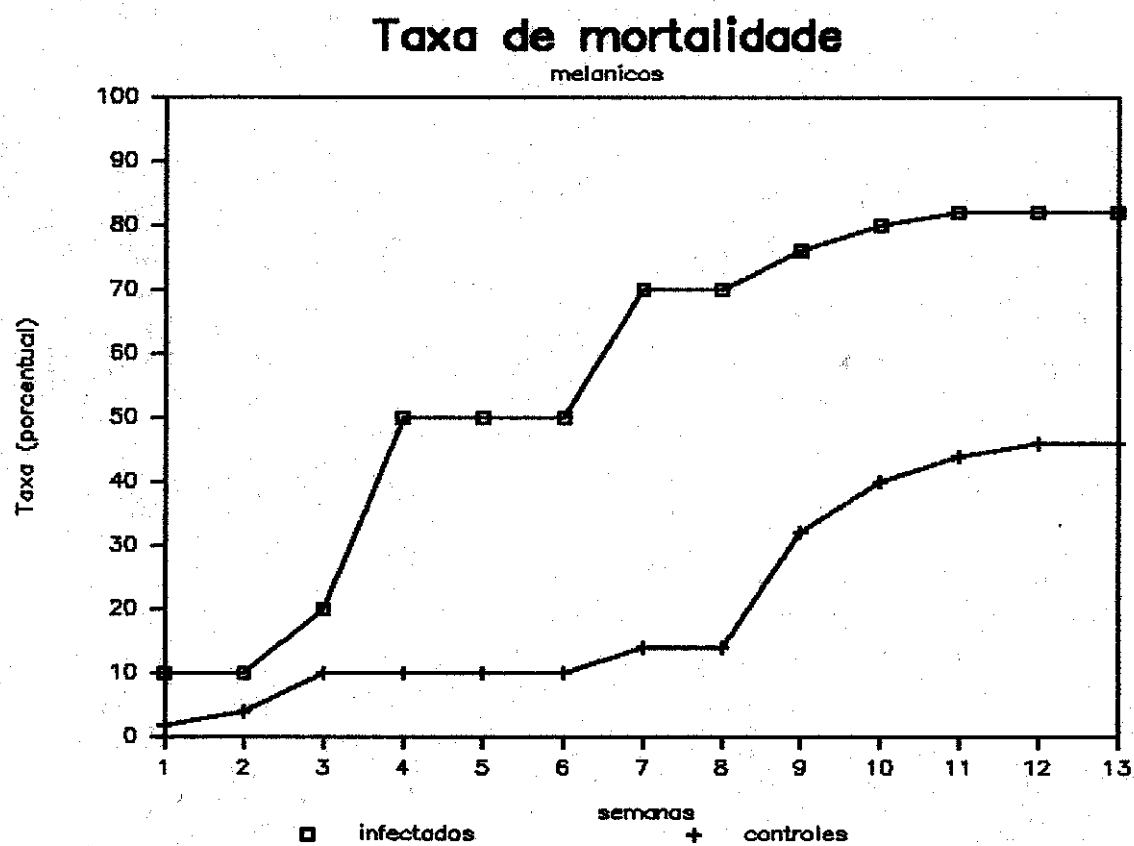
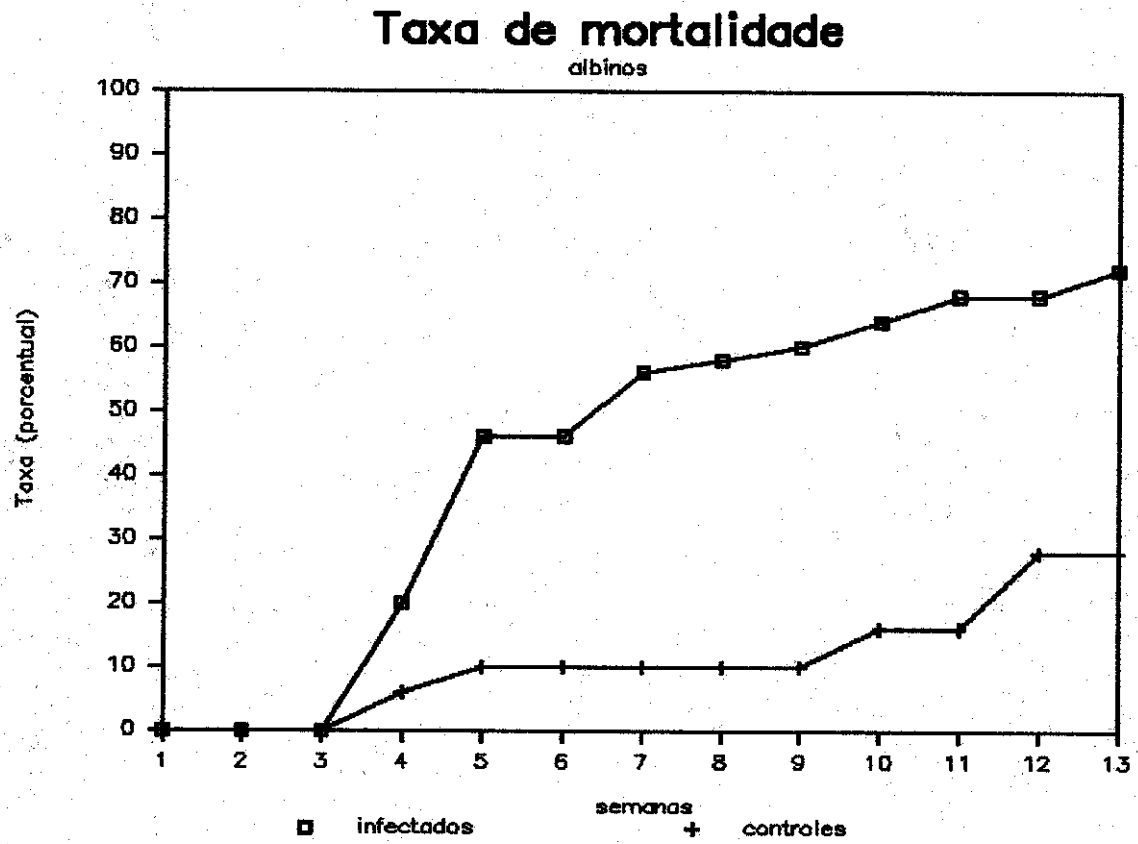


Figura 7:



### 3.2) Avaliação do número de amebócitos na hemolinfa de moluscos Biomphalaria glabrata, variantes albina e melânica.

As figuras 8 e 9 e as tabelas 5 e 6 mostram a variação do número de amebócitos circulantes nas duas variantes em diferentes tempos de infecção, que vão de 30 minutos após a infecção até 72 horas.

Tabela 5 - Número médio de amebócitos estrelados em Biomphalaria glabrata variantes albina e melânica infectadas por Schistosoma mansoni.

| Tempo de<br>infecção | Valor médio ** |      | Variância |       | Desvio-padrão |      |
|----------------------|----------------|------|-----------|-------|---------------|------|
|                      | Alb.           | Mel. | Alb.      | Mel.  | Alb.          | Mel. |
| Controle †           | 3,0            | 2,6  | 6,57      | 4,24  | 2,56          | 2,06 |
| 30 minutos           | 1,4            | 2,1  | 3,96      | 2,41  | 1,99          | 1,55 |
| 1 hora               | 1,7            | 0,3  | 3,92      | 0,20  | 1,98          | 0,45 |
| 2 horas              | 2,7            | 3,4  | 4,78      | 5,67  | 2,19          | 2,38 |
| 4 horas              | 5,1            | 2,7  | 7,84      | 5,35  | 2,80          | 2,31 |
| 6 horas              | 3,6            | 1,6  | 7,96      | 1,96  | 2,82          | 1,40 |
| 8 horas              | 3,6            | 3,7  | 6,53      | 1,92  | 2,56          | 1,39 |
| 10 horas             | 5,0            | 1,0  | 2,00      | 1,14  | 1,41          | 1,07 |
| 12 horas             | 7,9            | 2,6  | 36,41     | 3,10  | 6,03          | 1,76 |
| 24 horas             | 3,6            | 4,3  | 4,24      | 13,63 | 2,06          | 3,69 |
| 48 horas             | 1,6            | 1,6  | 2,53      | 0,82  | 1,59          | 0,90 |
| 72 horas             | 4,0            | 1,4  | 4,86      | 1,67  | 2,20          | 1,29 |

Alb - variante albina

Mel - variante melânica

† Controle no gráfico é considerado como hora 0 de infecção.

\*\* Para cada horário foram contados amebócitos em hemolinfa de 7 caramujos.

Tabela 6 - Número médio de amebócitos não estrelados circulantes na hemolinfa de Biomphalaria glabrata variantes albina e melânica expostos ao Schistosoma mansoni.

| Tempo de<br>infecção | Valor médio |      | Variância |        | Desvio-padrão |       |
|----------------------|-------------|------|-----------|--------|---------------|-------|
|                      | Alb.        | Mel. | Alb.      | Mel.   | Alb.          | Mel.  |
| Controle             | 12,7        | 4,3  | 236,49    | 29,06  | 15,38         | 5,39  |
| 30 minutos           | 5,4         | 2,1  | 29,39     | 2,98   | 5,42          | 1,73  |
| 1 hora               | 9,4         | 5,3  | 24,24     | 11,35  | 4,92          | 3,37  |
| 2 horas              | 3,7         | 11,4 | 5,63      | 72,25  | 2,37          | 8,50  |
| 4 horas              | 16,1        | 6,4  | 198,12    | 13,39  | 14,08         | 3,66  |
| 6 horas              | 6,9         | 10,3 | 70,98     | 98,20  | 8,42          | 9,91  |
| 8 horas              | 11,0        | 16,0 | 28,00     | 83,43  | 5,29          | 9,13  |
| 10 horas             | 12,4        | 11,0 | 20,82     | 42,57  | 4,56          | 6,52  |
| 12 horas             | 20,1        | 21,9 | 126,70    | 273,27 | 11,26         | 16,53 |
| 24 horas             | 14,4        | 11,7 | 35,96     | 50,49  | 6,00          | 7,11  |
| 48 horas             | 9,0         | 10,4 | 45,43     | 89,96  | 6,74          | 9,48  |
| 72 horas             | 16,0        | 3,6  | 132,86    | 5,39   | 11,53         | 2,32  |

Alb - variante albina

Mel - variante melânica

\* Controle no gráfico é considerado como hora 0 de infecção

\*\* Para cada horário foram contados amebócitos em hemolinfa de 7 caramujos.

As células contadas foram classificadas como amebócitos estrelados (figura 14) e não estrelados (figura 15).

