

LUCIANE DE SETA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL E DA COMPOSIÇÃO
BIOQUÍMICA DA HEMOLÍNFA, DA ÁGUA DE CONDICIONAMENTO E
DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE *Biomphalaria glabrata* E
Biomphalaria tenagophila INFECTADAS POR *Schistosoma mansoni*.

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese (defendida por) candidato a)

Luciane de Seta

e aprovada pela Comissão Julgadora.

26/7/96

Tese a ser apresentada ao Instituto de Biologia,
Depto. de Parasitologia da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do título
de Doutor em Ciências, área de concentração
Parasitologia.

Dr. Augusto Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães

Campinas / SP
1996

PADE	BC
CILADA:	
17/11/96	
20/11/96	
21/11/96	
22/11/96	
23/11/96	
24/11/96	
25/11/96	
26/11/96	
27/11/96	
28/11/96	
29/11/96	
30/11/96	
31/11/96	
12/12/96	
13/12/96	
14/12/96	
15/12/96	
16/12/96	
17/12/96	
18/12/96	
19/12/96	
20/12/96	
21/12/96	
22/12/96	
23/12/96	
24/12/96	
25/12/96	
26/12/96	
27/12/96	
28/12/96	
29/12/96	
30/12/96	
31/12/96	
1/1/97	
2/1/97	
3/1/97	
4/1/97	
5/1/97	
6/1/97	
7/1/97	
8/1/97	
9/1/97	
10/1/97	
11/1/97	
12/1/97	
13/1/97	
14/1/97	
15/1/97	
16/1/97	
17/1/97	
18/1/97	
19/1/97	
20/1/97	
21/1/97	
22/1/97	
23/1/97	
24/1/97	
25/1/97	
26/1/97	
27/1/97	
28/1/97	
29/1/97	
30/1/97	
31/1/97	
1/2/97	
2/2/97	
3/2/97	
4/2/97	
5/2/97	
6/2/97	
7/2/97	
8/2/97	
9/2/97	
10/2/97	
11/2/97	
12/2/97	
13/2/97	
14/2/97	
15/2/97	
16/2/97	
17/2/97	
18/2/97	
19/2/97	
20/2/97	
21/2/97	
22/2/97	
23/2/97	
24/2/97	
25/2/97	
26/2/97	
27/2/97	
28/2/97	
29/2/97	
30/2/97	
31/2/97	
1/3/97	
2/3/97	
3/3/97	
4/3/97	
5/3/97	
6/3/97	
7/3/97	
8/3/97	
9/3/97	
10/3/97	
11/3/97	
12/3/97	
13/3/97	
14/3/97	
15/3/97	
16/3/97	
17/3/97	
18/3/97	
19/3/97	
20/3/97	
21/3/97	
22/3/97	
23/3/97	
24/3/97	
25/3/97	
26/3/97	
27/3/97	
28/3/97	
29/3/97	
30/3/97	
31/3/97	
1/4/97	
2/4/97	
3/4/97	
4/4/97	
5/4/97	
6/4/97	
7/4/97	
8/4/97	
9/4/97	
10/4/97	
11/4/97	
12/4/97	
13/4/97	
14/4/97	
15/4/97	
16/4/97	
17/4/97	
18/4/97	
19/4/97	
20/4/97	
21/4/97	
22/4/97	
23/4/97	
24/4/97	
25/4/97	
26/4/97	
27/4/97	
28/4/97	
29/4/97	
30/4/97	
31/4/97	
1/5/97	
2/5/97	
3/5/97	
4/5/97	
5/5/97	
6/5/97	
7/5/97	
8/5/97	
9/5/97	
10/5/97	
11/5/97	
12/5/97	
13/5/97	
14/5/97	
15/5/97	
16/5/97	
17/5/97	
18/5/97	
19/5/97	
20/5/97	
21/5/97	
22/5/97	
23/5/97	
24/5/97	
25/5/97	
26/5/97	
27/5/97	
28/5/97	
29/5/97	
30/5/97	
31/5/97	
1/6/97	
2/6/97	
3/6/97	
4/6/97	
5/6/97	
6/6/97	
7/6/97	
8/6/97	
9/6/97	
10/6/97	
11/6/97	
12/6/97	
13/6/97	
14/6/97	
15/6/97	
16/6/97	
17/6/97	
18/6/97	
19/6/97	
20/6/97	
21/6/97	
22/6/97	
23/6/97	
24/6/97	
25/6/97	
26/6/97	
27/6/97	
28/6/97	
29/6/97	
30/6/97	
31/6/97	
1/7/97	
2/7/97	
3/7/97	
4/7/97	
5/7/97	
6/7/97	
7/7/97	
8/7/97	
9/7/97	
10/7/97	
11/7/97	
12/7/97	
13/7/97	
14/7/97	
15/7/97	
16/7/97	
17/7/97	
18/7/97	
19/7/97	
20/7/97	
21/7/97	
22/7/97	
23/7/97	
24/7/97	
25/7/97	
26/7/97	
27/7/97	
28/7/97	
29/7/97	
30/7/97	
31/7/97	
1/8/97	
2/8/97	
3/8/97	
4/8/97	
5/8/97	
6/8/97	
7/8/97	
8/8/97	
9/8/97	
10/8/97	
11/8/97	
12/8/97	
13/8/97	
14/8/97	
15/8/97	
16/8/97	
17/8/97	
18/8/97	
19/8/97	
20/8/97	
21/8/97	
22/8/97	
23/8/97	
24/8/97	
25/8/97	
26/8/97	
27/8/97	
28/8/97	
29/8/97	
30/8/97	
31/8/97	
1/9/97	
2/9/97	
3/9/97	
4/9/97	
5/9/97	
6/9/97	
7/9/97	
8/9/97	
9/9/97	
10/9/97	
11/9/97	
12/9/97	
13/9/97	
14/9/97	
15/9/97	
16/9/97	
17/9/97	
18/9/97	
19/9/97	
20/9/97	
21/9/97	
22/9/97	
23/9/97	
24/9/97	
25/9/97	
26/9/97	
27/9/97	
28/9/97	
29/9/97	
30/9/97	
31/9/97	
1/10/97	
2/10/97	
3/10/97	
4/10/97	
5/10/97	
6/10/97	
7/10/97	
8/10/97	
9/10/97	
10/10/97	
11/10/97	
12/10/97	
13/10/97	
14/10/97	
15/10/97	
16/10/97	
17/10/97	
18/10/97	
19/10/97	
20/10/97	
21/10/97	
22/10/97	
23/10/97	
24/10/97	
25/10/97	
26/10/97	
27/10/97	
28/10/97	
29/10/97	
30/10/97	
31/10/97	
1/11/97	
2/11/97	
3/11/97	
4/11/97	
5/11/97	
6/11/97	
7/11/97	
8/11/97	
9/11/97	
10/11/97	
11/11/97	
12/11/97	
13/11/97	
14/11/97	
15/11/97	
16/11/97	
17/11/97	
18/11/97	
19/11/97	
20/11/97	
21/11/97	
22/11/97	
23/11/97	
24/11/97	
25/11/97	
26/11/97	
27/11/97	
28/11/97	
29/11/97	
30/11/97	
31/11/97	
1/12/97	
2/12/97	
3/12/97	
4/12/97	
5/12/97	
6/12/97	
7/12/97	
8/12/97	
9/12/97	
10/12/97	
11/12/97	
12/12/97	
13/12/97	
14/12/97	
15/12/97	
16/12/97	
17/12/97	
18/12/97	
19/12/97	
20/12/97	
21/12/97	
22/12/97	
23/12/97	
24/12/97	
25/12/97	
26/12/97	
27/12/97	
28/12/97	
29/12/97	
30/12/97	
31/12/97	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00095436-3

Se73e

Seta, Luciane de

Estudo da atração miraxonal e da composição bioquímica da hemolinfa, da água de condicionamento e da glândula do albúmen de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* / Luciane de Seta. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Luiz Augusto Magalhães.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. *Biomphalaria glabrata*. 2. *Biomphalaria tenagophila*. 3. Aminoácidos. 4. *Schistosoma mansoni*. I. Magalhães, Luiz Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 26 de Julho de 1996

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães



Assinatura

Profa. Dra. Selma de Giorgio



Assinatura

Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães



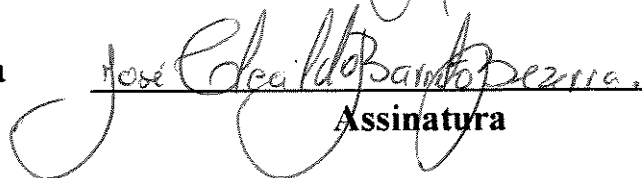
Assinatura

Prof. Dr. Oswaldo Marçal Junior



Assinatura

Prof. Dr. José Clecildo Barreto Bezerra



Assinatura

SUPLENTES:

Prof. Dr. Rogério de Jesus Pedro

Assinatura

Prof. Nelson da Silva Cordeiro

Assinatura

Aos meus pais, Miguel e
Wilma, com amor...

AGRADECIMENTOS

À Deus Pai, Filho e Espírito Santo, fonte de vida e de coragem para enfrentar todas as barreiras encontradas pelo caminho...

À Maria Santíssima, mãe de Deus, à quem eu tenho a honra de chamar de mãe, companheira e intercessora, durante toda a minha vida...

Aos meus pais, escolhidos por Deus para serem minha família, a quem eu devo a vida, eu os agradeço de coração pelo seu amor e dedicação, pelo apoio nos momentos mais difíceis, e pelo incentivo à nunca desistir (inclusive o financeiro!)...

Aos meus formadores em Parasitologia, que me fizeram tomar gosto pelo estudo da relação parasita x hospedeiro, não somente da esquistosomose, mas das demais parasitoses, incentivando e ampliando meus horizontes no estudo e na pesquisa, eu os agradeço com sinceridade, Dr. Luiz Augusto Magalhães e Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães...

Aos amigos, sempre por perto, dando aquele apoio carinhoso, de modo especial ao Carlos, meu irmãozinho; à Rejane, amiga fiel; à Verônica, coração de criança e espírito de luta; à Claudia, que mesmo longe ajudou na execução do projeto de qualificação, com sua tese de mestrado; ao Clecildo, pelo apoio e incentivo à continuar buscando, e pela coragem que me deu à entrar pelos caminhos obscuros da bioquímica, me dando uma luz para começar a entender os “aminoácidos livres”...

Ao Steve, do Departamento de Farmacologia do Hospital das Clínicas, por sua prontidão em colaborar, pelo fornecimento do Mixer Homogeneizador alemão, que permitiu que preparássemos o extrato da glândula do albúmen.

Ao laboratório de Química de Proteínas, pela utilização do aparelho Pico Tag da Waters e ao Edmir, pela execução das análises; ao Evandro, pelas análises cromatográficas, ao Prof. Camilo e ao Marcos, pelas eletroforeses; ao Prof. Benedito, pela permissão da utilização do laboratório.

Ao Departamento de Parasitologia, onde foi realizado a maior parte deste trabalho, e aos funcionários pela sua disponibilidade em ajudar.

À todos, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

DESCRIÇÃO	página
1) INTRODUÇÃO	1
1.1) OBJETIVOS	7
2) MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1) RESUMO DO PROJETO EXPERIMENTAL DESENVOLVIDO:	9
2.2) MANUTENÇÃO DOS MOLUSCOS EM LABORATÓRIO	12
2.3) MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>S.</i> <i>mansoni</i> BH E SJ E INFECÇÃO DE MOLUSCOS <i>B.</i> <i>glabrata</i> E <i>B. tenagophila</i>	12
2.4) COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE HEMOLINFA DOS MOLUSCOS	12
2.5) ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL	13
2.5.1) DESCRIÇÃO DO APARELHO UTILIZADO	13
2.5.2) PREPARO DA HEMOLINFA PARA O ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL EM BLOCOS DE AGAROSE	14
2.5.3) PREPARO DA SCW (SNAIL CONDITIONED WATER) DOS MOLUSCOS	14
2.5.4) EXTRAÇÃO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DOS MOLUSCOS E PREPARO DE EXTRATOS	14
2.6) ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS	15
2.7) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	16

2.8) CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR DA HEMOLINFA DOS MOLUSCOS	16
2.9) TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES DE CROMATOGRAFIA DA HEMOLINFA	16
2.10) ANÁLISE ESTATÍSTICA	17
2.11) GRUPOS EXPERIMENTAIS	18
2.11.1) ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL	18
2.11.2) ANÁLISE DOS COMPONENTES DA HEMOLINFA, SCW E EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN	22
2.12) DENOMINAÇÃO DAS AMOSTRAS EM SIGLAS	24
2.13) SIGLAS E NOMES DOS AMINOÁCIDOS	25
3) RESULTADOS	27
3.1) ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL	27
3.1.1) ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE A MOLUSCOS <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> INFECTADOS POR <i>S. mansoni</i> E SUA SCW	27
3.1.2) ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE A HEMOLINFA DOS MOLUSCOS INFECTADOS OU NÃO PELO <i>S. mansoni</i>	32
3.1.3) ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DOS MOLUSCOS INFECTADOS OU NÃO PELO <i>Schistosoma mansoni</i> E O CONFRONTO ENTRE ESSES EXTRATOS E A SCW	34
3.2) ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS	41

3.2.1) ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS LIVRES A HEMOLINFA DOS MOLUCOS INFECTADOS OU NÃO PELO <i>S. mansoni</i>	41
3.2.2) ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS LIVRES NA SCW DOS MOLUSCOS INFECTADOS OU NÃO PELO <i>S. mansoni</i>	42
3.2.3) ANÁLISE DO CONTEÚDO DE AMINOÁCIDOS LIVRES NO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DOS MOLUSCOS INFECTADOS OU NÃO PELO <i>S. mansoni</i>	44
3.3) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DAS AMOSTRAS DE HEMOLINFA DE <i>B. glabrata</i> E <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS OU NÃO PELO <i>S. mansoni</i>	45
3.4) CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR DA HEMOLINFA DE MOLUSCOS INFECTADOS OU NÃO PELO <i>S. mansoni</i>	47
3.4.1) TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA - ATRAÇÃO MIRAXONAL	48
3.4.2) ELETROFORESE DAS FRAÇÕES DE CROMATOGRAFIA DA HEMOLINFA DE <i>B. glabrata</i> NÃO INFECTADA PELO <i>S. mansoni</i>	49
3.5) TABELAS - ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL	ANEXO 2 -PÁGINAS 1 A 27

3.5.1) TABELA 1. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À MOLUSCOS <i>B. glabrata</i> SADIOS	ANEXO 2 - PÁG. 1
3.5.2) TABELA 2. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À MOLUSCOS <i>B. glabrata</i> INFECTADOS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 2
3.5.3) TABELA 3. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. glabrata</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 3
3.5.4) TABELA 4. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. glabrata</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 4
3.5.5) TABELA 5. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À MOLUSCOS <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIOS	ANEXO 2 - PÁG. 5
3.5.6) TABELA 6. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À MOLUSCOS <i>B.</i> <i>tenagophila</i> INFECTADOS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 6
3.5.7) TABELA 7. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 7
3.5.8) TABELA 8. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 8
3.5.9) TABELA 9. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. glabrata</i> SADIAS E À SCW DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 9

3.5.10) TABELA 10. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> E À SCW DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 10
3.5.11) TABELA 11. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. glabrata</i> E <i>B.</i> <i>tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 11
3.5.12) TABELA 12. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À HEMOLINFA DE <i>B.</i> <i>glabrata</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 12
3.5.13) TABELA 13. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À HEMOLINFA DE <i>B.</i> <i>glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 13
3.5.14) TABELA 14. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À HEMOLINFA DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 14
3.5.15) TABELA 15. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À HEMOLINFA DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 15
3.5.16) TABELA 16. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 16
3.5.17) TABELA 17. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 17

3.5.18) TABELA 18. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN E À SCW DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 18
3.5.19) TABELA 19. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS E À SCW DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 19
3.5.20) TABELA 20. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> E À SCW DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 20
3.5.21) TABELA 21. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN E À SCW DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 21
3.5.22) TABELA 22. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. glabrata</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 22
3.5.23) TABELA 23. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 23

3.5.24) TABELA 24. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN E À SCW DE <i>B.</i> <i>glabrata</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 24
3.5.25) TABELA 25. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> E À SCW DE <i>B.</i> <i>glabrata</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 25
3.5.26) TABELA 26. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. glabrata</i> SADIAS E À SCW DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 26
3.5.27) TABELA 27. - TESTE DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN E À SCW DE <i>B.</i> <i>glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 27
3.6) GRÁFICOS DO ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL:	51
3.6.1) FIGURAS 1 E 2: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À <i>B. glabrata</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	51
3.6.2) FIGURAS 3 E 4: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. glabrata</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	52

3.6.3) FIGURAS 5 E 6: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À <i>B. tenagophila</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	53
3.6.4) FIGURAS 7 E 8: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	54
3.6.5) FIGURAS 9 E 10: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. glabrata</i> E <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S.</i> <i>mansoni</i>	55
3.6.6) FIGURA 11: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À SCW DE <i>B. glabrata</i> E <i>B.</i> <i>tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	56
3.6.7) FIGURAS 12 E 13: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À HEMOLINFA DE <i>B.</i> <i>glabrata</i> SADIA OU INFECTADA POR <i>S. mansoni</i>	57
3.6.8) FIGURAS 14 E 15: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE À HEMOLINFA DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIA OU INFECTADA POR <i>S.</i> <i>mansoni</i>	58
3.6.9) FIGURAS 16 E 17: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. tenagophila</i> SADIA OU INFECTADA POR <i>S. mansoni</i>	59

3.6.10) FIGURAS 18 E 19: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN E À SCW DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S.</i> <i>mansoni</i>	60
3.6.11) FIGURAS 20 E 21: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> E À SCW DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIAS OU INFECTADAS	61
3.6.12) FIGURAS 22 E 23: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. glabrata</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	62
3.6.13) FIGURAS 24 E 25: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. glabrata</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> E À SCW DE <i>B. glabrata</i> SADIAS	63
3.6.14) FIGURAS 26 E 27: ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL FRENTE AO EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. glabrata</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> E À SCW de <i>B. glabrata</i> INFECTADA	64
3.7) TABELAS - AMINOÁCIDOS LIVRES	65

3.7.1) TABELA 28: AMINOÁCIDOS LIVRES - HEMOLINFA DE <i>B. glabrata</i> SADIAS (HBgS) E INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (HBgI); HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS OU INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> .	65
3.7.2) TABELA 29: AMINOÁCIDOS LIVRES - SCW DE <i>B. glabrata</i> SADIAS (WBgS) E INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (WBgI); SCW DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS (WBtS) E INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (WBtI)	66
3.7.3) TABELA 30: AMINOÁCIDOS LIVRES - EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B.</i> <i>glabrata</i> SADIAS (GABgS) E INFECTADAS POR <i>S.</i> <i>mansoni</i> (GABgI); EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS (GABtS) E INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (GABtI)	67
3.8) GRÁFICOS - AMINOÁCIDOS LIVRES	ANEXO 2 - PÁGINAS 28 A 40
3.8.1) FIGURA 28: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - PADRÃO 12	ANEXO 2 - PÁG. 28
3.8.2) FIGURA 29: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - HEMOLINFA DE <i>B.</i> <i>glabrata</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 29
3.8.3) FIGURA 30: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - HEMOLINFA DE <i>B.</i> <i>glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 30
3.8.4) FIGURA 31: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - HEMOLINFA DE <i>B.</i> <i>tenagophila</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 31

3.8.5) FIGURA 32: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 32
3.8.7) FIGURA 33: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - SCW DE <i>B. glabrata</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 33
3.8.8) FIGURA 34: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - SCW DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 34
3.8.9) FIGURA 35: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - SCW DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 35
3.8.10) FIGURA 36: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - SCW DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 36
3.8.12) FIGURA 37: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. glabrata</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 37
3.8.13) FIGURA 38: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. glabrata</i> INFECTADA POR <i>S. mansoni</i>	ANEXO 2 - PÁG. 38
3.8.14) FIGURA 39: PERFÍL DE ELUIÇÃO - AMINOÁCIDOS LIVRES - EXTRATO DA GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS	ANEXO 2 - PÁG. 39

3.8.15) **FIGURA 40:** PERFÍL DE ELUIÇÃO -
AMINOÁCIDOS LIVRES - EXTRATO DA
GLÂNDULA DO ALBÚMEN DE *B. tenagophila*
INFECTADAS POR *S. mansonii*

3.9) FIGURAS - ELETROFORESE EM GEL DE
POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

3.9.1) **FIGURA 28:** ELETROFORESE (SDS-PAGE) - 68
HEMOLINFA DE *B. glabrata* SADIAS (**HBgS**) E
INFECTADAS (**HBgI**); HEMOLINFA DE *B.*
tenagophila SADIAS (**HBtS**) E INFECTADAS POR
S. mansonii

3.9.2) **FIGURA 34:** ELETROFORESE (SDS-PAGE) - 74
FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO
MOLECULAR DA HEMOLINFA DE *B. glabrata*
SADIA

3.10) GRÁFICOS - TESTE DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE ATRAÇÃO MIRAXONAL
(FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA)

3.10.1) **FIGURAS 36 E 37:** ATIVIDADE 75
BIOLÓGICA - FRAÇÕES 1 E 2 - HEMOLINFA DE
B. glabrata SADIAS (CROMATOGRAFIA)

3.10.2) **FIGURAS 38 E 39:** ATIVIDADE 76
BIOLÓGICA - FRAÇÕES 3 E 4 - HEMOLINFA DE
B. glabrata SADIAS (CROMATOGRAFIA)

3.10.3) **FIGURAS 40 E 41:** ATIVIDADE 77
BIOLÓGICA - FRAÇÕES 5 E 6 - HEMOLINFA DE
B. glabrata SADIAS (CROMATOGRAFIA)

3.10.4) FIGURAS 42 E 43: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 7 E 8 - HEMOLINFA DE <i>B. glabrata</i> SADIAS (CROMATOGRAFIA)	78
3.10.5) FIGURAS 44 E 45: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 1 E 2 - HEMOLINFA DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (CROMATOGRAFIA)	79
3.10.6) FIGURAS 46 E 47: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 3 E 4 - HEMOLINFA DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (CROMATOGRAFIA)	80
3.10.7) FIGURAS 48 E 49: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 5 E 6 - HEMOLINFA DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (CROMATOGRAFIA)	81
3.10.8) FIGURAS 50 E 51: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 7 E 8 - HEMOLINFA DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (CROMATOGRAFIA)	82
3.10.9) FIGURAS 52 E 53: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 9 E 10 - HEMOLINFA DE <i>B. glabrata</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (CROMATOGRAFIA)	83
3.10.10) FIGURAS 54 E 55: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 1 E 2- HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS (CROMATOGRAFIA)	84

3.10.11) FIGURAS 56 E 57: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 3 E 4- HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS (CROMATOGRAFIA)	85
3.10.12) FIGURAS 58 E 59: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 5 E 6- HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS (CROMATOGRAFIA)	86
3.10.13) FIGURAS 60 E 61: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 7 E 8- HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> SADIAS (CROMATOGRAFIA)	87
3.10.14) FIGURAS 62 E 63: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 1 E 2- HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (CROMATOGRAFIA)	88
3.10.15) FIGURAS 64 E 65: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 3 E 5- HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (CROMATOGRAFIA)	89
3.10.16) FIGURAS 66 E 67: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 6 E 8- HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (CROMATOGRAFIA)	90
3.10.17) FIGURAS 68 E 69: ATIVIDADE BIOLÓGICA - FRAÇÕES 10 E 12- HEMOLINFA DE <i>B. tenagophila</i> INFECTADAS POR <i>S. mansoni</i> (CROMATOGRAFIA)	91
3.10.18) FIGURAS 70 E 71: ATIVIDADE BIOLÓGICA, FRENTE À OVALBUMINA (OVA) E AO TAMPÃO FOSFATO (TF) - CONTROLE	92

3.10.19) FIGURA 72: ATIVIDADE BIOLÓGICA, FRENTE À AGAROSE (AGA) - CONTROLE.	93
4) DISCUSSÃO	94
4.1) ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL	95
4.2) ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS LIVRES	102
4.3) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	112
4.4) CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	115
5) CONCLUSÃO	119
5.1) ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL	119
5.2) ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS LIVRES	120
5.3) ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)	120
5.4) CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	121
5.5) CONSIDERAÇÕES FINAIS:	122
6) RESUMO DA TESE	124
7) SUMMARY	126
8) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	EM ANEXO
9) ANEXO 1 - RELATÓRIO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA	PÁGINAS 1 A 9
10) ANEXO 2 :TABELAS 1 A 27 (ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL E PERFÍS DE AMINOÁCIDOS LIVRES	PÁGINAS 1 A 40

1.- INTRODUÇÃO

A imunidade em invertebrados é eficiente embora não conte com a produção de anticorpos e a interação de células imunocompetentes como ocorre nos vertebrados, havendo, entretanto, a participação de componentes celulares e humorais (lectinas, substâncias citotóxicas, enzimas). Em moluscos hospedeiros do *Schistosoma mansoni* infectados pelo parasita, ocorre um aumento da capacidade fagocitária dos amebócitos circulantes (Santana, 1985) bem como a liberação de substâncias citotóxicas que atuam a distância (enzimas lisossomais). Além disso, tem sido verificado um aumento de fatores solúveis contidos na hemolinfa e também no complexo gônada-glândula digestiva desses moluscos, incluindo aglutininas, opsoninas, enzimas como as aminotransferases (transaminase), a lisosima e a aminopeptidase (Christie & Michelson, 1975; Cheng et alii, 1977, 1978), fosfatase alcalina (Michelson & Dubois, 1973; Cheng & Butler, 1979), inibidores de enzimas, substâncias reativas à grupos sanguíneos e substâncias imobilizadoras de miracídios (Lie et alii, in Soulsby, E. J. L., Protozoa, Arthropods and Invertebrates, chapter 7, 211-270, Vol. IV, 1987). Através da técnica de hemaglutinação, tem sido demonstrada a presença de aglutininas na hemolinfa ou na glândula de albúmen, que reagem com eritrócitos humanos A, B e O (Gilbertson & Etges, 1967; Mello & Paraense, 1978; Stein & Basch, 1979).

A atividade hemaglutinante da hemolinfa e da glândula de albúmen dos moluscos *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* tem apresentado diferenças quando são utilizadas populações de moluscos provenientes de várias regiões geográficas. Gilbertson & Etges (1967) observaram que a hemolinfa de *B. glabrata* de Belo Horizonte e Salvador apresentaram ausência ou presença de aglutinação de hemáceas humanas e de coelhos, respectivamente. Mello & Paraense (1978) verificaram diversas atividades hemaglutinantes de extratos de glândula de albúmen de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, segundo a origem dos

moluscos coletados em diferentes regiões brasileiras (Paraná, Goiás, Bahia, Minas Gerais e Maranhão) e na Venezuela (Lago do Valença, em Maracay).

Hemaglutininas da hemolinfa e extratos de glândula de albúmen de moluscos hospedeiros de *S. mansoni* vem sendo isoladas e purificadas (Gilbertson & Etges, 1967; Mello & Paraense, 1978; Stein & Basch, 1979), porém não foi realizada a caracterização bioquímica dessas frações.

Nos moluscos gastrópodos a glândula do albúmen é um órgão sexual secundário que produz carboidratos necessários para o embrião em desenvolvimento na massa de ovos e está sob controle endócrino do sistema nervoso central. Tem uma estrutura tubular e consiste de um único tipo de célula secretória, cujo produto, o polissacarídeo galactogênio, é armazenado ao redor de cada ovo fertilizado (Crews & Yoshino, 1990). A atividade sintética da glândula do albúmen consiste de ciclos de estoque de galactogênio e formação subsequente de ovos (Wijdenes et alii, 1983).

Tem sido verificado que condições ambientes como o fotoperíodo, o jejum, a baixa temperatura e a dessecação influenciam a síntese de polissacarídeos nas glândulas do albúmen (Dogteron et alii., 1983; Veldhuijzen & Cuperus, 1976; De Jong-Brink, 1973).

Além disso, tem-se observado que a infecção por larvas de trematódeo pode alterar a síntese de galactogênio, o crescimento da glândula do albúmen e a reatividade dos hormônios nos moluscos *Lymnaea stagnalis* infectados por *Trichorobilharzia ocellata* (Bayomy et alii, 1989). Christie et alii (1974) ao estudarem a possibilidade de alteração da síntese de polissacarídeos das glândulas do albúmen de *B. glabrata* durante o curso da infecção por *S. mansoni* observaram que os níveis de galactogênio permaneciam inalterados no período de 20 a 50 dias após a infecção. Ao realizarem um estudo histológico de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* observaram não haver alterações nas quantidades de galactogênio nas glândulas do albúmen desses moluscos. Looker & Etges (1979) verificaram que as concentrações de proteína e galactogênio em ovos eliminados por *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* não foram alteradas durante o período em que a produção de ovos começava a declinar. Os autores

concluíram que a redução da produção de ovos nos moluscos infectados não era provocado pela depleção das reservas de carboidratos da glândula do albúmen. Crews & Yoshino (1990) ao estudarem a influência dos esporocistos na síntese de polissacarídeos pela glândula do albúmen de *B. glabrata* observaram não haver alterações 'in vivo' nos períodos de 14, 21 e 28 dias após a infecção. No entanto quando amostras de glândula do albúmen foram incubadas com hemolinfa de moluscos *B. glabrata* infectados por *S. mansoni* houve diferenças significativas na quantidade de polissacarídeos e galactogênio, os quais foram detectados somente nos órgãos incubados com a hemolinfa de 28 dias após infecção. Além disso, observaram também que produtos (ES) de esporocistos filhos gerados durante as primeiras 48 horas de cultura causaram uma redução significativa da síntese de polissacarídeos ou galactogênio. Tais dados demonstram que os esporocistos filhos são capazes de modular um aspecto específico da atividade reprodutora do molusco hospedeiro através de moléculas existentes na hemolinfa, oriundas do hospedeiro ou de origem parasitária, ou diretamente, através de produtos dos esporocistos (ES), 'in vitro'. Crews & Yoshino (1991) ao estudarem a influência da infecção pelo *S. mansoni* nos níveis de RNAm sob tradução e na síntese de polipeptídeo no ovotestis e glândula do albúmen fizeram as seguintes observações: 1) Reduções das quantidades de proteína total no ovotestis (OT), nos períodos de 21 e 28 dias após a infecção; 2) Aumento inicial da quantidade de proteína na glândula do albúmen (AG), no período de 14 dias após a infecção, seguido por reduções significativas nos períodos de 21 e 28 dias após infecção; 3) Reduções significativas das quantidades de polipeptídeos marcados encontrados nos sobrenadantes de culturas nos períodos de 14, 21 e 28 dias após infecção; 4) Síntese de polipeptídeo total foi reduzida nas glândulas do albúmen solubilizadas de moluscos infectados, no período de 21 e 28 dias após infecção; 4) Resultados indicaram que a infecção por larvas de trematódeo induziu um rompimento generalizado do metabolismo nos OTs e AGs de *B. glabrata*. Tais mudanças podem ter ocorrido em ambos os níveis, de transcrição e tradução, e se manifestam logo no início da infecção, durante a fase em que os esporocistos filhos começam a migrar e colonizar a glândula digestiva e ovotestis. Os autores discutem que

os efeitos da infecção pelo schistosoma, alterando a atividade metabólica dos órgãos-alvo específicos, a ovotestis (OT) e a glândula do albúmen (AG) podem ser refletidas por alterações nas concentrações de aminoácidos na hemolinfa ou proteínas em particular. Segundo Becker (1980), o maior stress do molusco infectado provavelmente ocorra quando esporocístos filhos estão crescendo em tamanho e produzindo cercárias viáveis. Os autores observaram a ocorrência do fenômeno citado por volta de 28 dias após a infecção. Entretanto, tem sido demonstrado que a maior parte dos rearranjos metabólicos ocorrem imediatamente após a infecção, quando as demandas metabólicas das larvas não são necessariamente tão grandes quanto o período mais tardio da infecção. Segundo Thompson (1985), o relacionamento fisiológico e a integração metabólica que deve ocorrer entre hospedeiro e parasita deve ser necessariamente complexo, e cada organismo deve se adaptar, de alguma forma, às condições fisiológicas do outro. Cousin et alii (1995) ao estudarem as alterações na glândula do albúmen de *B. glabrata* selecionada para não - susceptibilidade (LAC-line) ao *S. mansoni*, procuraram traçar um paralelo entre as alterações morfológicas e bioquímicas ocorridas com a glândula e a diminuição na susceptibilidade dos moluscos à infecção pelo *S. mansoni* e também a redução da fecundidade. Os autores observaram algumas anormalidades nas glândulas estudadas. Células secretórias, normalmente cuboidais em moluscos susceptíveis, foram encontradas como escamosas, nos moluscos 'Lac-Line'. Essas células continham pequenos grânulos secretórios, retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi insignificantes, comparados aos grandes grânulos e a presença significativa das organelas citadas, nas glândulas do albúmen de moluscos susceptíveis (F₀). Análises comparativas dos extratos de proteínas solúveis de F₀ e de glândulas do albúmen de moluscos 'LAC-line' mostraram diferenças qualitativas. A mais proeminente foi uma proteína de 18 Kda., encontrada em moluscos F₀, apresentou uma redução significativa nos extratos proteicos dos moluscos 'LAC-line'. Além disso, nesses moluscos, houve uma diminuição da incorporação de [³⁵S] - Metionina.

Alguns autores tem sugerido que a glândula do albúmen pode ter uma função na resposta imune frente ao parasita (Michelson & Dubois, 1977; Stein & Basch, 1979; Jeong et.

al., 1981; Boswell & Bayne, 1984). Estudos anteriores realizados pela equipe de Cousin et alii (1995), usando microscopia óptica e eletrônica, associada à imunofluorescência, indicaram que os moluscos chamados 'LAC-line' (selecionados para o caráter de não-susceptibilidade por fecundação cruzada, F3-F16) apresentaram uma resposta imune ativa contra os miracídios de *S. mansoni*, podendo destruí-los dentro de 12 horas. Sabe-se que a glândula do albúmen produz heteroaglutinina e substâncias anti-bacterianas importantes nos mecanismos gerais de defesa nos moluscos, e está envolvida na produção da massa de ovos, fornecendo componentes importantes para o desenvolvimento do embrião. Portanto, modificações dessa glândula podem afetar ao mesmo tempo, a susceptibilidade do molusco aos esquistossomas invasores e a sua capacidade reprodutiva.

O estudo dos componentes da hemolinfa de moluscos vem sendo feito por alguns pesquisadores, analisando o perfil de proteínas, aminoácidos livres, bem como íons inorgânicos, glucose e a concentração de uréia, em moluscos planorbídeos hospedeiros de *S. mansoni*, submetidos ou não à infecção. Alterações na proteína total, hemoglobina e demais frações da hemolinfa de *B. glabrata* submetidas à infecção pelo *S. mansoni* tem sido demonstradas (Lee & Cheng, 1972; Gress & Cheng, 1973; Figueiredo et alii, 1973; Anteson & Williams, 1975; Michelson & Dubois, 1975; Becker & Schmale, 1975; Schmale & Becker, 1977; Becker & Schmale, 1978; Meyer & Becker, 1980; Herberts et alii, 1986 e 1988; Granath, 1988; Rupprecht et alii, 1989). Tem sido observado, de um modo geral, que a proteína predominante é a hemoglobina, e as demais frações possivelmente sejam sub-frações desta. Discute-se a possibilidade dessas frações exercerem um papel importante na reação imune contra o parasita

Ao estudarem o metabolismo de excreção de nitrogênio de *B. glabrata*, Becker & Schmale (1975; 1978) e Schmale & Becker (1975; 1977) observaram um aumento significativo da concentração de uréia na hemolinfa e incorporação de $^{14}\text{CO}_2$ na uréia na glândula digestiva sob as condições fisiológicas de jejum de 5 dias ou de infecção pelo *S. mansoni*. Os autores afirmam ser comum à essas situações fisiológicas haver um aumento na degradação de

proteína, seguida de um aumento na produção de NH_3 , o que levaria à uma elevada concentração de amônia na hemolinfa. Segundo Meyer & Becker (1980), a intensificação da produção de uréia, tendo em vista sua concentração na hemolinfa, depende da concentração de amônia na hemolinfa. Em *B. glabrata* o ciclo da uréia serve principalmente para a desintoxicação de NH_3 (Schmale & Becker, 1977).

A interação *S. mansoni* x molusco vetor parece ser influenciada pela presença de substâncias miraxonais que atuam na atração e/ou repelência de miracídios.

Brasio et alii (1985), estudaram as substâncias quimiotáticas provenientes de moluscos planorbídeos *B. glabrata* e *B. tenagophila* em resposta à infecção pelo *S. mansoni*, observando na água de condicionamento dos moluscos (água em que os moluscos permaneciam durante 24 horas), a presença de aminoácidos livres que possivelmente atuariam como quimioatraentes para os miracídios. Provavelmente os aminoácidos encontrados na água de condicionamento correspondem aos aminoácidos livres encontrados na hemolinfa desses moluscos, visto que são produtos de excreção dessas bionfalárias.

Com relação aos aminoácidos livres presentes na hemolinfa e SCW de *B. glabrata*, estudos qualitativos e quantitativos foram realizados (Dusanic & Lewert, 1963; Targett, 1962; Gilbertson et alii, 1967; Mc Innis et alii, 1974; Wolmarans et alii, 1986; Wolmarans & Farrell, 1987), em moluscos submetidos ou não à infecção por *S. mansoni*. De um modo geral, tem sido verificada uma redução significativa das proteínas e aminoácidos livres em caramujos infectados (Malek, E.A. in **Snail Transmitted Parasitic Diseases**, Chapter 1, Vol. I (1980); Gilbertson, D. E. et alii, 1967; Lee & Cheng, 1972; Michelson & DuBois, 1975, etc.).