Os gráficos mostram que nas duas variantes houve uma pequena redução no número de amebócitos circulantes de ambos os tipos, após 30 minutos de infecção (Figuras 8 e 9). Após 1 hora do período de exposição houve redução do número de amebócitos estrelados na hemolinfa circulante, sendo maior para os moluscos melânicos do que para os albinos. A partir da segunda hora após a infecção houve um aumento gradual dos amebócitos não estrelados na variante melânica e o número de amebócitos estrelados começou a apresentar uma tendência de aumento. Na variante albina observou-se uma diminuição dos amebócitos não estrelados e os estrelados apresentaram uma tendência de aumento. Depois de 4 horas de infecção houve o primeiro pico de células estreladas na variante albina, tanto dos amebócitos estrelados como dos não estrelados, não sendo considerado significativo (ver Anexo). Na variante melânica houve uma diminuição tanto dos amebócitos estrelados como dos não estrelados (Figuras 8 e 9 e Tabelas 5 e 6). Nos intervalos seguintes, até as 8 horas de infecção, houve pouca oscilação das células nas duas variantes, havendo um pequeno aumento de células estreladas e não estreladas na variante melânica. Este aumento não foi considerado estatisticamente significativo (Anexo e Tabelas 5 e 6). Na oitava hora pós infecção houve um aumento gradual dos amebócitos estrelados e não estrelados nas variantes

albina e melânica. Após este pico verificou-se uma diminuição dos amebócitos estrelados na variante melânica, enquanto na variante albina continuou a aumentar o número destas células. As 12 horas de infecção observou-se maior elevação do número de células estreladas na variante albina, resultado considerado significativamente diferente (Anexo), enquanto na melânica este aumento foi mais gradual. O maior número de células estreladas na variante melânica aconteceu às 24 horas após a infecção, não ultrapassando entretanto o valor observado às 12 horas na variante albina (Figura 8).

Observamos portanto que houve um aumento dos amebócitos estrelados nas primeiras horas de infecção na variante albina, com o pico máximo 12 horas após o período de infecção e com tendência de redução até 48 horas com novo acréscimo às 72 horas. No caso da variante melânica verificou-se que a tendência de aumento começou também nas primeiras horas e a redução iniciou-se às 48 horas.

Figura 8:

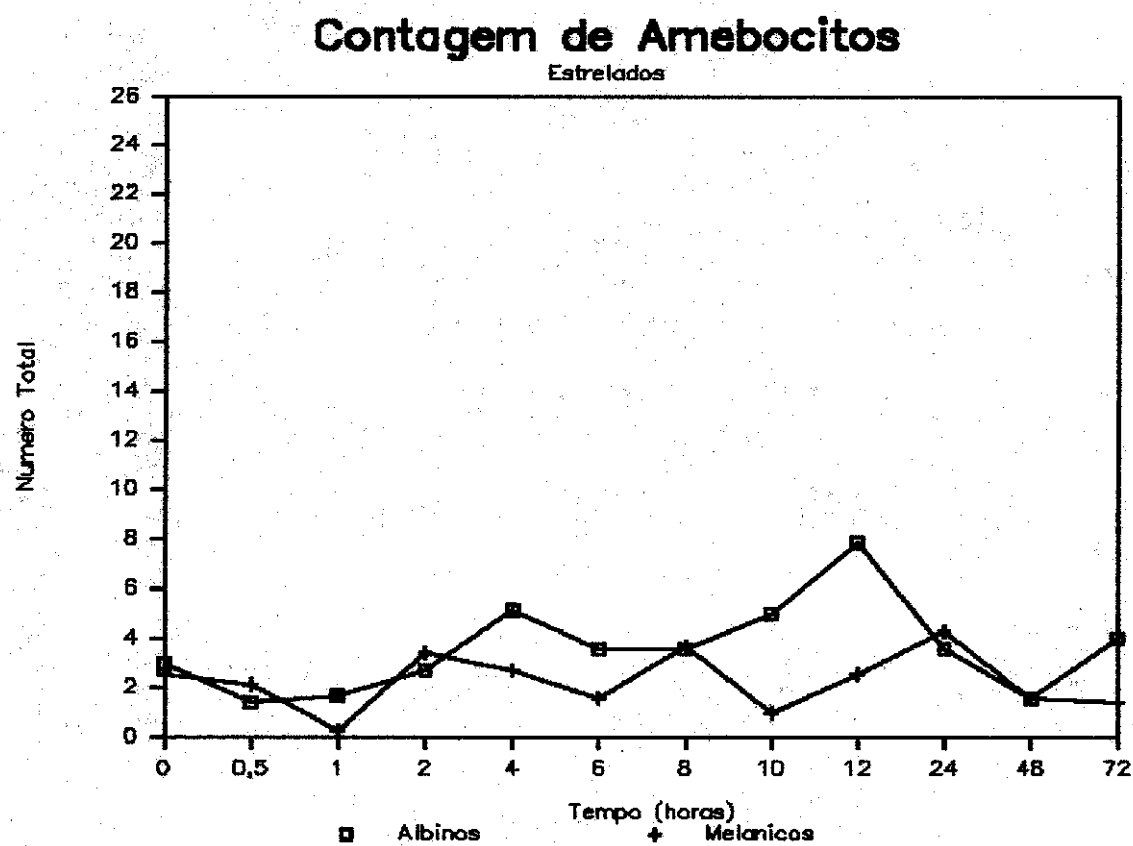
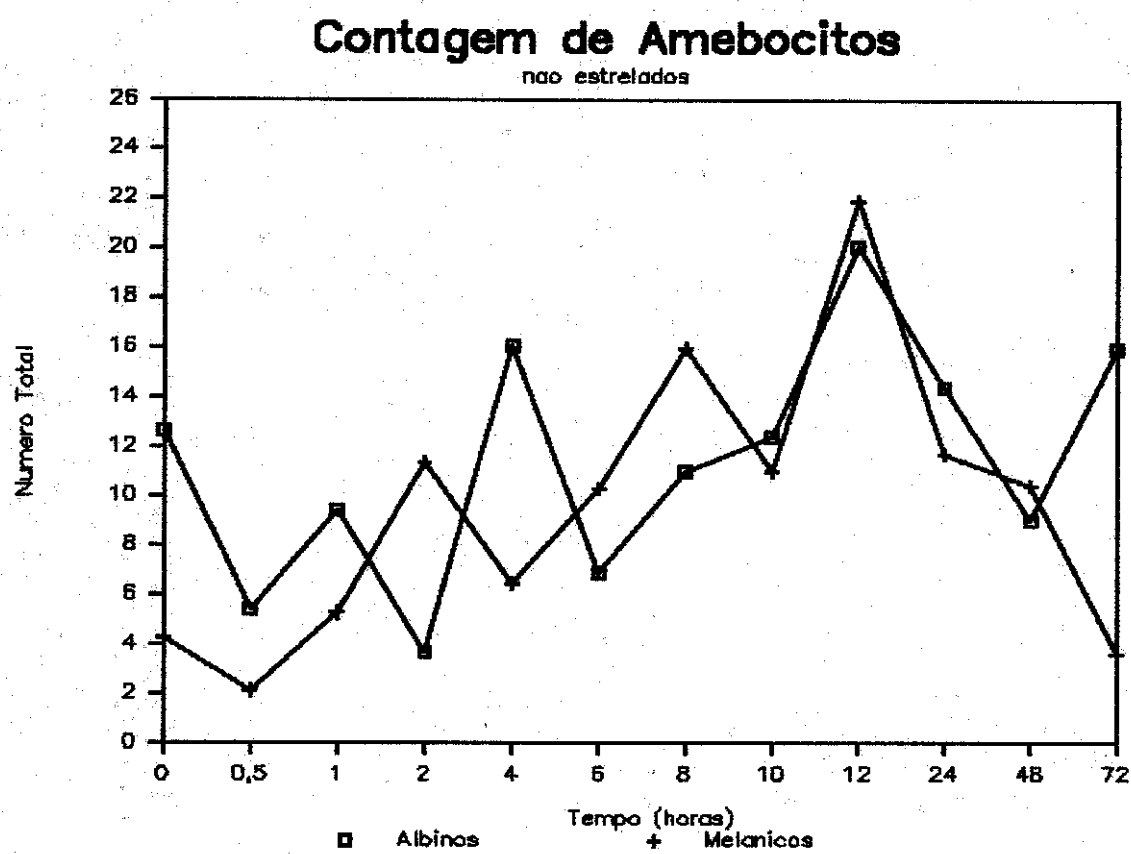


Figura 9:



### 3.3) Cortes Histológicos:

Os cortes histológicos foram feitos com o objetivo de se avaliar a viabilidade das larvas de S. mansoni presentes nos moluscos expostos ao trematódeo (Figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19) e de relacionar o número de amebócitos circulantes com as reações verificadas nos tecidos, em torno da larva do parasita (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Tabela 7 - Número médio (em 3 caramujos) de larvas de Schistosoma mansoni observado em Biomphalaria glabrata, variante albina, exposta a 100 miracídios

| ! Tempo de<br>! infecção | ! Números absolutos |      |      | ! Números relativos % |      |      | ! Variância |       |       | ! Desvio-padrão |      |      |
|--------------------------|---------------------|------|------|-----------------------|------|------|-------------|-------|-------|-----------------|------|------|
|                          | Tot.                | Int. | Deg. | Tot.                  | Int. | Deg. | Tot.        | Int.  | Deg.  | Tot.            | Int. | Deg. |
| ! 30 minutos             | ! 162               | 82   | 80   | ! 54,0                | 50,6 | 49,4 | ! 0,67      | 4,22  | 2,89  | ! 0,82          | 2,05 | 1,70 |
| ! 2 horas                | ! 95                | 52   | 43   | ! 31,7                | 54,7 | 45,3 | ! 6,89      | 29,56 | 10,89 | ! 2,62          | 5,44 | 3,30 |
| ! 24 horas               | ! 68                | 37   | 31   | ! 22,7                | 54,4 | 45,6 | ! 134,22    | 17,56 | 54,89 | ! 11,59         | 4,19 | 7,41 |
| ! 48 horas               | ! 49                | 30   | 19   | ! 16,3                | 61,2 | 38,8 | ! 30,89     | 2,00  | 17,56 | ! 5,56          | 1,41 | 4,19 |
| ! 72 horas               | ! 73                | 17   | 56   | ! 24,3                | 23,3 | 76,7 | ! 33,56     | 6,22  | 10,89 | ! 5,79          | 2,49 | 3,30 |

Tot. Número total de esporocistos nos tecidos de 3 caramujos (íntegros e degenerados).

Int. Número de total de esporocistos íntegros nos tecidos de 3 caramujos.

Deg. Número de total de esporocistos degenerados de 3 caramujos.