Wolmarans, C.T. et alii (1986), investigaram o conteúdo de aminoácidos da hemolinfa e produtos da excreção na SCW de seis espécies de moluscos de água doce, entre elas a *B. glabrata*. Foi verificado haver uma variação considerável no conteúdo de aminoácidos entre as espécies de moluscos estudadas, observando-se uma menor variação nos produtos de excreção que nas amostras de hemolinfa. Além disso, verificou-se que os aminoácidos encontrados nos produtos de excreção corresponderam aos encontrados na hemolinfa. Discute-

se a possibilidade de que aminoácidos específicos encontrados nos produtos de excreção sejam oriundos da hemolinfa ou que aminoácidos do muco sejam eliminados juntamente com os produtos de excreção.

A informação sobre a ocorrência da diminuição dos aminoácidos livres em moluscos infectados e sobre a possível correspondência entre aminoácidos livres da hemolinfa e dos produtos de excreção nos leva às seguintes questões:

a- Haveria também uma diminuição da quantidade de aminoácidos livres liberados na água de condicionamento de moluscos infectados?

b- Visto que os aminoácidos livres da água de condicionamento parecem exercer uma atração miraxonal (Brasio et alii, 1985), qual seria o comportamento dos miracídios de *S. mansoni* frente a moluscos submetidos à infecção ?

c- Haveria uma correspondência entre os aminoácidos livres da hemolinfa de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* e da água de condicionamento (SCW) desses moluscos, sadios ou infectados?

Magalhães et alii (1991), ao estudarem a atração miraxonal de miracídios de *S. mansoni* frente à molusco vetor não submetido previamente à infecção, observaram que em um caso houve repelência dos miracídios pelo caramujo, ao invés de atração. A literatura tem sugerido a existência de uma resistência dos caramujos à reinfecção (Reis, 1990).

1.1) OBJETIVOS:

Neste trabalho tivemos como objetivos principais:

- 1) Estudar a atração miraxonal da hemolinfa, água de condicionamento e extrato da glândula do albúmen em moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* frente à infecção por *S. mansoni* ou na ausência de infecção;
- 2) Estudar a composição bioquímica da hemolinfa, água de condicionamento e glândula do albúmen dos moluscos citados submetidos ou não à infecção por *S. mansoni*.

3) Verificar entre os componentes estudados sua função biológica na relação parasita x hospedeiro.

2.- MATERIAL E MÉTODOS

2.1) - RESUMO DO PROJETO EXPERIMENTAL DESENVOLVIDO:

Nosso trabalho constou basicamente de oito etapas. Na primeira etapa fizemos a padronização das amostras de hemolinfa, água de condicionamento e extrato da glândula do albúmen, escolhendo o melhor método para coleta e conservação.

Na segunda etapa realizamos a eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras de hemolinfa, dos moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectados ou não por *S. mansoni*.

Na terceira etapa iniciamos o estudo da atração miraxonal frente à miracídeos de *S. mansoni* das linhagens BH ou SJ, na presença dos moluscos *B. glabrata* ou *B. tenagophila* infectados ou não pelo *S. mansoni*. Cada um dos testes foi realizado com dez réplicas, utilizando dez miracídeos por vez. Paralelamente iniciamos a análise automática de aminoácidos livres das amostras de hemolinfa. Inicialmente fizemos a análise das amostras de hemolinfa de *B. glabrata* sadia (HBgS) e da hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (HBgI).

Na quarta etapa estudamos a atração miraxonal frente à água de condicionamento (SCW) dos moluscos infectados ou não pelo *S. mansoni*. As amostras de SCW foram estudadas individualmente ou em confronto com outra amostra, como por exemplo : na câmara A era adicionada a amostra de SCW de *B. glabrata* sadia, na câmara B a amostra de SCW de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* e no canal C, miracídeos da linhagem BH. Paralelamente fizemos a análise automática de aminoácidos livres das amostras de hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (HBtS). Posteriormente fizemos a análise de aminoácidos livres da hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (HBtI).

Na quinta etapa estudamos a atração miraxonal frente à hemolinfa dos moluscos de ambas espécies infectados ou não pelo *S. mansoni*. Paralelamente fizemos a análise automática de aminoácidos livres das amostras de água de condicionamento de *B. glabrata* sadia (WBgS)

e da água de condicionamento de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (WBgI). Posteriormente fizemos a análise da água de condicionamento de *B. tenagophila* sadia (WBtS) e da água de condicionamento de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (WBtI).

Na sexta etapa estudamos a atração miraxonal frente ao extrato de glândula do albúmen dos moluscos de ambas espécies infectados ou não por *S. mansoni*. Paralelamente fizemos a análise automática dos aminoácidos livres do extrato de glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadia (GABtS) e do extrato de glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (GABtI). Posteriormente fizemos a análise automática de aminoácidos livres do extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadia (GABgS) e do extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (GABgI).

Na sétima etapa demos início aos testes preliminares para a realização da cromatografia de exclusão molecular das amostra de hemolinfa de *B. glabrata* sadia (HBgS) e da amostra de hemolinfa *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (HBgI). Após a realização dos testes, procedemos a análise cromatográfica dessas amostras. Fizemos três réplicas para cada amostra. Paralelamente fizemos eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) das frações cromatográficas da hemolinfa de *B. glabrata* sadia (HBgS). Posteriormente fizemos a cromatografia de exclusão molecular das amostras de hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (HBtS) e de *B. tenagophila* infectada (HBtI).

Na oitava etapa realizamos o teste da atração miraxonal, escolhido para verificação da atividade biológica das frações cromatográficas da hemolinfa. Inicialmente testamos a atração miraxonal das frações da hemolinfa de *B. glabrata* sadia (HBgS) e da hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (HBgI) e posteriormente das frações da hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (HBtS) e de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (HBtI). Para essa análise tivemos três grupos-controle: 1) Agarose (usada como substrato), 2) Fosfato (usado como solvente) e 3) OVA (Ovoalbumina, proteína não relacionada à hemolinfa). Todos os testes de atração miraxonal foram realizados em dez réplicas e foram utilizados por réplica 10

miracídeos de *S. mansoni* de linhagem simpátrica aos moluscos de origem das amostras. Para os grupos-controle foram utilizados 10 miracídeos da linhagem BH.

2.2) Manutenção dos moluscos em laboratório:

Moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* foram mantidos em tanques de criação Eternit, com água sem cloro. A alimentação diária consistiu de folhas frescas de alface.

B. glabrata era procedente de Belo Horizonte, MG e *B. tenagophila* do vale do Rio Paraíba do Sul, SP.

2.3) Manutenção das linhagens de *S. mansoni* BH e SJ e infecção dos moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila*:

As linhagens BH e SJ de *S. mansoni* foram mantidas em *Mus musculus* Swiss, SPF e em moluscos simpátricos às linhagens estudadas.

Miracídeos das linhagens BH e SJ de *S. mansoni* foram obtidos de ovos colhidos em fezes de camundongos albinos Swiss, SPF, previamente infectados. A eclosão dos miracídeos e a infecção dos moluscos foi realizada segundo Standen (1951). Para a infecção dos camundongos utilizamos a técnica de Magalhães (1969).

2.4) Coleta e preparação da amostra de hemolinfa dos moluscos:

A hemolinfa dos moluscos foi coletada por punção rápida através da concha, com uma pipeta Pasteur. Os moluscos foram secos em papel higiênico após lavagem em água destilada, retirando-se o muco liberado. Imediatamente, o molusco se contraía para dentro da concha, liberando a hemolinfa que foi coletada com pipeta Pasteur. Opcionalmente, para coletar maior quantidade de hemolinfa foi feito um pequeno orifício com a ponta da pipeta na concha, sem, contudo, lesar as partes moles do animal, coletando deste modo a hemolinfa depositada no interior da concha. Em moluscos de 7 a 9 mm temos obtido por volta de 0,3 a 0,5 mL por lote de vinte animais. Esse método foi selecionado como o mais adequado, pois garante a sobrevivência da maioria dos animais após a sangria. Após a coleta, a hemolinfa

era centrifugada à 12.000 rpm por 2 minutos em centrífuga refrigerada e filtrada em membrana Millipore de 45 u, a fim de que fossem retirados todos os resíduos celulares da amostra. Posteriormente, era submetida à liofilização ou congelamento.

2.5) Estudo da atração miraxonal:

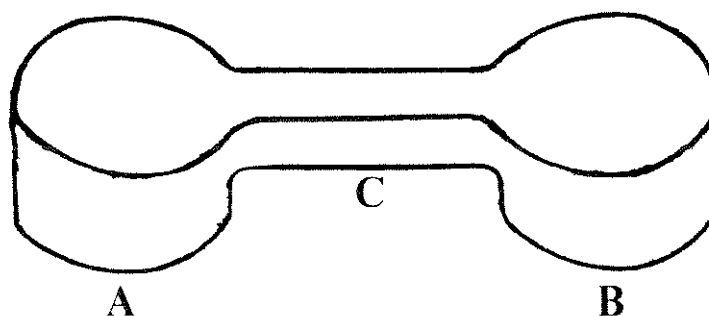
Para o estudo da atração miraxonal utilizamos um aparato de vidro com três compartimentos, câmaras A e B ligadas por um canal C (Brasio et alii, 1985).

Cada um dos experimentos consistiu de 10 replicas. Os moluscos utilizados mediam de 7 a 9 mm de diâmetro. Estudamos a atração miraxonal frente aos moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, sadios ou infectados por *S. mansoni*, sua água de condicionamento (SCW), sua hemolinfa e seu extrato da glândula do albúmen.

Os moluscos infectados eram expostos à 10 miracídios da linhagem BH ou SJ de *S. mansoni*. Em todos os experimentos utilizamos o período de duas horas após a infecção.

2.5.1) Descrição do aparelho utilizado:

O aparelho utilizado para o estudo da atração miraxonal foi construído em vidro, com as seguintes dimensões, segundo o desenho esquemático abaixo:



a) duas câmaras circulares com 30 mm de diâmetro, ligadas por um canal. Foram chamadas de câmara A e câmara B.

b) canal com 40 mm de comprimento e 11 mm de largura. Foi chamado de canal C

2.5.2) Preparo da hemolinfa em blocos de agarose:

A hemolinfa de moluscos sadios ou infectados por *S. mansoni* foi diluída na proporção de 0,4 mL de hemolinfa para 2 mL de água destilada. Em seguida foi misturada à 2 mL de agarose (Sigma) a 2%. Após a solidificação foram cortados cubinhos com o diâmetro de 7 mm, simulando um caramujo. Esses cubinhos foram usados para o estudo da atração miraxonal, frente aos miracídios de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ.

2.5.3) Preparo da SCW (Snail Conditioned Water) dos moluscos:

A água de condicionamento (Snail Conditioned Water, SCW) foi isolada segundo Brasio et alii (1985). Vinte caramujos foram colocados em aquário com água destilada e após 24 horas eram retirados e a água utilizada para o estudo da atração miraxonal.

2.5.4) Extração da glândula de albúmen dos moluscos e preparo do extrato:

Para a extração da glândula de albúmen foram usados moluscos de 7 à 9 mm de diâmetro. Os moluscos foram colocados em solução salina (NaCl 0,15 M) e em seguida comprimidos entre lâmina e laminula. As conchas eram retiradas, e com o auxílio de dois estiletes, um deles de ponta recurvada e outro mais fino e reto, extraímos a glândula de albúmen. As glândulas retiradas eram colocadas imediatamente em solução salina 0,15 M gelada, e conservadas em geladeira até o preparo do extrato, que era realizado em período de tempo mais breve possível.

A preparação do extrato foi feita segundo método descrito por Mello & Paraense (1978), com adaptações. Foram obtidos 200 mg de tecido de glândula de albúmen de moluscos *B. tenagophila* sadios e de moluscos *B. tenagophila* infectados. Cada uma das amostras foi colocada em frasco de vidro com 1,35 mL de NaCl 0,15 M.

As amostras foram homogenizadas com o Mixer - Homogenizador da Janke & Kunkel GMBH & CO.Kg, modelo T 25 (Ultraturrax T25), mantidas em gelo. Depois disso foram submetidas à centrifugação à 1500 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante (extrato cru de glândula de albúmen) foi estocado por congelamento.

O extrato da glândula de albúmen de moluscos sadios ou infectados por *S. mansoni* foi diluído na proporção de 0,4 mL de extrato para 2 mL de água destilada. Em seguida foi misturado à 2 mL de agarose a 2%. Após a solidificação foram cortados cubinhos com o diâmetro de 7 mm, simulando um caramujo. Esses cubinhos foram usados para o estudo da atração miraxonal, frente aos miracídeos de *S. mansoni* da linhagem SJ.

2.6) Análise automática de aminoácidos:

O sistema utilizado foi basicamente o do analisador Pico-Tag da Waters, onde a identificação dos aminoácidos é feita através do derivado PTC aminoácido (Feniltiocarbamil-aminoácido). A desproteínização e a derivatização (produção de derivados de aminoácidos) do extrato de glândula de albúmen foram feitas segundo metodologia descrita por Sarwar & Botting, 1990. As amostras foram desproteínizadas pela adição de um volume equivalente ao da amostra de acetonitrila, seguido de centrifugação, filtração em membrana Millipore Millex - GS de 0,2 µm. Depois disso, 50 µL do filtrado era evaporado por secagem em nitrogênio líquido, por quinze minutos, em evaporador analítico. Após a evaporação, a amostra era misturada com 50 µL de metanol + água + TEA (Tryethylamine), na proporção de 1:1:1, e novamente era passada pelo processo de evaporação, durante quinze minutos a 35°C, para remoção da amônia. A solução derivatizante consistiu da mistura de 200 µL de metanol, 50 µL de água, 50 µL de TEA (Triethylamine) e 20 µL de PITC (Phenyl-isothiocyanate). Todos os aminoácidos passaram pelo processo de derivatização (produção de derivados), através da adição de 50 µL da solução citada no tubo contendo a amostra, eram cobertos por Parafilm e deixados por vinte minutos à temperatura

ambiente. O reagente em excesso era evaporado em Nitrogênio (15 minutos, 35°C); a amostra era então redissolvida com a solução diluente (710 mg de Fosfato de hidrogênio dissódico em 1 litro de água e acetonitrila, proporção: 19: 1) e o pH era ajustado para 7.40 com ácido fosfórico para cromatografia. Depois disso, 20 µL da amostra era injetada no sistema cromatográfico.

2.7) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Foi utilizada metodologia segundo Shapiro et alii, 1967 e Weber et alii, 1969.

2.8) Cromatografia líquida de exclusão molecular da hemolinfa dos moluscos:

Foi utilizada metodologia descrita por Graff et alii, 1978; Regnier, 1983. A cromatografia de exclusão molecular foi feita sob gradiente isocrático em solução de tampão fosfato pH 7.2, em coluna SW-300 (LC-650, da Waters).

2.9) Teste da atividade biológica das frações de cromatografia da hemolinfa:

Escolhemos como atividade biológica a ser testada nas frações da cromatografia da hemolinfa a atração miraxonal, devido à sua relevância na conclusão de nossos resultados experimentais.

Para essa análise procedemos o teste de atração miraxonal de cada uma das frações cromatográficas das amostras de hemolinfa utilizadas, ou seja, de moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectados ou não pelo *S. mansoni*. Para cada uma das frações foram feitas dez réplicas. Em cada uma delas foram adicionados 10 miracídios de *S. mansoni* da linhagem BH ou SJ, simpátricas às linhagens dos moluscos utilizados. Além das frações da cromatografia procedemos o teste de atração miraxonal frente à agarose, utilizada como

substrato, ao tampão fosfato, utilizado como solvente, e à OVA (Ovalbumina), proteína não relacionada à hemolinfa. Esses foram nossos grupos- controle dos testes de atividade biológica.

2.10) Análise estatística:

A consultoria estatística de nossos resultados experimentais foi realizada pelos alunos de Pós-Graduação do IMEEC - UNICAMP, André Luís Santos de Pinho e Carla Almeida Vivacqua, sob a orientação do Prof. Dr. José F. de Carvalho.

Foi utilizado o software SAS (Statistical Analysis System) versão 6.08. O procedimento usado para a análise dos resultados do estudo da atração miraxonal foi o **CATMOD** (Categorical Modeling). Para analisar os resultados dos testes de atividade biológica das frações da cromatografia de exclusão da hemolinfa foi utilizado o teste t-Student para amostras dependentes. O relatório das análises estatísticas estão apresentadas no Anexo 1.

2.11) GRUPOS EXPERIMENTAIS:

2.11.1) Estudo da atração miraxonal:

GRUPO	Câmara A	Canal C	Câmara B
1o.	Moluscos B. glabrata não infectados por S. mansoni	10 miracídios BH	água
2o.	Moluscos B. glabrata infectados por S. mansoni	10 miracídios BH	água
3o.	SCW de B. glabrata não infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	água
4o.	SCW de B. glabrata infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	água
5o.	Moluscos B. tenagophila não infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	água
6o.	Moluscos B. tenagophila infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	água
7o.	SCW de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	água

GRUPO	Câmara A	Canal C	Câmara B
8o.	SCW de B. tenagophila infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	água
9o.	SCW de B. glabrata não infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. tenagophila infectadas por S. mansoni
10o.	SCW de B. glabrata infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni
11o.	SCW de B. glabrata infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	SCW de B. tenagophila infectadas por S. mansoni
12o.	Hemolinfa de B. glabrata não infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	água
13o.	Hemolinfa de B. glabrata infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	água
14o.	Hemolinfa de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	água

GRUPO	Câmara A	Canal C	Câmara B
15o.	Hemolinfa de B. tenagophila infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	água
16o.	Extrato de glândula do albúmen de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	água
17o.	Extrato de glândula do albúmen de B. tenagophila infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	água
18o.	Extrato de glândula do albúmen de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	SCW de B. tenagophila não infectadas S. mansoni
19o.	Extrato de glândula do albúmen de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	SCW de B. tenagophila infectadas por S. mansoni
20o.	Extrato de glândula do albúmen de B. tenagophila infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	SCW de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni

GRUPO	Câmara A	Canal C	Câmara B
21o.	Extrato de glândula do albúmen de B. tenagophila infectadas por S. mansoni	10 miracídios SJ	SCW de B. tenagophila infectadas por S. mansoni
22o.	Extrato de glândula do albúmen de B. glabrata não infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	água
23o.	Extrato de glândula do albúmen de B. glabrata infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	água
24o.	Extrato de glândula do albúmen de B. glabrata não infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	água
25o.	Extrato de glândula do albúmen de B. glabrata infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. glabrata não infectadas por S. mansoni
26o.	Extrato de glândula do albúmen de B. glabrata não infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. glabrata infectadas por S. mansoni

GRUPO	Câmara A	Canal C	Câmara B
27o.	Extrato de glândula do albúmen de B. glabrata infectadas por S. mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. glabrata infectadas por S. mansoni

2.12.2) Análise dos componentes da hemolinfa, SCW e extrato da glândula do albúmen:

GRUPO	Amostras
1o.	- Hemolinfa livre de células de B. glabrata não infectadas por S. mansoni
2o.	- Hemolinfa livre de células de B. glabrata infectadas por S. mansoni
3o.	- Hemolinfa livre de células de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni
4o.	- Hemolinfa livre de células de B. tenagophila infectadas por S. mansoni
5o.	- SCW de B. glabrata não infectadas por S. mansoni
6o.	- SCW de B. glabrata infectadas por S. mansoni
7o.	- SCW de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni
8o.	- SCW de B. tenagophila infectadas por S. mansoni
9o.	- Extrato da glândula do albúmen de B. glabrata não infectadas por S. mansoni
10o.	- Extrato da glândula do albúmen de B. glabrata infectadas por S. mansoni

GRUPO

Amostras

-
- | | |
|------|--|
| 11o. | - Extrato da glândula do albúmen de B. tenagophila não infectadas por S. mansoni |
| 12o. | - Extrato de glândula de albúmen de B. tenagophila infectadas por S. mansoni |

2.12) Denominação das amostras em siglas:

Sigla	Nome da amostra
- HBgS	- Hemolinfa de <i>B. glabrata</i> sadia (não infectada por <i>S. mansoni</i>)
- HBgI	- Hemolinfa de <i>B. glabrata</i> infectadas por <i>S. mansoni</i>
- HBtS	- Hemolinfa de <i>B. tenagophila</i> sadia (não infectada por <i>S. mansoni</i>)
- HBtI	- Hemolinfa de <i>B. tenagophila</i> infectada por <i>S. mansoni</i>
- WBgS	- Água de condicionamento (SCW) de <i>B. glabrata</i> sadia (não infectada por <i>S. mansoni</i>)
- WBgI	- Água de condicionamento (SCW) de <i>B. glabrata</i> infectada por <i>S. mansoni</i>
- WBtS	- Água de condicionamento (SCW) de <i>B. tenagophila</i> sadia (não infectada por <i>S. mansoni</i>)
- WBtI	- Água de condicionamento (SCW) de <i>B. tenagophila</i> infectada por <i>S. mansoni</i>
- GABgS	- Extrato da glândula do albúmen de <i>B. glabrata</i> sadia (não infectada por <i>S. mansoni</i>)
- GABgI	- Extrato da glândula do albúmen de <i>B. glabrata</i> infectada por <i>S. mansoni</i>
- GABtS	- Extrato da glândula do albúmen de <i>B. tenagophila</i> sadia (não infectada por <i>S. mansoni</i>)
- GABtI	- Extrato da glândula do albúmen de <i>B. tenagophila</i> infectada por <i>S. mansoni</i>

2.13) Siglas e nomes dos aminoácidos livres:

Sigla	Nome do aminoácido
PSer	Fosfoserina
Asp	Ácido aspártico
Glu	Glutamina
AAD	Ácido aminoadípico
HyPro	Hidroxiprolina
PEA	Fosfoetanolamina
Ser	Serina
Asn	Asparagina
Gly	Glicina
B-Ala	Beta alanina
Tau	Taurina
His	Histidina
GABA	Acido Amino-butírico (Gama-aminobutirato)
Cit	Citrulina
NH3	Amonio
Thr	Treonina
Ala	Alanina
BAIB	Ácido beta aminoisobutírico
Carn	Carnosina
Arg	Arginina

Sigla	Nome do aminoácido
Met.SO2	Metionina sulfona
3MH	3 - Methyl - L-histidina
AAB	Ácido alfa - amino-n-butírico
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Met	Metionina
Cyst	Cistina
Cis	Cistatione
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Norleu	Norleucina
HyLys 1	Hidroxilisina I
HyLys 2	Hidroxilisina II
Phe	Fenilalanina
Trp	Triptofano
Orn	Ornitina
Lys	Lisina
HyPro	Hidroxiprolina
Pro	Prolina
1MH	1 Metil -L- histidina
RG1	Reagente de derivatização
RG2	Reagente de derivatização

3.- RESULTADOS

3.1) Atração miraxonal frente à moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectados ou não pelo *S. mansoni* e sua SCW:

No primeiro grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro (item 2.5.1), pág. 13):

Câmara A	Canal C	Câmara B
B. glabrata não infectada por S. mansoni	10 miracídios BH	água

Observamos que em média 7,7 miracídios, dos 10 adicionados ao canal C, foram atraídos para a câmara A, onde estava o molusco. Houve portanto 77% de atração miraxonal (Tabela 1, Figura 1).

No segundo grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
B. glabrata infectada por S. mansoni	10 miracídios BH	água

Observamos que em média, 8,3 miracídios migraram em direção à câmara B, onde havia somente água do tanque filtrada e 1,7 miracídios migraram para a câmara A, em

direção ao molusco. Houve portanto 83% de migração para a câmara B e apenas 17% em direção à câmara A (Tabela 2, Figuras 1 e 2).

No terceiro grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
SCW de B. glabrata não infectada por S.mansoni	10 miracidios BH	água

Observamos que em média, 10 miracidios migraram para a câmara A, onde estava a água de condicionamento (SCW) de *B. glabrata* não infectada por *S. mansoni*. Houve portanto 100% de atração miraxonal em direção à SCW desses moluscos (Tabela 3, Figura 3).

No quarto grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
SCW de B. glabrata infectada por S. mansoni	10 miracidios BH	água

Observamos que em média, houve 84% de atração miraxonal em direção à câmara B, onde havia apenas água, e somente 16% em direção à câmara A, onde estava a SCW de *B. glabrata* infectada (Tabela 4, Figura 4, Figura 2).

No quinto grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
B. tenagophila não infectada por S.mansoni	10 miracídios SJ	água

Observamos que em média 4,4 dos 10 miracídios adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estavam os moluscos *B. tenagophila* sadios. Houve portanto 44% de atração miraxonal. Do restante dos miracídios, 41% migraram em direção à câmara B (água) e 15% permaneceram no canal C (Tabela 5, Figura 5).

No sexto grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
B. tenagophila infectada por S.mansoni	10 miracídios SJ	água

Observamos que em média 7 miracídios, dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estavam os moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni*. Houve portanto 70% de atração miraxonal. Do restante dos miracídios, 24% migraram em direção à câmara B (água) e 6% permaneceram no canal C (Tabela 6, Figura 6).

No sétimo grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
SCW de <i>B. tenagophila</i> não infectada por <i>S.mansoni</i>	10 miracídios SJ	água

Observamos que em média 6,8 miracídios, dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estava a SCW de *B. tenagophila* não infectada. Houve portanto 68% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 26% migraram para a câmara B (água) e 6% permaneceram no canal C (Tabela 7, Figura 7).

No oitavo grupo experimental foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
SCW de <i>B. tenagophila</i> infectada por <i>S.mansoni</i>	10 miracídios SJ	água

Observamos que em média 7,7 miracídios foram atraídos para a câmara A, onde estava a SCW de *B. tenagophila* infectada. Houve portanto 77% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 23% migraram para a câmara B (água), não permanecendo nenhum deles no canal C. Observamos que, assim como os moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni*, a SCW desses moluscos também atraiu mais miracídios que os moluscos sadios

e sua água de condicionamento. Frente à SCW desses moluscos houve 68% de atração miraxonal, comparado à 70% e 77% de atração miraxonal frente à moluscos infectados e à SCW desses moluscos (Tabela 8, Figura 8, Figura 6).

No nono grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
SCW de B. glabrata não infectada por S.mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. tenagophila infectada por S.mansoni

Observamos que em média, 4,7 miracídios foram atraídos para a câmara A, onde estava a SCW de *B. glabrata* sadia. Houve portanto 47% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 5 migraram para a câmara B, onde estava a SCW de *B. tenagophila* infectadas, o que corresponde à 50% de atração miraxonal. Apenas 3% permaneceram no canal C (Tabela 9, Figura 9).

No décimo grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
SCW de B. glabrata não infectada por S.mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. tenagophila não infectada por S.mansoni

Observamos que em média 2,8 miracídios foram atraídos para a câmara A, onde estava a SCW de *B. glabrata* infectada. Houve portanto 28% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, em média 6,9 miracídios migraram para a câmara B, onde estava a SCW de *B. tenagophila* sadias, o que corresponde à 69% de atração miraxonal. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 10, Figura 10).

No décimo primeiro grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
SCW de B. glabrata infectada por S.mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. tenagophila infectada por S.mansoni

Observamos que em média 2,7 miracídios, dos 10 adicionados no canal C migraram para a câmara A, onde estava a SCW de *B. glabrata* infectada, o que corresponde à 27% de atração miraxonal, 7,1 miracídios migraram em direção à câmara B, onde estava a SCW de *B. tenagophila* infectada, havendo portanto 71% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 2% deles permaneceram no canal C (Tabela 11, Figura 11).

3.1.2) Atração miraxonal frente à hemolinfa dos moluscos infectados ou não pelo *Schistosoma mansoni*:

No décimo segundo grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
B. glabrata não infectada por S.mansoni	10 miracídios BH	água

Observamos que em média 7,2 miracídeos, dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estava a hemolinfa de *B. glabrata* sadia. Houve portanto 72% de atração miraxonal. Do restante, uma média de 2,7 miracídeos migraram para a câmara B onde havia apenas água, oque corresponde à 27% de atração miraxonal. Apenas 0,1% dos miracídeos permaneceram no canal C (Tabela 12, Figura 12).

No décimo terceiro grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Hemolinfa de B. glabrata infectada por S. mansoni	10 miracídeos BH	água

Observamos que em média 6,1 miracídeos, dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estava a hemolinfa de *B. glabrata* infectada. Houve portanto 61% de atração miraxonal. Dos miracídeos restantes, em média, 39% migraram para a câmara B, onde havia apenas água e nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 13, Figura 13).

No décimo quarto grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Hemolinfa de B. tenagophila não infectada S. mansoni	10 miracídeos SJ	água

Observamos que em média 7,1 miracídios foram atraídos para a câmara A, onde estava a hemolinfa de *B. tenagophila* sadia. Houve portanto 71% de atração de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 29% migraram para a câmara B, onde havia apenas água. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 14, Figura 14).

No décimo quinto grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Hemolinfa de <i>B. tenagophila</i> infectada por <i>S. mansoni</i>	10 miracídios SJ	água

Observamos que em média, 8,5 miracídios foram atraídos para a câmara A, onde estava a hemolinfa de *B. tenagophila* infectada. Houve portanto 85% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 15% migraram para a câmara B, onde havia apenas água. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 15, Figura 15).

3.1.3) Atração miraxonal frente ao extrato da glândula do albúmen dos moluscos infectados ou não pelo *S. mansoni* e o confronto entre esses extratos e a SCW:

No décimo sexto grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de <i>B. tenagophila</i> não infectada por <i>S. mansoni</i>	10 miracídios SJ	água

Observamos que em média 6,5 miracídios, dos 10 adicionados no canal C migraram para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadia, o que corresponde à 65% de atração miraxonal. Do restante, em média, 34% migraram para a câmara B, onde havia somente água. Apenas 0,1% permaneceram no canal C (Tabela 16, Figura 16).

No décimo sétimo grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de <i>B. tenagophila</i> infectada por <i>S.mansoni</i>	10 miracídios SJ	água

Observamos que em média 7,2 miracídios, dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectada. Houve portanto 72% de atração miraxonal. Do restante, uma média de 2,8 miracídios migraram para a câmara B, onde havia apenas água, o que corresponde à 28% de atração miraxonal. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 17, Figura 17).

No décimo oitavo grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de <i>B. tenagophila</i> não infectada por <i>S. mansoni</i>	10 miracídios SJ	SCW de <i>B. tenagophila</i> não infectada por <i>S. mansoni</i>

Observamos que em média 8,2 miracídios, dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* não infectada. Houve portanto 82% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, em média, 18% migraram para a câmara B, onde havia SCW de *B. tenagophila* não infetada por *S. mansoni*. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 18, Figura 18).

No décimo nono grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de B. tenagophila não infectada por S.mansoni	10 miracídios SJ	SCW de B. tenagophila infectada por S. mansoni

Observamos que em média 8,8 miracídios foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* não infectada. Houve portanto 88% de atração miraxonal . Dos miracídios restantes, 12% migraram para a câmara B, onde havia SCW de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 19, Figura 19).

No vigésimo grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula da glândula do albúmen de <i>B. tenagophila</i> infectada por <i>S. mansoni</i>	10 miracídios SJ	SCW de B. tenagophila não infectada por S.mansoni

Observamos que em média, 8,3 miracídios foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*. Houve portanto 83% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 17% migraram para a câmara B, onde havia SCW de *B. tenagophila* não infectada por *S. mansoni*. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 20, Figura 20).

No vigésimo primeiro grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de B. tenagophila infectada por S.mansoni	10 miracídios SJ	SCW de B. tenagophila infectada por S. mansoni

Observamos que em média, 8,2 miracídios, dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectada. Houve portanto 82% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 18% migraram para a câmara B, onde estava a SCW de *B. tenagophila* infectada, havendo portanto 18% de atração miraxonal. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 21, Figura 21).

No vigésimo segundo grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de B. glabrata não infectada por S. mansoni	10 miracídios SJ	água

Observamos que em média 8,5 miracídios, dos 10 adicionados no canal C migraram para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadia, o que corresponde à 85% de atração miraxonal. Do restante, 1,5 migraram em direção à câmara B, onde havia somente água, havendo portanto 15% de atração miraxonal. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 22, Figura 22).

No vigésimo terceiro grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de B. glabrata infectada por S. mansoni	10 miracídios BH	água

Observamos que em média 7,5 miracídios dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* infectada. Houve portanto 75% de atração miraxonal. Do restante, uma média de 2,4 miracídios migraram para a câmara B, onde havia apenas água, o que corresponde à 24% de atração miraxonal. Apenas 1% permaneceu no canal C (Tabela 23, Figura 23).

No vigésimo quarto grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de B. glabrata não infectada por S.mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. glabrata não infectada por S.mansoni

Observamos que em média 7,8 miracídios, dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* não infectada. Houve portanto 78% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, em média, 22% migraram para a câmara B, onde havia SCW de *B. glabrata* sadia e nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 24, Figura 24).

No vigésimo quinto grupo experimental realizado foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de B. glabrata infectada por S.mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. glabrata não infectada por S.mansoni

Observamos que em média 7,9 miracídios foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* não infectada. Houve portanto 79% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 21% migraram para a câmara B, onde havia SCW de *B. glabrata* sadia. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 25, Figura 25).

No vigésimo sexto grupo experimental foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de B. glabrata não infectada por S.mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. glabrata infectada por S.mansoni

Observamos que em média, 7,4 miracídios foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* não infectada. Houve portanto, 75% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 25% migraram para a câmara B, onde estava a SCW de *B. glabrata* infectada. Apenas 1% permaneceu no canal C (Tabela 26, Figura 26).

No vigésimo sétimo grupo experimental foram adicionados aos compartimentos do aparato de vidro:

Câmara A	Canal C	Câmara B
Extrato da glândula do albúmen de B. glabrata infectada por S.mansoni	10 miracídios BH	SCW de B. glabrata infectada por S.mansoni

Observamos que em média, 8,3 miracídios, dos 10 adicionados no canal C foram atraídos para a câmara A, onde estava o extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* infectada. Houve portanto 83% de atração miraxonal. Dos miracídios restantes, 1,7 migraram para a câmara B, onde a SCW de *B. glabrata* infectada, havendo portanto 17% de atração miraxonal. Nenhum deles permaneceu no canal C (Tabela 27, Figura 27).

3.2) ANÁLISE AUTOMÁTICA DE AMINOÁCIDOS

3.2.1) Análise do conteúdo de aminoácidos livres na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* sadias ou infectadas por *S. mansoni*:

O padrão contendo 35 componentes, incluindo aminoácidos e derivados de aminoácidos, revelou uma boa separação de cada um deles (Anexo 2, Figura 1, Pág. 28). Os aminoácidos livres foram determinados nas amostras de hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* sadias ou infectadas por *S. mansoni*. Os perfis de eluição das amostras são mostradas nas figuras 2 a 5 (Anexo 2, Págs. 29 a 32). De um modo geral, todos os aminoácidos encontrados foram identificados satisfatoriamente, tendo como referência o padrão (Figura 1, Anexo 2).

Na hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS) foram encontrados 28 componentes, enquanto que na hemolinfa de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* foram encontrados 31 (Tabela 28), incluindo aminoácidos livres e derivados.

De um modo geral, observamos haver um aumento da concentração de aminoácidos livres na hemolinfa de moluscos infectados por *S. mansoni* (HBgl), em relação à hemolinfa de moluscos sadios (HBgS). Os componentes Cis, NH₃, e Cyst apresentaram concentrações menores na HBgl que na HBgS. Os componentes AAB, Arg, Carn e HyPro foram encontrados somente na hemolinfa dos moluscos infectados (HBgl).

Na hemolinfa de *B. tenagophila* sadios (HBtS) foram encontrados 28 componentes, enquanto que na hemolinfa de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* (HBtl) foram encontrados 33 (Tabela 28).

Segundo os resultados obtidos, pudemos observar uma redução do conteúdo dos componentes encontrados na hemolinfa (aminoácidos livres e derivados) de *B. tenagophila* infectadas (HBtl) em relação ao encontrado na hemolinfa dos moluscos sadios. Os

componentes HyLys2, 3MH, AAD, Carn e Cit foram encontrados somente na hemolinfa dos moluscos infectados por *S. mansoni*. Os demais apresentaram redução ou concentrações semelhantes à HBtS (Tabela 28, Figuras 4 e 5, Anexo 2).

3.2.2) Análise do conteúdo de aminoácidos livres na água de condicionamento (SCW) de *B. glabrata* e *B. tenagophila* sadias ou infectadas por *S. mansoni*:

Os componentes (aminoácidos livres e derivados) foram identificados nas amostras de água de condicionamento (SCW) de *B. glabrata* e *B. tenagophila* sadios ou infectados por *S. mansoni*. Os perfis de eluição das amostras são mostrados nas figuras 6 a 9 (Anexo 2, págs 33 a 36). De um modo geral, todos os aminoácidos foram identificados satisfatoriamente, tendo como referência o padrão (Figura 1, pág. 28, Anexo 2).

Na SCW de *B. glabrata* sadias (HBgS) foram encontrados 19 componentes (aminoácidos livres e derivados), enquanto que na SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* foram encontrados 17 (Tabela 29).

De um modo geral, observamos haver uma diminuição da concentração dos componentes encontrados na água de condicionamento (SCW) de *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni* em relação às concentrações encontradas na SCW desses moluscos não infectados pelo parasita.