Tabela 8 - Número médio (em 3 caramujos) de larvas de Schistosoma mansoni observado em Biomphalaria glabrata, variante melânica, exposta a 100 miracídeos

| ! Tempo de<br>! infecção | ! Números absolutos |        |        | ! Números relativos % |        |        | ! Variância |         |         | ! Desvio-padrão |        |        |
|--------------------------|---------------------|--------|--------|-----------------------|--------|--------|-------------|---------|---------|-----------------|--------|--------|
|                          | ! Tot.              | ! Inf. | ! Deg. | ! Tot.                | ! Int. | ! Deg. | ! Tot.      | ! Int.  | ! Deg.  | ! Tot.          | ! Int. | ! Deg. |
| ! 30 minutos             | ! 228               | ! 126  | ! 102  | ! 76,0                | ! 55,3 | ! 44,7 | ! 144,67    | ! 92,67 | ! 18,67 | ! 12,03         | ! 9,63 | ! 4,32 |
| ! 2 horas                | ! 146               | ! 63   | ! 83   | ! 48,7                | ! 43,2 | ! 56,8 | ! 24,22     | ! 42,00 | ! 4,22  | ! 4,92          | ! 6,48 | ! 2,05 |
| ! 24 horas               | ! 154               | ! 94   | ! 60   | ! 51,3                | ! 61,0 | ! 39,0 | ! 96,89     | ! 11,56 | ! 42,67 | ! 9,84          | ! 3,40 | ! 6,53 |
| ! 48 horas               | ! 156               | ! 83   | ! 73   | ! 52,0                | ! 53,2 | ! 46,8 | ! 144,67    | ! 30,89 | ! 44,22 | ! 12,03         | ! 5,56 | ! 6,65 |
| ! 72 horas               | ! 120               | ! 73   | ! 47   | ! 40,0                | ! 60,8 | ! 39,2 | ! 82,67     | ! 57,56 | ! 24,22 | ! 9,09          | ! 7,59 | ! 4,92 |

Tot. Número total de esporocistos nos tecidos de 3 caramujos (íntegros e degenerados).

Int. Número total de esporocistos íntegros nos tecidos de 3 caramujos.

Deg. Número total de esporocistos degenerados de 3 caramujos.

Nas duas variantes observamos discreta reação em torno da larva de Schistosoma mansoni, parecendo que a variante albina apresentou mais esporocistos degenerados 72 horas após a infecção, tendo sido fracas as reações observadas nos horários restantes (Figuras 10 e 13).

Desde as primeiras horas de infecção (Figuras 10, 11, 13 e Tabelas 7 e 8) verificou-se esporocistos degenerados nas duas variantes com discreta reação amebocitária ao seu redor. As 24 horas após a infecção observou-se maior número de esporocistos degenerados na variante albina do que na variante melânica, respectivamente 45% e 39% (Figura 13). Esta diferença foi considerada não significativa. Após 48 horas de infecção as proporções se alteraram, sendo na variante melânica o percentual de esporocistos degenerados

encontrados de 46% e na variante albina 38% (Figuras 10, 11 e 13). O período de 48 horas foi aquele em que se pôde observar menor percentual de esporocistos degenerados na variante albina. Neste mesmo período houve uma diminuição de células estreladas na hemolinfa. A maior diferença entre o percentual de esporocistos degenerados nos tecidos foi observado às 72 horas (Figura 19). Na variante albina foram encontrados 76% dos esporocistos degenerados, enquanto na variante melânica foram encontrados 36% (Figura 13). A proporção de esporocistos íntegros encontrados nos diferentes períodos observados foi maior para a variante melânica (Figuras 11 e 12).