Os componentes B-Ala, Arg, AAB, Met, Cys, Ile, Leu, Hylys-1, Hylys-2, Phe e Lys foram encontrados em menor concentração na amostra de SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* em relação aos valores encontrados na amostra de SCW de *B. glabrata* sadias. Os componentes P-Ser, Ser, Asn, Ala e Cyst foram encontrados somente na SCW de *B. glabrata* sadias e os componentes NH₃ e Thr foram encontrados somente na SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*.

Ao compararmos as amostras de SCW de *B. glabrata* sadias (WBgS) e infectadas por *S. mansoni* (WBgI) verificamos que o componente Rg-2 foi encontrado em maior

concentração em ambas as amostras, ou seja, de 397,01 $\mu\text{moles}/250\text{ mL}$ de água (SCW) na WBgS e de 331,56 $\mu\text{moles}/250\text{ mL}$ de água na WBgI (Tabela 29, Figuras 6 e 7, Anexo 2). Segundo informações obtidas da Waters, os componentes Rg-1 e também RG-2 seriam reagentes de derivatização (derivados de aminoácidos).

Os componentes Val, Met, Leu e Hylys-1 foram encontrados em menor concentração na SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* em relação à SCW de *B. tenagophila* sadias. Os componentes Glu, AAD, GABA, Cit, 3-MH, AAB, Cyst, Ile, Phe, Trp e Lys foram encontrados somente na SCW de *B. tenagophila* sadias e os componentes PSer, Ser, Asn, Gly, NH_3 , Thr, Ala e Hylys-2 foram encontrados somente na amostra de SCW de *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni*.

Observamos haver um aumento significativo na concentração de alguns componentes na SCW de *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni* em relação ao encontrado na SCW de *B. tenagophila* sadias. Os referidos componentes, relacionados em ordem decrescente, são os seguintes:

Aminoácidos livres ou derivados	WBtS	WBtI
Tyr	3,50	957,64
Rg-2	29,95	359,16
Cys	5,87	107,20

* concentração dada em $\mu\text{moles}/250\text{ mL}$ de água

O aminoácido livre Asn foi encontrado somente na WBtI, na concentração de 206,82 $\mu\text{moles}/250\text{ mL}$ de água de condicionamento (SCW).

3.2.3) Análise do conteúdo de aminoácidos livres no extrato da glândula do albúmen dos moluscos infectados ou não pelo *S. mansoni*:

Estudamos o conteúdo de aminoácidos livres nas amostras de glândula do albúmen de *B. glabrata* sadias ou infectadas por *S. mansoni* e nas amostras de *B. tenagophila* sadias ou infectadas por *S. mansoni*. As amostras foram denominadas da seguinte forma: - Extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadias, **GABgS**; - Extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*, **GABgI**; - Extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadias, **GABtS**; - Extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*, **GABtI**.

A análise automática dos aminoácidos livres das amostras de glândula do albúmen de *B. glabrata* sadias ou infectadas por *S. mansoni* mostrou os seguintes resultados:

1) Em **GABgS** observamos um total de 4 componentes e em **GABgI**, um total de 5 componentes, incluindo aminoácidos livres e derivados (Tabela 30, Figuras 10 e 11, Anexo 2, págs. 37 e 38);

2) O aminoácido livre **Asp** variou de 8,49 umoles/100 mL (**GABgS**) para 57,65 μ moles/100 mL em **GABgI**;

3) O aminoácido livre **Orn** variou de 14,22 μ moles/100 mL (**GABgS**) para 1,79 μ moles/100 mL em **GABgI**;

4) Os aminoácidos **PSer** e **Lys** foram encontrados em ambas as amostras e o componente **RG-2** foi encontrado somente em **GABgS**.

A análise automática de aminoácidos livres do extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadios ou infectados por *S. mansoni* mostrou os seguintes resultados:

1) Em **GABtS** observamos um total de 7 componentes e em **GABtI**, um total de 5 componentes, incluindo aminoácidos livres e derivados (Tabela 30, Figuras 12 e 13, Anexo 2, págs. 39 e 40);

2) O aminoácido livre **Asp** variou de 46,56 μ moles/100 mL (**GABtS**) para 6,96 μ moles/100 mL em **GABtI**;

3) O aminoácido **His** foi encontrado na concentração de 38,8 μ moles/100 mL em **GABtS** e esteve ausente em **GABtI**;

4) Os aminoácidos **PSer**, **B-Ala**, **Cys** e **Leu** e o componente RG-1 foram encontrados nas duas amostras em concentrações semelhantes.

3.3) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) das amostras de hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectados ou não pelo *S. mansoni*:

Para a corrida eletroforética foram adicionados 5 μ l das amostras de hemolinfa de *B. glabrata* ou *B. tenagophila* sadias ou infectadas por *S. mansoni* nos compartimentos da placa de gel. A concentração proteica das amostras de hemolinfa foi em média de 15 mg/ml. O padrão de peso molecular usado está citado na legenda da Figura 29.

Obtivemos um bom perfil de bandas, permitindo a visualização geral das frações proteicas encontradas nas quatro amostras de hemolinfa testadas (Figura 29). Observamos algumas bandas nítidas, entre 40 a 66 Kda em todas as amostras de hemolinfa testadas. Acima de 66 Kda, encontramos várias outras bandas, que foram visualizadas com maior nitidez nas amostras de hemolinfa de *B. glabrata* sadias (**BgS**) e de *B. glabrata* infectadas (**BgI**), nas amostras de hemolinfa de *B. tenagophila* sadias (**BtS**) e de *B. tenagophila* infectada (**BtI**) observamos algumas bandas nesta faixa de peso molecular, com menor nitidez.

As amostras de hemolinfa de *B. glabrata* sadias (**BgS**) e de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* (**BgI**) apresentaram perfis idênticos, com bandas bem definidas. O mesmo não parece ter ocorrido com as amostras de hemolinfa de *B. tenagophila* sadias (**BtS**) ou infectadas por *S. mansoni* (**BtI**). Algumas frações de peso molecular entre 24,0 e 45,0 Kda,

presentes na hemolinfa de *B. tenagophila* sadias (**BtS**) estiveram ausentes na hemolinfa desses moluscos infectados (**BtI**).

3.4) Cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de moluscos infectados ou não pelo *S. mansoni*:

A cromatografia de exclusão molecular foi feita sob gradiente isocrático em tampão fosfato pH 7.2, em coluna SW-300 (LC-650 E, da Waters).

Inicialmente fizemos um teste para padronização das condições a serem utilizadas na análise cromatográfica (Figura 30). Para esse teste utilizamos a amostra de hemolinfa de *B. glabrata* não infectada por *S. mansoni* (HBgS), e concluímos que as condições ideais para a cromatografia dessas amostras seria: fluxo de 0,2 ml por minuto, densidade óptica de 280 nm e absorbância 1.

Posteriormente, fizemos a cromatografia da amostra de hemolinfa de *B. glabrata* sadia (HBgS), nas condições pré-estabelecidas. Na primeira corrida, utilizamos 100ul da amostra e a densidade óptica de 280 nm (Figura 31). Na segunda, mantivemos as mesmas condições e na terceira, utilizamos 200 ul da amostra e a mesma densidade óptica, de 280 nm. Nas três corridas observamos haver predominância de uma fração, eluída no primeiro pico, correspondente à hemoglobina e outras frações menores, provavelmente sub-frações da hemoglobina ou outras proteínas de baixo peso molecular.

Em seguida fizemos a cromatografia de exclusão molecular da amostra de hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (HBgI), utilizando as condições padronizadas. Realizamos três aplicações da amostra. O resultado da primeira aplicação da amostra está apresentado na Figura 32. Nas três corridas realizadas observamos haver predominância da fração eluída nos primeiros picos, correspondentes à molécula de hemoglobina e outras pequenas frações, semelhante aos resultados encontrados com a amostra de hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS).

Posteriormente, fizemos a cromatografia de exclusão molecular da amostra de hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (HBtS), seguindo as mesmas condições previamente

padronizadas. Foram realizadas três aplicações da amostra. O resultado da segunda aplicação está apresentado na **Figura 33**. Nas três corridas realizadas observamos também haver um predomínio da fração eluída nos primeiros picos, correspondente à hemoglobina e as demais frações pequenas, semelhantes às outras amostras de hemolinfa testadas.

Depois disso, fizemos a cromatografia de exclusão molecular da amostra de hemolinfa de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* (HBtI), seguindo às condições padronizadas. Como nos experimentos anteriores, realizamos três aplicações da amostra. Nas três aplicações obtivemos perfil semelhante ao encontrado nas demais amostras de hemolinfa testadas. Houve predomínio da fração eluída nos primeiros picos, correspondente à hemoglobina, e as outras frações menores. O resultado da primeira corrida está apresentado na **Figura 34**.

3.4.1) Teste da atividade biológica das frações da cromatografia - Atração miraxonal:

Escolhemos como atividade biológica a atração miraxonal em substituição ao teste de hemaglutinação de hemáceas por essa atividade ser reconhecida nas duas espécies de moluscos estudados e pela sua relevância na complementação de nossos dados experimentais.

Procedemos o teste de atração miraxonal em cada uma das frações cromatográficas da hemolinfa de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* infectadas ou não pelo *S. mansoni*. Observamos haver atração miraxonal em todas as frações (Figuras 36 à 67).

Fizemos também três grupos controle: *Teste de atração miraxonal frente: 1) à OVA (Ovalbumina), proteína não relacionada à hemolinfa, 2) ao tampão fosfato pH 7.2, usado como solvente, e 3) à agarose, usada como substrato para as amostras de hemolinfa (Figuras 91 à 93). Observamos haver 75% de atração miraxonal frente à OVA (Figura 68); o tampão fosfato e a agarose não apresentaram a atividade de atração miraxonal (Figuras 69 e 70).

Esses resultados foram confirmados com a análise estatística de nossos resultados (Anexo 1, págs. 7 a 13).

3.4.2) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page) das frações de cromatografia da hemolinfa dos moluscos sadios ou infectados pelo *S. mansoni*:

Inicialmente fizemos a eletroforese em gel de poliacrilamida das frações de cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* não infectada por *S. mansoni* (HBgS). Para a corrida eletroforética foram adicionados 5 µl da amostra de hemolinfa de *B. glabrata* sadias e a mesma quantidade de cada uma das frações cromatográficas. A concentração média estimada de proteínas na amostra de hemolinfa foi de 15 mg/ml. O padrão de peso molecular utilizado está descrito na legenda da **Figura 35**.

Tivemos dificuldades para a diluição das amostras correspondentes às frações cromatográficas liofilizadas e tentamos utilizar vários métodos para solucionar o problema, incluindo a tentativa de um gradiente. Procuramos mudar o tipo de coloração, para verificar as frações que havíamos procurado solubilizar haviam se dissolvido e se a visualização das bandas seria melhor.

Quanto à hemolinfa total de *B. glabrata* sadias encontramos um perfil semelhante ao encontrado anteriormente na eletroforese em SDS-PAGE. Obtivemos um bom perfil das bandas correspondentes às frações proteicas (Figura 35). Quanto ao perfil proteico encontrado nas frações cromatográficas da hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS), observamos a presença de bandas proteicas em todas as frações cromatográficas testadas. No entanto, devido à utilização da coloração por prata não foi possível distinguí-las com segurança. Foram testadas sete amostras, uma correspondente à hemolinfa total (Hem) e as outras seis correspondentes às frações da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS). Na verdade, foram isoladas oito frações através da cromatografia dessa amostra, mas duas delas foram impossíveis de serem dissolvidas.

Ao realizarmos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das frações da cromatografia da hemolinfa de *B. glabrata* infectadas (HBgI), da hemolinfa de *B. tenagophila* sadias (HBtS) e da hemolinfa de *B. tenagophila* infectada (HBtI) não obtivemos um perfil satisfatório de bandas de peso molecular correspondentes às frações cromatográficas. Suspeitamos que a dificuldade de visualização das bandas tenha ocorrido devido à quantidade mínima de proteína existente em cada fração, e que isso tenha ocorrido devido ao tampão utilizado para as corridas da cromatografia de exclusão molecular, o tampão-fosfato pH 7.2 (não mostrado).

Fig. 1

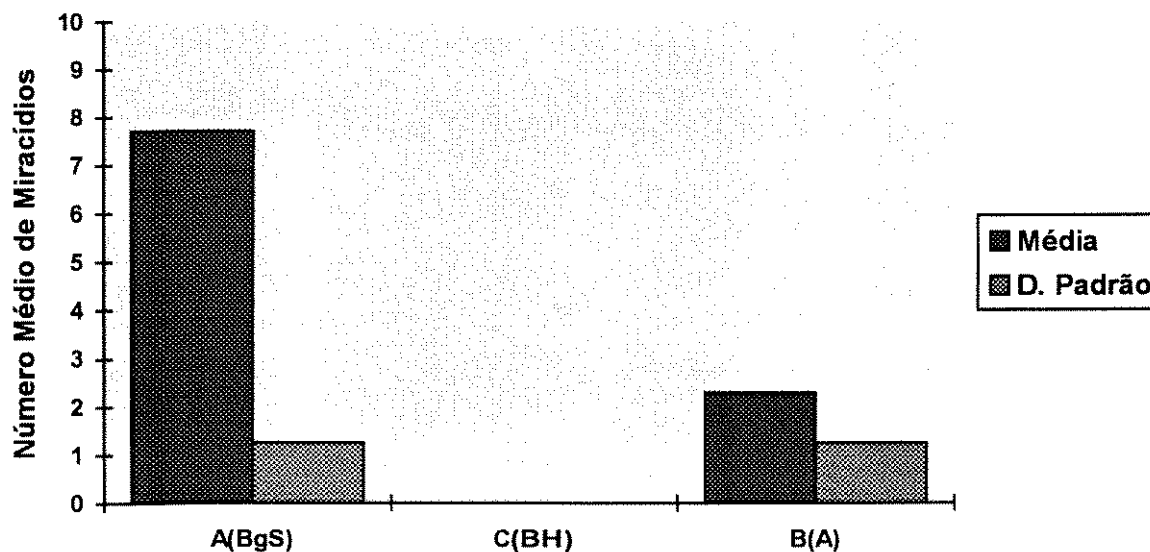
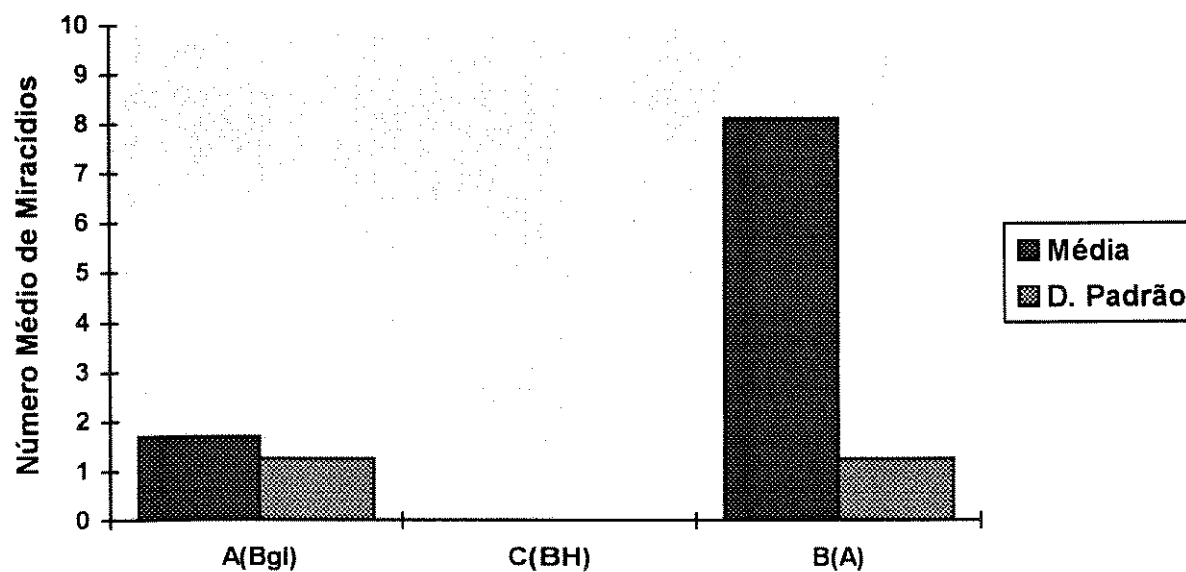


Fig. 2



FIGURAS 1 E 2: Estudo da atração miraxonal frente à *B. glabrata* sadia (Fig. 1) ou infectada por *S. mansoni* (Fig. 2). Eixo X: A(BgS) = Câmara A, onde era colocado o molusco sadio; A(Bgl) = Câmara A, onde era colocado o molusco infectado; C(BH) = canal C, onde eram adicionados os miracídeos BH; B(A) = Câmara B, onde continha água. Eixo Y: Média do número de miracídeos encontrados nas câmaras A ou B ou no canal C e o desvio padrão.

Fig. 3

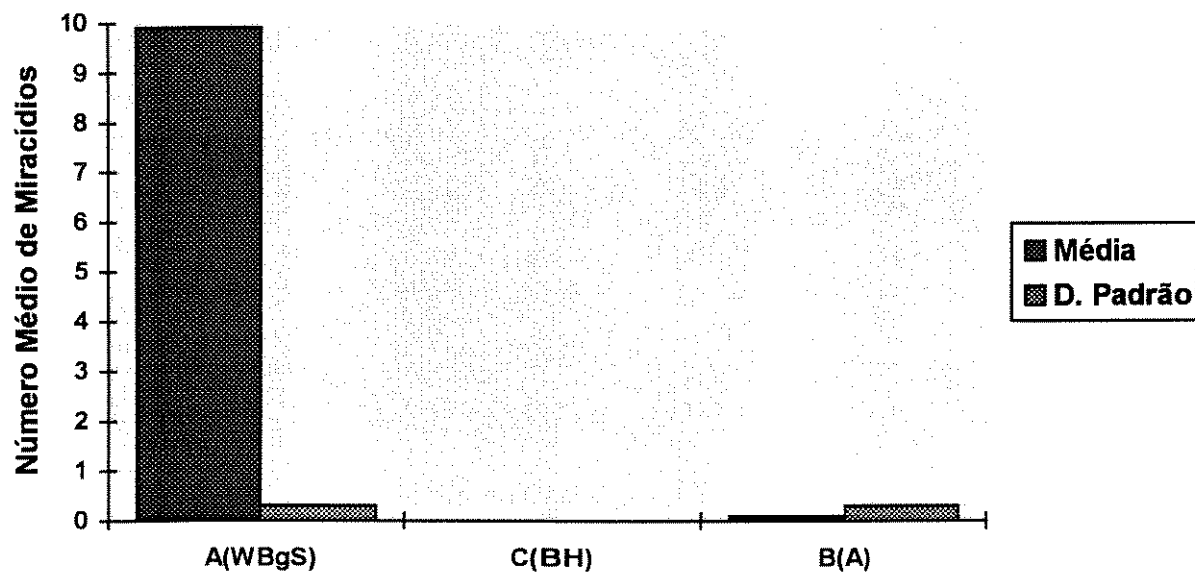
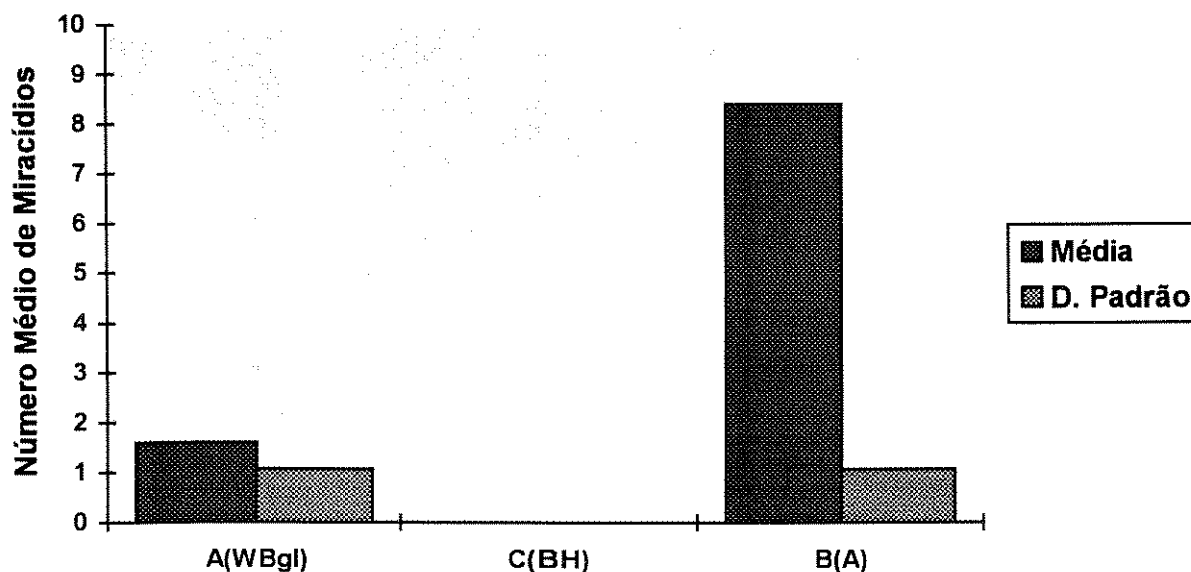


Fig. 4



FIGURAS 3 E 4: Estudo da atração miraxonal frente à água de condicionamento (SCW) de *B. glabrata* sadias (Fig. 3) ou infectadas por *S. mansoni* (Fig. 4). Eixo X: A(WBgS) = Câmara A, onde era depositada a SCW de *B. glabrata* sadia; A(WBgI) = Câmara A, onde era depositada a SCW de *B. glabrata* infectada; C(BH) = canal C, onde eram adicionados os miracídeos BH; B(A) = Câmara B, onde continha água. Eixo Y: Média do número de miracídeos encontrados nas câmaras A ou B ou no canal C e o desvio padrão.

Fig. 5

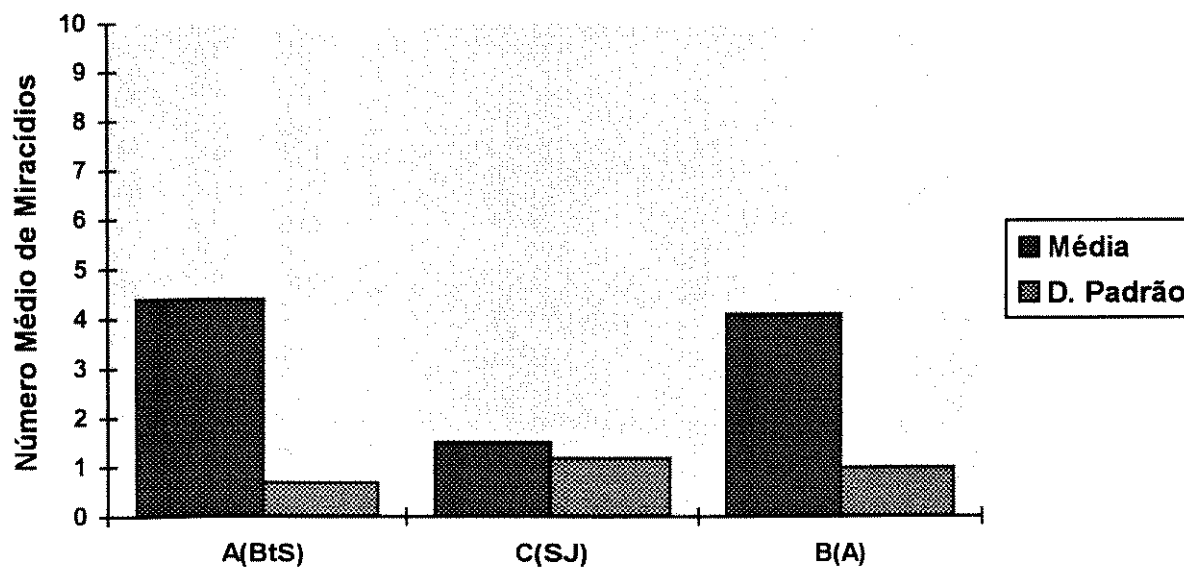
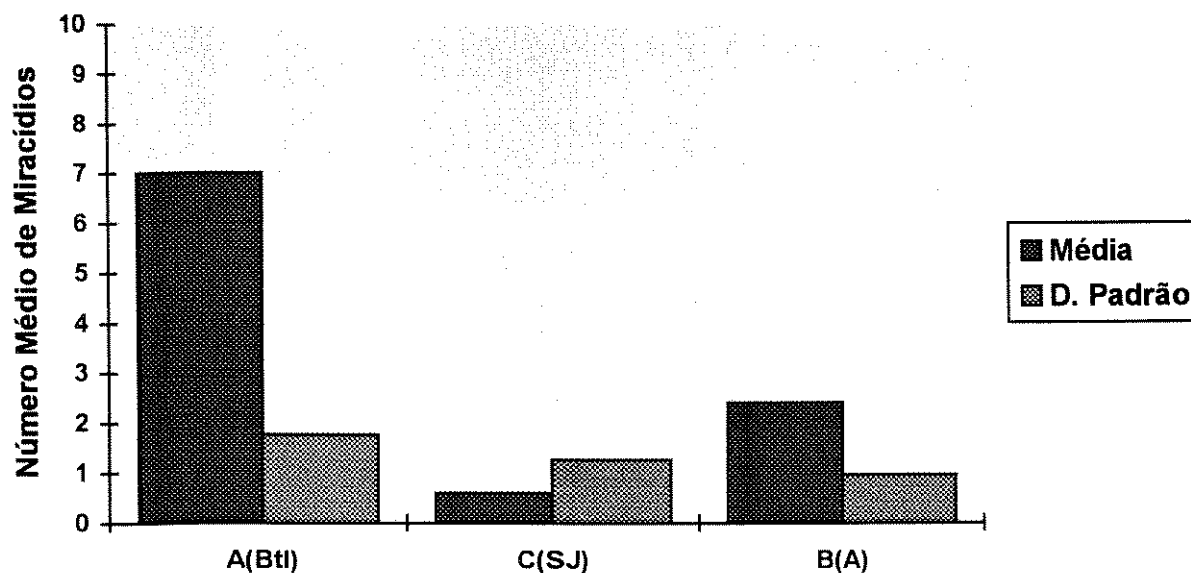


Fig. 6



FIGURAS 5 E 6: Estudo da atração miraxonal frente à *B. tenagophila* sadias (Fig. 5) ou infectadas por *S. mansoni* (Fig. 6). Eixo X: A(BtS) = Câmara A, onde era depositada *B. tenagophila* sadia; A(BtI) = Câmara A, onde era depositada *B. tenagophila* infectada; C(BH) = canal C, onde eram adicionados os miracidios BH; B(A) = Câmara B, onde continha água. Eixo Y: Média do número de miracidios encontrados nas câmaras A ou B ou no canal C e o desvio padrão.

Fig. 7

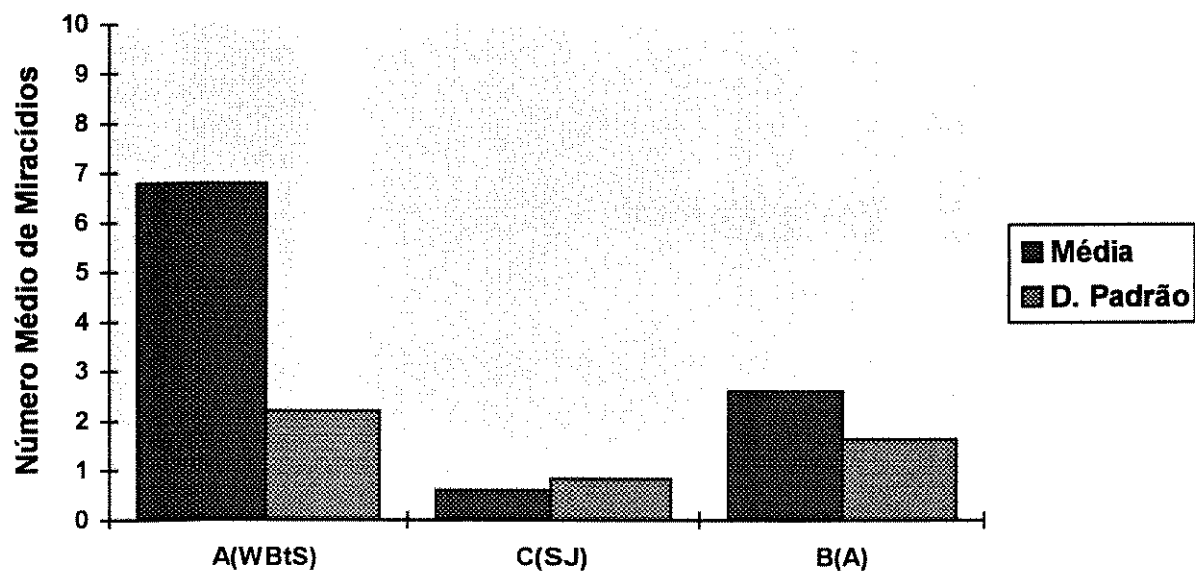
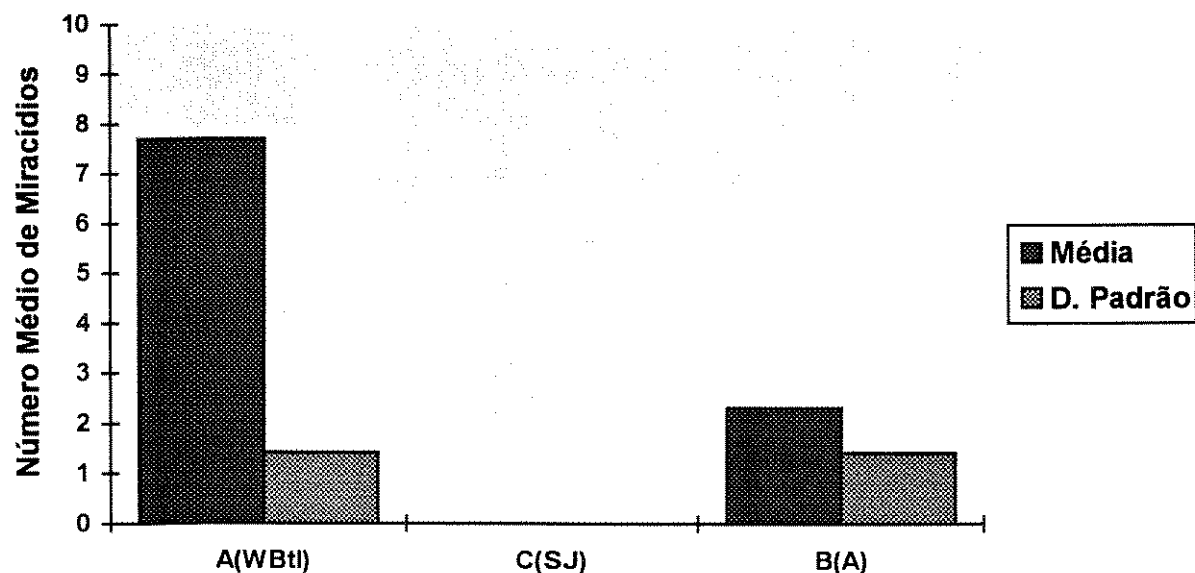


Fig. 8



FIGURAS 7 E 8: Estudo da atração miraxonal frente à água de condicionamento (SCW) de *B. tenagophila* sadias (Fig. 7) ou infectadas por *S. mansoni* (Fig. 8). Eixo X: A(WBtS) = Câmara A, onde era depositada a SCW de *B. tenagophila* sadia; A(WBtI) = Câmara A, onde era depositada a SCW de *B. tenagophila* infectada; C(BH) = canal C, onde eram adicionados os miracídeos BH; B(A) = Câmara B, onde continha água. Eixo Y: Média do número de miracídeos encontrados nas câmaras A ou B ou no canal C e o desvio padrão.

Fig. 9

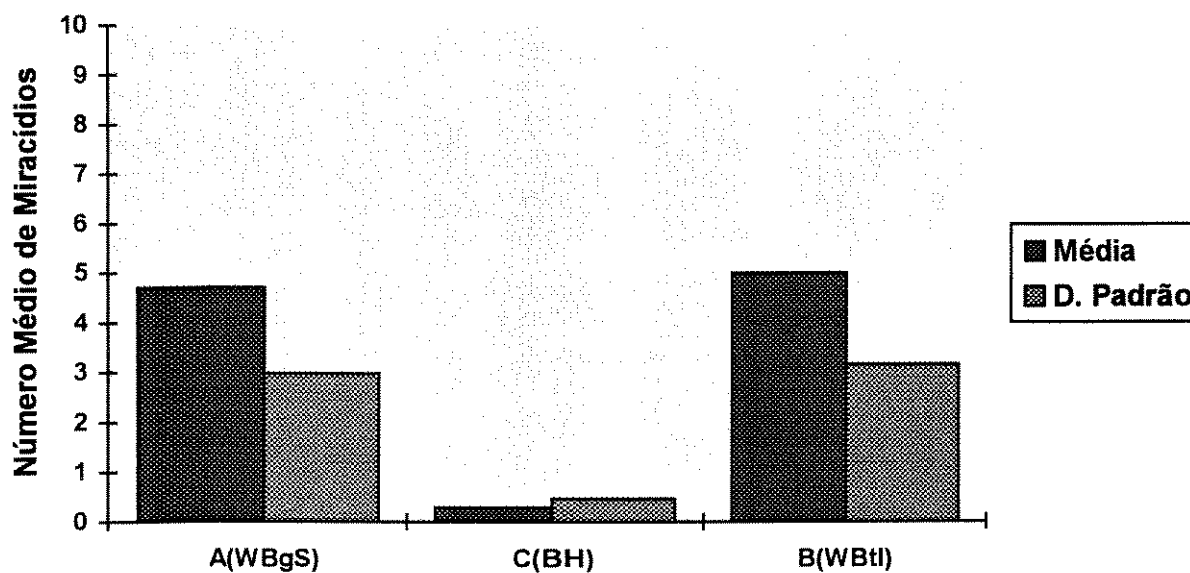
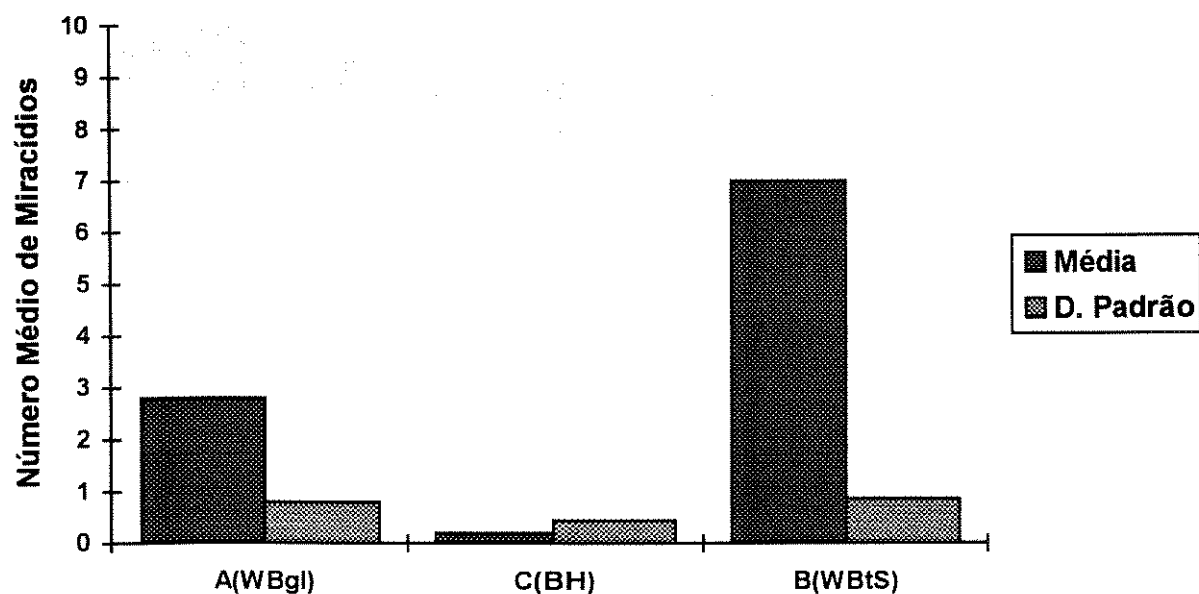


Fig. 10



FIGURAS 9 E 10: Estudo da atração miraxonal frente ao confronto da água de condicionamento (SCW) de *B. glabrata* e *B. tenagophila* sadias ou infectadas por *S. mansoni*. Eixo X(Fig. 9): A(WBgS) = Câmara A, contendo SCW de *B. glabrata* sadia; B(WBtI) = Câmara B, contendo SCW de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*. Eixo X(Fig. 10): A(WBgI) = Câmara A, contendo SCW de *B. glabrata* infectada; B(WBtS) = Câmara A, contendo SCW de *B. tenagophila* sadia. C(BH): Canal C, onde eram depositados miracídeos BH (Figs 9 e 10). Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C e o desvio padrão.