Figura 10:  
**Esporocistos íntegros e degenerados**  
3 moluscos albinos

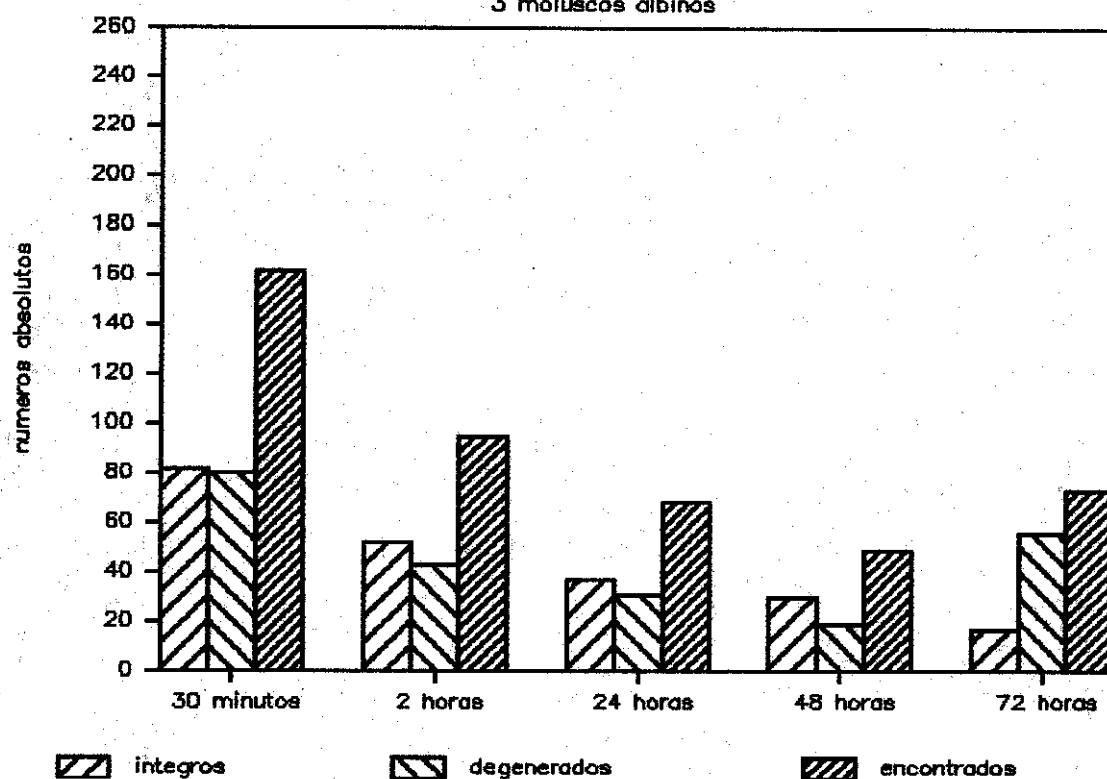


Figura 11:  
**Esporocistos íntegros e degenerados**  
3 moluscos melánicos

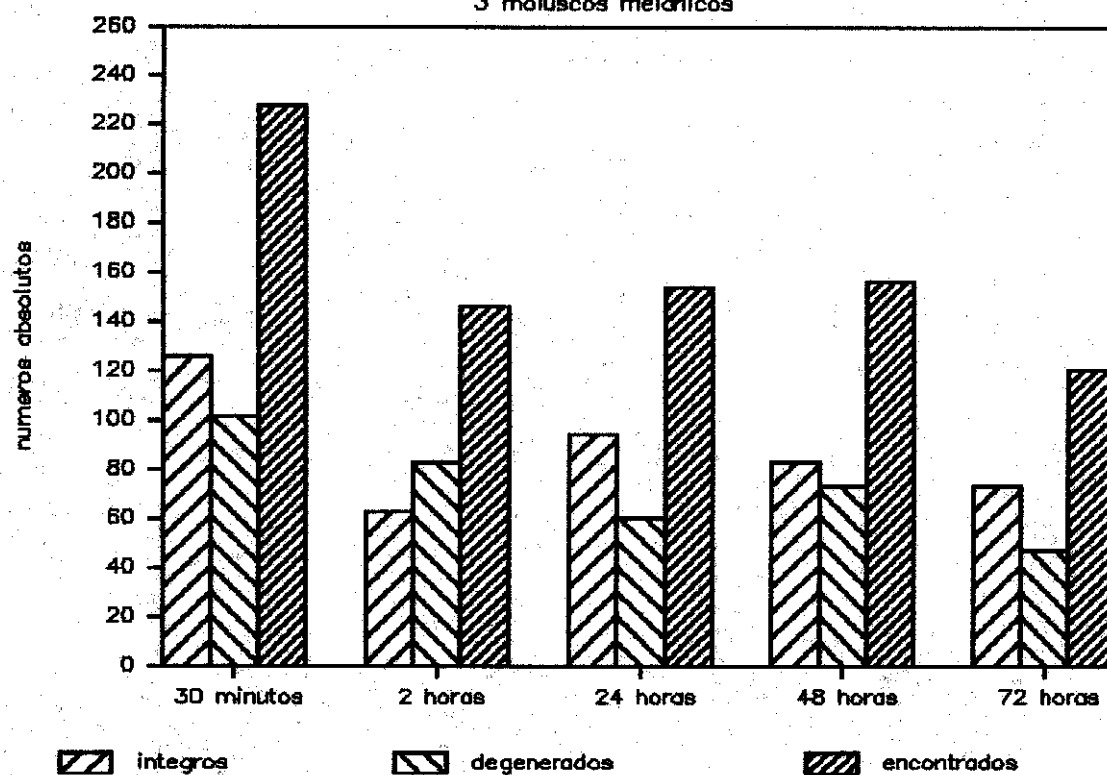


Figura 12:  
**Esporocistos integros**

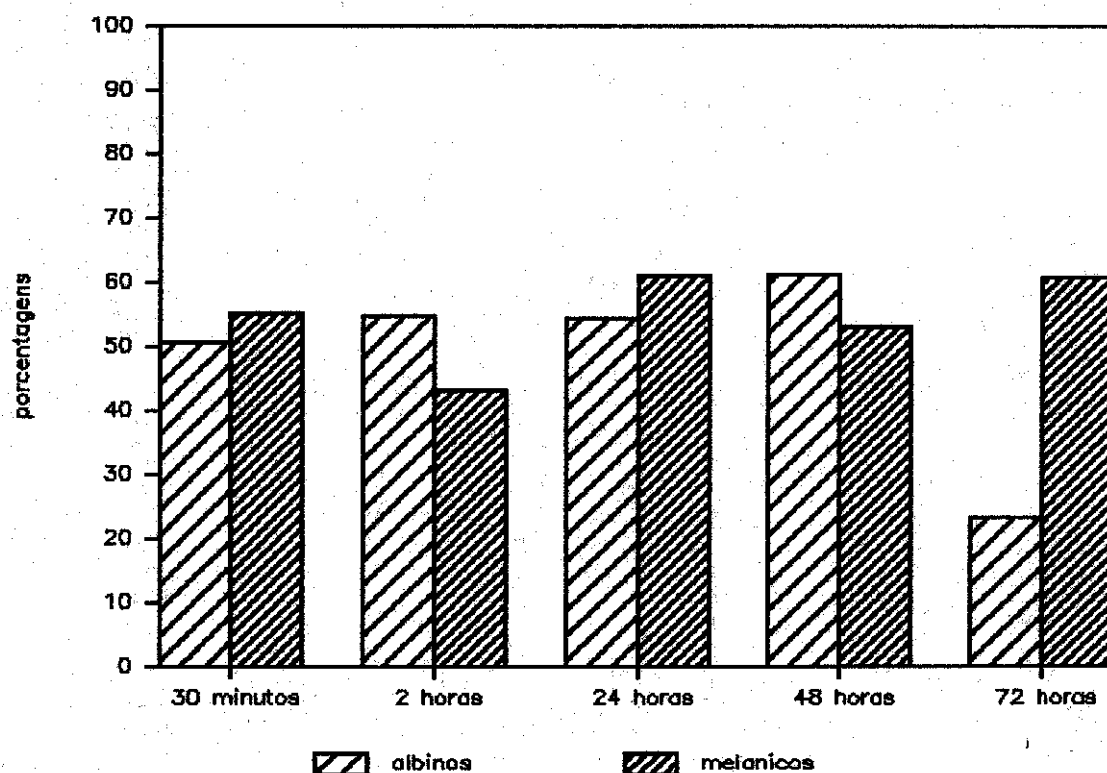


Figura 13:  
**Esporocistos degenerados**

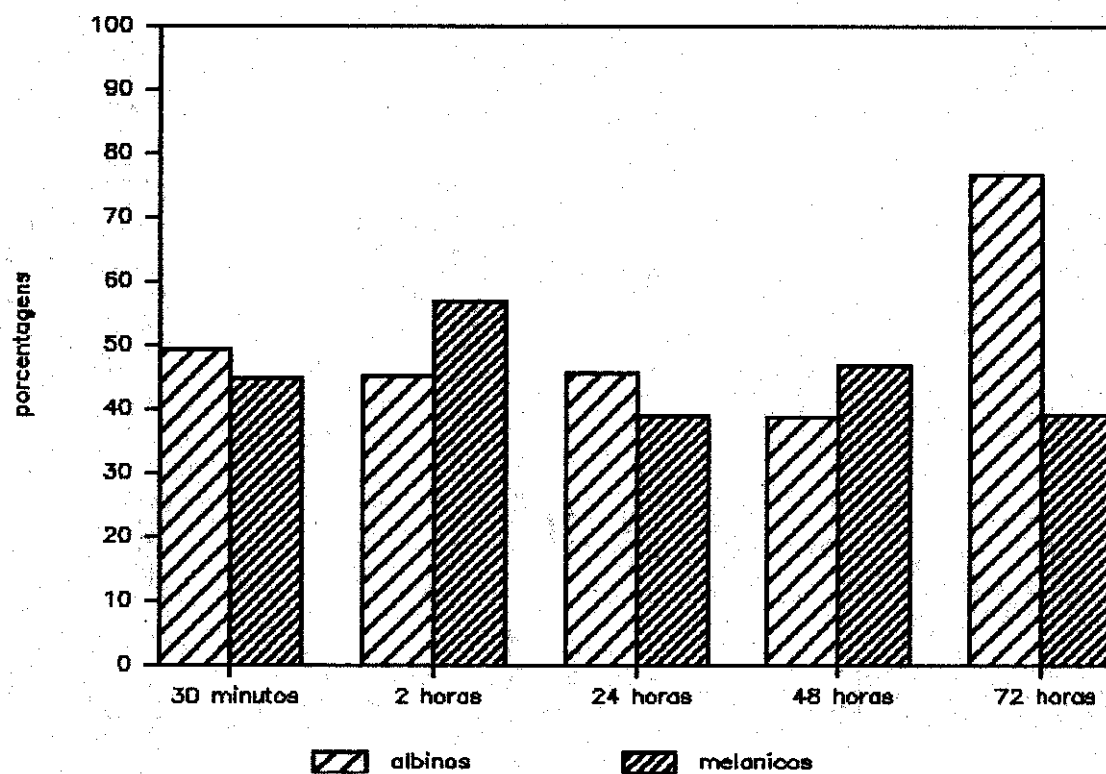


Figura 14. Fotomicrografia de amebócitos de bionfalária livres de infecção.

Amebócitos estrelados (granulócitos)

material observado a fresco em microscópio de contraste e fase.

Ausência de coloração vital, X 200.

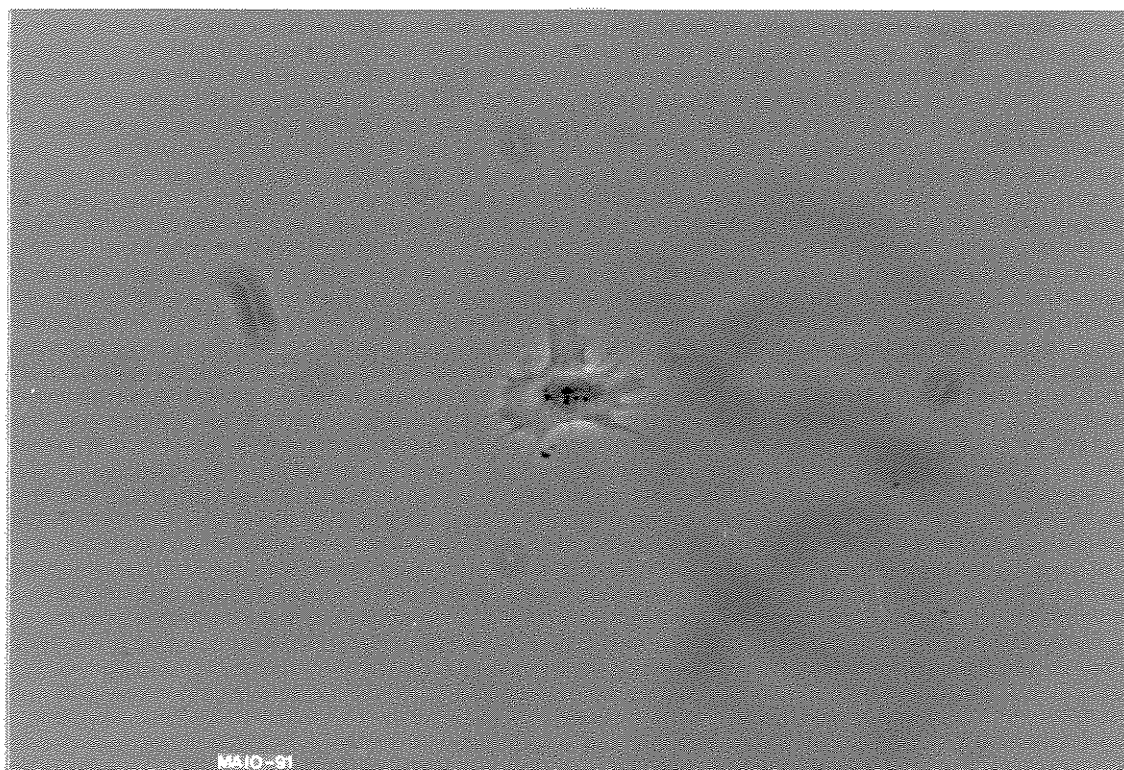


Figura 15. Fotomicrografia de amebócitos de bionfalárias livres de infecção.

Amebócitos não estrelados (hialinócitos)

material observado a fresco em microscópio de contraste e fase.

Ausência de coloração vital, X 250.

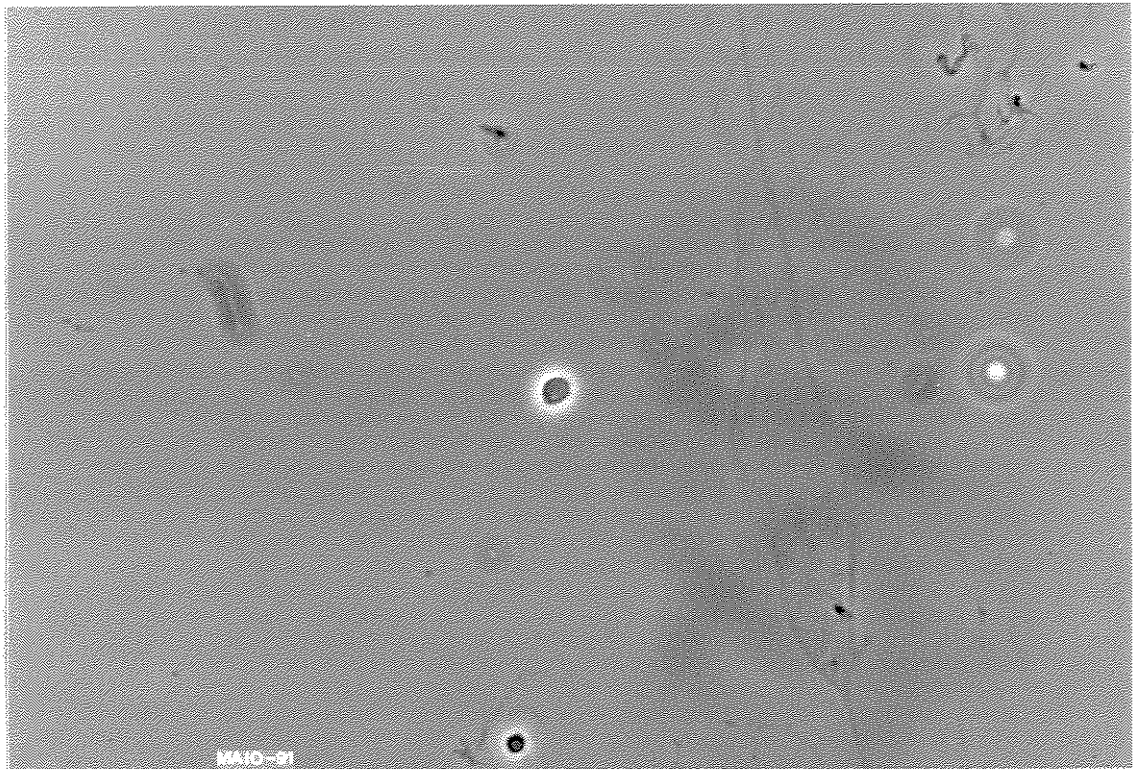


Figura 16. Corte histológico da região céfalo-podal de Biomphalaria glabrata variante albina após 30 minutos de infecção por miracídio de Schistosoma mansoni. Observa-se discreta reação amebocitária em torno da larva.

Coloração usada Tricrômico: de Gomori, X 250.

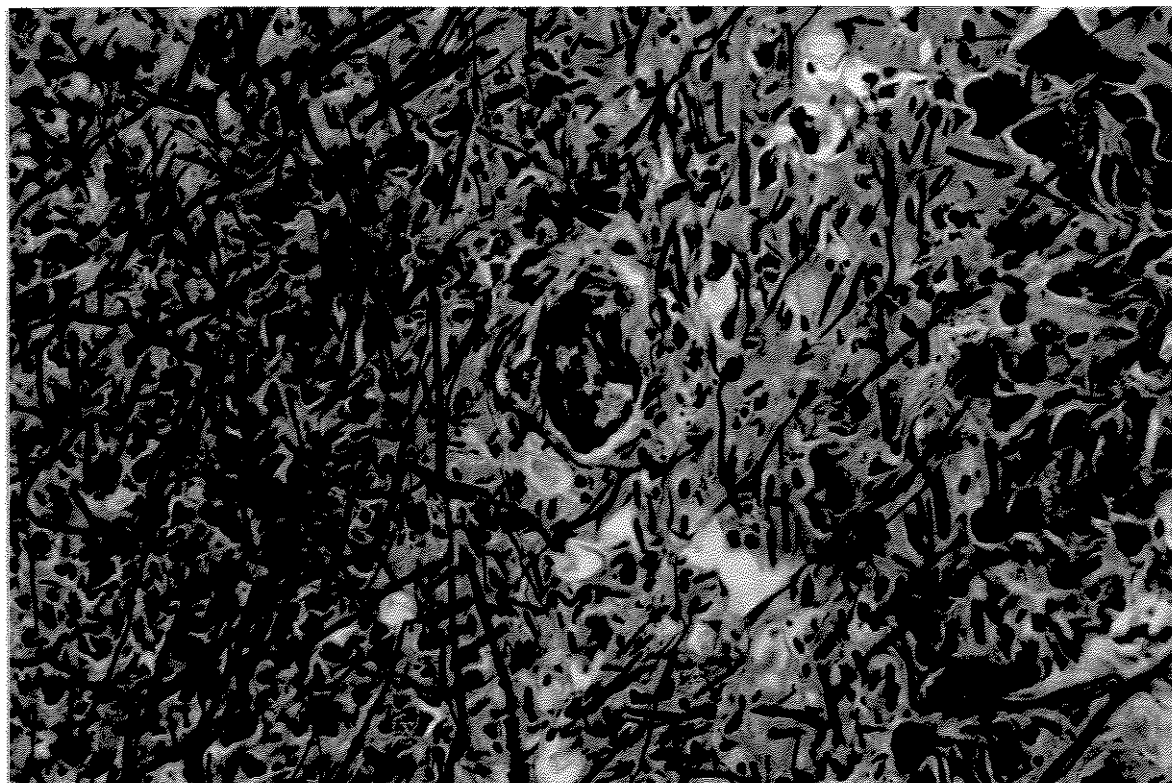


Figura 17. Corte histológico da região céfalo-podal de Biomphalaria glabrata após 2 horas de infecção por Schistosoma mansoni. Observa-se reação amebocitária em torno da larva.