Fig. 11

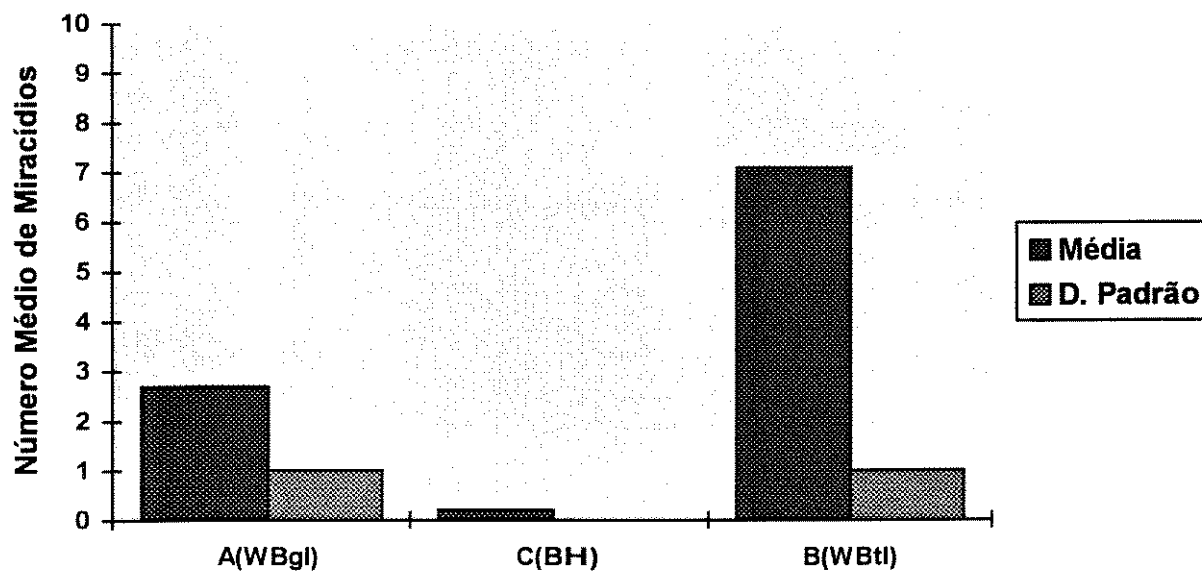


FIGURA 11: Estudo da atração miraxonal frente ao confronto da água de condicionamento (SCW) de *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*. Eixo X: A(WBgl) = Câmara A, contendo SCW de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*; B(WBtl) = Câmara B, contendo SCW de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*; C(BH): Canal C, onde eram depositados miracídeos BH. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C e o desvio padrão.

Fig. 12

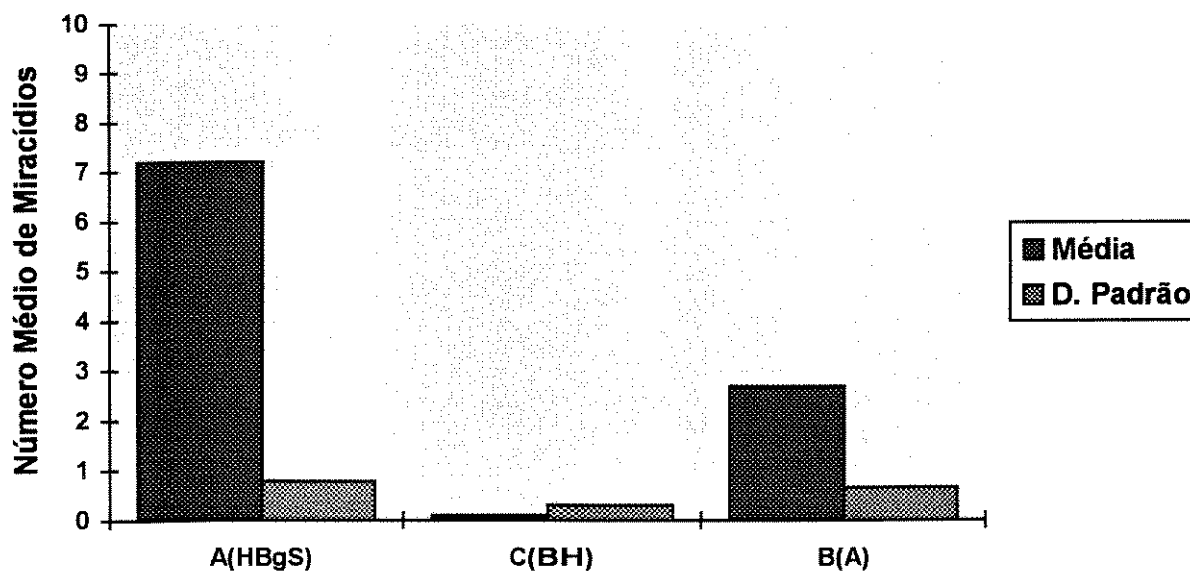
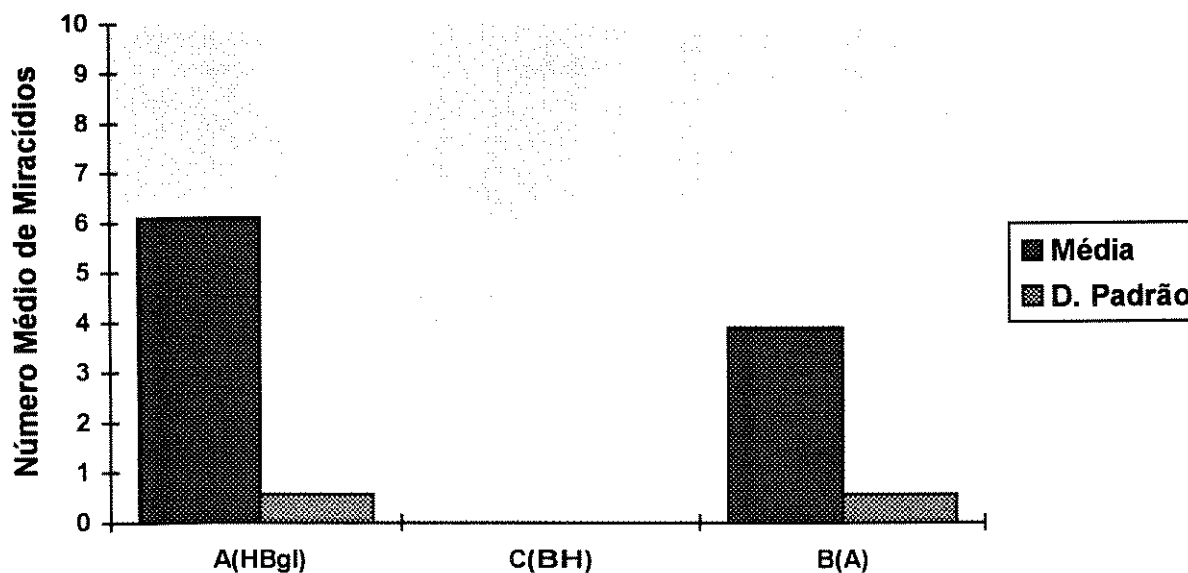


Fig. 13



FIGURAS 12 E 13: Estudo da atração miraxonal frente à hemolinfa de *B. glabrata* sadia (Fig. 12) ou à hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (Fig. 13). Eixo X: A(HBgS) = Câmara A, onde era depositada a hemolinfa de *B. glabrata* sadia; A(HBgI) = Câmara A, onde era depositada a hemolinfa de *B. glabrata* infectada; C(BH) = canal C, onde eram adicionados os miracídeos BH; B(A) = Câmara B, onde continha água. Eixo Y: Média do número de miracídeos encontrados nas câmaras A ou B ou no canal C e o desvio padrão.

Fig. 14

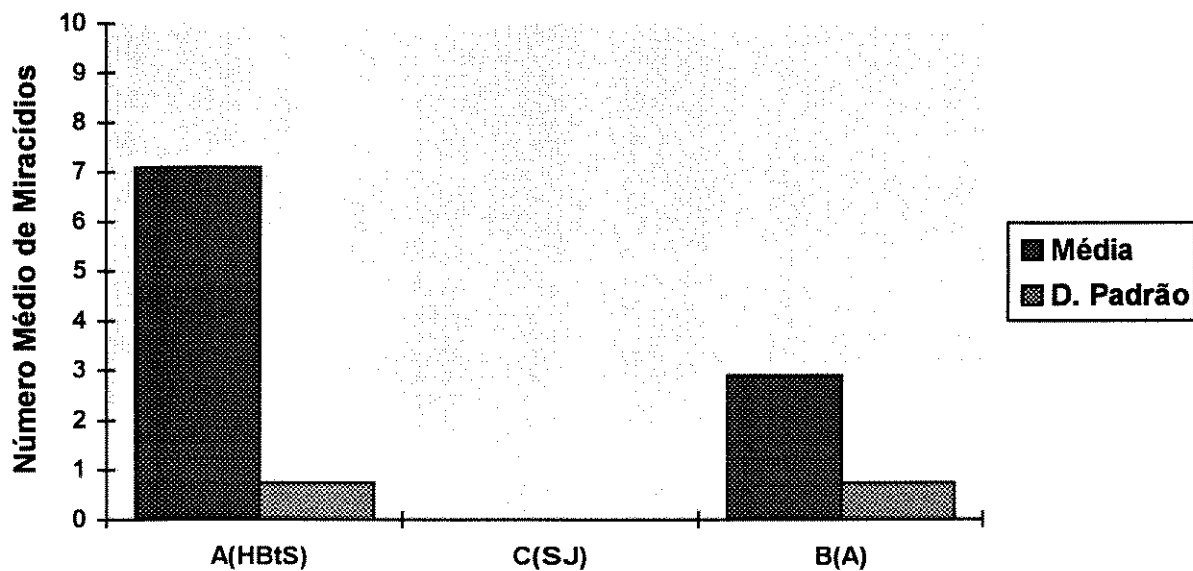
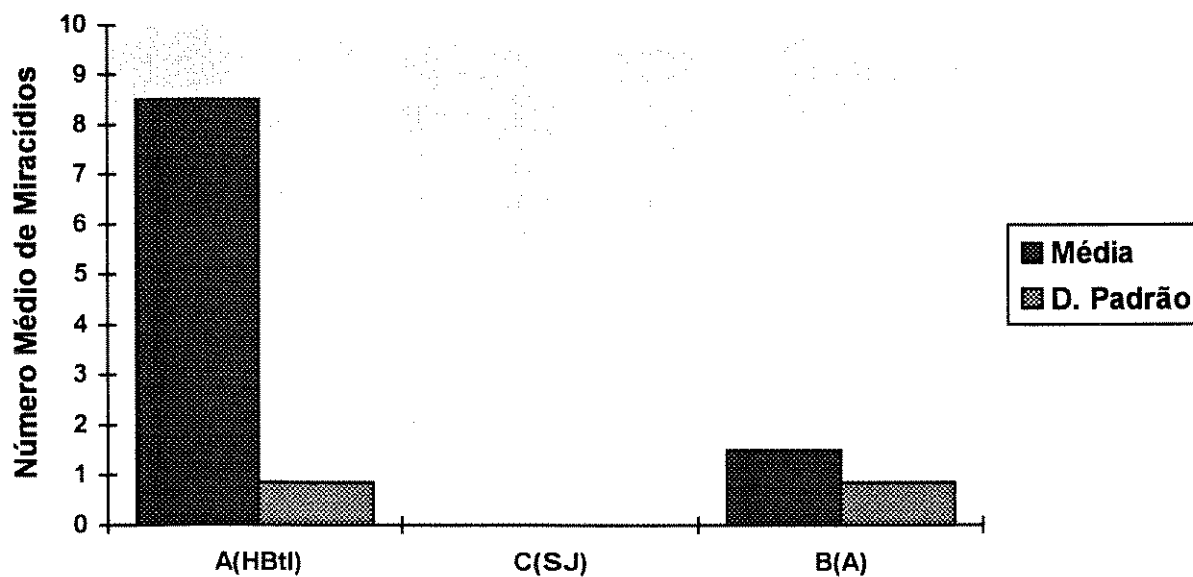


Fig. 15



FIGURAS 12 E 13: Estudo da atração miraxonal frente à hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (Fig. 13) ou à hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (Fig. 14). Eixo X: A(HBtS) = Câmara A, onde era depositada a hemolinfa de *B. tenagophila* sadia; A(HBtI) = Câmara A, onde era depositada a hemolinfa de *B. tenagophila* infectada; C(SJ) = canal C, onde eram adicionados os miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde continha água. Eixo Y: Média do número de miracídeos encontrados nas câmaras A ou B ou no canal C e o desvio padrão.

Fig. 16

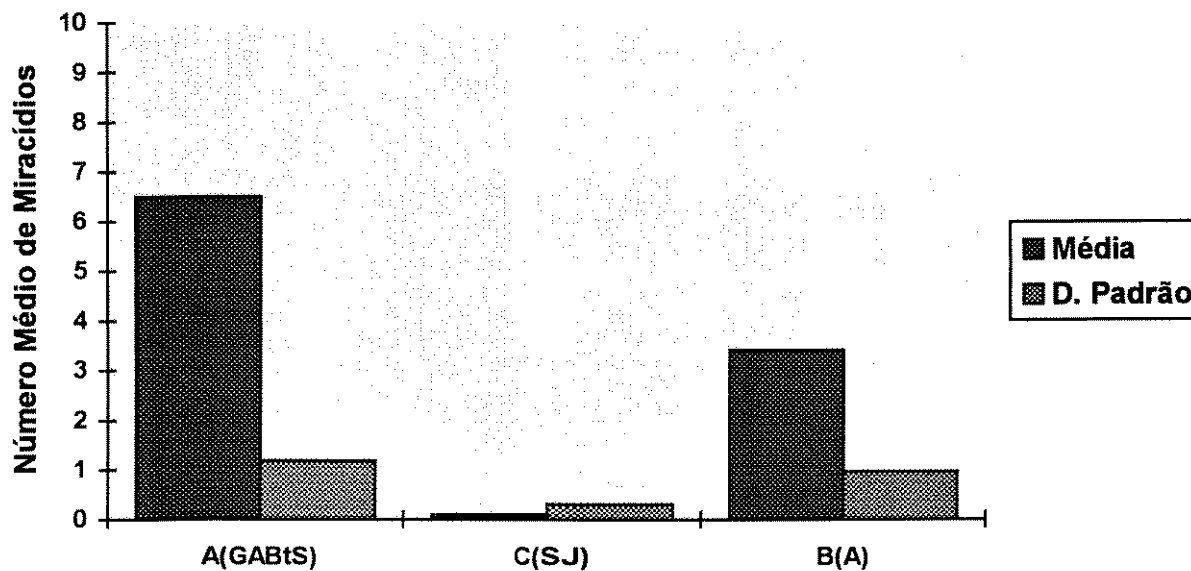
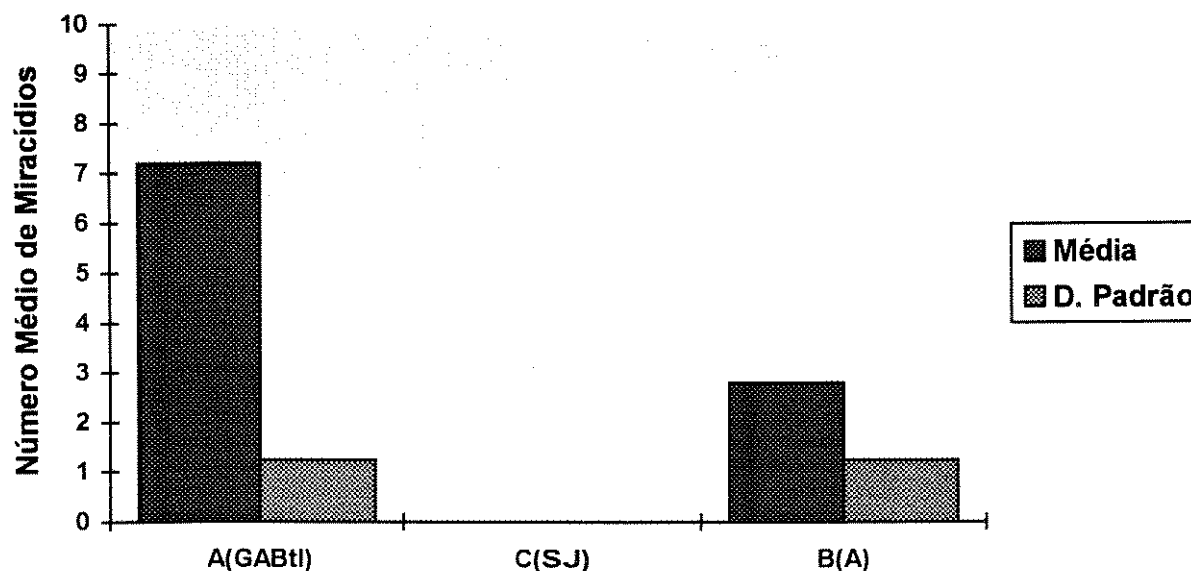


Fig. 17



FIGURAS 16 E 17: Estudo da atração miraxonal frente ao extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadia (Fig. 16) ou ao extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (Fig. 14). Eixo X: A(GABtS) = Câmara A, onde era depositado o extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadia; A(GABtI) = Câmara A, onde era depositado o extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectada; C(SJ) = canal C, onde eram adicionados os miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde continha água. Eixo Y: Média do número de miracídeos encontrados nas câmaras A ou B ou no canal C e o desvio padrão.

Fig. 18

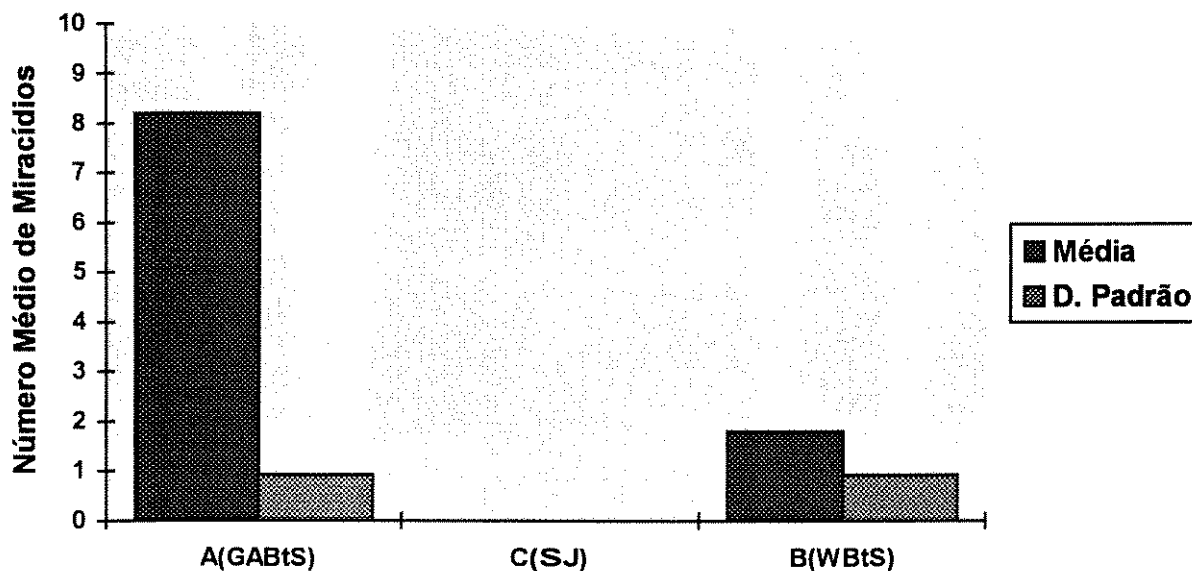
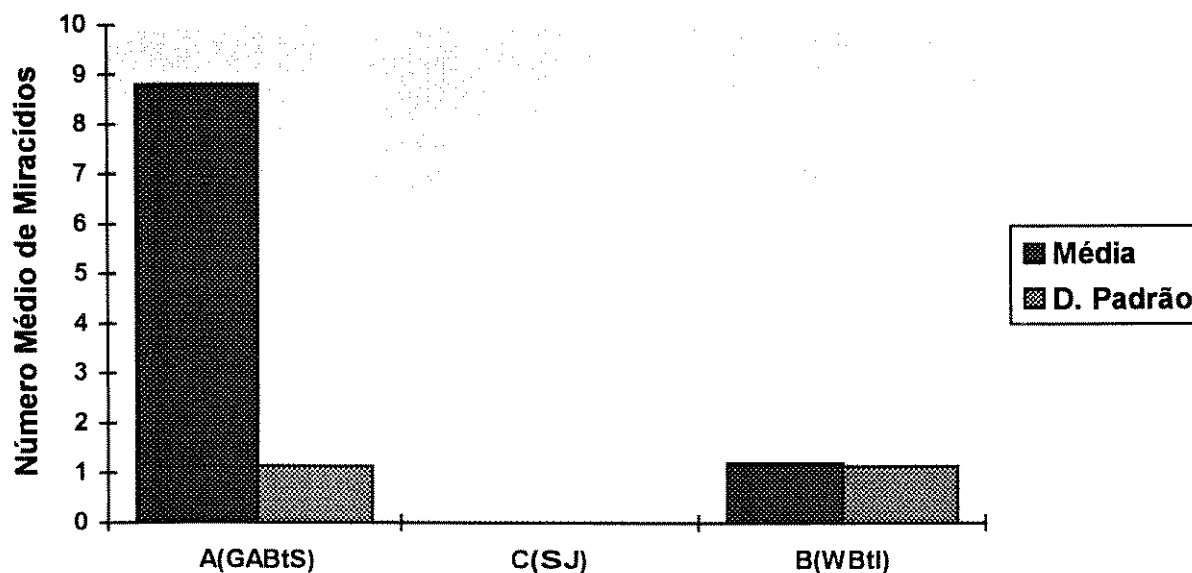


Fig. 19



FIGURAS 18 E 19: Estudo da atração miraxonal frente ao extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadias e a SCW de *B. tenagophila* sadias (Fig. 18) ou infectadas por *S. mansoni* (Fig. 19). Eixo X (Fig. 18): A(GABtS), Câmara A, contendo extrato da glândula de *B. tenagophila* sadia; B(WBtS), Câmara A, contendo SCW de *B. tenagophila* sadia. Eixo X (Fig. 19): A(GABtS), Câmara A, contendo extrato da glândula de *B. tenagophila* sadia; B(WBtI), Câmara B, contendo SCW de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*. C(SJ): Canal C, onde eram depositados miracídeos BH (Figs 18 e 19). Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C e o desvio padrão.

Fig. 20

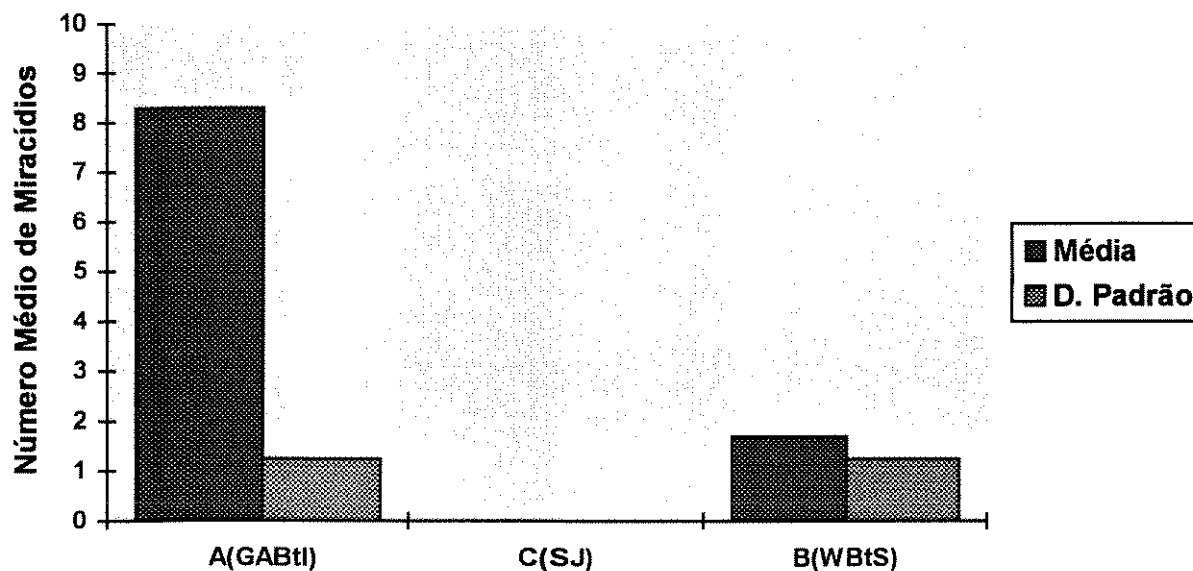
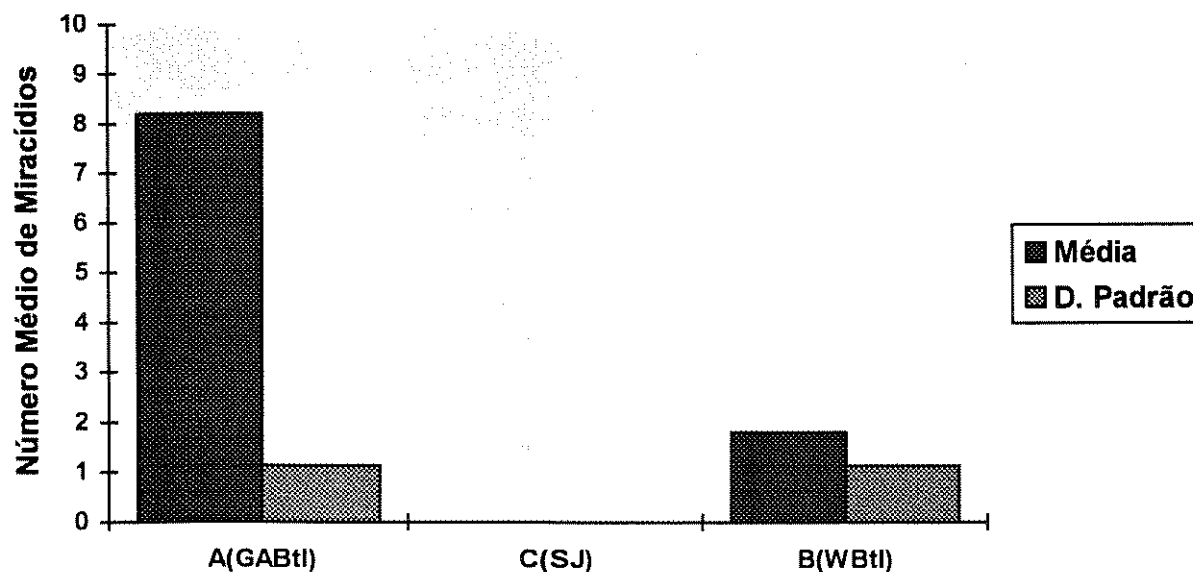


Fig. 21



FIGURAS 20 E 21: Estudo da atração miraxonal frente ao extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* e a SCW de *B. tenagophila* sadias (Fig. 20) ou infectadas por *S. mansoni* (Fig.21).Eixo X(Fig.20): A(GABtI),Câmara A, contendo o extrato de *B. tenagophila* infectada; B(WBtS), Câmara A, contendo SCW de *B. tenagophila* sadia.Eixo X(Fig. 21):A(GABtI), Câmara A, contendo o extrato de *B. tenagophila* infectada; B(WBtI), Câmara B, contendo SCW de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*. C(SJ): Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ (Figs 20 e 21). Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C e o desvio padrão.

Fig. 22

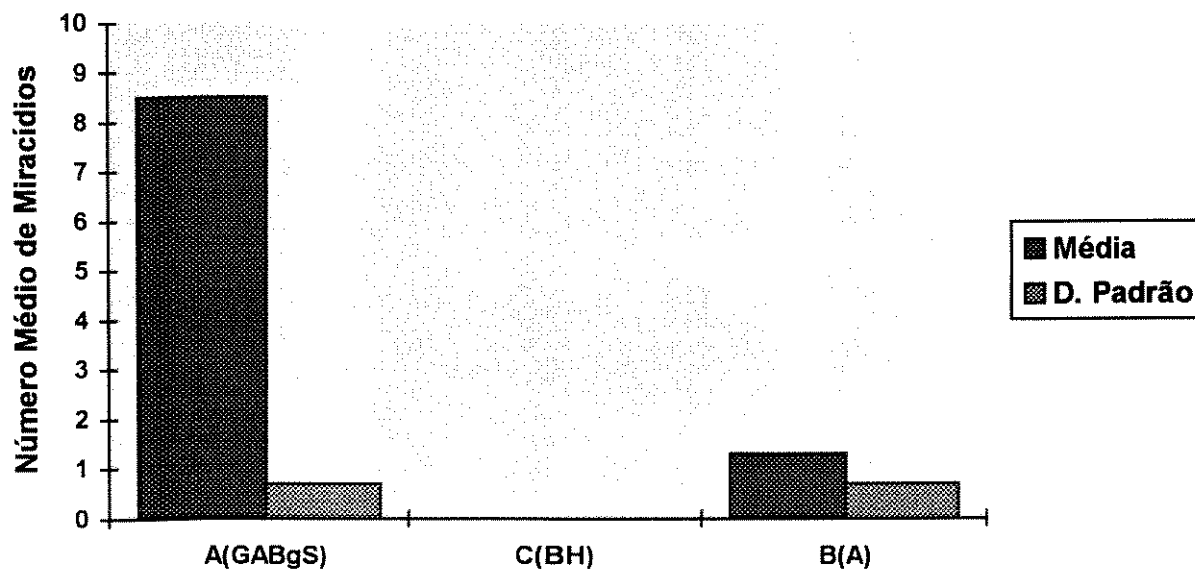
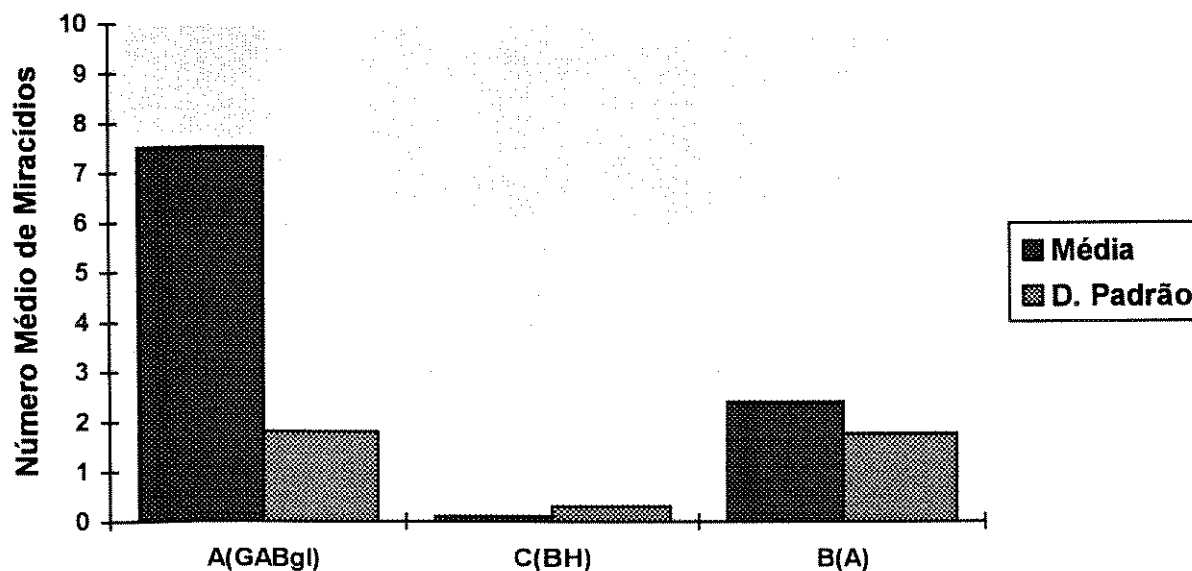


Fig. 23



FIGURAS 22E 23: Estudo da atração miraxonal frente ao extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadia (Fig. 22) ou ao extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (Fig. 23). Eixo X: A(GABgS) = Câmara A, onde era depositado o extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadia; A(GABgl) = Câmara A, onde era depositado o extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* infectada; C(BH)= canal C, onde eram adicionados os miracídeos SJ; B(A)= Câmara B, onde continha água. Eixo Y: Média do número de miracídeos encontrados nas câmaras A ou B ou no canal C e o desvio padrão.

Fig. 24

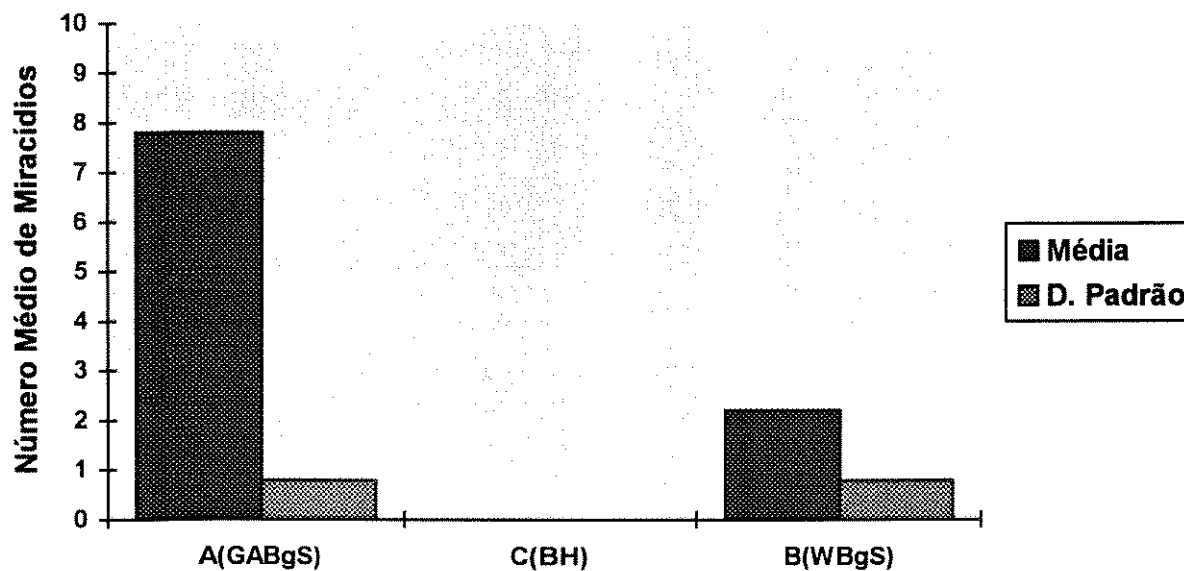
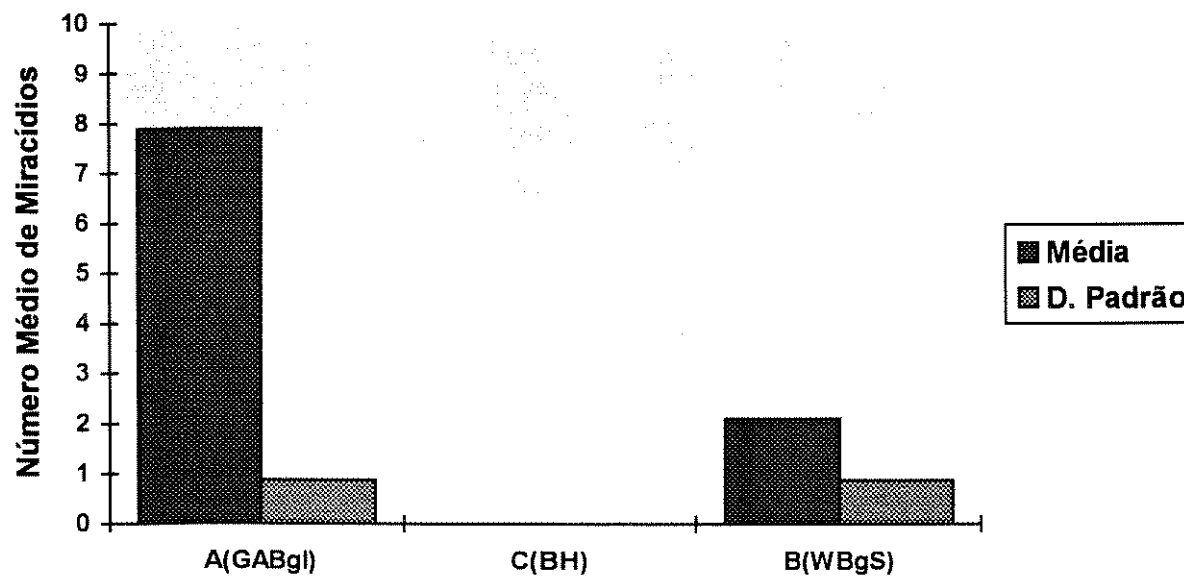


Fig. 25



FIGURAS 24 E 25: Estudo da atração miraxonal frente ao extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadias (Fig. 24) ou infectadas por *S. mansoni* (Fig. 25) e a SCW de *B. glabrata* sadias (WBgS). Eixo X(Fig. 24): A(GABgS) = Câmara A, contendo o extrato de *B. glabrata* sadia; B(WBgS) = Câmara B, contendo SCW de *B. glabrata* sadia. Eixo X(Fig. 25): A(GABgl) = Câmara A, contendo o extrato de *B. glabrata* infectada; B(WBgS) = Câmara A, contendo SCW de *B. glabrata* sadia. C(BH): Canal C, onde eram depositados miracídeos BH (Figs 24 e 25). Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C e o desvio padrão.

Fig. 26

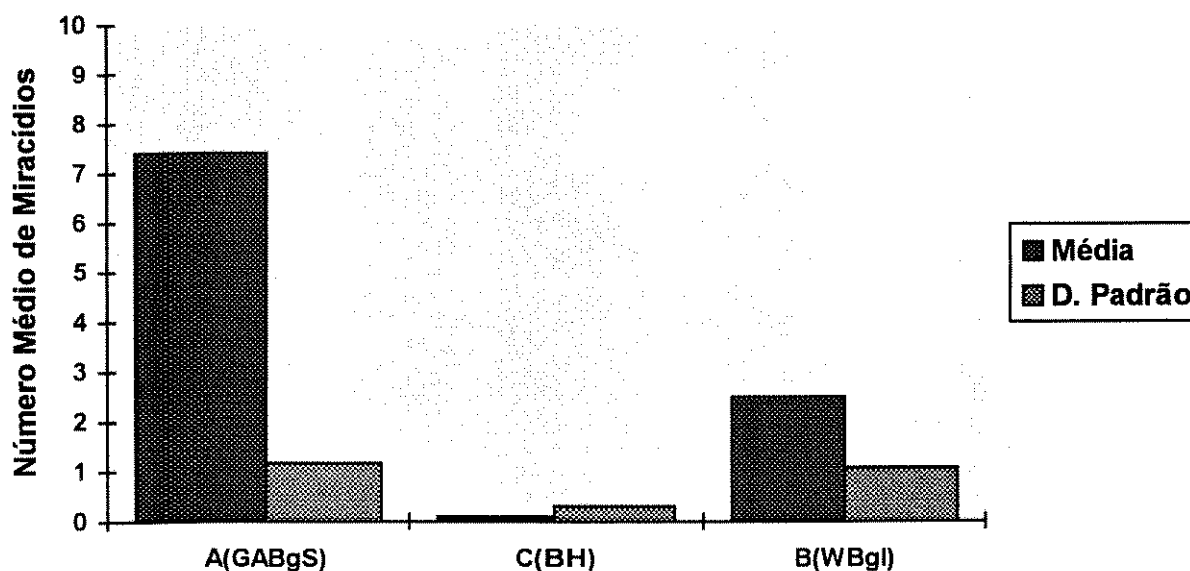
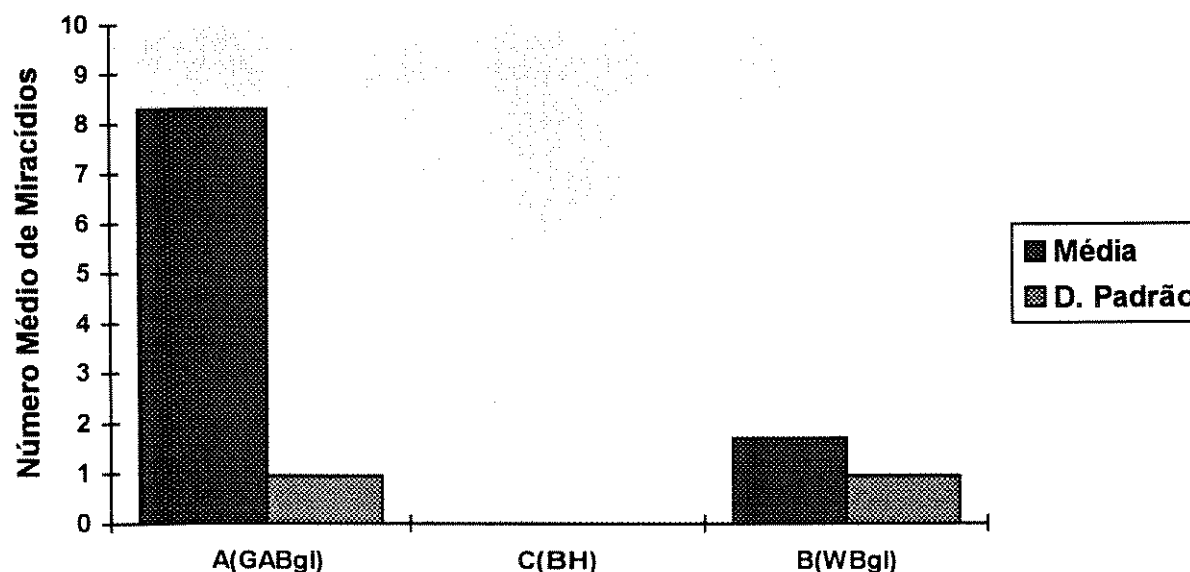


Fig. 27



FIGURAS 26 E 27: Estudo da atração miraxonal frente ao extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadias (Fig. 26) ou infectadas por *S. mansoni* (Fig. 27) e a SCW de *B. glabrata* infectada (WBgI). Eixo X(Fig. 26): A(GABgS) = Câmara A, contendo o extrato de *B. glabrata* sadia; B(WBgI) = Câmara B, contendo SCW de *B. glabrata* infectada. Eixo X(Fig. 27): A(GABgI) = Câmara A, contendo o extrato de *B. glabrata* infectada; B(WBgI) = Câmara A, contendo SCW de *B. glabrata* infectada. C(BH): Canal C, onde eram depositados miracídios BH (Figs 25 e 26). Eixo Y: Número médio de miracídios presentes nas câmaras A ou B ou canal C e o desvio padrão.

TABELA 28: - Concentrações de aminoácidos livres (μ moles/100 ml) na hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS) ou infectadas por *S. mansoni* (HBgI), e na hemolinfa de *B. tenagophila* sadias (HBtS) ou infectadas por *S. mansoni* (HBtI).

Aminoácido ou derivado	HBgS	HBgI	HBtS	HBtI
PSer	25,21	50,77	56,08	79,27
Asp	4,54	9,58	9,45	14,30
Glu	65,09	199,04	87,84	109,97
AAD	6,73	6,84	0,0	8,20
HYPro	0,0	1,22	0,0	0,0
Ser	48,07	95,65	115,47	96,40
ASN	53,46	881,05	158,02	335,78
Gly	42,51	71,62	125,0	97,08
B-Ala	69,29	295,89	119,23	47,16
His	43,73	62,54	60,08	29,16
Cit	0,0	0,0	0,0	5,02
NH ₃	315,72	165,94	197,54	187,59
Thr	86,30	105,68	105,73	116,60
Ala	105,36	125,69	167,52	147,56
Carn	0,0	7,75	0,0	6,0
Arg	0,0	8,05	30,01	20,15
Met-SO ₂	33,03	40,48	69,45	55,14
3MH	0,0	0,0	0,0	13,14
AAB	0,0	9,91	6,01	7,71
Tyr	15,04	5,79	26,61	17,22
Val	24,98	33,58	81,19	52,57
Met	3,58	6,43	9,43	11,97
Cyst	20,76	15,17	11,63	7,74
Cis	306,51	273,71	317,97	301,97
RG2	138,75	115,81	137,75	133,96
Ile	17,13	22,80	57,58	31,01
Leu	33,19	39,83	100,23	69,18
NorLeu	236,47	249,0	254,70	214,97
HyLys1	16,10	12,48	19,96	14,13
HyLys2	15,72	12,48	0,0	15,39
Phe	22,36	27,13	47,20	37,42
Trp	3,85	9,87	10,16	11,13
Orn	5,47	22,49	6,84	55,65
Lys	8,44	41,30	62,79	72,04

TABELA 29: - Concentrações de aminoácidos livres (μ moles/250 ml) na SCW de *B. glabrata* sadias (WBgS) ou infectadas por *S. mansoni* (WBgl), e na SCW de *B. tenagophila* sadias (WBtS) ou infectadas por *S. mansoni* (WBtl).

Aminoácido ou derivado	WBgS	WBgl	WBtS	WBtl
PSer	117,67	0,0	0,0	41,83
Asp	0,0	0,0	0,0	0,0
Glu	0,0	0,0	103,38	0,0
AAD	0,0	0,0	47,30	0,0
HYPPro	0,0	0,0	0,0	0,0
PEA	0,0	0,0	0,0	0,0
Ser	33,24	0,0	0,0	125,25
Asn	70,60	0,0	0,0	206,82
Gly	18,18	23,82	0,0	16,99
B-Ala	106,73	84,19	0,0	0,0
Tau	0,0	0,0	0,0	0,0
His	0,0	0,0	0,0	0,0
GABA	0,0	0,0	0,54	0,0
Cit	0,0	0,0	138,26	0,0
NH ₃	0,0	64,17	0,0	90,45
Thr	0,0	112,13	0,0	137,76
Ala	76,71	0,0	0,0	26,84
BAIB	44,64	45,31	0,0	0,0
Carn	0,0	0,0	0,0	0,0
Arg	22,10	7,96	0,0	0,0
Met-SO ₂	0,0	0,0	0,0	0,0
Pro	0,0	0,0	0,0	0,0
1-MH	0,0	0,0	0,0	0,0
3-MH	0,0	0,0	0,83	0,0
AAB	43,99	13,38	164,85	0,0
Tyr	0,0	0,0	3,50	957,64
Val	0,0	0,0	36,22	23,35
Met	17,15	7,34	35,49	19,35
Cyst	15,00	0,0	1,30	0,0
Rg-1	0,0	13,23	0,0	0,0
Cys	34,69	30,79	5,87	107,20
Rg-2	397,01	331,56	24,95	359,16
Ile	11,36	4,81	41,19	0,0
Leu	34,11	9,50	365,19	14,21
HyLys1	80,87	60,05	102,13	63,05
HyLys2	13,80	11,02	0,0	31,05
Phe	17,53	3,97	13,71	0,0
Trp	0,0	0,0	20,56	0,0
Orn	0,0	0,0	12,45	17,45
Lys	25,39	6,14	51,51	0,0

TABELA 30: - Concentrações de aminoácidos livres no extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadias (GABgS) e infectadas por *S. mansoni* (GABgl), e no extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophilas* sadias (GABtS) e infectadas por *S. mansoni* (GABtl).

Aminoácido ou derivado	GABgS	GABgl	GABtS	GABtl
PSer	1,89	0,56	27,23	22,06
Asp	8,49	57,65	46,56	6,96
Glu	0,0	0,0	0,0	0,0
ADD	0,0	0,0	0,0	0,0
HyPro	0,0	0,0	0,0	0,0
PEA	0,0	0,0	0,0	0,0
Ser	0,0	0,0	0,0	0,0
Asn	0,0	0,0	0,0	0,0
Gly	0,0	0,0	0,0	0,0
B-Ala	0,0	0,0	2,91	2,40
Tau	0,0	0,0	0,0	0,0
Hys	0,0	0,0	38,80	0,0
GABA	0,0	0,0	0,0	0,0
Cit	0,0	0,0	0,0	0,0
NH ₃	0,0	0,0	0,0	0,0
Thr	0,0	0,0	0,0	0,0
Ala	0,0	0,0	0,0	0,0
BAIB	0,0	0,0	0,0	0,0
Carn	0,0	0,0	0,0	0,0
Met-SO ₂	0,0	0,0	0,0	0,0
Pro	0,0	0,0	0,0	0,0
1-MH	0,0	0,0	0,0	0,0
3-MH	0,0	0,0	0,0	0,0
AAB	0,0	0,0	0,0	0,0
Tyr	0,0	0,0	0,0	0,0
Val	0,0	0,0	0,0	0,0
Met	0,0	0,0	0,0	0,0
Cyst	0,0	0,0	0,0	0,0
Rg-1	0,0	0,0	41,07	35,55
Cys	0,0	0,0	53,05	49,64
Rg-2	0,0	4,36	0,0	0,0
Ile	0,0	0,0	0,0	0,0
Leu	0,0	0,0	10,75	7,74
HyLys-1	0,0	0,0	0,0	0,0
HyLys-2	0,0	0,0	0,0	0,0
Phe	0,0	0,0	0,0	0,0
Trp	0,0	0,0	0,0	0,0
Orn	14,22	1,79	0,0	0,0
Lys	13,81	11,35	0,0	0,0

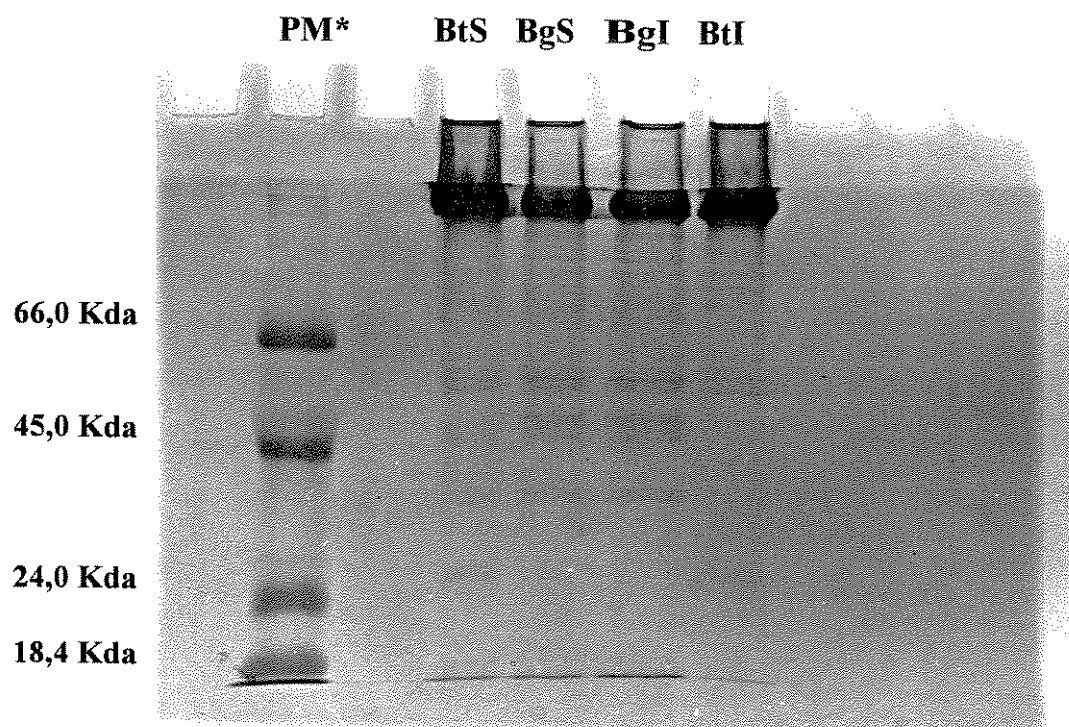


FIGURA 28: - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da hemolinfa de *B. glabrata* sadia (BgS), de *B. glabrata* infectadas (BgI), de *B. tenagophila* sadia (BtS) e *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (BtI). -PM: padrão de peso molecular.

*** Componentes do padrão de peso molecular:**

- 1) B. Lactoglobulina - PM: 18,4 Kda
- 2) Tripsinogênio - PM: 24,0 Kda
- 3) Ovoalbumina - PM: 45,0 Kda
- 4) Albumina bovina - PM: 66,0 Kda

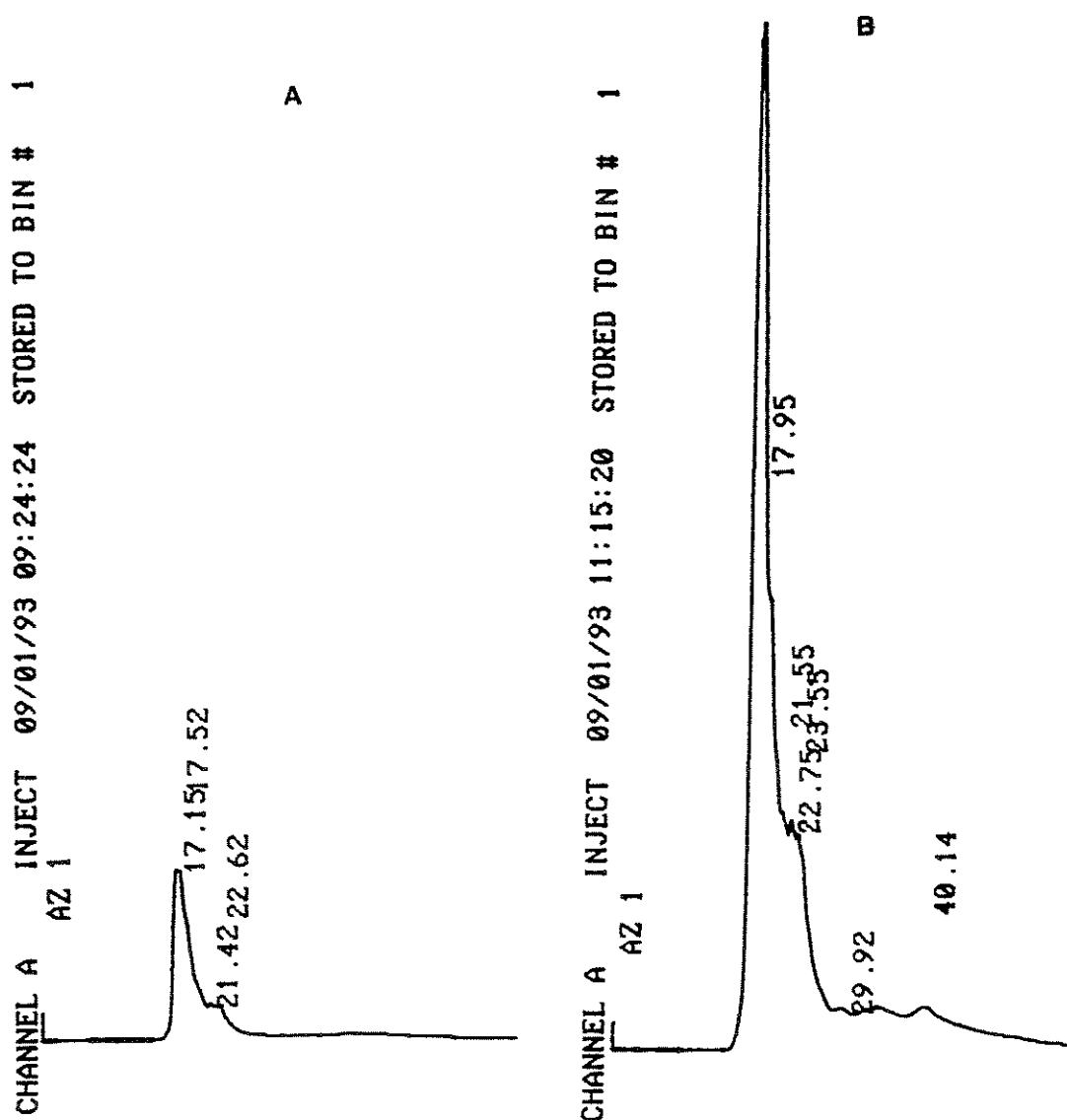


FIGURA 29: - Perfil de cromatografia líquida de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* sadias. Fig. 29(A): Foi adicionado 100 µl da amostra, com o fluxo de 0,2 ml por minuto e a densidade óptica de 280 nm; Fig. 29(B): Foi adicionado 100 µl da amostra, com o fluxo de 0,2 ml por minuto e a densidade óptica de 220 nm.

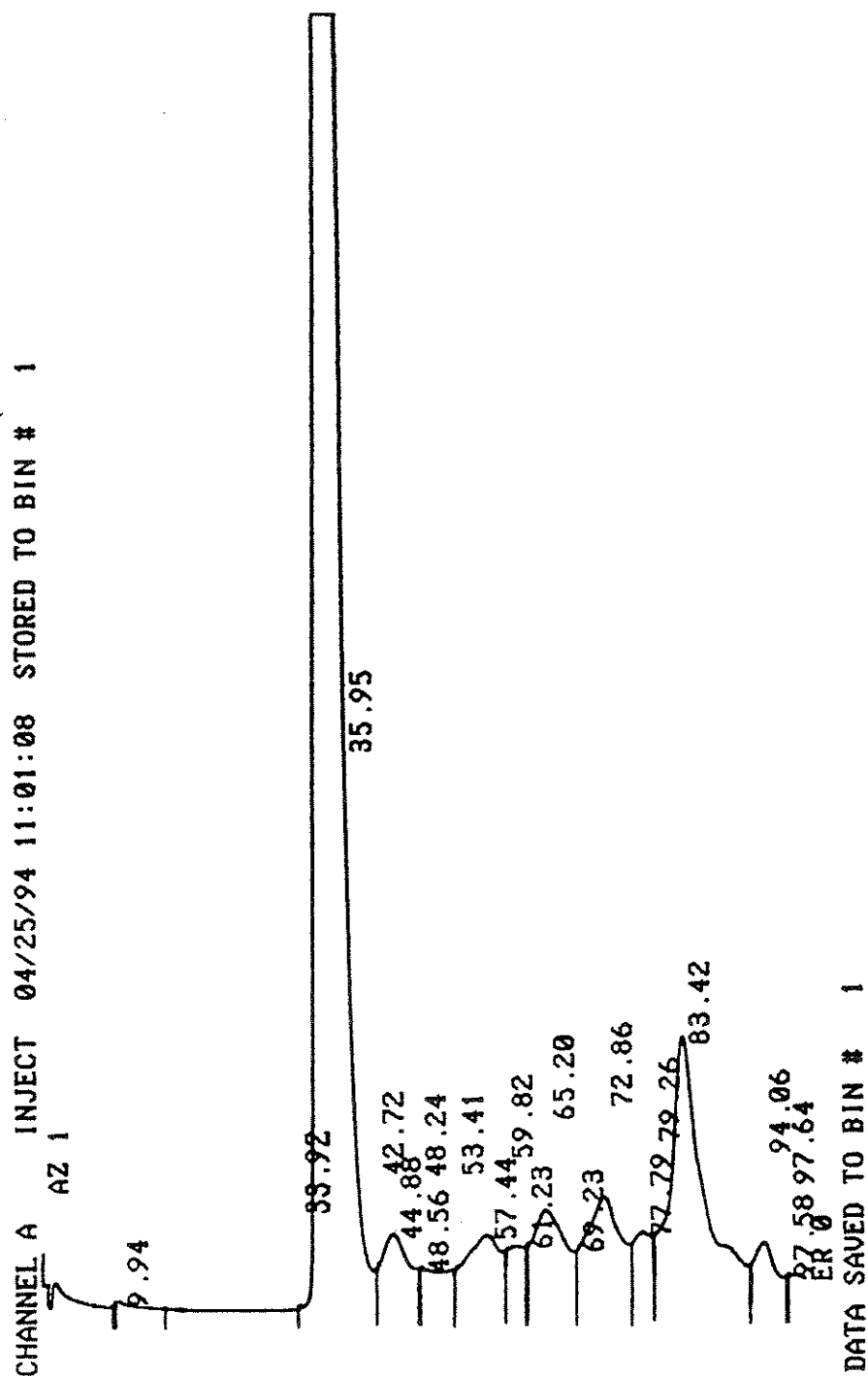


FIGURA 30: - Perfil de cromatografia líquida de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* sadia (1ª aplicação da amostra). Foi adicionado 100 µl da amostra, com o fluxo de 0,2 ml por minuto, a densidade óptica de 280 nm e absorbância 1.

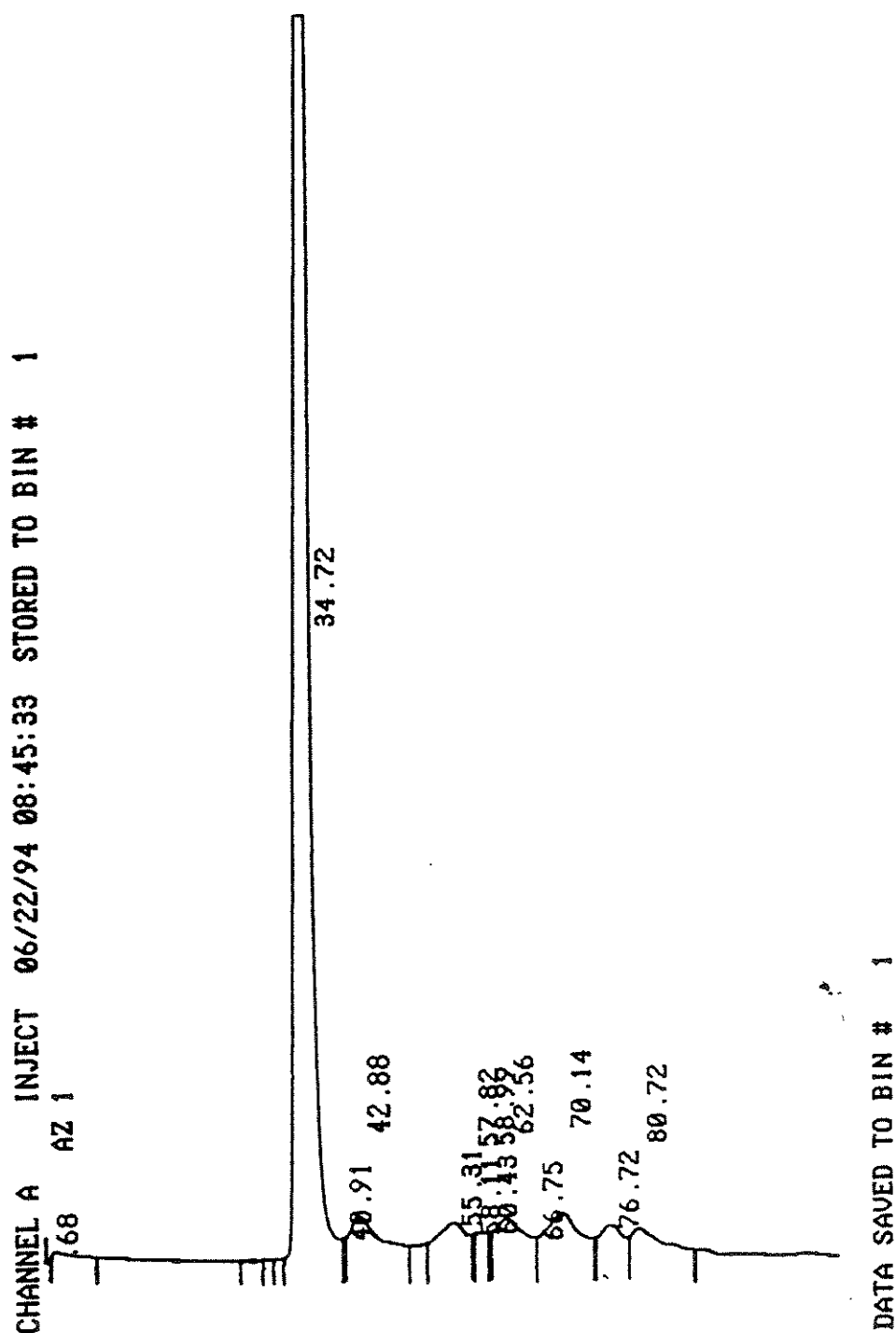


FIGURA 31: - Perfil de cromatografia líquida de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (1ª aplicação da amostra). Foi adicionado 100 μ l da amostra, com o fluxo de 0,2 ml por minuto, a densidade óptica de 280 nm e absorvância 1.

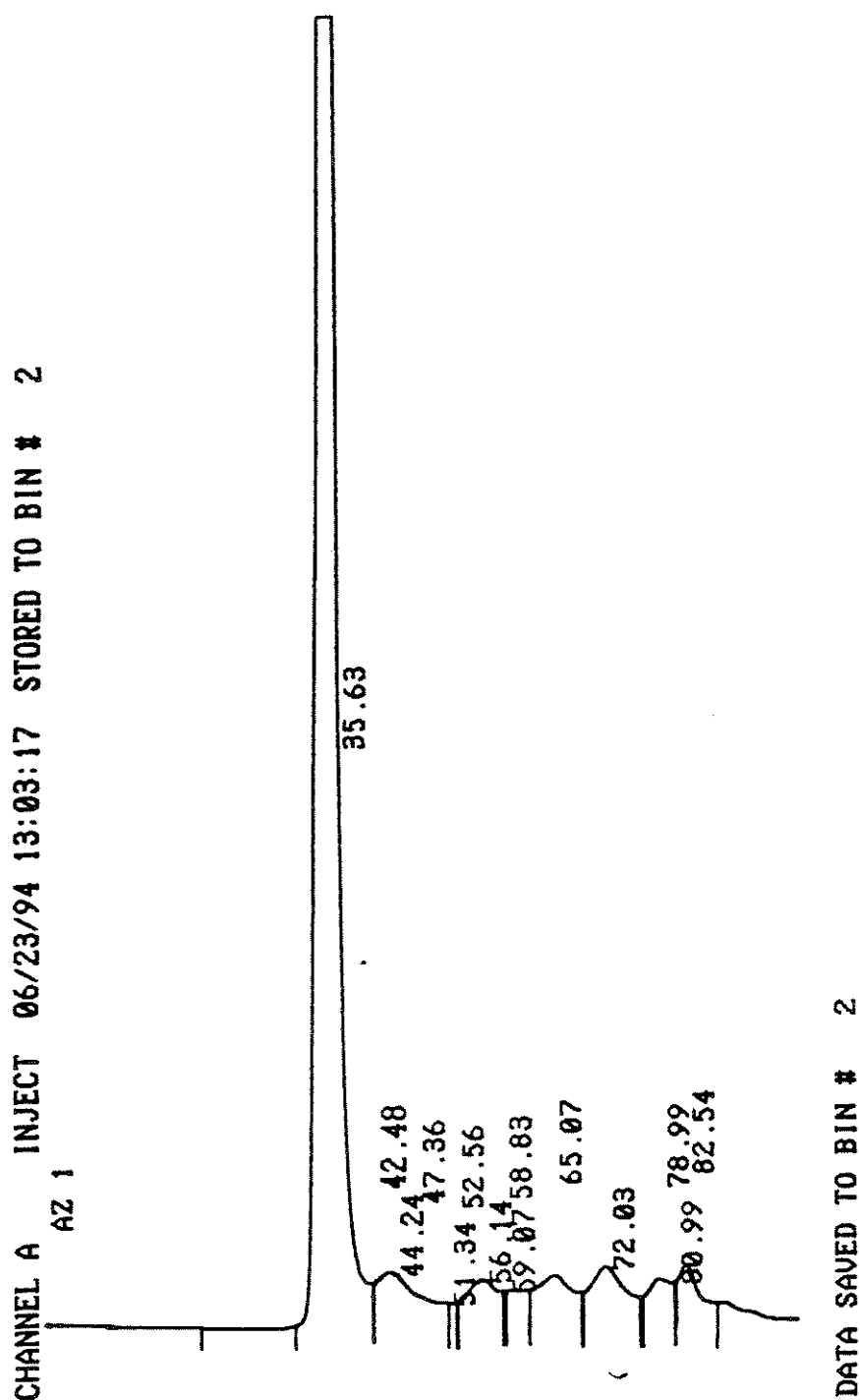


FIGURA 32: - Perfil de cromatografia líquida de exclusão molecular da hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (2ª aplicação da amostra). Foi adicionado 100 µl da amostra, com o fluxo de 0,2 ml por minuto, a densidade óptica de 280 nm e absorbância 1.

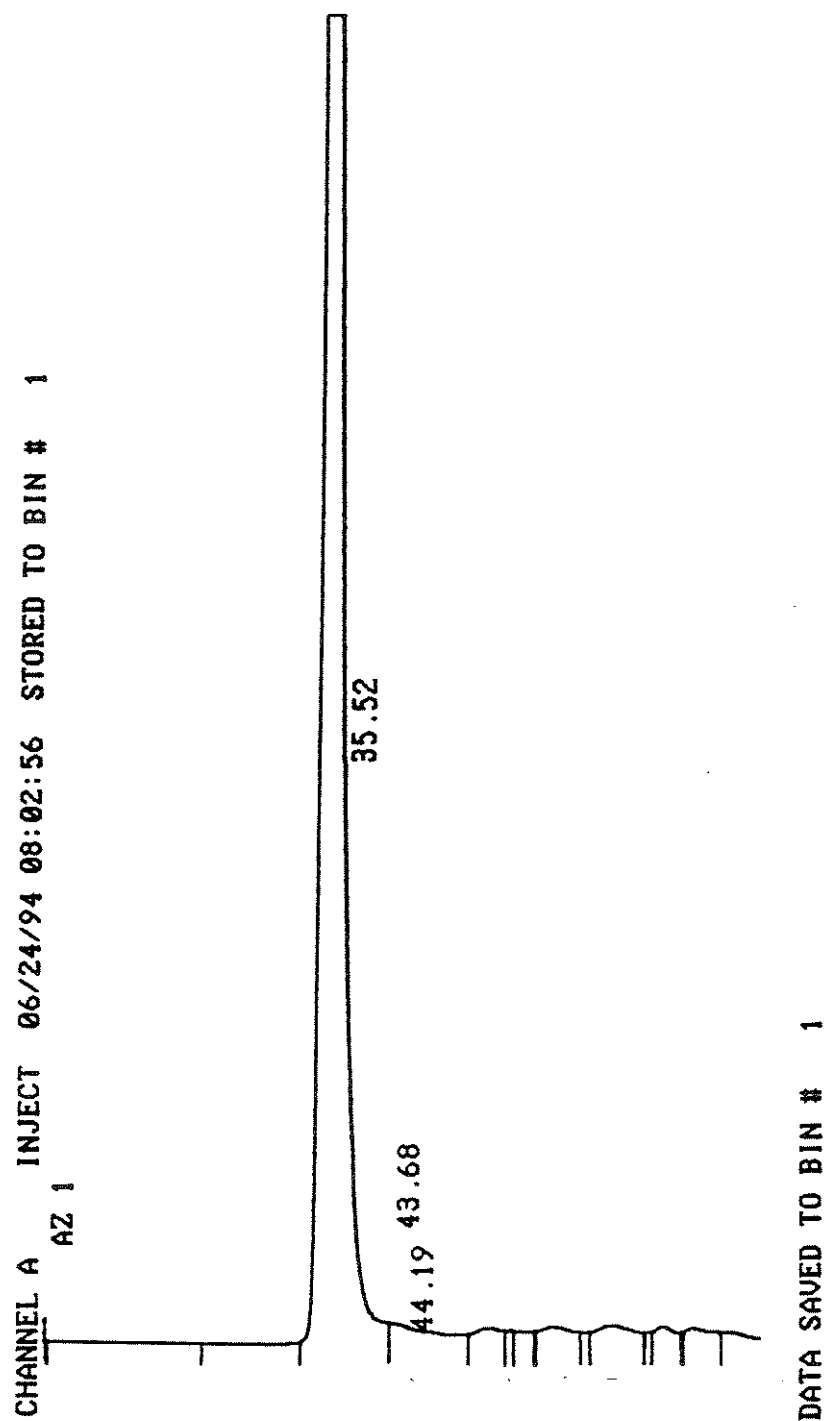


FIGURA 33: - Perfil de cromatografia líquida de exclusão molecular da hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (1ª aplicação da amostra). Foi adicionado 100 µl da amostra, com o fluxo de 0,2 ml por minuto, a densidade óptica de 280 nm e absorvância 1.

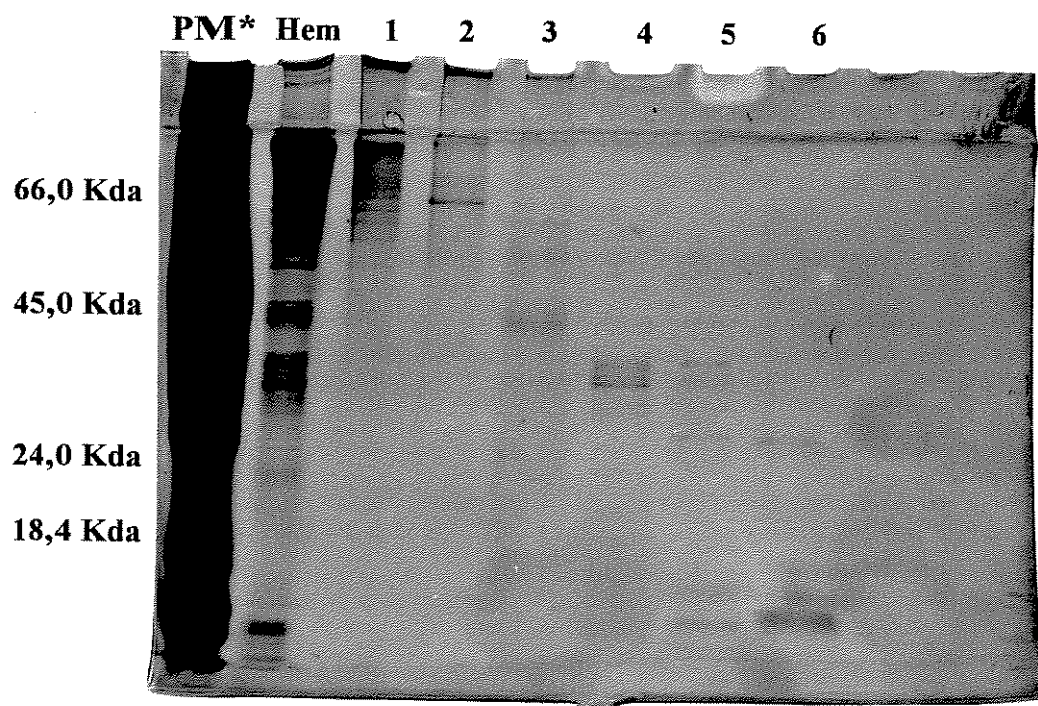


FIGURA 34: - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das frações da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* sadia (HBgS).

* **Hem:** Amostra de hemolinfa de *B. glabrata* sadia; 1 a 6: Frações cromatográficas 1 a 6 da HBgS; **PM*:** padrão de peso molecular (estimativa).