Coloração usada: Tricrômico de Gomori, X 340.

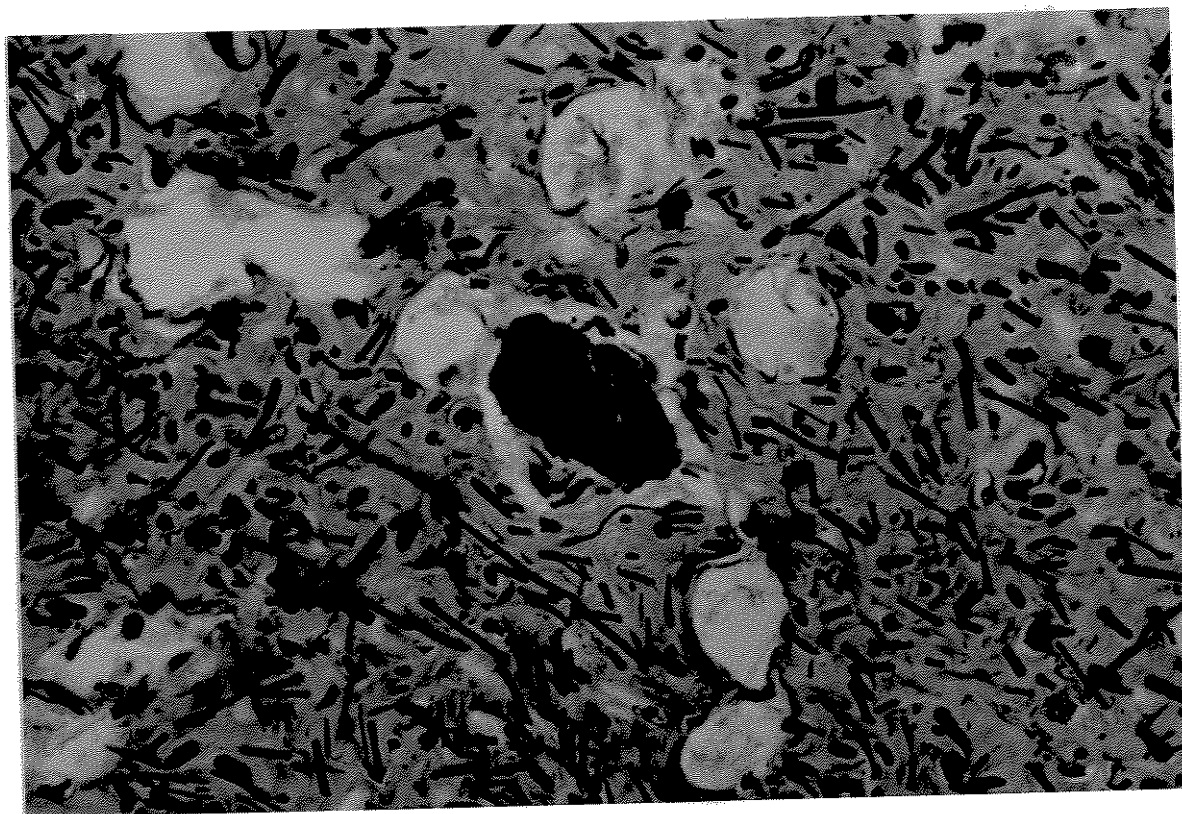


Figura 18. Corte histológico da região céfalo-podal de Biomphalaria glabrata variantes melânica após 24 horas de infecção por Schistosoma mansoni.

Larva integra com discreta reação amebocitária ao redor.

Coloração usada: tricrômico de Gomori, X 250.

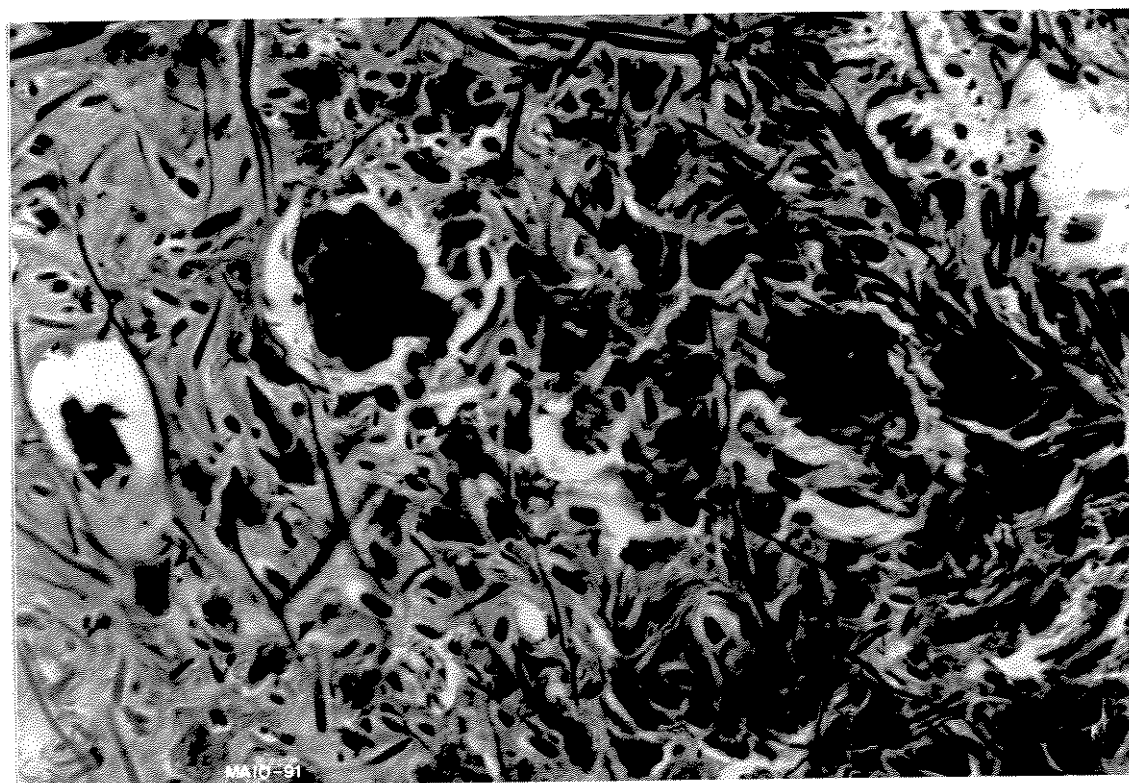
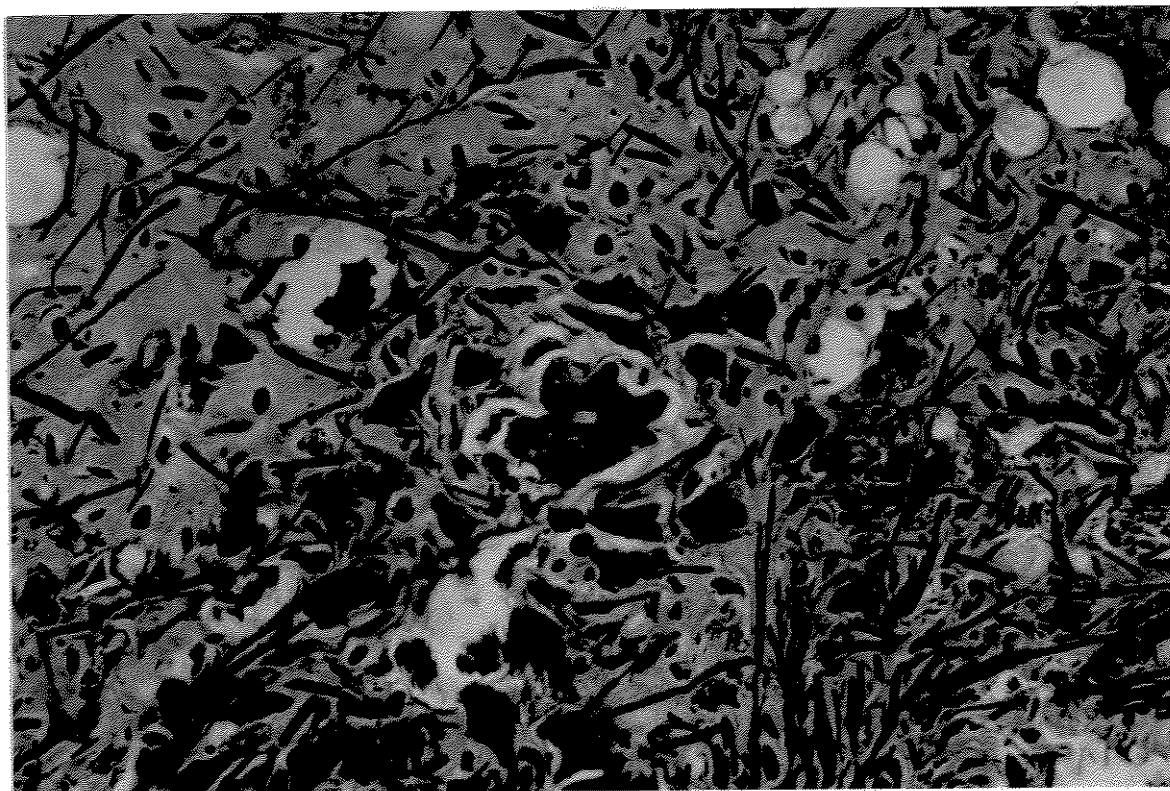


Figura 19. Corte histológico da região céfalo-podal de *Biomphalaria glabrata* albina após 72 horas de infecção por *Schistosoma mansoni*.

Larva degenerada com reação amebocitária ao redor.

Coloração usada: tricrômico de Gomori, X 250



#### 4) DISCUSSÃO

As taxas de susceptibilidade e mortalidade da variante melânica apresentou-se mais elevada que as da variante albina em todo o período observado. A infecção foi mais notável a partir da primeira semana, onde houve um maior número de esporocistos visíveis em relação aos da variante albina. A diferença do número dos esporocistos visíveis macroscopicamente entre as duas variantes não foi considerada estatisticamente significativa, indicou uma tendência de um maior número de moluscos infectados na variante melânica. A tendência verificada na primeira semana de observação foi confirmada no decorrer de todo o experimento.

O período pré-patente foi menor no grupo de moluscos melânicos e alguns exemplares eliminaram cercárias até o final do período de observação. Os moluscos albinos cessaram de eliminar cercárias antes dos melânicos. Esta parada não foi só devida à morte dos moluscos mais sim, provavelmente, à interrupção da infecção. Richards & Merritt (1972) verificaram que a susceptibilidade e a resistência à infecção são características genéticas, herdáveis. Richards (1973), estudando a refratariedade em moluscos adultos que eram susceptíveis quando jovens, verificou através de cruzamentos que a resistência à infecção em adultos era determinada por um único gene dominante. Quanto aos fatores imunológicos, depois de algum tempo de infecção, as células

reconhecem o parasita como estranho. Isto pode ser atribuído a diversos fatores, como perda da capacidade de mimetismo e atenuação dos mecanismos de escape.

A variação da taxa de mortalidade dos moluscos infectados e dos controles nas duas variantes obedeceram ao mesmo ritmo, isto é, quando aumentou a taxa de mortalidade dos moluscos infectados aumentou também a taxa de mortalidade dos moluscos controles. Provavelmente fatores ambientes comuns influenciaram a mortalidade dos moluscos infectados e controles, sendo que a própria manipulação pode ter influenciado na taxa de mortalidade.

As variações dos padrões de pigmentação no manto do molusco são geneticamente determinadas e poderiam influenciar a susceptibilidade ao S. mansoni. Isto poderia levar-nos a pensar que moluscos albinos podem ser mais susceptíveis que os moluscos melânicos. Esta hipótese não foi comprovada por Richards (1969) e Richards e Merritt (1972), que se preocuparam em estudar este aspecto. Foi sugerido por Richards que poderia haver alguma possibilidade de que a pigmentação dos moluscos pudesse ter algum efeito na susceptibilidade e na refratariedade dos moluscos à infecção por Schistosoma mansoni. Richards verificou através de vários cruzamentos entre moluscos refratários e susceptíveis e através de autofecundação, que a susceptibilidade ou refratariedade à infecção decorre de uma grande variabilidade de genes, sendo independentes da pigmentação.

As taxas de susceptibilidade e mortalidade dos moluscos se revelaram diferentes. A mortalidade foi mais alta nos moluscos melânicos, o que era esperado devido a maior percentagem de moluscos infectados, que provoca maiores danos no caramujo. Estes danos poderiam ser consequência da produção de toxinas pelo parasita, de ação mecânica, ação espoliadora.

Houve em ambas variantes de Biomphalaria glabrata (albina e melânica) um maior número de células não estreladas, com relação às estreladas, na hemolinfa. Foi verificado por Sminia (1987), que em moluscos medindo 5 a 7 mm de diâmetro máximo de concha houve um maior número de células não estreladas na hemolinfa. Este resultado vem de encontro aos resultados encontrados por Seta (1990).

Analisando a contagem de células estreladas na hemolinfa dos moluscos, verificamos que, mesmo estando estas células em menor número, em relação às não estreladas, houve uma diferença significativa entre as duas variantes. Isto é, a variante albina apresentou um número maior de células estreladas no decorrer das 72 horas.

Verificamos que houve uma diminuição do número de células da hemolinfa tanto da variante albina como da melânica nas primeiras horas e esta observação foi seguida por um aumento significativo às 12 horas para a variante albina e às 24 horas para a variante melânica. O número máximo de células estreladas observado foi significativamente maior para a variante albina.

Um aumento brusco de células circulantes na hemolinfa nas duas variantes não foi observado no momento inicial (às 2 horas) após a exposição dos moluscos aos miracídios, como havia sido verificado por Stumpf & Gilbertson (1978) e Seta (1990). Registramos uma pequena elevação do número de células circulantes na hemolinfa da variante melânica, mas não foi um aumento considerado significativo em relação aos controles nem em relação ao pico máximo observado às 24 horas. Nossos registros estão em conformidade com os resultados encontrados por Santana (1990), que verificou o pico máximo destas células por volta das 24 horas após a exposição dos moluscos aos miracídios. Estes resultados também estão de acordo com as observações feitas por Matricón-Gondran (1985) que verificou uma intensa atividade mitótica do APD nas primeiras 48 horas após a infecção em Biomphalaria glabrata infectada anteriormente com Echinostoma caproni, sendo que o pico máximo do número de células não aconteceu nos primeiros instantes após a infecção.

O aumento tardio das células estreladas, mostrado na figura 10, que ocorreu às 12 horas na variante albina e às 24 horas na variante melânica, após a exposição dos moluscos aos miracídios, leva-nos a crer que os amebócitos estrelados migraram para os tecidos para tentar combater a infecção e depois voltaram para a hemolinfa circulante após algumas horas. Este aumento observado após 12 horas na variante albina e após 24 horas na variante melânica, poderia ser

devido a três fatores: O primeiro seria a volta dos amebócitos estrelados dos tecidos para a hemolinfa circulante; o segundo seria decorrente do tempo necessário para que o APO produzisse um maior número de células e até estas serem lançadas na hemolinfa circulante. O terceiro seria uma combinação dos dois, ou seja, o retorno das células que estavam nos tecidos e a produção de novas células pelo APO. O APO é estimulado a produzir mais células nas primeiras 48 horas após a infecção. O número de células aumenta progressivamente até chegar a um pico. Depois deste pico acredita-se que há uma estabilização da quantidade de células após a infecção ter se instalado.

Os resultados encontrados na contagem de amebócitos na hemolinfa circulante estão relacionados aos resultados do primeiro experimento, onde pudemos verificar que um menor número de moluscos albinos se infectou em relação aos melânicos. Relacionando esta ocorrência com a contagem dos amebócitos constatamos um maior número de células estreladas na hemolinfa dos moluscos albinos, células estas responsáveis pelo combate aos esporocistos. Como os amebócitos estrelados (granulócitos) parecem ter a capacidade fagocitária e estão em maior número na hemolinfa da variante albina, este resultado significa que há uma capacidade maior da variante albina em combater a infecção pelo Schistosoma mansoni.

Foi verificado um número maior de larvas nos tecidos nos primeiros períodos observados, sendo que este número foi

declinando com o passar do tempo. Isto nos levou a pensar que o menor número de larvas encontradas após 72 horas de infecção seria decorrente da destruição e eliminação de larvas pelos mecanismos de defesa do molusco.

O número total de esporocistos degenerados encontrados nos tecidos, em todas as horas observadas, foi maior na variante albina. Os esporocistos integros foram encontrados em maior número na variante melânica.

Verificou-se discreta reação amebocitária em torno das larvas nas duas variantes. Esta reação foi discreta nos esporocistos degenerados encontrados aos 30 minutos e às 2 horas após a infecção. Isto nos leva a acreditar que a morte dos esporocistos nas primeiras horas foi devida também a fatores não celulares da hemolinfa. Não descartamos porém a participação dos amebócitos, apenas achamos que esta participação pode não ter sido direta.

Os resultados obtidos nos cortes histológicos estão correlacionados com o número de células presentes na hemolinfa observada nas mesmas horas de infecção. Verificamos que houve um número grande de esporocistos degenerados nas primeiras horas após a infecção. Esta observação está em conformidade com os resultados obtidos na contagem das células na hemolinfa, onde foi verificado um baixo número de células nas primeiras horas após a infecção, indicando que os amebócitos poderiam estar nos tecidos. Após 24 horas de infecção, na variante melânica houve um aumento grande no número de células na hemolinfa. Neste mesmo

momento, nas reações teciduais, houve um número maior de esporocistos integros com relação aos degenerados, indicando que nesta hora, não havia combate as larvas por estarem os amebócitos presentes na hemolinfa circulante.

Os resultados observados estão de acordo com o trabalho de Guaraldo et. al. (1981) que estudaram as reações teciduais em Biomphalaria glabrata e Biomphalaria tenagophila desde as primeiras horas até a oitava semana após infecção, observando que havia pequena reação amebocitária em volta da larva em Biomphalaria glabrata, enquanto na Biomphalaria tenagophila havia uma forte reação tecidual. Portanto houve maior reação tecidual em moluscos resistentes do que em moluscos susceptíveis. Em nosso trabalho verificamos um número significativamente maior de esporocistos degenerados após 72 horas de infecção na variante albina com relação aos encontrados na variante melânica. Este achado foi considerado importante porque após 72 horas de infecção as reações tissulares mais intensas já haviam ocorrido. Os moluscos pertencentes à variante albina demonstraram maior capacidade de combater a infecção.

## 5) RESUMO E CONCLUSÕES

O trabalho teve como objetivo verificar as diferenças de comportamento existentes entre Biomphalaria glabrata, variantes albina e melânica, em relação à susceptibilidade ao Schistosoma mansoni, através da observação da eliminação de cercárias por um período de 3 meses e a verificação das taxas de mortalidade nos moluscos controles e infectados. Foi também objetivo do trabalho analisar a existência de diferenças em número de células estreladas e não estreladas nos diferentes períodos de infecção e observar, através de cortes histológicos, a evolução da infecção nos tecidos.

Foram infectados moluscos Biomphalaria glabrata variantes albina e melânica da linhagem BH com Schistosoma mansoni da linhagem BH com a intenção de verificarmos qual das duas variantes era a mais susceptível ao parasita. Verificamos que houve maior número de moluscos melânicos que eliminaram cercárias e por um tempo mais prolongado. Foi observado que houve uma interrupção precoce na eliminação de cercárias pelos moluscos albinos. A taxa de mortalidade dos moluscos infectados pertencentes à variante melânica também foi maior do que a observada na variante albina. Isto era esperado, em decorrência dos danos provocados pelo parasita no molusco.

A contagem das células da hemolinfa, feita nas diferentes horas, mostrou-nos que a variante albina possuiu um maior número de células estreladas e não estreladas do que a variante melânica. A variante albina apresentou maior número de células estreladas combateu mais eficientemente a infecção. Isto se explica pela capacidade destas células fagocitarem parasitas e qualquer corpo estranho que entre no organismo do molusco. Foi observado que no início da infecção houve uma queda do número de amebócitos estrelados devido, provavelmente, à sua migração para os tecidos, com a finalidade de combater a infecção. Depois de um certo período observou-se um pico no número de células nas duas variantes, o que pode significar que estas células podem ter retornado dos tecidos para a hemolinfa ou então que houve uma produção de células pelo APO. Pode ainda ter ocorrido uma combinação destas duas hipóteses.

A análise da infecção nos tecidos teve como intenção principal verificar se havia diferença do comportamento dos amebócitos nas duas variantes. Observou-se que nas duas primeiras horas de infecção houve discreta reação amebocitária ao redor da larva de Schistosoma mansoni em ambas as variantes, porém foram observados esporocistos degenerados com discreta reação amebocitária, levando-nos a acreditar na existência de fatores do plasma que atuariam na morte dos esporocistos. Nos intervalos de tempo estudados, constatou-se maior número de esporocistos degenerados na

variante albina e maior número de esporocistos íntegros na variante melânica.