* **Componentes do padrão de peso molecular:**

- | | |
|----------------------|----------------|
| 1) B- Lactaglobulina | - PM: 18,4 Kda |
| 2) Tripsinogênio | - PM: 24,0 Kda |
| 3) Ovoalbumina | - PM: 45,0 Kda |
| 4) Albumina bovina | - PM: 66,0 Kda |

Fig. 36

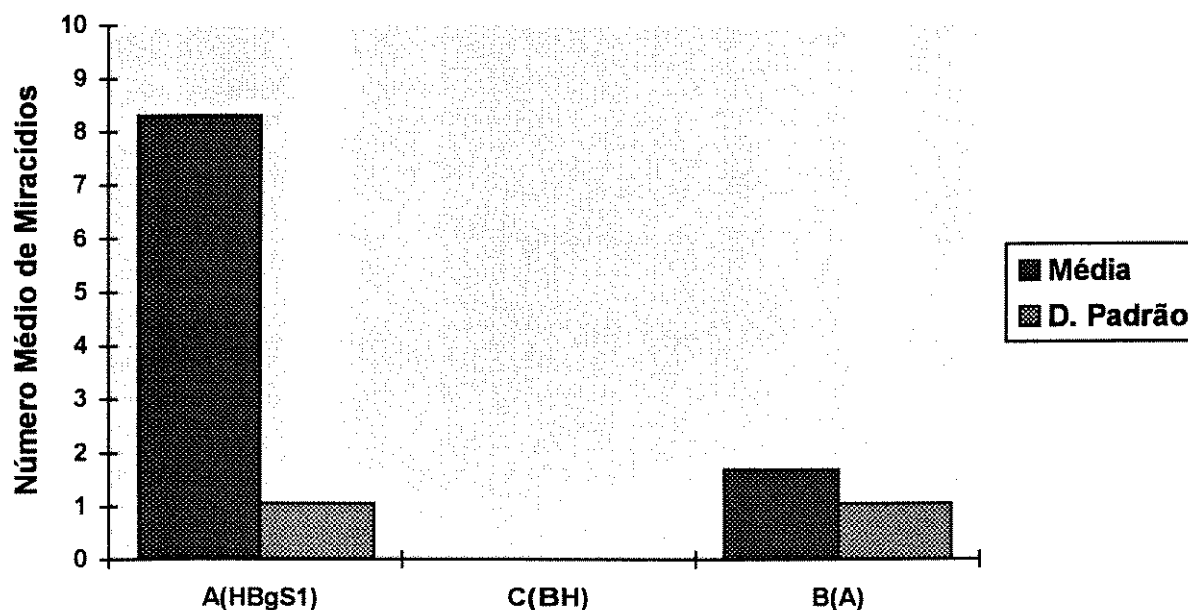
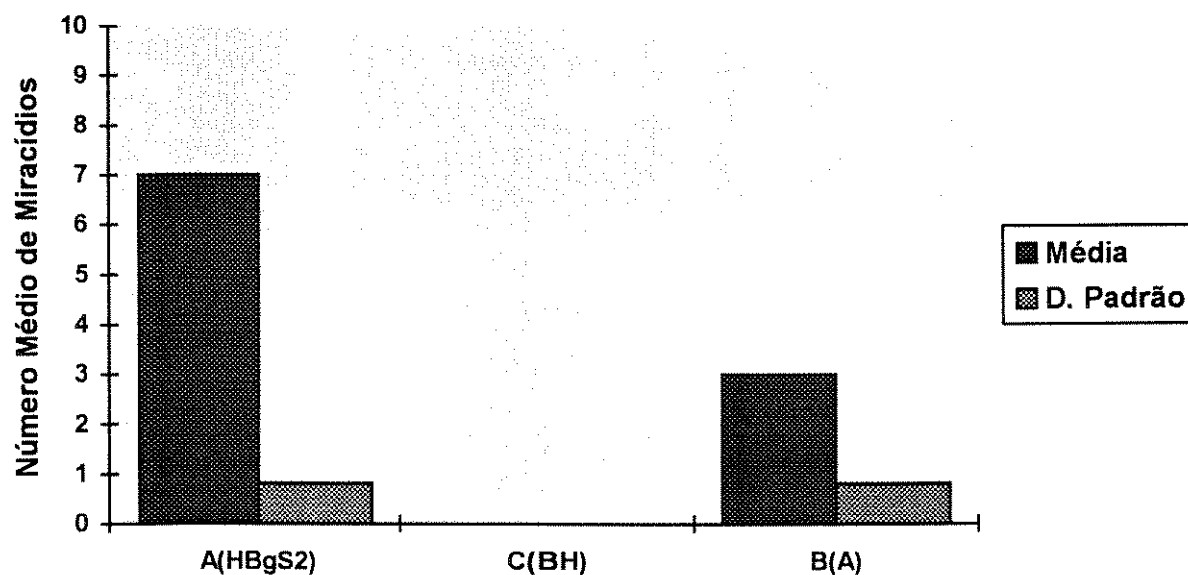


Fig. 37



FIGURAS 36 E 37: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 1 (Fig. 36) e 2 (Fig. 37) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS). Eixo X: A(HBgS1)= Câmara A, contendo a fração 1 da cromatografia da HBgS; A(HBgS2)= Câmara A, contendo a fração 2 da cromatografia da HBgS; C(BH)= Canal C onde eram depositados miracídeos BH; B(A)= Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 38

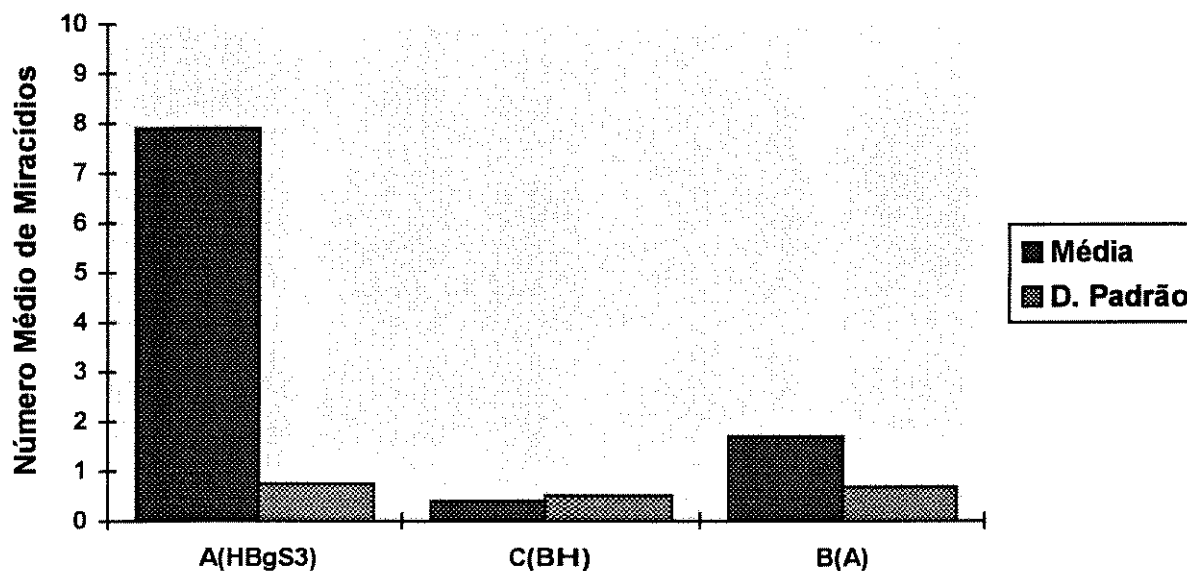
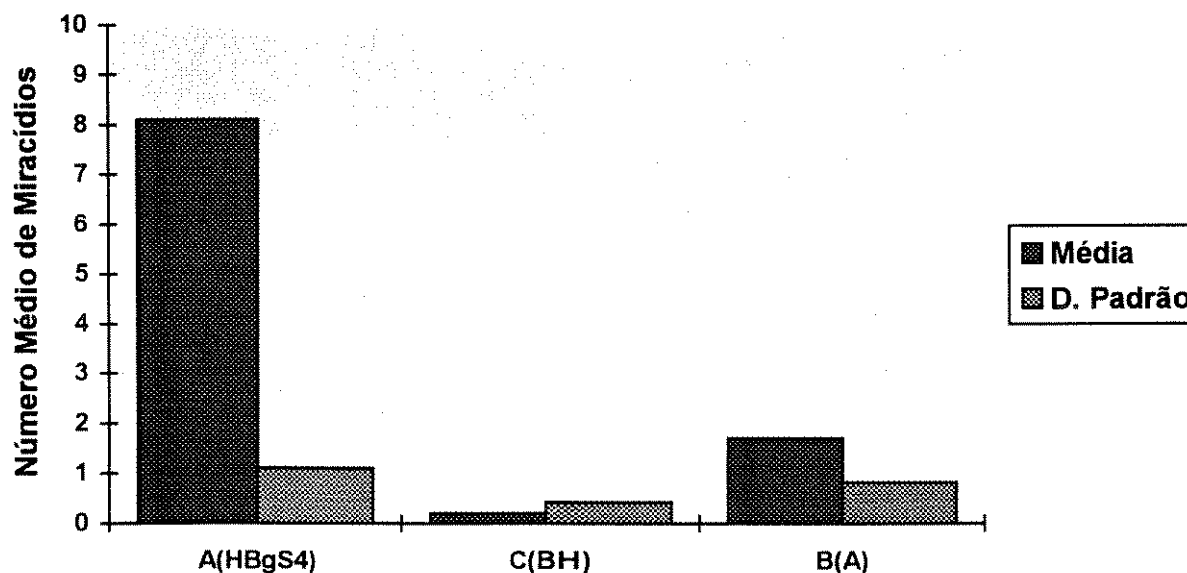


Fig. 39



FIGURAS 38 E 39: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 3 (Fig. 38) e 4 (Fig. 39) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS). Eixo X: A(HBgS3) = Câmara A, contendo a fração 3 da cromatografia da HBgS; A(HBgS4) = Câmara A, contendo a fração da cromatografia da HBgS; C(BH) = Canal C, onde eram depositados miracídeos BH; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y = Número médio de miracídeos presentes nasa câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 40

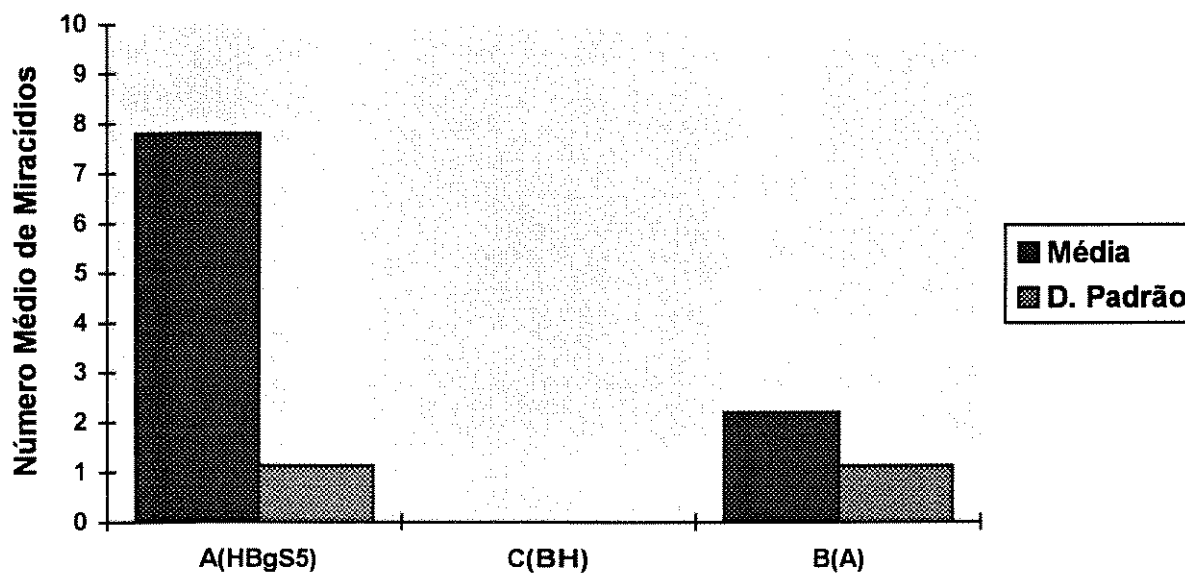
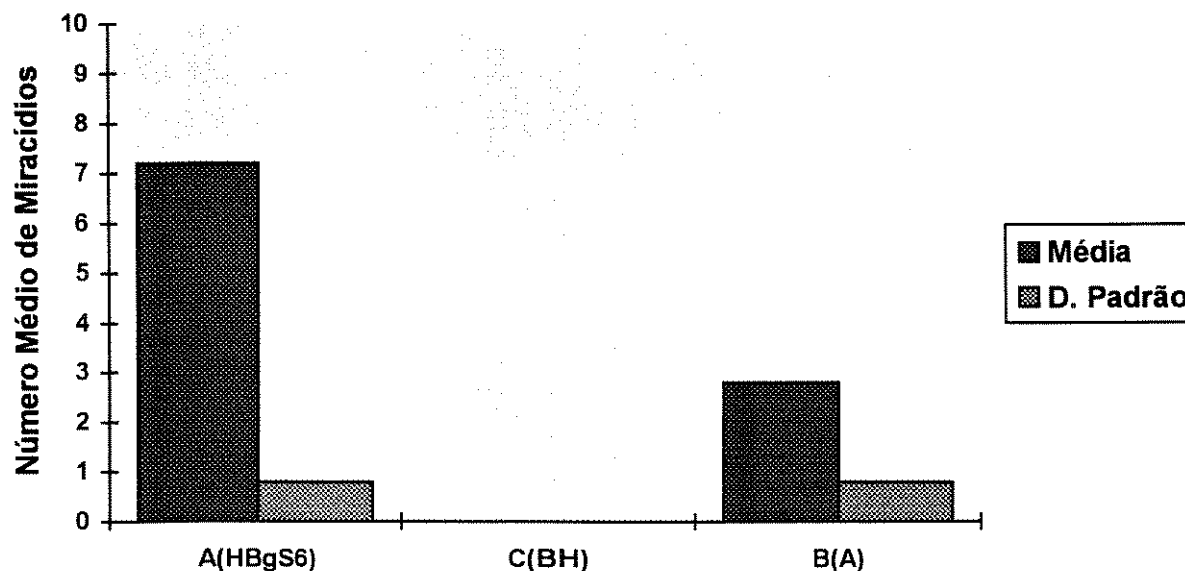


Fig. 41



FIGURAS 40 E 41: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 5 (Fig. 40) e 6 (Fig. 41) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS). Eixo X: A(HBgS5) = Câmara A, contendo a fração 5 da cromatografia da HBgS; A(HBgS6) = Câmara A, contendo a fração 6 da cromatografia da HBgS; C(BH) = Canal C, onde eram depositados miracídeos BH; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y = Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A, B ou canal C.

Fig. 42

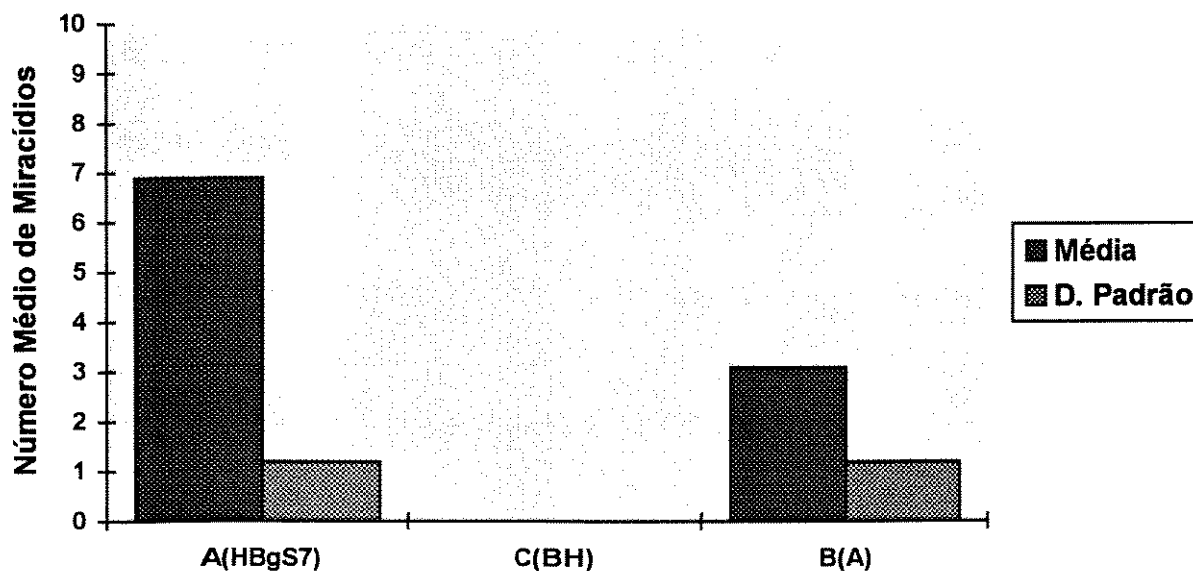
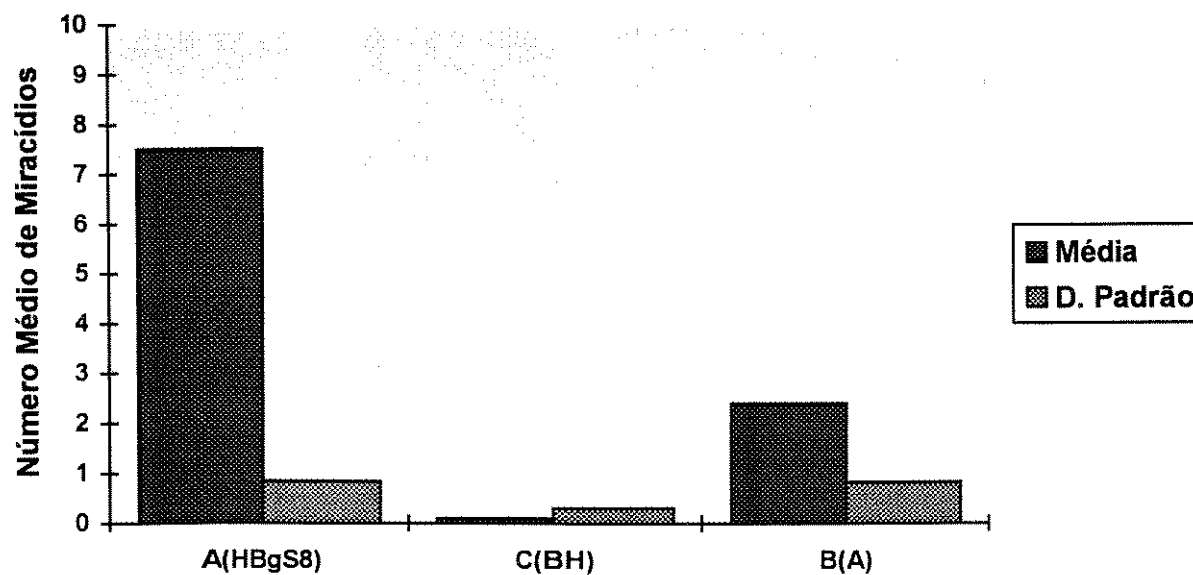


Fig. 43



FIGURAS 42 E 43: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 7 (Fig. 42) e 8 (Fig. 43) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS). Eixo X: A(HBgS7) = Câmara A, contendo a fração 7 da cromatografia da HBgS; A(HBgS8) = Câmara A, contendo a fração 8 da cromatografia da HBgS; C(BH) = Canal C, onde eram depositados miracídeos BH; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 44

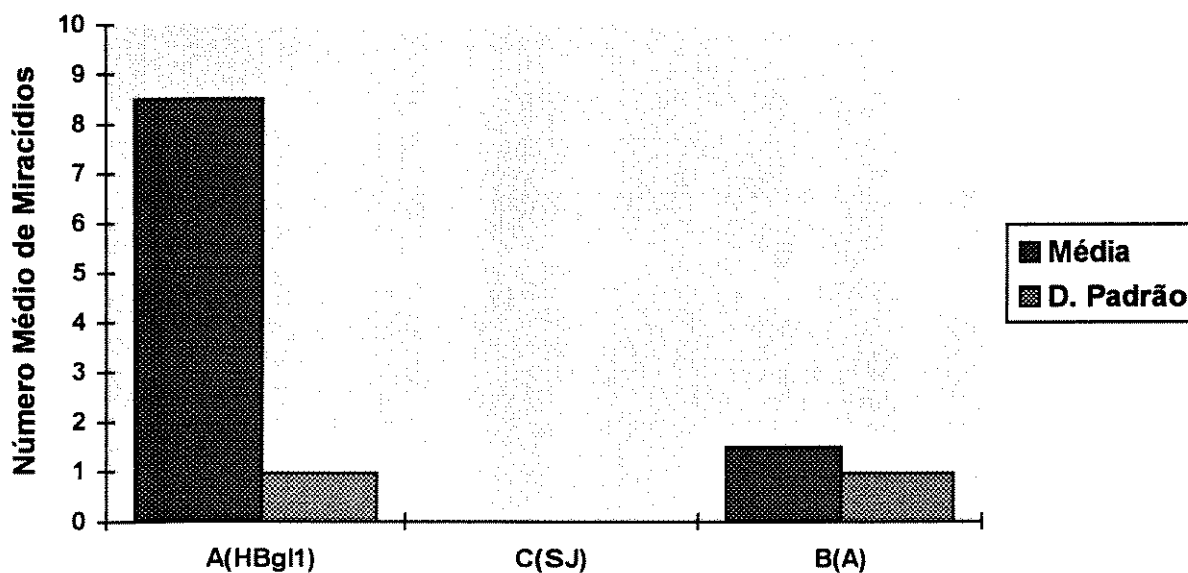
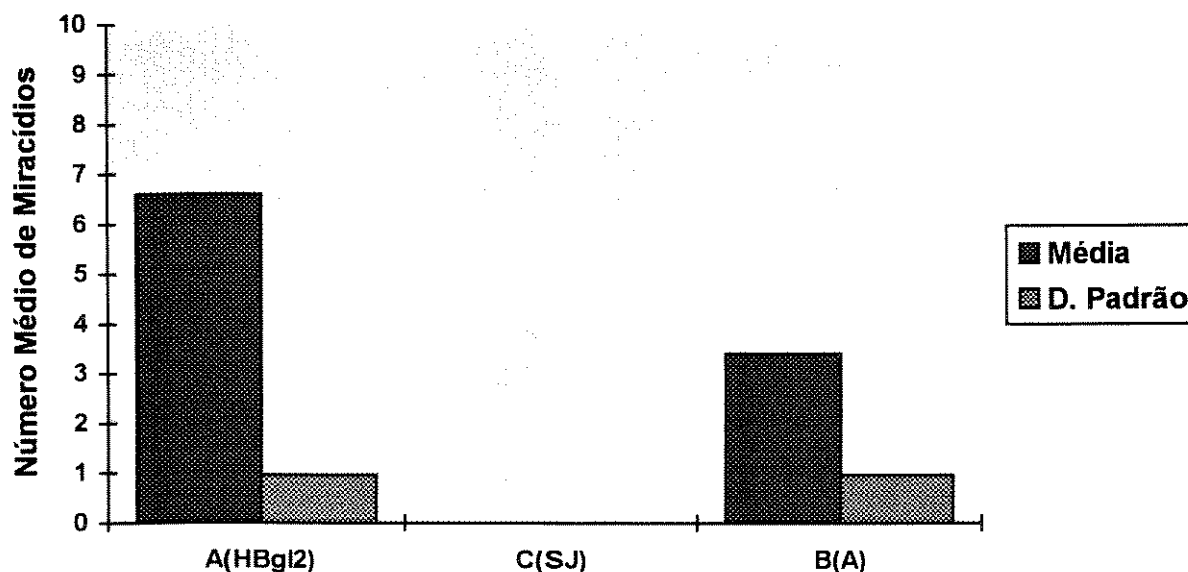


Fig. 45



FIGURAS 44 E 45: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 1 (Fig. 44) e 2 (Fig. 45) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*(HBgI). Eixo X: A(HBgI1) = Câmara A, contendo a fração 1 da cromatografia da HBgI; A(HBgI2) = Câmara A, contendo a fração 2 da cromatografia da HBgI; C(BH) = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 46

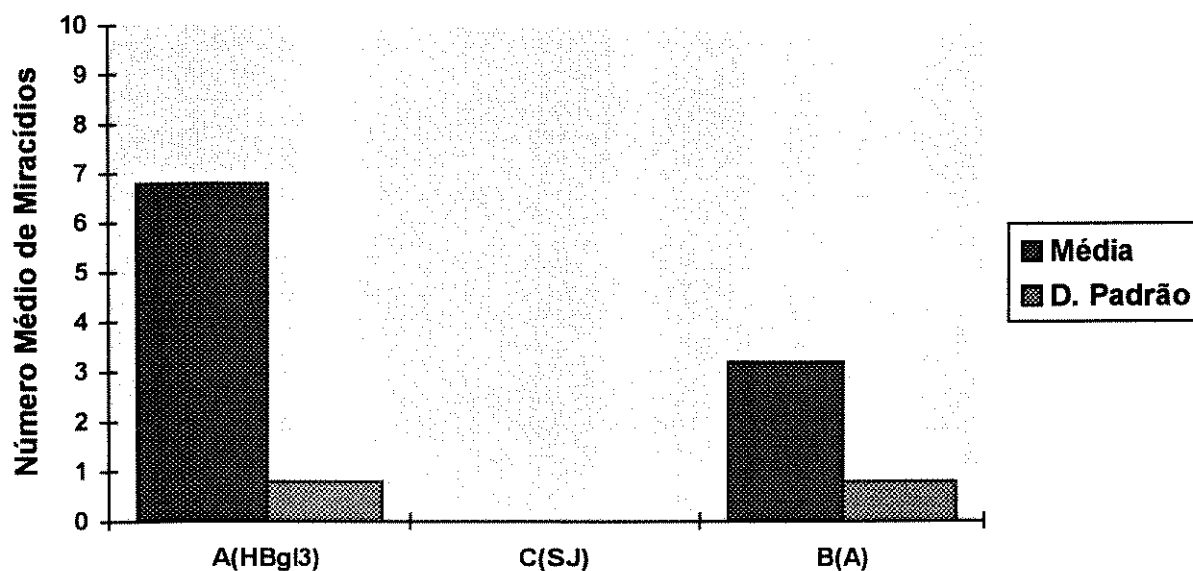
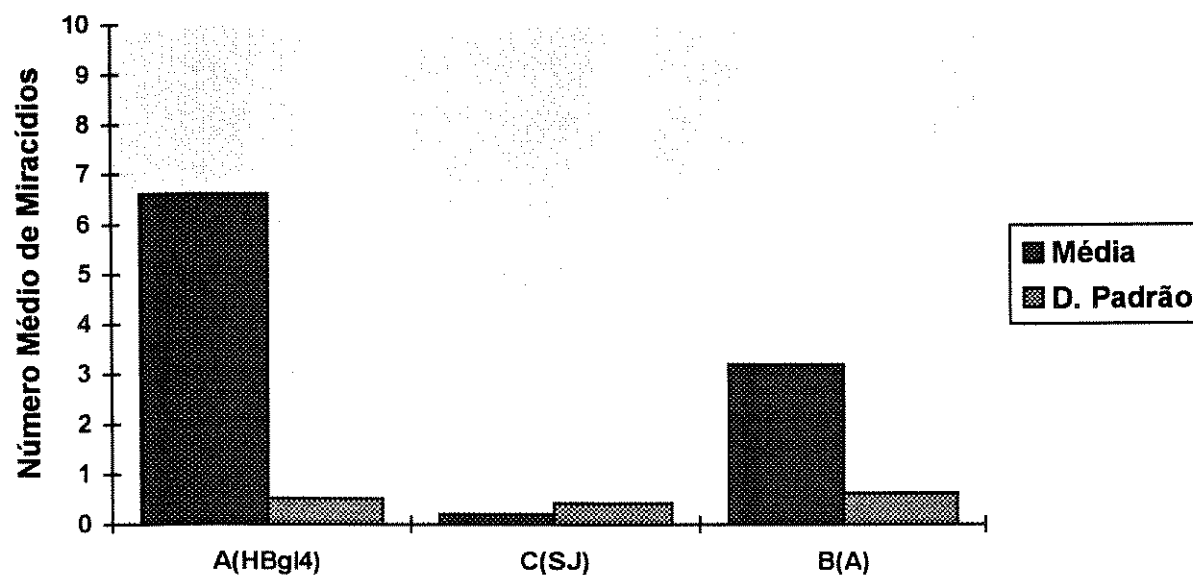


Fig. 47



FIGURAS 46 E 47: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 3 (Fig. 46) e 4 (Fig. 47) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* (HBgI). Eixo X: A(HBgI3) = Câmara A, contendo a fração 3 da cromatografia da HBgI; A(HBgI4) = Câmara A, contendo a fração 4 da cromatografia da HBgI; C(SJ) = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 48

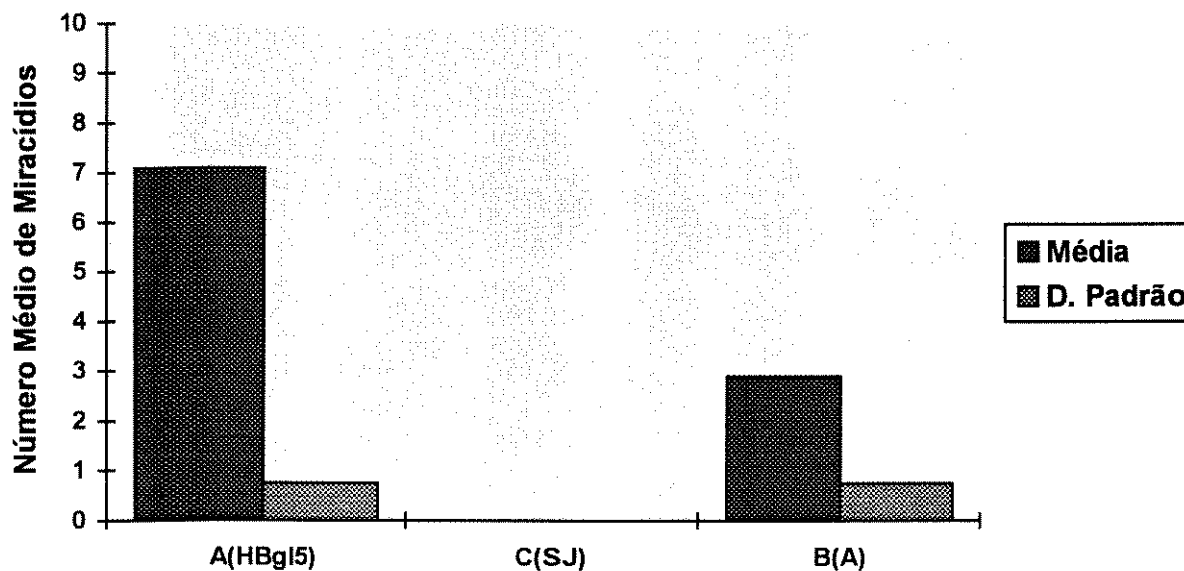
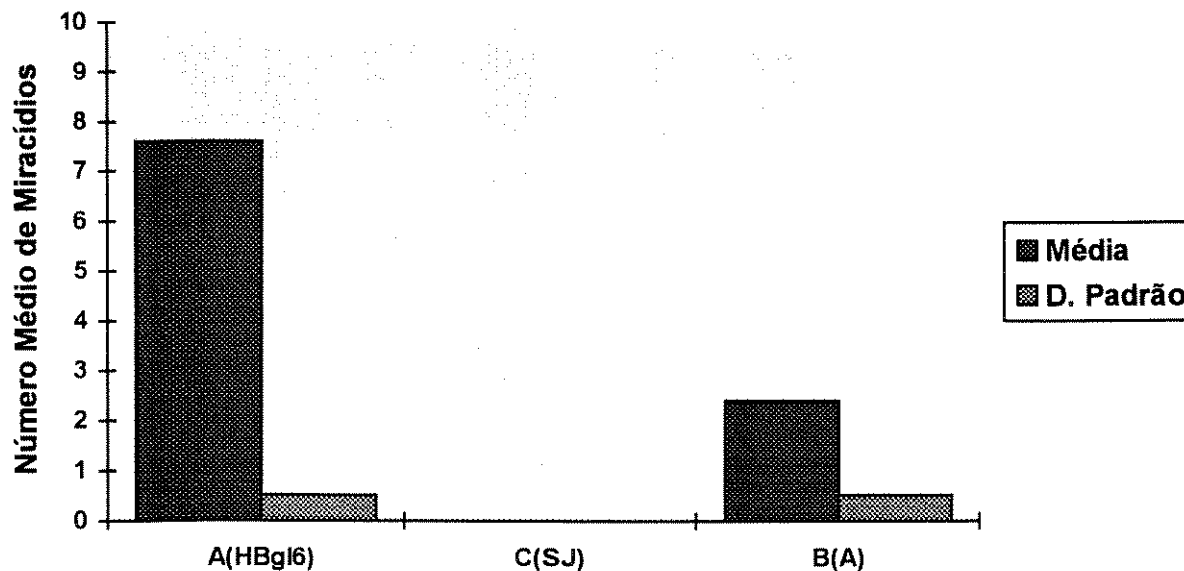


Fig. 49



FIGURAS 48 E 49: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 5 (Fig. 48) e 6 (Fig. 49) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (HBgI). Eixo X: A(HBgI5) = Câmara A, contendo a fração 5 da cromatografia da HBgI; A(HBgI6) = Câmara A, contendo a fração 6 da cromatografia da HBgI; C(SJ): Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y = Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 50

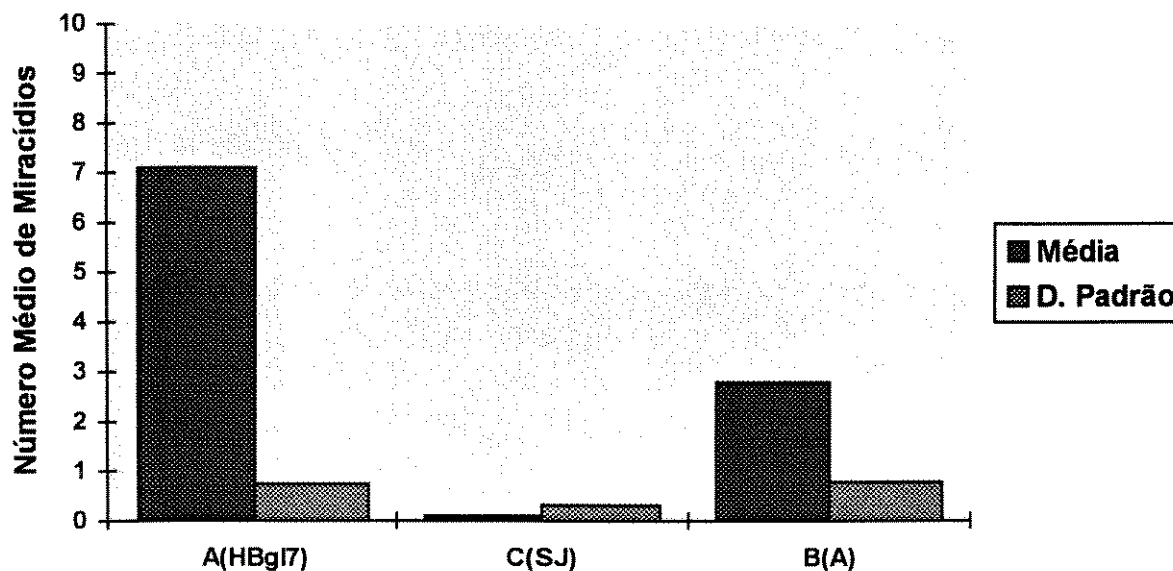
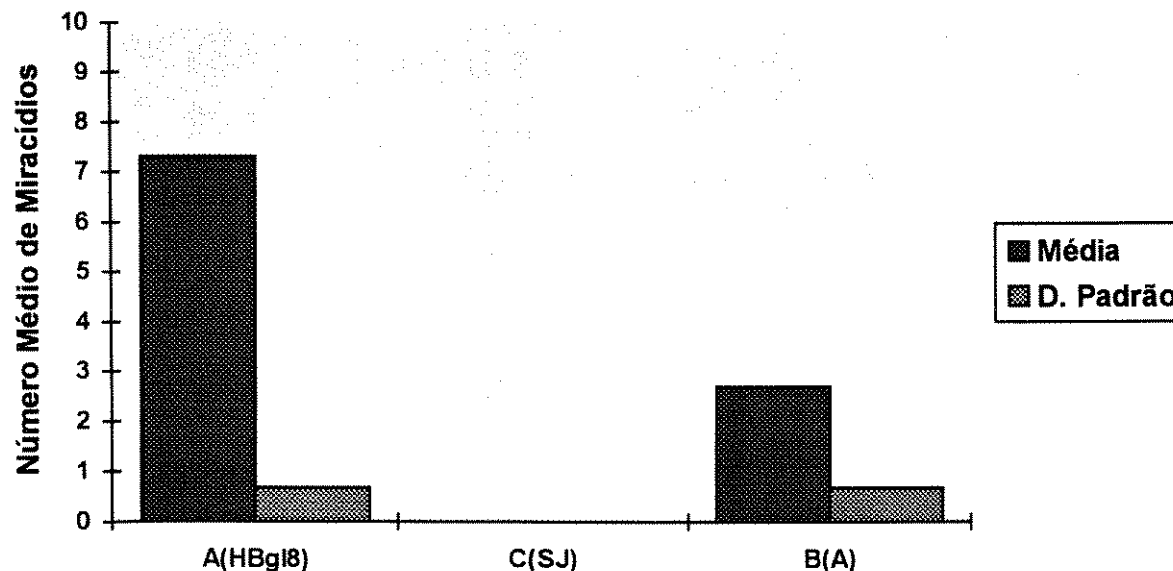


Fig. 51



FIGURAS 50 E 51: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 7 (Fig. 50) e 8 (Fig. 51) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* (HBgI). Eixo X: A(HBgI7) = Câmara A, contendo a fração 7 da cromatografia da HBgI; A(HBgI8) = Câmara A, contendo a fração 8 da cromatografia da HBgI; C(SJ) = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 52