Comparando os resultados obtidos, em Biomphalaria glabrata, variantes albina e melânica, concluimos que os moluscos melânicos tiveram taxas de susceptibilidade e mortalidade maiores que os moluscos da variante albina. Os moluscos da variante albina apresentaram maior número de células estreladas e não estreladas na hemolinfa circulante. Nos cortes histológicos havia maior número de esporocistos degenerados na variante albina e maior número de esporocistos íntegros na variante melânica.

Por estes resultados, sugerimos que moluscos pertencentes à espécie Biomphalaria glabrata, variante melânica de Belo Horizonte, infectados com Schistosoma mansoni simpátricos são mais susceptíveis que os moluscos da mesma espécie e origem, pertencentes à variante albina.

### Bibliografia

- Abdul-Salam, J.M. & Michelson, E.H.  
Biomphalaria glabrata Amebocytes: Effect of Schistosoma mansoni infection on in vitro phagocytosis.  
J. Invert. Pathol. V.35 p:241-48, 1980
- Abdul-Salam, J.M. & Michelson, E.H.  
Biomphalaria glabrata amebocytes: assay of factors influencing in vitro phagocytosis.  
J. Invert. Pathol. V.36 p:52-9, 1980b.
- Balan, D.S.L.  
 Aspectos imunológicos e parasitológicos em Biomphalaria tenagophila (D' Orbigny, 1835) infectada por trematódeos digenéticos.  
 Campinas Tese (Mestrado) Unicamp Instituto de Biologia, 1990.
- Barreto, M.P.  
 Esboço histórico da parasitologia médica no Brasil até os fins do século XIX.  
Rev. Bras. Mal. doenças trop. V.15 N.3 p:469-85, 1963.
- Basch, P.F.,  
 Intermediate host specificity in Schistosoma mansoni.  
Exp. Parasitol. V.39 p:150-69 1976.
- Bastos, O.C.; Guaraldo, A.M.A. e Magalhães, L.A.  
 Suscetibilidade de Biomphalaria glabrata, variante albina, oriunda de BH, Mg, à infecção por Schistosoma mansoni, parasita em condições naturais, de roedores silvestres do vale do rio paraíba do sul, Sp Brasil  
Rev. Saúde Publica S.P. V.12 p:179-83 1978.
- Bayne, C.j.; Buckley, P.M. and DeWan  
Schistosoma mansoni: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant Biomphalaria glabrata.  
Exp. Paras. V.50 p:409-16 1980.
- Bayne, C.J.; Loker, E.S. and Yui, M.A.  
 Interactions between the plasma proteins of Biomphalaria glabrata (Gastropoda) and the sporocyst tegument of Schistosoma mansoni (Trematode)  
Parasitology V.92 p:653-64 1986.
- Boray, J.C.  
 The role of the relative susceptibility of snails to infection with helminths and of the adaptation of the parasites in the epidemiology of some helminthic disease.  
Malacologia V.14 p:125-7 1973.

- Carter, O.S.; Bogitsh, B.J.  
Histologic and cytochemical observations of the effects of *Schistosoma mansoni* on *Biomphalaria glabrata*.  
Ann. N.Y. Acad. Scien. V.266 p:380-93, 1975
- Cheng, T.C.,  
An eletroforetic analysis of hemolymph proteins of *Helisoma Duryi normale* experimentally challenged with bacteria. J. Invert. Pathol. V.14 p:60-81 1969.
- Cheng, T.C.  
Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. V.266 p:343-79 1975.
- Cheng, T.C. and Yoshino, T.P.  
Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (mollusca) challenged with bacterial lipids.  
J. Inv. Path. V28 p:143-146, 1976
- Cheng, T.C. and Auld, K.R.  
Hemocytes of the pulmonate Gastropod *Biomphalaria glabrata*.  
J. Invert. Path. V.30 119-122, 1977.
- Cheng, T.C. and Mohandas, A.  
Effect of hight dosages of bacterial challenge on acid phosphatase release from *Biomphalaria glabrata* hemocytes.  
J. Inv. Path. V.45 p:236-41 1985.
- Cheng, T.C. and Jordane, J.  
Transient cellular reaction in *Biomphalaria glabrata* (mollusca) to heterotopic isografts.  
J. Inv. Path. V.49 N.3 p:273-278, 1987.
- Dias, L.C.S.; Ueta, M.T. & Guaraldo, A.M.A.  
Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*.  
Rev. Inst. Med. trop. São Paulo V29 N4 p:205-12, 1987.
- Dikkeboom, R.; van Der Knaap, W.P.W.; van Der Bovenkamp, W.; Tjnagel, J.M.G.H. & Bayne, C.J.  
The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species.  
Dev. Comp. Immunol. V.12 p:509-20, 1988.
- Ferreira, A.B.H.  
Dicionário da língua portuguesa  
Ed. Nova Fronteira, 1975
- Files, V.S. & Cram, E.B.  
A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni*.  
J. Parasitol. V.35 p:555-60, 1949.

- Fisher, P.H.,  
Vie et morts des mollusques. Paris, Payot, p: 312 1950.
- Foley, D.A. and Cheng, T.C.  
Morphology, hematologic parameters and behavior of hemolymph cells of the quahog clam, *Mercenaria mercenaria*.  
Biol. Bull. V.146 p:343-56 1974.
- Foley, D.A. & Cheng, C.T.  
A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypoda *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*.  
J. Invert. Pathol. V.25 p:189-97 1975.
- Foley, D.A. and Cheng, T.C.  
Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis.  
J. Inv. Path. V.29 p:321-5 1977.
- Freitas, J.R.,  
Ecologia de vetores de doenças, o habitat primitivo da *Biomphalaria glabrata*. Ciência e Cultura V.28 N.2 1976.
- Ghiretti, F.  
Respiration  
Wilbur, K.M. e Yonge, C.M. - Physiology of mollusca II, 1966
- Ghiretti, F. e Ghiretti, M.  
Respiration  
Fretter, V. e Peake, J.  
Pulmonates - Functional anatomy and physiology I, 1975
- Granath, W.O.Jr. and Yoshino, T.P.  
*Schistosoma mansoni*: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*.  
Exp. Parasitol. V.58 p:188-93, 1982.
- Granath, W.O.Jr. and Yoshino, T.P.  
*Schistosoma mansoni*: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*.  
Exp. Parasitol. V.58 p:188-93, 1984
- Guaraldo, A.M.A.; Magalhães, L.A.et. alii.  
Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D Orbigny, 1835)  
Rev. Saúde Publ. S.P. V.15 p:436-47 1981.

- Harris, K.R.  
The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*.  
Ann. Acad. N. Y. Scien. V.266 p:437-63 1975.
- Hoffman, W.A.; Pons, J.A. & Janer, J.L.,  
Sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. Puerto Rico J. Publ. Health & Trop. Med. V.9 p:283-98 1934.
- Jeong, K.H. & Heyneman, D.  
Leucocytes of *Biomphalaria glabrata*: Morphology and behavior of granulocytes cells in vitro. J. Invert. Pathol. V.28 p:357-62 1976.
- Jeong, K.H.; Lie, K.J. & Heyneman, D.  
The ultrastructure of the amebocyte - producing organ in *Biomphalaria glabrata*.  
Dev. Comp. Immunol. N.7 p:217-28, 1983.
- Joky, A. & Matricon-Gondran, M.  
Response to the amebocyte-producing organ of sensitized *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Echinostoma caproni* miracidia.  
J. Invert. Pathol. V.45 N.28 p:28-33, 1985.
- Knaap, W.P.W.; Sminia, T.; Schutte, R. & Boerrigter - Barendsen, L.H.,  
Citophilic receptors for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leucocytes: In vitro phagocytosis by amebocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. Immunol. V.48 p:377-83 1983.
- Knaap, W.P.W. van & Loker, E.S.  
Immune Mechanisms in Trematode-Snail Interactions  
Parasitology Today Vol.6 N6 p-175-182, 1990.
- Lie, K.J. & Heyneman, D.  
Studies on resistance in snails: A specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails.  
Int. J. Parasitol. V.V p:621-26, 1975.
- Lie, K.J. and Heyneman, D. and Richards, C.S.  
Studies on resistance in snail: Interference by nonirradiated *Echinostoma* larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*.  
J. Invert. Pathol. V.29 p:118-25, 1977.
- Lie, K.J. and Heyneman, D. and Richards, C.S.  
*Schistosoma mansoni*: temporary reduction of natural resistance in *Biomphalaria glabrata* induced by irradiated miracidia of *Echinostoma paraense*.  
Exp. Parasitol. V.43 p:54-62, 1977b.

- Lie, K.J. and Heyneman, D. and Richards, C.S.  
Specificity of natural resistance to trematode infections in Biomphalaria glabrata.  
Inter. J. Parasitol. V.9 529-31, 1979.
- Lie, K.J. & Heyneman,  
D. Tissues reactions induced by Schistosoma mansoni in Biomphalaria glabrata. Ann. of Trop. Med. and Parasitol. V.74 p:157-66 1980.
- Lie, K.J.; Heyneman, D. and Jeong, K.H.  
Selective interference with granulocyte function induced by Echinostoma paraense (trematoda) larvae in Biomphalaria glabrata (mollusca).  
J. Parasitol. V.67 N.6 p:790-96, 1981.
- 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. and Hyg. V31 p:999-1005, 1982.
- LoVerde, P.T.; Gherson, J. and Richards, C.S.  
Reaction against self an invertebrate?  
J. Phis. Pathol. V.39 p:247-9 1982.
- Machado, S.M.P.R.  
Estudo da ação da hemolinfa no mecanismo de defesa de Biomphalaria tenagophila (orbigny, 1835).  
Campinas - Tese (Mestrado) Unicamp - Instituto de Biologia, 1990.
- Magalhães, L.A.  
Moluscos planorbídeos do Distrito Federal, Brasília.  
Campinas Tese (Doutoramento) - Unicamp. Faculdade de Ciências Médicas, 1966.
- Magalhães, L.A. and Carvalho, J.F.  
Sobre o comportamento de duas linhagens de Schistosoma mansoni Sambon de estudo quantitativo..  
Rev. Soc. Bras. med. trop. V.10 p:169 1976
- Matricón-Gondran, M. Joky, A. & Benex, J.  
Responses of the amebocytes producing organ (APO) in Biomphalaria glabrata susceptible or resistant to trematode invasion: an ultrastructural study.  
Poster Presentation, ISDCI Invert. Immunol. Conf., Berlim, 1986. Dev. Comp. Immunol., in press.
- Morton, J.E. e Yonge, C.M.  
Classification and structure of the mollusca  
Wilbur, K.M. e Yonge, C.M. Physiology of mollusca I, 1964

- Mullainadhan, P. & renwrantz, L.  
Lectin - dependent recognition of foreing cells by hemocytes of the mussel Mytilus edulis.  
Immunobiol. V.171 p:263-73, 1986.
- Newton, W.L.  
he comparative tissue reaction of two strains of Australorbis glabratus to infection with Schistosoma mansoni.  
J. Parasitol V.38 p:362-6, 1952.
- Newton, W.L.  
The inheritance of susceptibility to infection with Schistosoma mansoni in Australorbis glabratus.  
Exp. Parasitol., V.2 p:242-57, 1953.
- Niemann, G.M. and Lewis, F.A.  
Schistosoma mansoni; Influence of Biomphalaria glabrata size on susceptibility to infection and resultant cercarial production.  
Exp. Parasitol. V70 N3 p: 286-292, 1990
- Noda, S.; Loker, E.S.  
Effects of infection with Echinostoma paraensi on the circulating haemocyte population of the host snail Biomphalaria glabrata.  
Parasitology V.98 p:35-41, 1989.
- Pan, C.T.  
The general histology and topographic microanatomy of Australorbis glabratus. Bull. Mus. Comp. Zool. V.119 p:237-99 1958.
- Pan, C.T.  
Generalized and focal tissue responses in the snail Australorbis glabratus, infected with Schistosoma mansoni.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. V.133 p:475-76, 1963.
- Pan, C.T.  
Studies on the host-parasite relantionship between Schistosoma mansoni and the snail Australorbis glabratus.  
Am. J. Trop. Med. and Hyg. V.14 N6 p:931-76, 1965.
- Paraense, W.L.  
Histórico  
Rev. Bras. Malario. doenças trop. V.II N2/3 p:105-17 1959.