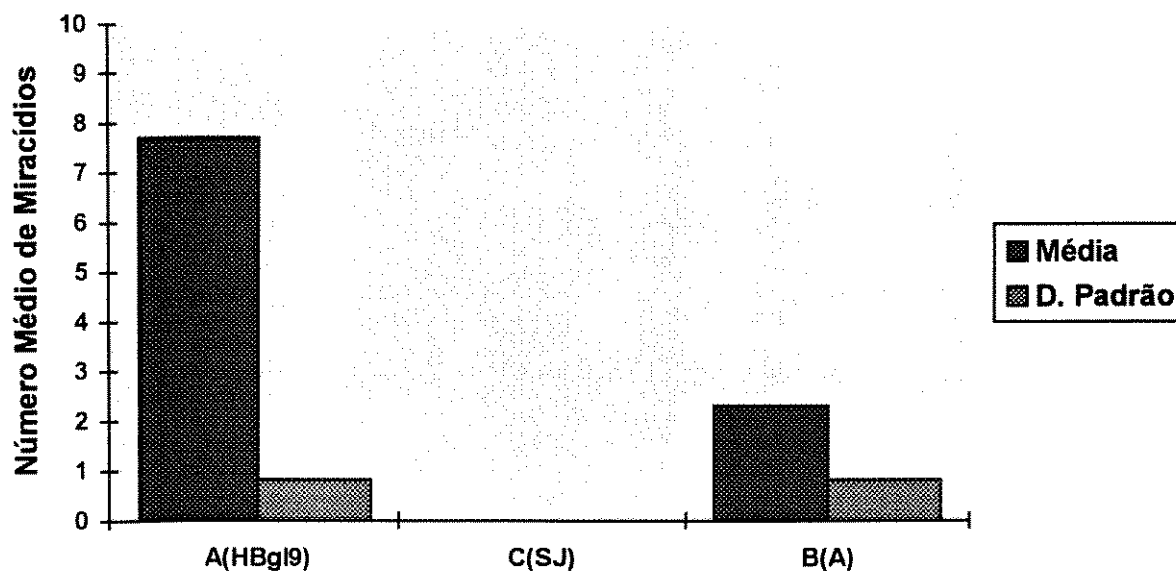
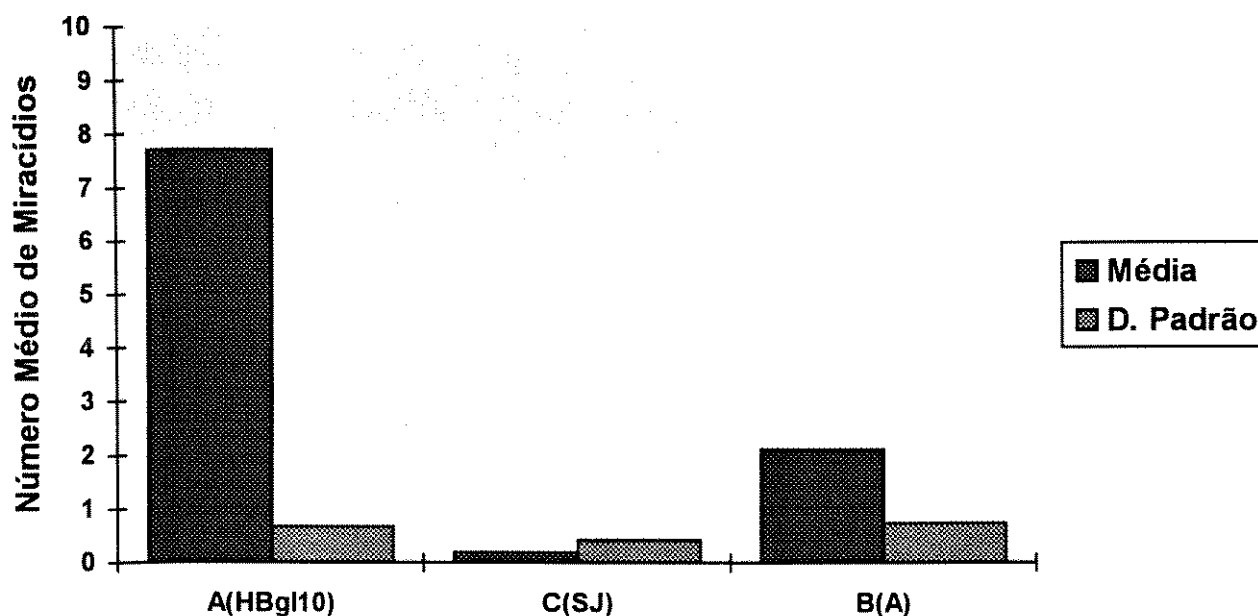


Fig. 53



FIGURAS 52 E 53: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 9 (Fig. 52) e 10 (Fig. 53) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* (HBgI). Eixo X: A(HBgI9) = Câmara A, contendo a fração 9 da cromatografia da HBgI; A(HBgI10) = Câmara A, contendo a fração 10 da cromatografia da HBgI; C(SJ) = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 54

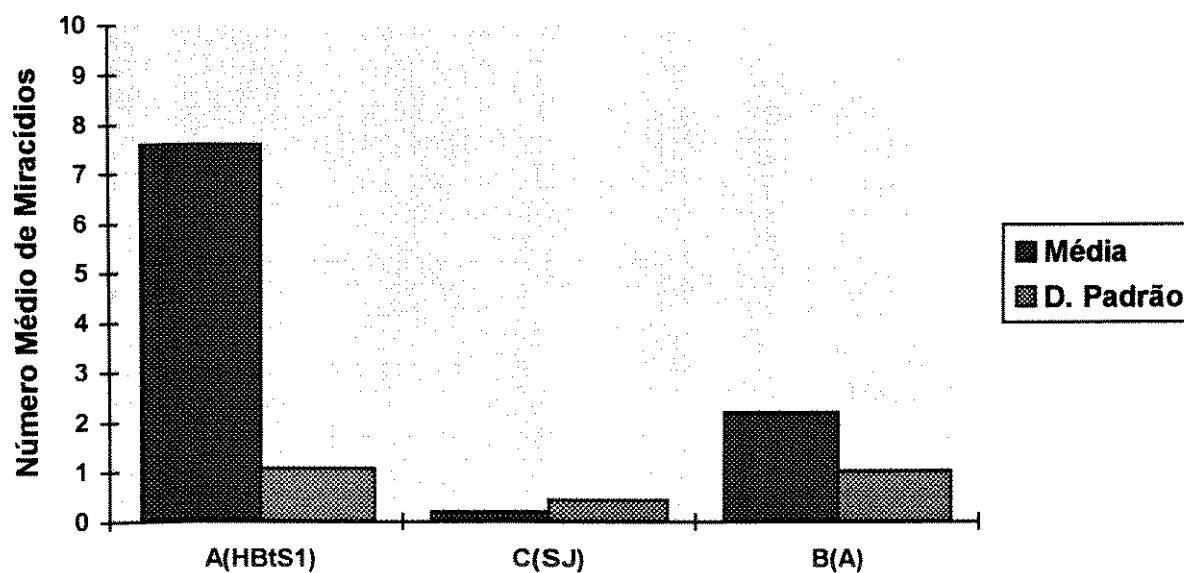
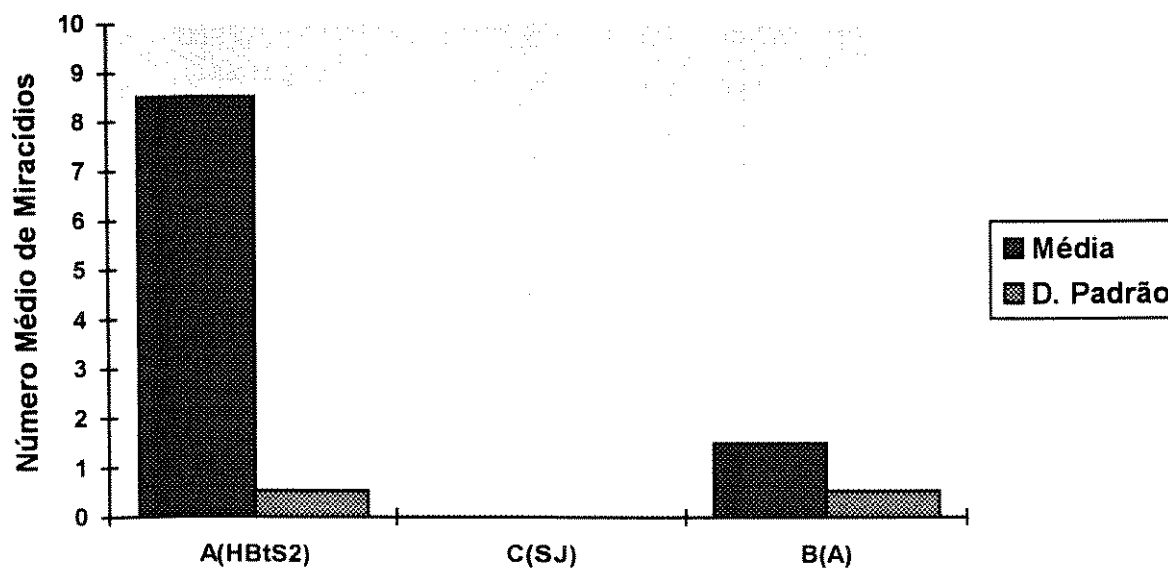


Fig. 55



FIGURAS 54 E 55: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 1 (Fig. 54) e 2 (Fig. 55) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (HBtS). Eixo X: A(HBtS1) = Câmara A, contendo a fração 1 da HBtS; A(HBtS2) = Câmara A, contendo a fração 2 da HBtS; C(SJ) = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 56

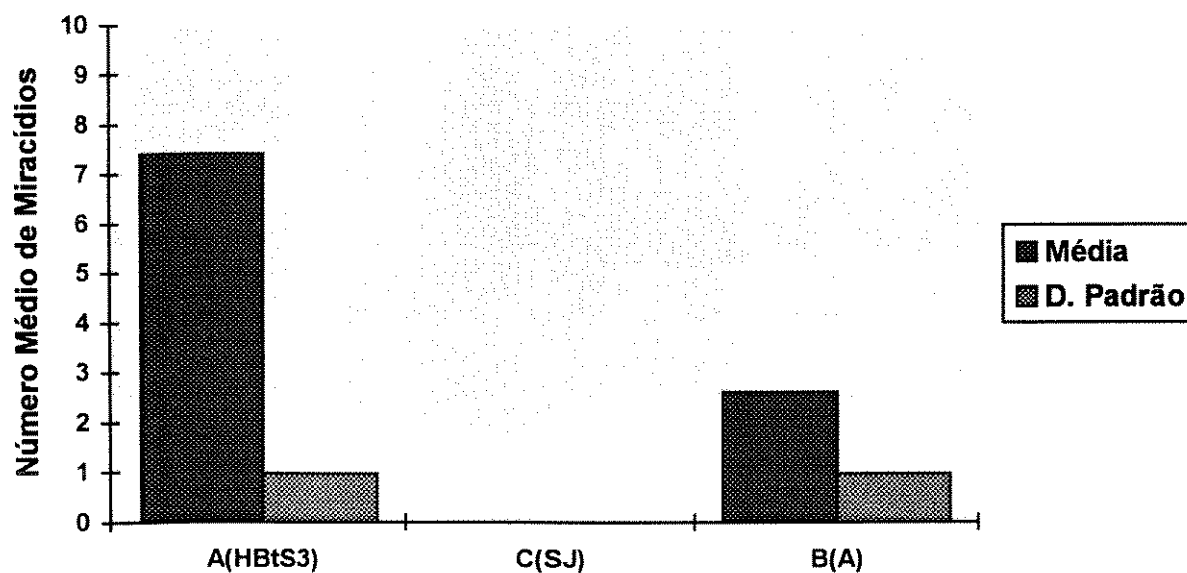
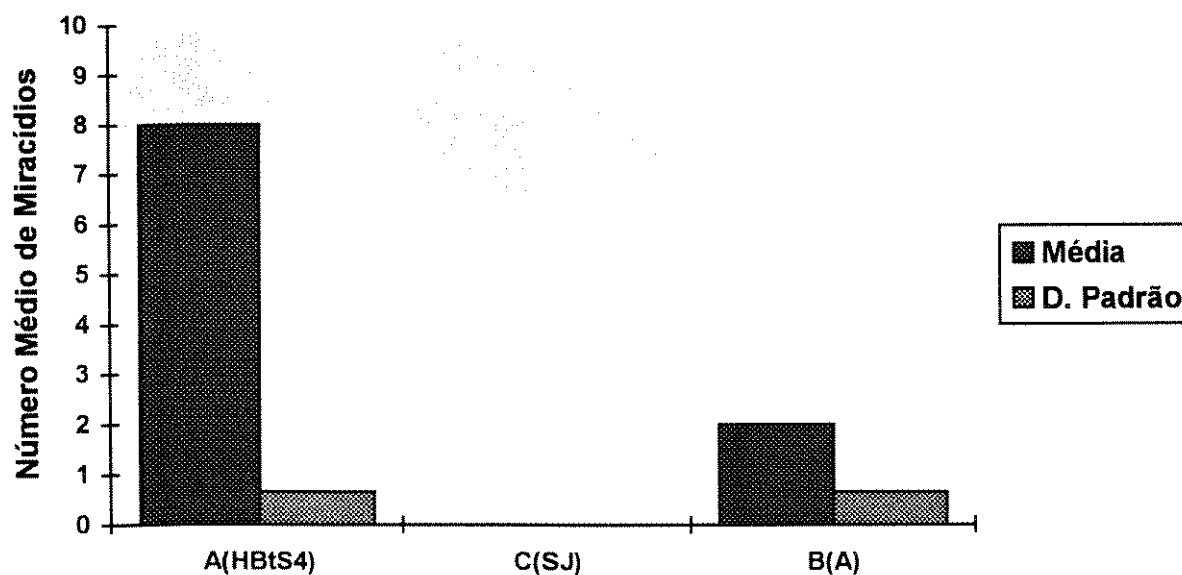


Fig. 57



FIGURAS 56 E 57: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 3 (Fig. 56) e 4 (Fig. 57) da cromatografia de exclusão molecular da hemoilinfá de *B. tenagophila* sadia (HBtS). Eixo X: A(HBtS3) = Câmara A, contendo a fração 3 da HBtS; A(HBtS4) = Câmara A, contendo a fração 4 da HBtS; C(SJ) = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 58

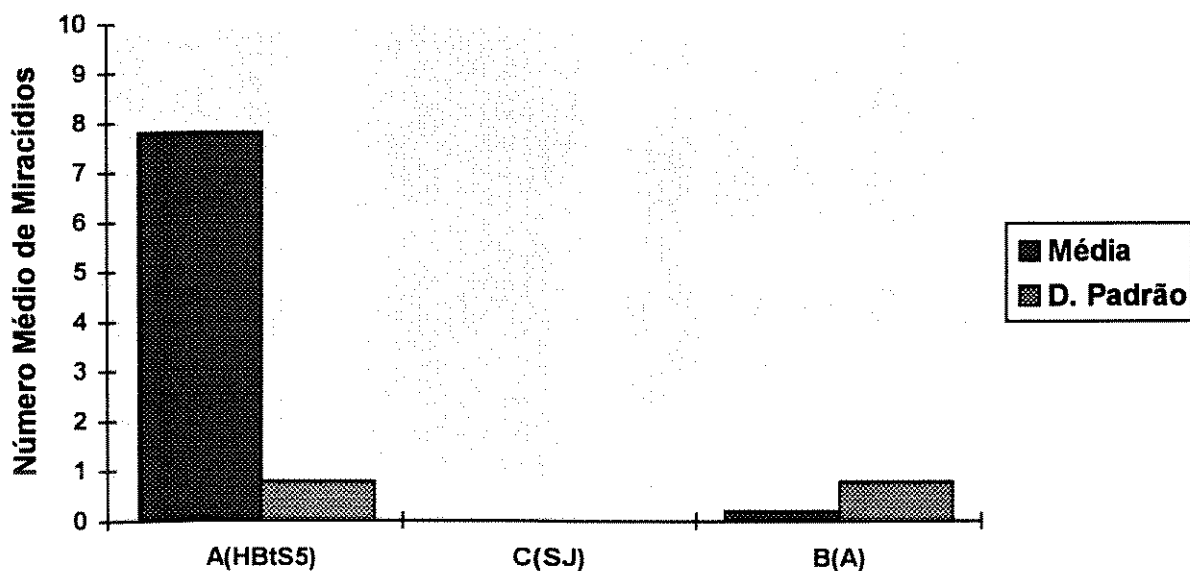
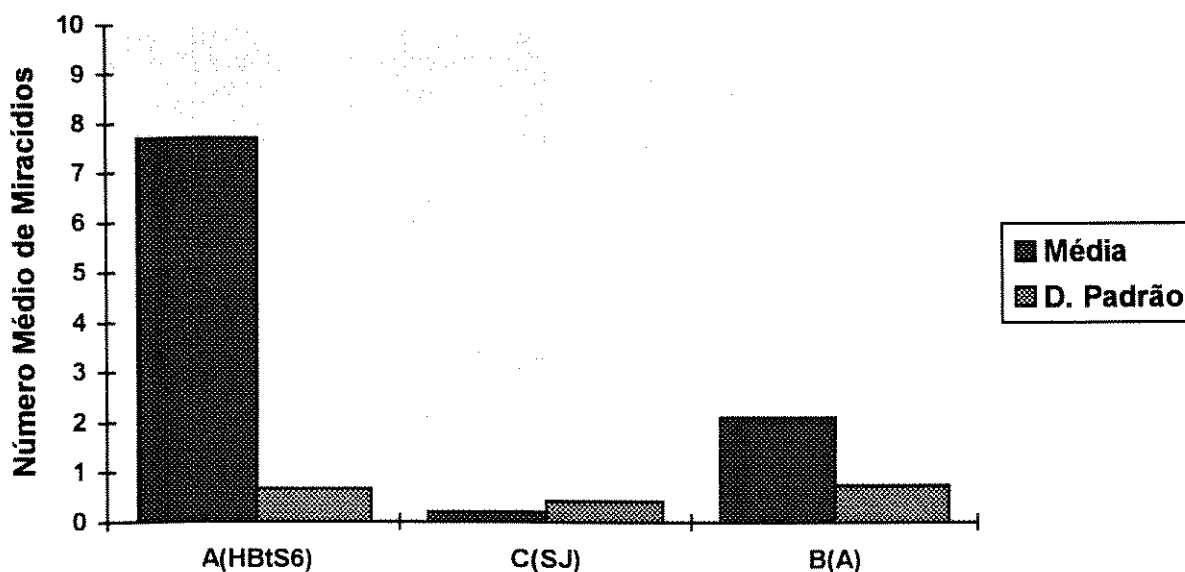


Fig. 59



FIGURAS 58 E 59: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 5 (Fig. 58) e 6 (Fig. 59) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (HBtS). Eixo X: **A(HBtS5)** = Câmara A, contendo a fração 5 da cromatografia da HBtS; **A(HBtS6)** = Câmara A, contendo a fração 6 da cromatografia da HBtS; **C(SJ)** = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; **B(A)** = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 60

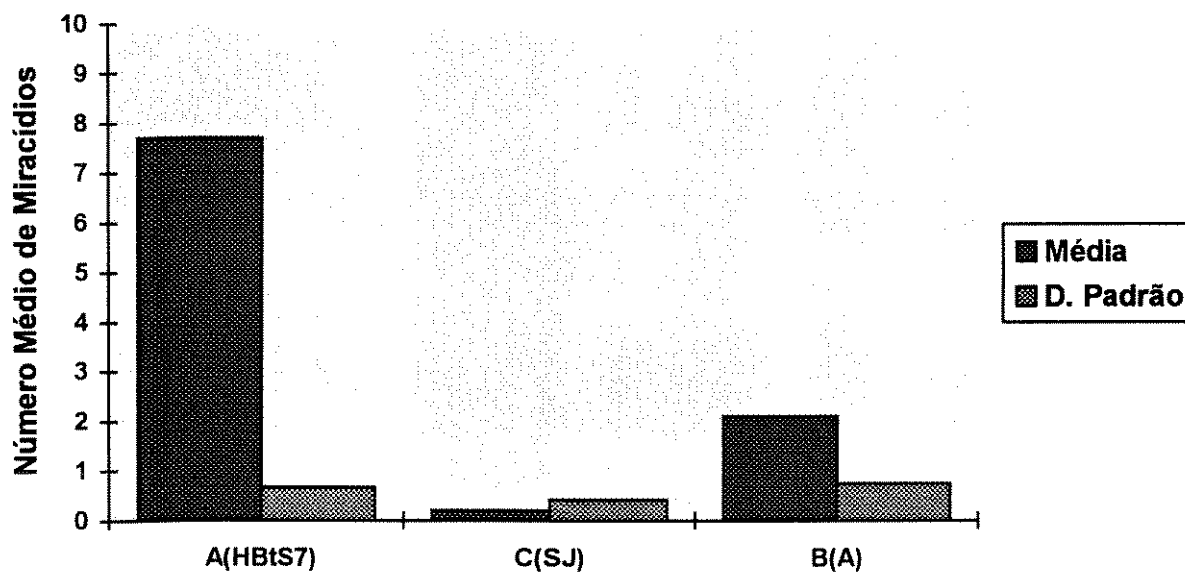
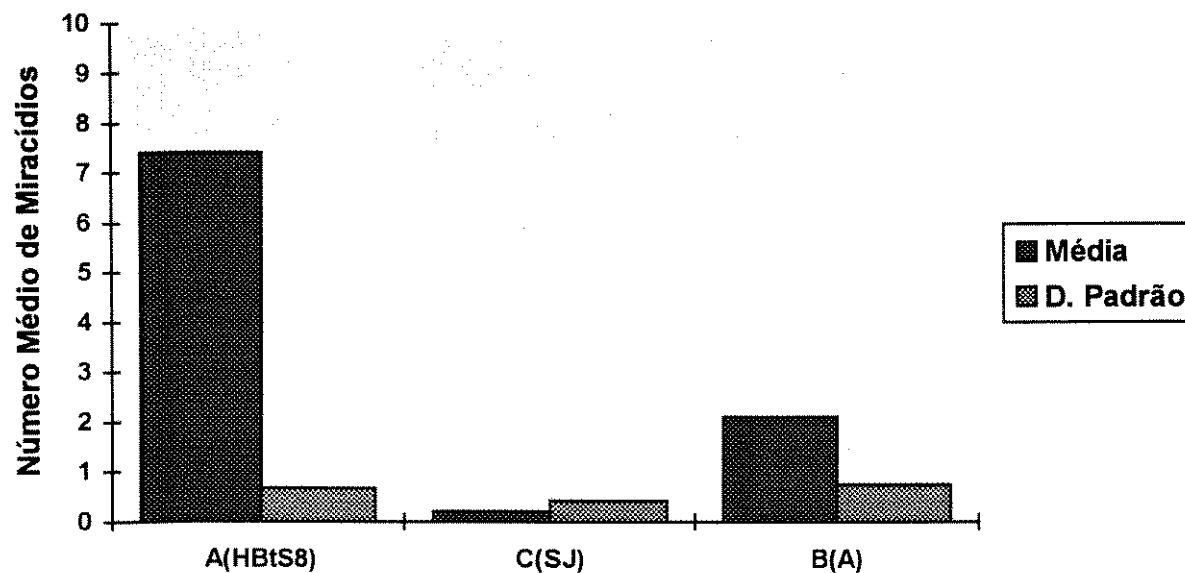


Fig. 61



FIGURAS 60 E 61: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 7 (Fig. 81) e 8 (Fig. 82) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (HBtS). Eixo X: **A(HBtS7)** = Câmara A, contendo a fração 7 da cromatografia da HBtS; **A(HBtS8)** = Câmara A, contendo a fração 8 da cromatografia da HBtS; **C(SJ)** = Canal C, onde eram depositados miracídios SJ; **B(A)** = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídios presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 62

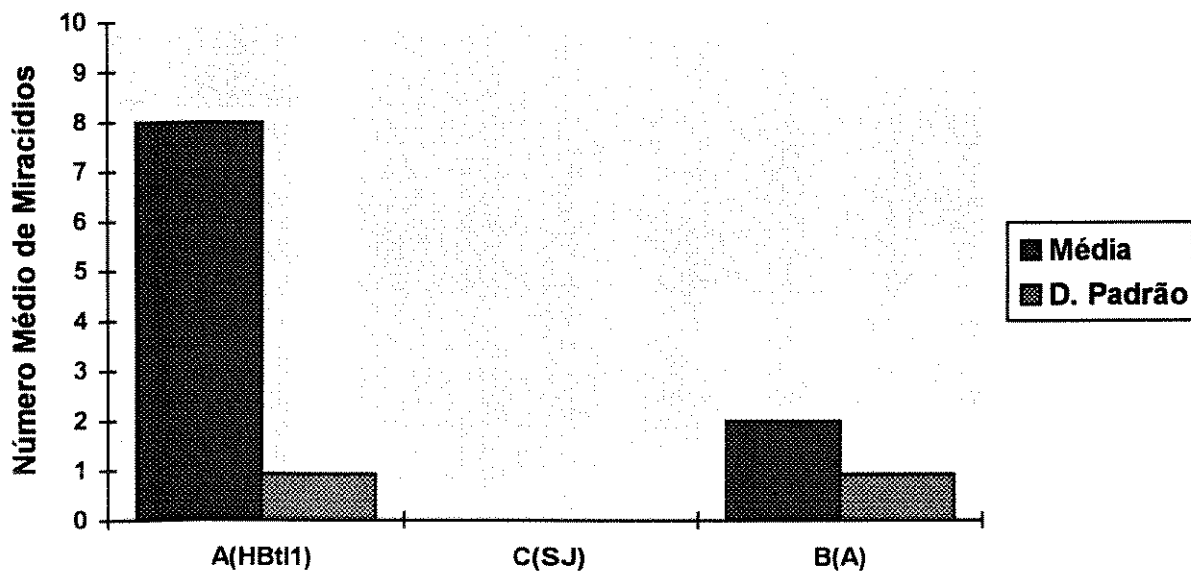
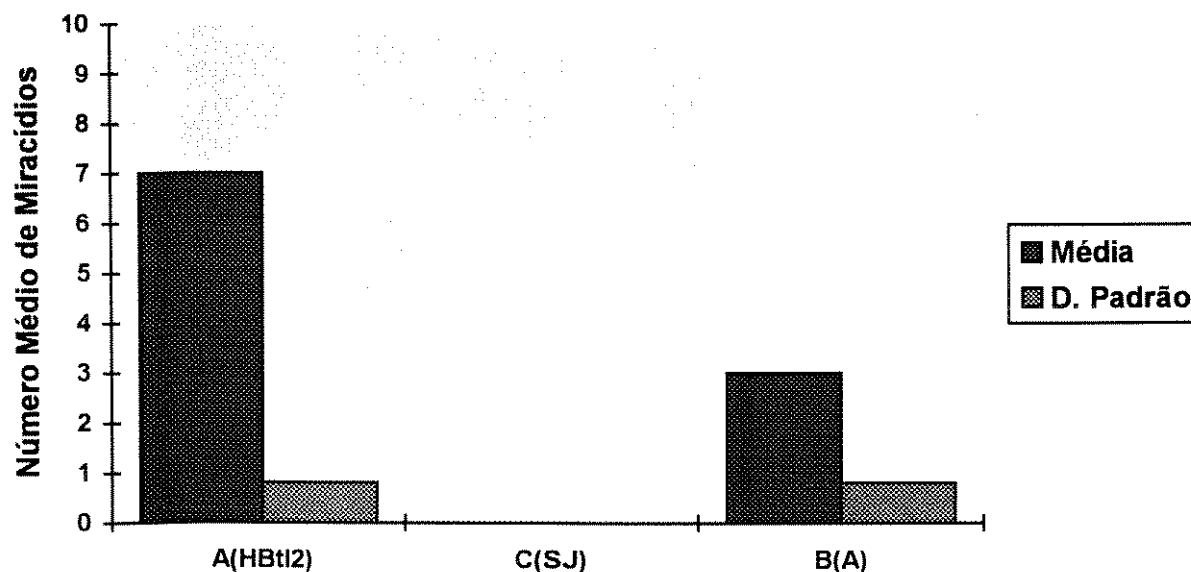


Fig. 63



FIGURAS 62 E 63: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 1 (Fig. 62) e 2 (Fig. 63) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (HBtI). Eixo X: A(HBtI1) = Câmara A, contendo a fração 1 da cromatografia da HBtI; A(HBtI2) = Câmara A, contendo a fração 2 da cromatografia da HBtI; C(SJ) = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 64

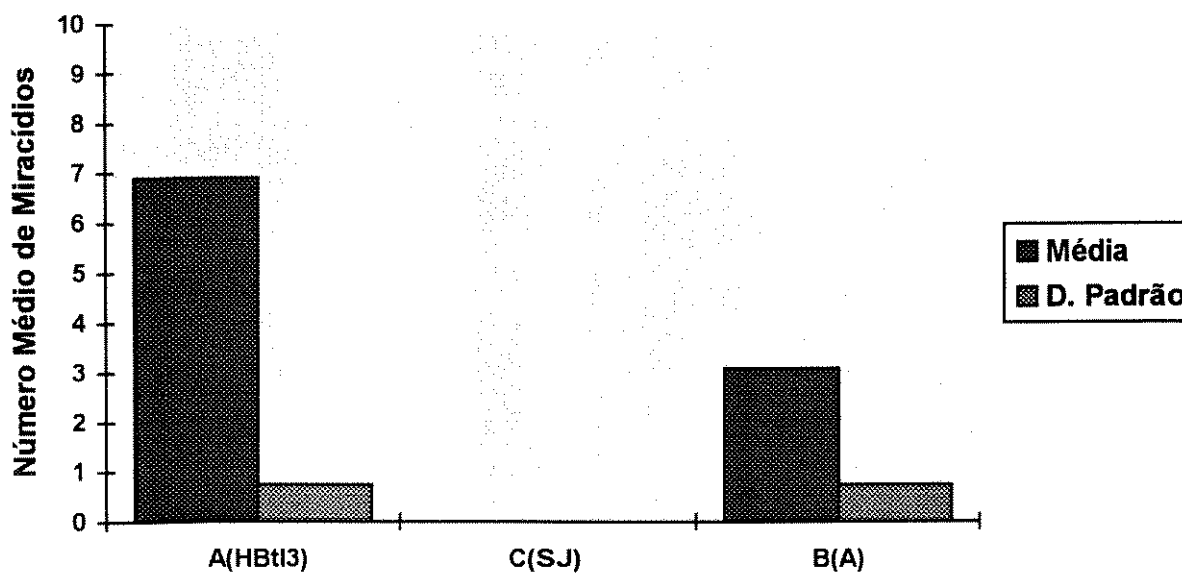
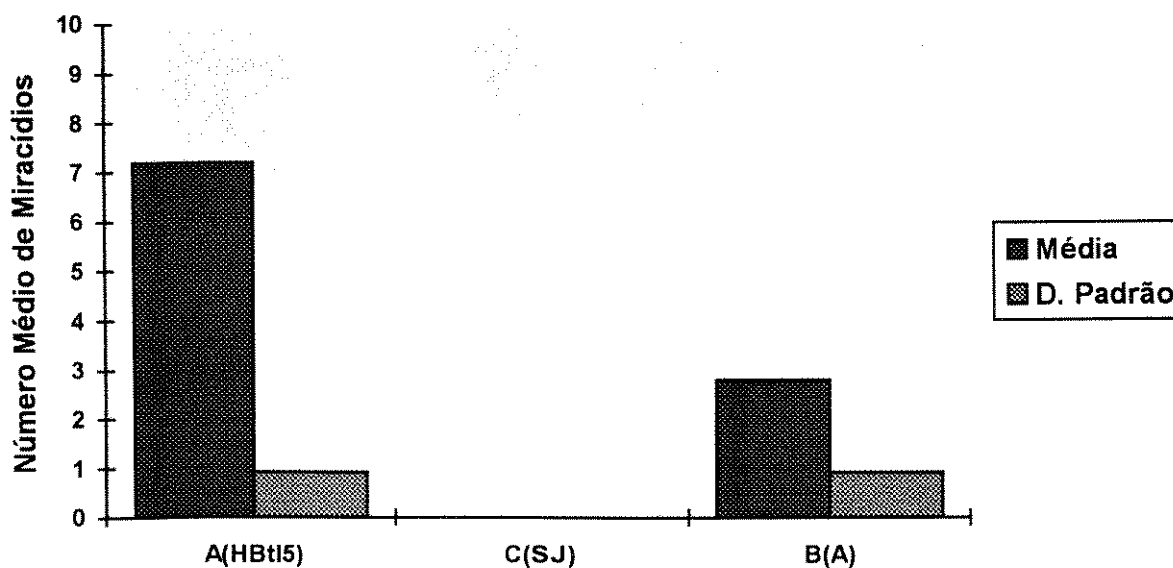


Fig. 65



FIGURAS 64 E 65: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 3 (Fig. 64) e 5 (Fig. 65) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (HBtI). Eixo X: A(HBtI3) = Câmara A, contendo a fração 3 da cromatografia da HBtI; A(HBtI5) = Câmara A, contendo a fração 5 da cromatografia da HBtI; C(SJ) = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 66

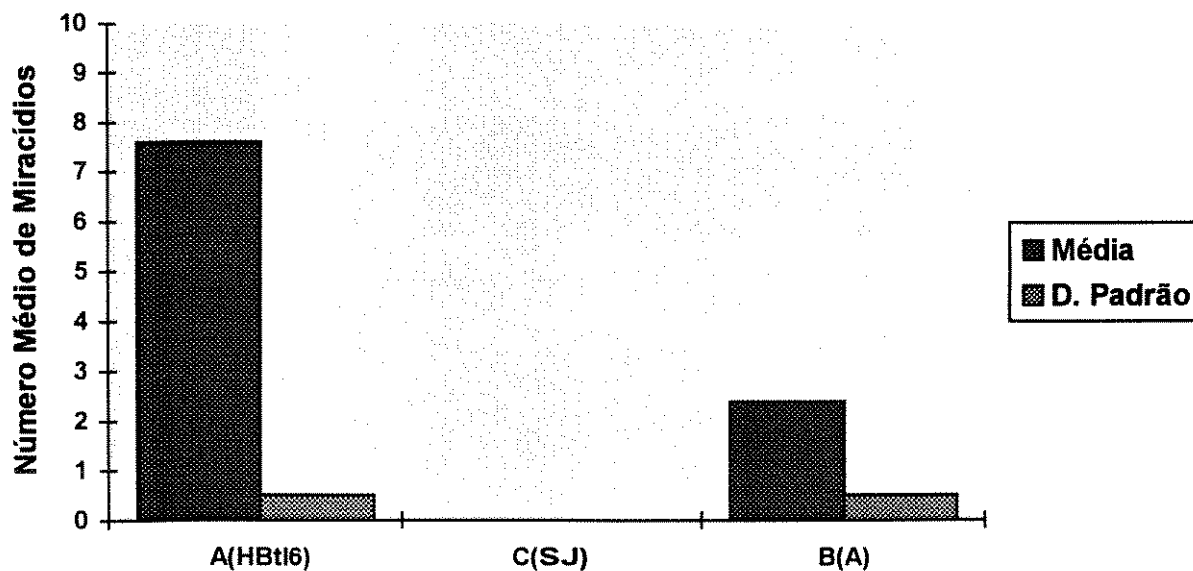
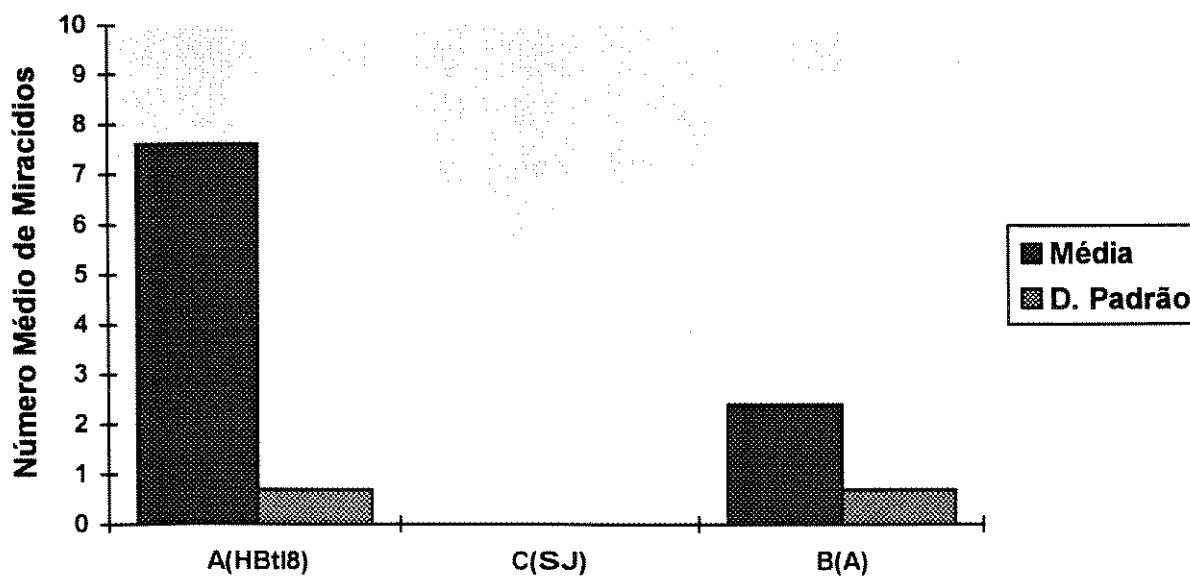


Fig. 67



FIGURAS 66 E 67: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 6 (Fig. 66) e 8 (Fig. 67) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (HBtI). Eixo X: A(HBtI6) = Câmara A, contendo a fração 6 da cromatografia da HBtI; A(HBtI8) = Câmara A, contendo a fração 8 da cromatografia da HBtI; C(SJ) = Canal C, onde eram depositados miracídeos SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 68