- Paraense, W.L. & Corrêa, L.R.  
Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*.  
Rev. Inst. Med. trop. São Paulo V.5 p:15-22, 1963.
- Paraense, W.L.  
Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros.  
Arg. Mus. nac., RJ V.55 nov., p:105-28, 1975.
- Prowse, R.H. and Tait, N.N.  
In vitro phagocytosis by amoebocytes from the haemolymph of *Helix aspersa* (Muller)  
Immunology, V.17 p:437-43, 1969.
- Ratcliffe, N.A.  
Invertebrate immunity. A Primer for the non-specialist.  
Immunol. Letters V.10 p:253-70, 1985
- Renwrautz, L.R. and Cheng, T.C.  
Identification of agglutinin receptors on hemocytes of *Helix pomatia*.  
J. Inv. Path. V.29 p:88-96 1977.
- Renwrautz, L.R. and Cheng, T.C.  
Agglutinin-mediated attachment of erythrocytes to hemocytes of *Helix pomatia*.  
J. Inv. Path. V.29 p:97-100 1977b.
- Renwrautz, L. & Stahmer, 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. V.149 p:535, 1983.
- Richards, C.S. and Merritt, J.W.Jr.  
Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection.  
Am. J. trop. med. hyg. V.21 N4 p:425-34 1972.
- Richards, C.S.  
Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection.  
Am. J. trop. med. hyg. V.22 N6 p:748-56 1973.
- Richards, C.S. & Merritt, J.W.Jr.  
Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection.  
The Am. J. of Trop. Med. and Hyg. V.21 N.4 p:425-34, 1975.

- Richards, C.S.  
Abnormal development of the digestive gland in *Biomphalaria glabrata*.  
J. Invert. Path. v.36 121-22, 1980.
- Richards, C.S.  
Influence of snail age on genetic variations in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for infection with *Schistosoma mansoni*.  
Malacologia V.25 N2 p:493-502, 1984.
- Richards, C.S. and Minchella, D.J.  
Transient non-susceptibility to *Schistosoma mansoni* associated with atrial amoebocytic accumulations in the snail host *Biomphalaria glabrata*.  
Parasitology v.95 499-505, 1987.
- Ruddell, C.L.  
The fine structure of oyster, agranular amoebocytes from regenerating mantle wounds in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*.  
J. Invert. Pathol. V.18 p:260-68 1971.
- Runham, N.W,  
Alimentary canal  
Fretter, V. e Peake, J. Pulmonates - Functional Anatomy and Physiology I, 1975.
- Santana, J.V.; Magalhães, L.A. & Rangel, H.A.  
Seleção de linhagens de *B. tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*.  
Rev. Saúde publ. S.P. V.12 p:67-77, 1978.
- Santana, J.V.  
Mecanismo de defesa em *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* frente ao *Schistosoma mansoni*.  
Campinas Tese de (Doutoramento) - Unicamp - Instituto de Biologia 1990.
- Seta, L.  
Comportamento dos amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni*, a inoculação de tinta nanquim ou fratura de concha.  
Campinas Tese (Mestrado) - Unicamp. Instituto de Biologia, 1990.
- 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. V.9 p:497-509, 1980.

Sminia, T.

Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh-water pulmonate Lymnaea stagnalis studied by the electrons microscopy and enzyme histochemistry.

Z. Zellforsch. p:13497-526, 1972

Sminia, T.; Winsemius, A. & Knaap, W.P.W. Recognition of foreignness by blood cells of the freshwater snail Lymnaea stagnalis with special reference to the role and structure of the cell coat. J. Invert. Pathol. V.38 p:175-83 1981.

Sminia, T. & Knaap, W.P.W. van

Cells and molecules in molluscan immunology.

Dev. Comp. Immunol. V.11 p:17-28, 1987.

Standen, D.D.

The effects of temperature, light and salinity upon the hatching ova of Schistosoma mansoni.

Trans. of Royal Soc. of Trop. Med. Hyg. V.45 N.2 p:221-41, 1951.

Stumpf, J.L. & Gilbertson, D.E.

Hemocytes of Biomphalaria glabrata = factor affecting variability.

J. Invert. Pathol. V.32 p:177-81, 1978.

Sullivan, J.T.; Cheng, T.C. & Howland, K.H.

Mitotic Responses of the anterior pericardial wall of Biomphalaria glabrata (mollusca) subjected to challenge.

J. of Invert. Path. V44 p:114-6, 1984

Suresh, K. and Mohandas, A.

Hemolymph lactic acid levels in Suetta scripta (Bivalvia) exposed to sublethal concentrations of mercury and copper.

J. Inv. Path. V49 N3 may, p:265-72, 1987

Tripp, M.R.

The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail Australorbis glabratus.

J. Parasitol. V47 p: 747-51, 1961.

Tripp, M.R.

Defense mechanism of molluscs.

J. Ret. Soc. N.7 p:173-82, 1970.

Tripp, M.R.

Molluscan Immunity.

Ann. Acad. N.Y. Sci. V.234-37, 1974.

Zanotti-Magalhães, E.M.; Magalhães, L.A.; Carvalho, J.F. & Rangel, H.A.

Relação entre a susceptibilidade de planorbídeos à infecção por Schistosoma mansoni e a nocividade produzida pelo trematódeo em camundongos.

Resumo do "International Symposium on Schistosomiasis". Rio de Janeiro. p:118, 1987.

Yoshino, T.P. and Cheng, T.C.

Aminopectidase activity in the hemolymph and body tissues of the pulmonate Gastropod Biomphalaria glabrata.

J. Invert. Path. V.36 76-9 1977.

Yoshino, T.P.

Selective acquisition of snail host antigens by larval Schistosoma mansoni: detection by monoclonal antibodies to snail haemocytes and hemolymph. In Aspects of Develop and Comp. Immunol. V.2 p:225 (abstract) New York Pergamon 1983.

Yoshino, T.P. & Granath, W.O.

Surface antigens of Biomphalaria glabrata (Gastropoda) hemocytes: Functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. J. Invert. Pathol. V.45 p:174-86 1985.

Yoshino, T.P. and Lodes, M.J.

Secretory protein biosynthesis in snail hemocytes: in vitro modulation by larval shistosome excretory-secretory products.

J. Parasitology V.74 N4 p:535-47 1988.

Wagge, L.E.

Amoebocytes

Int. Rev. Cytol. V.IV p:31-78, 1955

Anexo Estatístico  
Tabelas-resumo do SAS

Análise estatística do número de células estreladas em  
moluscos albinos e melânicos em diferentes períodos

"General Linear Models Procedure"

| de | Agrupamento <sup>1</sup> |   | Média | N  | Tempo<br>infecção |
|----|--------------------------|---|-------|----|-------------------|
|    |                          |   |       |    |                   |
|    | A                        |   | 2,043 | 14 | 12                |
| B  | A                        |   | 1,857 | 14 | 24                |
| B  | A                        |   | 1,828 | 14 | 8                 |
| B  | A                        |   | 1,799 | 14 | 4                 |
| B  | A                        |   | 1,547 | 14 | 2                 |
| B  | A                        | C | 1,474 | 14 | 10                |
| B  | A                        | C | 1,451 | 14 | 72                |
| B  | A                        | C | 1,422 | 14 | 0                 |
| B  | A                        | C | 1,393 | 14 | 6                 |
| B  | A                        | C | 1,074 | 14 | 48                |
| B  |                          | C | 1,025 | 14 | 0,5               |
|    |                          | C | 0,621 | 14 | 1                 |

<sup>1</sup> Teste aplicado: Ryan-Einot-Gabriel-Welsch. Médias com a mesma letra "não diferem significativamente a nível de 5%"

Análise estatística do número de células não estreladas em  
moluscos albinos e melânicos em diferentes períodos

"General Linear Models Procedure"

| de | Agrupamento <sup>2</sup> |   | Média | N  | Tempo<br>infecção |
|----|--------------------------|---|-------|----|-------------------|
|    |                          |   |       |    |                   |
|    | A                        |   | 4,340 | 14 | 12                |
| B  | A                        |   | 3,538 | 14 | 8                 |
| B  | A                        |   | 3,508 | 14 | 24                |
| B  | A                        | C | 3,326 | 14 | 10                |
| B  | A                        | C | 3,017 | 14 | 4                 |
| B  | A                        | C | 2,826 | 14 | 48                |
| B  |                          | C | 2,792 | 14 | 72                |
| B  |                          | C | 2,615 | 14 | 6                 |
| B  |                          | C | 2,494 | 14 | 1                 |
| B  |                          | C | 2,428 | 14 | 2                 |
| B  |                          | C | 2,368 | 14 | 0                 |
|    |                          | C | 1,653 | 14 | 0,5               |

<sup>2</sup> Teste aplicado: Ryan-Einot-Gabriel-Welsch. Médias com a  
mesma letra "não diferem significativamente a nível de 5%"

Análise de variância dos resultados obtidos sobre  
susceptibilidade de B. glabrata variantes albina e melânica

SAS - Analysis of Variance Table

| Source        | DF | Chi-Square | Prob   |
|---------------|----|------------|--------|
| Intercept     | 1  | 89,13      | 0,0000 |
| Semana        | 12 | 94,47      | 0,0000 |
| Tipo          | 1  | 15,37      | 0,0000 |
| Semana * Tipo | 12 | 8,57       | 0,7392 |
| Residual      | 0  |            |        |

Análise de variância dos resultados obtidos sobre mortalidade de B. glabrata variantes albina e melânica

SAS - Analysis of Variance Table

| Source        | DF | Chi-Square | Prob   |
|---------------|----|------------|--------|
| Intercept     | 1  | 123,94     | 0,0000 |
| Semana        | 12 | 98,85      | 0,0000 |
| Tipo          | 1  | 26,61      | 0,0000 |
| Semana * Tipo | 12 | 8,05       | 0,7812 |
| Residual      | 0  |            |        |