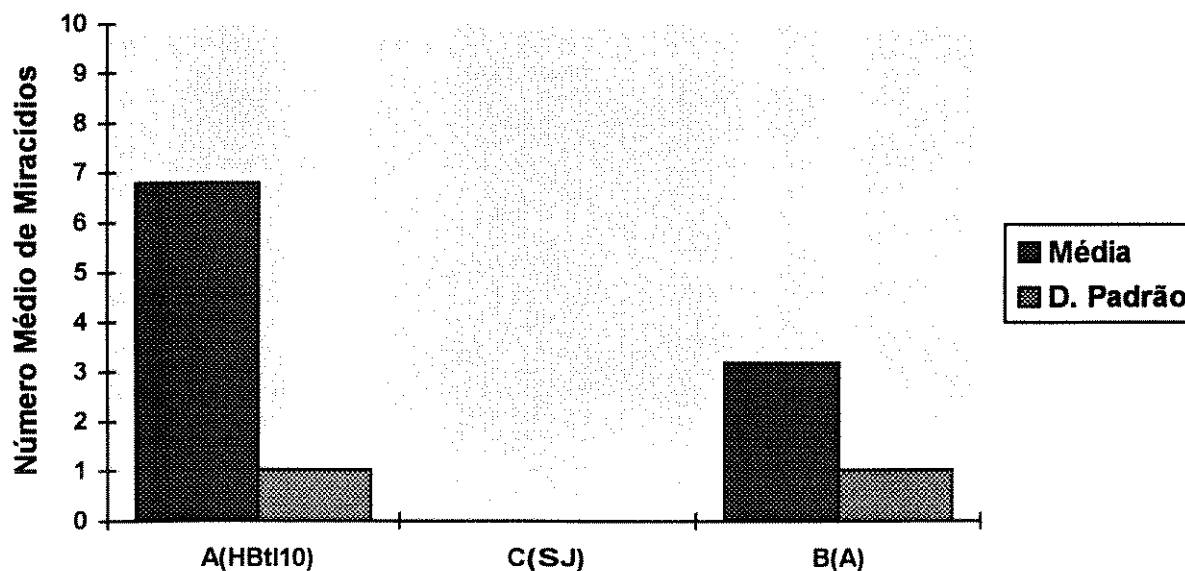
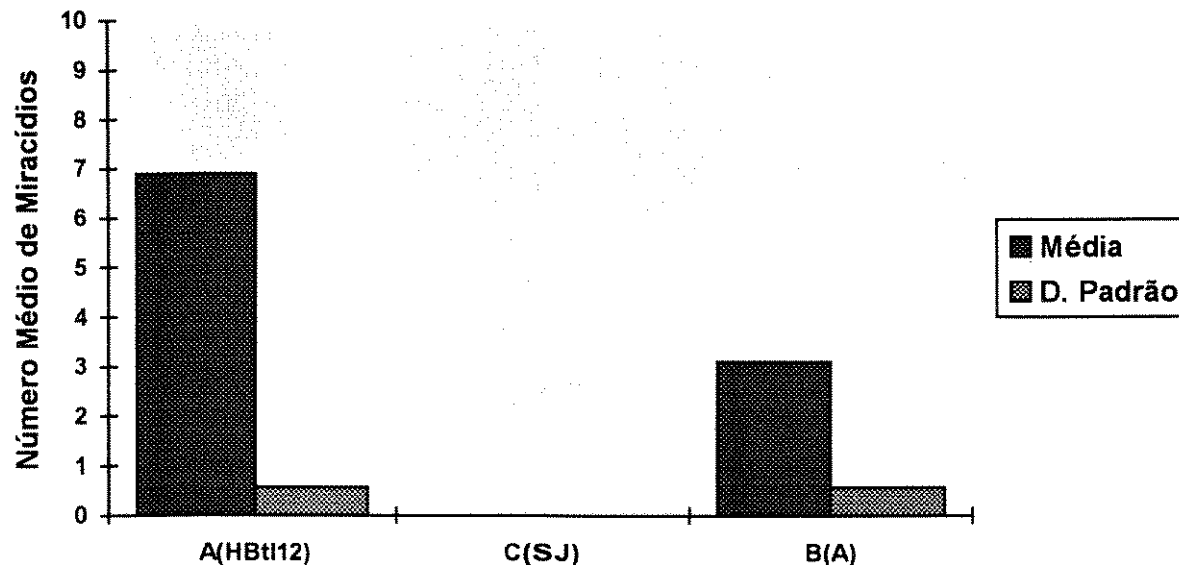


Fig. 69



FIGURAS 68 E 69: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente às frações 10 (Fig. 68) e 12 (Fig. 69) da cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (HBtI). Eixo X: A(HBtI10) = Câmara A, contendo a fração 10 da cromatografia da HBtI; A(HBtI12) = Câmara A, contendo a fração 12 da cromatografia da HBtI; C(SJ) = Canal C, onde eram depositados miracidios SJ; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 70

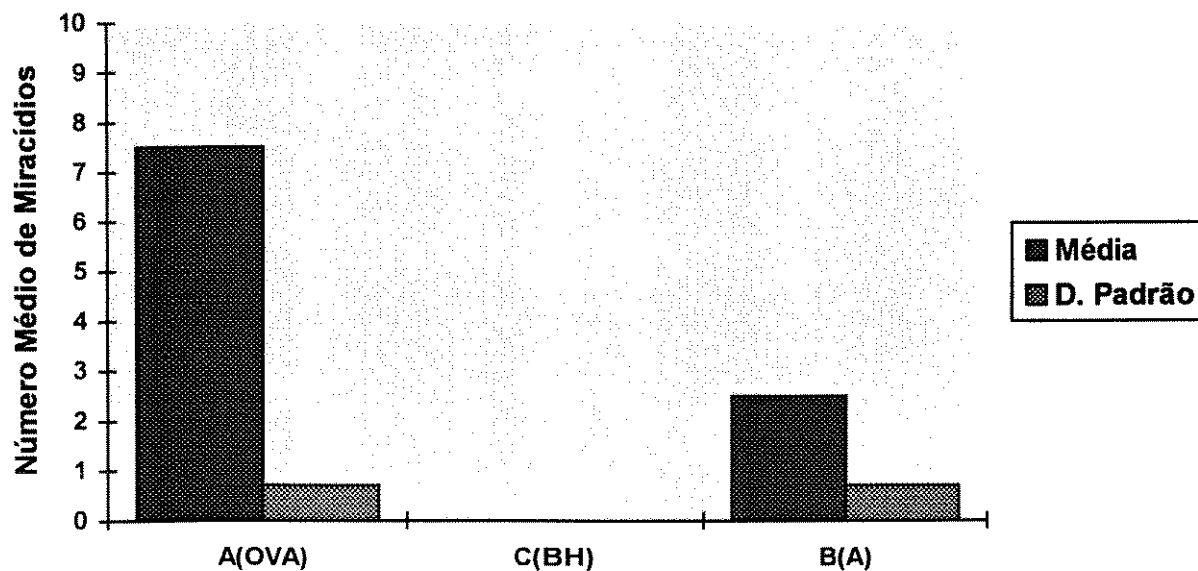
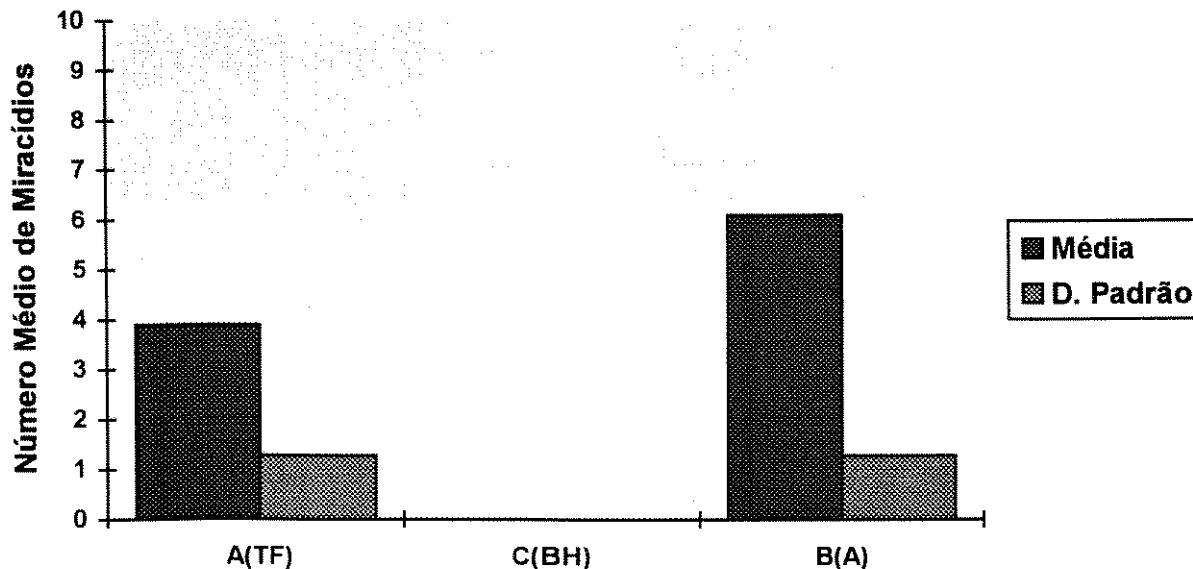


Fig. 71



FIGURAS 70 E 71: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente à Ovalbumina (OVA), Fig. 70 e ao tampão fosfato (TF), Fig. 71, ambos grupos-controle do teste de atração miraxonal. Eixo X: **A(OVA)** = Câmara A, contendo a Ovalbumina; **A(TF)** = Câmara A, contendo o tampão fosfato; **C(BH)** = Canal C, onde eram depositados miracídeos BH; **B(A)** = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y: Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

Fig. 72

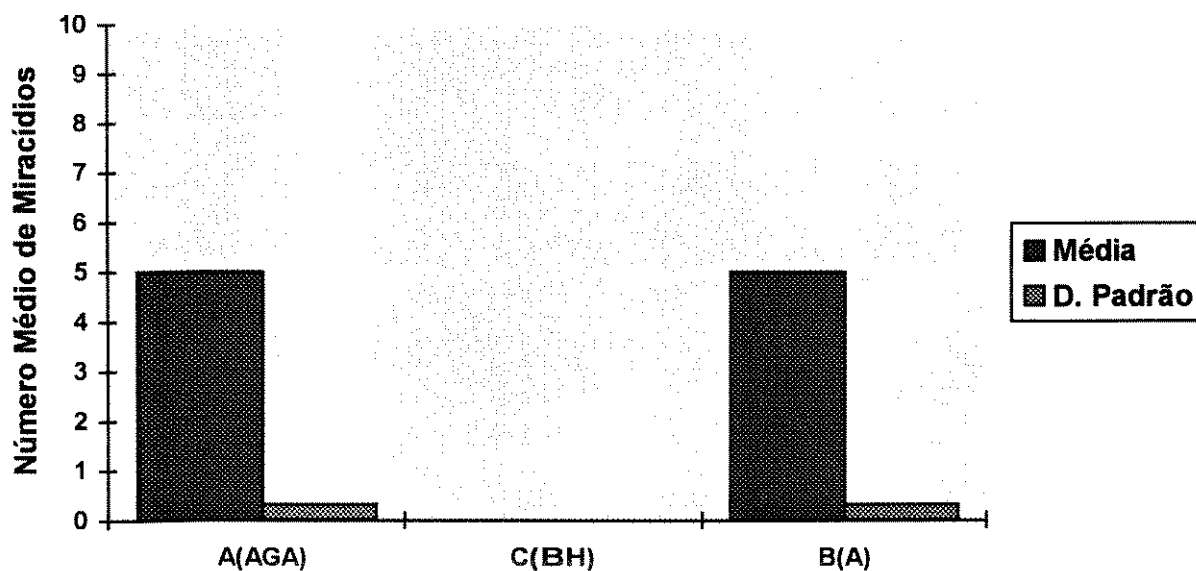


FIGURA 72: Teste da atividade biológica de atração miraxonal frente à Agarose (AGA), Grupo - Controle do teste de atração miraxonal. Eixo X: A(AGA) = Câmara A, contendo a Agarose (AGA); C(BH) = Canal C, onde eram depositados miracídeos BH; B(A) = Câmara B, onde era adicionada água. Eixo Y = Número médio de miracídeos presentes nas câmaras A ou B ou canal C.

4.- DISCUSSÃO

A eficiência da relação parasita x hospedeiro, particularmente do *S. mansoni* com seu hospedeiro invertebrado, molusco do gênero **Biomphalaria**, depende de diversos fatores associados às condições do ecossistema, incluindo o nível de oxigênio, os nutrientes necessários ao desenvolvimento do parasita, umidade, luz, calor, etc. Interferem nessa relação a herança genética do parasita e do seu hospedeiro, o que confere a ambos o grau de especificidade. Nos trematódeos digenéticos, salvo algumas exceções, cada espécie de trematódeo é capaz de infectar somente algumas espécies de moluscos, normalmente do mesmo gênero, encontradas em determinadas localizações geográficas. Embora a especificidade do hospedeiro possa ser influenciada por fatores ecológicos, etológicos ou fisiológicos, existe um forte componente imunológico. Existem mecanismos específicos de resposta imune contra a larva do trematódeo, e ao mesmo tempo, mecanismos de evasão desenvolvidos pelo parasita (van der Knaap & Loker, 1990).

A presença do *S. mansoni* nos moluscos planorbídeos do gênero **Biomphalaria** leva a diversas alterações bioquímicas, fisiológicas e metabólicas do hospedeiro, incluindo a participação dos aminoácidos livres e proteínas. Existem diversos aspectos importantes nessa relação, que merecem especial atenção. Entre eles, escolhemos estudar a atração miraxonal e verificar a composição bioquímica dos moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* submetidos ou não à infecção pelo *S. mansoni*, sua SCW (Snail Conditioned Water), sua hemolinfa e glândula do albúmen.

4.1) Estudo da atração miraxonal:

Verificamos haver por volta de 80% de atração miraxonal frente aos moluscos *B. glabrata* sadios, ao utilizarmos miracídios de *S. mansoni* de linhagem simpátrica (1º grupo experimental, figura 1). Ao submetermos miracídios da mesma linhagem à moluscos *B. glabrata* infectados por *S. mansoni* observamos apenas 20% de migração em direção à câmara A, onde estava o molusco e 80 % em direção à câmara B, onde havia apenas água. Isto sugere haver repelência aos miracídios exercida pelos moluscos infectados (2º grupo experimental, figura 2). Frente à SCW de moluscos *B. glabrata* sadios observamos haver 100% de atração miraxonal (3º grupo experimental, figura 3). O mesmo foi observado frente à SCW de moluscos infectados por *S. mansoni* (4º grupo experimental, figura 4). Tais resultados demonstraram haver maior atração miraxonal frente à SCW que na presença do molusco. Esta conclusão é concordante com a obtida por Brasio et alii (1985).

Magalhães et alii (1993) ao estudarem o comportamento de *B. glabrata* infantil e adulta exposta ao *S. mansoni* com relação à atração miraxonal, obtiveram as seguintes conclusões: 1) Moluscos que continham esporocístos secundários perderam o poder de atração; 2) O efeito idade (infantil ou adulta) não exerceu influência nos resultados. Essas observações foram confirmadas estatisticamente.

No quinto grupo experimental realizado, ao submetermos miracídios SJ à moluscos *B. tenagophila* sadios verificamos apenas 44% de atração miraxonal (figura 5). Tal resultado pode ser entendido, visto que esta espécie de molusco é considerada geneticamente resistente à infecção por *S. mansoni* se comparada à *B. glabrata*. Por outro lado, quando submetemos miracídios SJ à SCW desses mesmos moluscos sadios, observamos 80 % de atração miraxonal (7º grupo experimental, figura 7). Isto talvez ocorra devido à liberação de substâncias quimioatraentes na água, atraindo portanto mais miracídios que na presença do molusco. Em *B. glabrata* verificamos um comportamento semelhante dos miracídios, com

relação à atração miraxonal exercida pela SCW (Figuras 1 a 4). Brasio et alii (1985) observaram que a SCW de *B. glabrata* exerceu atração aparentemente semelhante sobre miracídios **BH** e **SJ**. Em *B. tenagophila*, a SCW exerceu atração mais intensa sobre os miracídios simpátricos.

Curiosamente, no sexto grupo experimental realizado, ao submetermos miracídios **SJ** aos moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni* verificamos haver 70 % de atração miraxonal, comparados aos 44% de atração miraxonal obtidos frente ao molusco sadio (Figura 6). Nossos resultados demonstraram que moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni* ou sua SCW atraem mais miracídios da linhagem simpátrica (**SJ**) que os moluscos sadios ou sua SCW. O mesmo não ocorreu com moluscos *B. glabrata* infectados ou sua SCW (Figuras 1 a 8). Podemos sugerir algumas hipóteses na tentativa de explicar a atração miraxonal exercida pelos moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni*, sua SCW e sua hemolinfa. Inicialmente, consideremos que o molusco infectado, bem como sua hemolinfa devem conter moléculas originadas do parasita ou moléculas sintetizadas pelo molusco, induzidas pelo parasita. Em vertebrados ocorreria normalmente uma situação inversa do que ocorreu com os moluscos *B. tenagophila* infectados, ou seja, havendo um primeiro contato com um determinado antígeno (patógeno), num próximo contato, a resposta imune seria exacerbada, a produção de anticorpos seria maior e a resposta celular seria mais eficiente. No caso da *B. tenagophila* infectada pode ter ocorrido que o parasita tenha se utilizado dos seguintes meios para mascarar a resposta imune do molusco hospedeiro: 1) Mimetismo molecular, ou seja, a síntese de moléculas semelhantes ao hospedeiro ou 2) Estimulação de um mecanismo de regulação da resposta imune, provocando a imunossupressão e possivelmente a liberação de moléculas quimioatraentes pelos moluscos no meio (água), atraindo os miracídios de *S. mansoni*.

Ao submetermos miracídios **BH** frente à SCW de *B. glabrata* não infectadas por *S. mansoni* e à SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*, verificamos haver 47 % de atração miraxonal em direção à câmara A, onde estava a SCW de *B. glabrata* sadias e 50 %

em direção à câmara B, onde estava a SCW de *B. tenagophila* infectadas (FIGURA 9). Tais resultados são coincidentes com os dados obtidos por Brasio et alii (1985) quando moluscos sadios de ambas espécies foram colocados nos dois compartimentos da câmara. Os miracídeos não discriminaram os moluscos sendo que 50% deles eram atraídos para cada um dos moluscos.

Quando confrontamos as amostras de SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* e de SCW de *B. tenagophila* não infectadas, frente à miracídeos SJ, verificamos haver 77% de atração miraxonal em direção à câmara B, onde estava a SCW de *B. tenagophila* sadias e apenas 31% em direção à câmara A, onde estava a SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* (Figura 10).

Esses resultados parecem fortalecer a hipótese de que quando infectados por *S. mansoni*, moluscos *B. glabrata* repelem miracídeos. Ao mesmo tempo, a migração em direção à SCW de *B. tenagophila* sadias parece indicar que realmente os miracídeos não discriminaram os moluscos, ou no caso, sua água de condicionamento (SCW). Os fatores que podem estar influenciando esse comportamento podem ser vários, principalmente a liberação de substâncias quimioatraentes pela *B. tenagophila* na SCW. Brasio et alii (1985), ao estudarem a resposta de miracídeos de *S. mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos, estudaram a eliminação de íons na água e verificaram que moluscos *B. tenagophila* eliminaram mais Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+ e NH_4^+ que *B. glabrata*. Esses cátions exerceram maior poder de atração frente à miracídeos SJ que frente à miracídeos BH. Nossos resultados parecem não serem concordantes com Brasio et alii (1985), pois observamos que na situação de confronto entre a SCW de *B. glabrata* infectadas, adicionada na câmara A, e a SCW de *B. tenagophila* sadias (câmara B), os miracídeos BH não discriminaram os moluscos e migraram em direção à câmara B. Entretanto, além da repelência exercida pela SCW de *B. glabrata* infectada, a atração exercida pela SCW de *B. tenagophila* pode não ter relação com os íons inorgânicos liberados, pode ter ocorrido pela liberação de outras substâncias quimioatraentes, como por exemplo, aminoácidos livres, peptídeos, etc.

Quando foram colocadas em confronto, a SCW de *B. glabrata* e a SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*, frente à miracídios SJ, observamos que 70% dos miracídios dirigiram-se para a câmara que continha a SCW de *B. tenagophila* infectadas (Figura 11). Podemos inferir que tenha ocorrido um efeito somatório entre a repelência aos miracídios exercida pela SCW de *B. glabrata* infectada e a atração exercida pela SCW de *B. tenagophila* infectada, como já observada anteriormente em nossos resultados.

Os resultados que havíamos obtido com os moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni* bem como de sua água de condicionamento foram confirmados com sua hemolinfa. Ao submetermos miracídios SJ à hemolinfa de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* 85% dos miracídios migraram para a câmara que continha a hemolinfa desses moluscos (Figura 15). O mesmo não ocorreu com moluscos *B. glabrata*. Ao submetermos miracídios BH à hemolinfa de *B. glabrata* não infectada por *S. mansoni* houve 72% de atração miraxonal enquanto que frente à hemolinfa de *B. glabrata* infectadas 61% dos miracídios migraram em direção à essa hemolinfa (Figura 13).

Em síntese, nossos resultados mostraram que tanto moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni* como sua SCW e sua hemolinfa atraem mais miracídios SJ que esses moluscos não infectados, sua SCW e sua hemolinfa. Resultados opostos ocorreram com moluscos *B. glabrata*.

Sugerimos algumas hipóteses para explicar a atração miraxonal exercida por *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*: 1) Moluscos *B. tenagophila* infectados, bem como sua hemolinfa devem conter moléculas originadas do parasita ou moléculas sintetizadas pelo molusco, induzidas pelo parasita; 2) Dois mecanismos podem ter sido usados pelo *S. mansoni* para mascarar a resposta imune do molusco hospedeiro: 2.1) Mimetismo molecular (síntese de moléculas semelhantes ao hospedeiro) ou 2.2) Estimulação de mecanismo regulador da resposta imune, provocando a imunossupressão e possivelmente a liberação de substâncias quimioatraentes na água, atraindo os miracídios.

Possivelmente, os mecanismos sugeridos para explicar a atração miraxonal exercida pelos moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni* podem estar envolvidos na preservação da linhagem de *S. mansoni*, da evolução do ciclo de vida do parasita e na manutenção da esquistossomose no estado de São Paulo e região sul do Brasil, onde é predominante o molusco *B. tenagophila*. Esta espécie é considerada geneticamente resistente à infecção pelo *S. mansoni*, baseada em estudos realizados, demonstrando a diferença de comportamento de *B. glabrata* e *B. tenagophila* frente à infecção pelas cepas simpátricas de *S. mansoni*, que é atribuída principalmente à herança genética. Vários fatores podem influenciar na susceptibilidade ou resistência, tais como a linhagem do parasita (Paraense & Correa, 1963a; Paraense & Correa, 1963b; Magalhães, L.A., 1970; Paraense & Correa, 1978; Souza Dias et. alii, 1987), a idade do hospedeiro (Richards, 1984) e a presença de infecção simultânea com outros parasitas (Noda & Loker, 1989), além das condições do ambiente.

Ao submetermos miracídios SJ ao extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* sadios ou de *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni* observamos que em média, houve 65% de atração miraxonal em direção ao extrato de glândula de moluscos sadios e 72% em direção ao extrato de glândula de moluscos infectados. Tal resultado parece ser semelhante aos resultados encontrados com miracídios SJ frente ao molusco *B. tenagophila*, bem como de sua hemolinfa e sua água de condicionamento (Figuras 5 e 6; 7 e 8; 11; 14 e 15; 16 e 17).

Ao confrontarmos a ação do extrato de glândula de albúmen e da SCW de *B. tenagophila* sadias observamos haver 82% de atração miraxonal em direção ao extrato da glândula de albúmen e apenas 18% em direção à SCW (Figuras 16 e 17).

Curiosamente, quando compararmos a capacidade de atração miraxonal do extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* sadios com a SCW de moluscos infectados da mesma espécie, verificamos haver 88% de atração miraxonal em direção ao extrato e apenas 12% em direção à SCW (Figuras 18 e 19). Tal resultado não parece refletir o que observamos com os moluscos *B. tenagophila* infectados, e o extrato de glândula do albúmen

de moluscos sadios foi ainda mais atrativo aos miracídios que a SCW dos moluscos infectados, da mesma espécie.

Ao submetermos miracídios SJ ao extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* e ao mesmo tempo à SCW de *B. tenagophila* sadias, observamos haver 83% de atração miraxonal em direção ao extrato dos moluscos infectados e 17% em direção à SCW dos moluscos sadios (Figura 20).

Ao estudarmos a atração miraxonal frente à miracídios SJ, através do confronto do extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* com a SCW de *B. tenagophila* infectadas, verificamos haver 82% de atração miraxonal em direção ao extrato de moluscos infectados e apenas 18% em direção à SCW dos moluscos infectados (Figura 21). Pudemos observar que em todas as situações estudadas, o extrato de glândula do albúmen de *B. tenagophila* atraiu mais miracídios que qualquer uma das amostras testadas, independente da origem do extrato, seja de moluscos sadios ou infectados por *S. mansoni*.

Ao submetermos miracídios BH ao extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias ou de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* observamos que em média, houve 85% de atração miraxonal em direção ao extrato de glândula de moluscos sadios e 75% em direção ao extrato de glândula de moluscos infectados. Tal resultado parece ser semelhante aos resultados encontrados com miracídios frente à moluscos *B. glabrata* sadios, bem como da hemolinfa desses moluscos, sadios ou infectados (Figuras 22 e 23, 1; 12 e 13). A SCW de *B. glabrata* sadia atraiu 100% dos miracídios (Figura 3); a SCW de *B. glabrata* infectada repeliu os miracídios, como fizeram os moluscos infectados, da mesma espécie (Figuras 4 e 2).

Ao confrontarmos o extrato de glândula de albúmen e a SCW de *B. glabrata* sadias frente à miracídios BH, observamos haver 78% de atração miraxonal em direção ao extrato de glândula de albúmen e apenas 22% em direção à SCW (Figura 24).

Ao estudarmos comparativamente a capacidade de atração miraxonal do extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias com a SCW de *B. glabrata* infectadas frente à

miracídeos BH, verificamos haver 79% de atração miraxonal em direção ao extrato e apenas 21% em direção à SCW (Figura 26). Podemos inferir que a atração miraxonal ocorrida seria resultante de um efeito somatório, ou seja, além da atração exercida pelo extrato soma-se a repelência aos miracídeos pelos moluscos *B. glabrata* infectados, verificado em nossos estudos anteriores.

Quando estudamos a atração miraxonal frente à miracídeos BH, através do confronto do extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* com a SCW de *B. glabrata* sadias, observamos haver 79% de atração miraxonal em direção ao extrato dos moluscos infectados e 21% em direção à SCW dos moluscos sadios (Figura 25).

Ao compararmos a capacidade de atração miraxonal frente à miracídeos BH, do extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias com a SCW de *B. glabrata* infectadas, verificamos haver 75% de atração miraxonal em direção ao extrato e apenas 25% em direção à SCW dos moluscos infectados (Figura 26).

Quando submetemos miracídeos BH ao extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* e ao mesmo tempo, à SCW de *B. glabrata*, ambas infectadas por *S. mansoni*, verificamos haver 83% de atração miraxonal em direção ao extrato e apenas 17% em direção à SCW.

Baseados nesses resultados do estudo da atração miraxonal frente ao extrato de glândula do albúmen, podemos sugerir:

1) Que os componentes do extrato de glândula do albúmen de moluscos *B. glabrata* ou *B. tenagophila* são quimioatraentes para os miracídeos de *S. mansoni* da linhagem BH ou SJ, respectivamente;

2) Que o extrato de glândula do albúmen, seja originado de moluscos sadios ou infectados por *S. mansoni* atrai mais os miracídeos BH ou SJ do que sua água de condicionamento (SCW), independente da SCW ser de moluscos *B. glabrata* ou *B. tenagophila* sadios ou infectados.

A análise de aminoácidos livres, bem como a análise cromatográfica e do conteúdo de proteínas, discutidas a seguir, complementam o estudo da atração miraxonal, na tentativa de

identificar possíveis quimioatraentes aos miracídios de *S. mansoni*, além de elucidar a composição bioquímica da hemolinfa, da SCW e do extrato da glândula do albúmen. Evidentemente, foram apenas passos iniciais, porém importantes, para o conhecimento da estrutura bioquímica dessas amostras e o seu significado biológico na relação parasita x hospedeiro.

4.2) Análise automática dos aminoácidos livres:

Segundo Barret (1991), nos invertebrados os aminoácidos livres são compostos predominantemente por um ou dois principais aminoácidos não - essenciais, de modo semelhante ao que ocorre com os helmintos parasitas. Nos invertebrados de vida livre os aminoácidos são importantes na regulação osmótica e isto requer geralmente a síntese intracelular e degradação de um aminoácido não essencial (Ex: Alanina ou Prolina). Os aminoácidos livres podem também ser uma importante fonte de energia. Ex: Prolina (insetos); Glutamato e Aspartato (durante a fase de anaerobiose, em moluscos). Alguns aminoácidos podem ter funções específicas como neurotransmissores (Glutamato, 4 - aminobutirato) ou produtos excretórios. A excreção de nitrogênio amino por invertebrados é feita sob a forma de aminoácidos, peptídeos ou proteínas. A origem dos aminoácidos excretórios tanto em helmintos como nos invertebrados não é clara, podendo vir de diversas fontes diferentes. A excreção de aminoácidos é um meio de eliminar a amônia, particularmente em organismos que não podem sintetizar uréia ou ácido úrico. Alguns aminoácidos, tais como Alanina ou Prolina podem ser verdadeiros produtos finais metabólicos. A Alanina é formada pela transaminação do piruvato, maior produto final anaeróbico do metabolismo de carboidratos, em invertebrados de vida livre. A Prolina é produto da clivagem da Arginina. Nos helmintos digenéticos ocorre em grandes quantidades. A excreção de Prolina em vermes adultos e ovos de *S. mansoni* podem causar hiperplasia do ducto biliar e fibrose em volta do granuloma.

Durante o ciclo de vida de um parasita a necessidade e a utilização de aminoácidos pode variar consideravelmente, dependendo da idade ou do estágio de desenvolvimento investigado. Exemplo: Os ovos de *S. mansoni* requerem aminoácidos exógenos para o seu desenvolvimento. Os aminoácidos são utilizados como fonte de energia. Quando são usados como combustíveis, sofrem perda de seu grupo amino, e seus esqueletos de carbono remanescentes seguem duas vias principais: 1) a conversão a glucose no processo da gluconeogênese, ou 2) a oxidação até CO_2 através do ciclo do ácido tricarboxílico.

A velocidade de utilização e a proporção dos diferentes aminoácidos utilizados pelos animais dependem de muitos fatores, incluindo: a) a disponibilidade de outros combustíveis; b) a disponibilidade de aminoácidos exógenos; c) a dependência nutricional de aminoácidos essenciais no organismo e d) as necessidades de aminoácidos específicos como precursores para outras biomoléculas importantes.

O catabolismo de aminoácidos é um processo importante na produção de precursores de vias sintéticas alternativas. Envolve um processo de degradação, iniciado pela remoção de grupos amino e catabolismo do esqueleto de carbono. Vários dos intermediários do catabolismo de aminoácidos são importantes precursores de outras vias sintéticas. O catabolismo pode ocorrer pela transaminação: transferência de um radical amino, mediada por transaminases; pela desaminação oxidativa: remoção de grupos amino dos aminoácidos, catalisada pelas aminoácido-oxidases; neste processo, o aminoácido é oxidado no ponto onde o radical amino se prende, o que causa sua liberação; por desaminases específicas: Aminoácidos como Arginina, Asparagina, Histidina, Serina, Treonina e Glutamato podem ser desaminadas por processo não oxidativo, por enzimas específicas.

Ao estudarmos o conteúdo de aminoácidos livres, observamos haver pouca correspondência entre os aminoácidos livres encontrados na hemolinfa e na SCW de *B. glabrata* ou *B. tenagophila* sadias ou infectadas por *S. mansoni*. Portanto, nossos resultados não são concordantes com Wolmarans et alii, 1986. Ao estudarem a composição de aminoácidos na hemolinfa e produtos de excreção de seis espécies de moluscos, incluindo a

B. glabrata, demonstraram que os aminoácidos encontrados nos produtos de excreção correspondiam aos aminoácidos encontrados na hemolinfa. Questionou-se sobre a origem desses aminoácidos encontrados nos produtos de excreção como sendo da hemolinfa ou do muco liberado pelos moluscos. As diferenças encontradas em nossos resultados em relação ao trabalho citado pode ter ocorrido devido ao uso de metodologias diferentes, bem como o aparelho utilizado para a análise.

Ao compararmos o conteúdo de aminoácidos livres presentes na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* sadias ou infectadas por *S. mansoni* observamos haver um aumento do número de aminoácidos livres na hemolinfa de ambos os moluscos infectados por *S. mansoni*.

Stanislawsky et al. (1979) observou após o jejum ou infecção parasitária um declínio de duas a quatro vezes do conteúdo de aminoácidos livres na hemolinfa de *B. glabrata*, seguido de um aumento de quatro a cinco vezes da quantidade de ureia, enquanto que a quantidade de amônia permaneceu constante. Schmale & Becker (1977) verificaram uma aumento da biossíntese de uréia de 14 a 40 vezes nos tecidos de *B. glabrata* submetidos à infecção pelo *S. mansoni*, ao jejum ou à estivação, comparados a tecidos de moluscos alimentados normalmente. Além disso, observaram altos níveis de enzimas do ciclo da uréia nos moluscos submetidos a qualquer dessas situações de stress, comparado aos níveis encontrados nos moluscos alimentados. A perda de nitrogênio aumentada durante essas situações de stress metabólico resultou da biossíntese aumentada de uréia através da ativação do ciclo da uréia. Segundo os autores, a alteração encontrada, de amoniotelismo para a combinação entre amoniotelismo e ureotelismo, nos períodos de stress fisiológico poderiam ser um meio de desintoxicar os aminoácidos ou a amônia produzida por ocasião dessas situações. Sabe-se que os moluscos pulmonados aquáticos são principalmente amoniotélicos, quando alimentados normalmente, na água. Pequenas quantidades de nitrogênio (30% do total) pode ser perdido como uréia, ácido úrico e aminoácidos livres. Esses moluscos aparentemente tem pouca ou nenhuma urease, de modo que toda a uréia

formada, seja da Arginina obtida da dieta, Arginina sintetizada pelo processo de síntese "de novo", ou possivelmente uricolise em alguns casos, é perdida como uréia e não catabolizada à amônia. A perda de proteína, através da produção de muco, pode ser considerada como um fenômeno importante para a perda de nitrogênio em algumas espécies (Bishop et alii., in **The Mollusca**, vol. 1, **Metabolic Biochemistry**, cap. 6, 243 - 327, 1983).

A diferença encontrada entre nossos resultados e aqueles encontrados por Stanislawsky et al. (1977) com relação ao aumento do número de aminoácidos livres na hemolinfa de moluscos infectados pelo *S. mansoni*, verificado em nossos estudos, e a diminuição de duas a quatro vezes dos aminoácidos livres após a infecção, verificado por esses pesquisadores, provavelmente pode ter ocorrido primeiramente pela utilização de metodologia e aparelhagem diferentes. Utilizamos em nossas análises o Analisador Pico-Tag da Waters, aparelho de alta sensibilidade e alta confiabilidade, o que nos leva a crer na fidelidade do conteúdo de aminoácidos livres observados em nossas amostras. Por outro lado, a relação parasita x hospedeiro, por ser altamente dinâmica, pode sofrer diversas alterações bioquímicas e fisiológicas, visando a adaptação adequada entre ambos. Além disso, devemos levar em consideração a procedência dos moluscos e da cepa de *S. mansoni* utilizados nas duas pesquisas.

Em relação à concentração de aminoácidos livres observamos que alguns aminoácidos ausentes ou em baixa concentração na hemolinfa de moluscos sadios foram encontrados em alta concentração na hemolinfa dos moluscos infectados por *S. mansoni*. Podemos destacar o caso do aminoácido livre ASN(Asparagina), encontrado na hemolinfa de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* na concentração de 881,05 umoles/100 ml e na concentração de 53,46 umoles/100 ml na hemolinfa de *B. glabrata* sadias. O mesmo aminoácido livre também foi encontrado em maior concentração na hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*, na concentração de 335,78 umoles/100 ml e na concentração de 158,02 umoles/100 ml na hemolinfa de *B. tenagophila* sadias. Ao analisarmos a SCW dos moluscos de ambas as espécies estudadas, infectados ou não pelo *S. mansoni*, observamos que a

Asparagina foi encontrada somente na SCW de *B. glabrata* sadia e na SCW de *B. tenagophila* infectadas. Nos extratos de glândula do albúmen esse aminoácido não foi encontrado em nenhuma das amostras.

A Asparagina é originada do Aspartato, é hidrolisada à ácido aspartico e amônia via asparaginase, para a formação de oxalacetato. Essa enzima tem sido demonstrada ser potente no controle da leucemia humana, quando injetada na corrente sanguínea e supõe-se que sua ação seja nesse caso, a de limitar a disponibilidade de Asparagina aos leucócitos malignos (Lehninger in **Bioquímica**, cap. 21, pag. 410, vol. 2, 1982). Em moluscos planorbídeos, a função dessa enzima não é conhecida. Segundo Bishop et alii (1983) a biossíntese de Asparagina pode não ocorrer nos tecidos dos moluscos; essa afirmação é baseada em diversas pesquisas realizadas com moluscos terrestres e aquáticos, incluindo os marinhos (mexilhões e ostras). Nesse caso, ao analisarmos nossos resultados, poderíamos pensar que a Asparagina pudesse ser de origem do parasita ou sua síntese pelo molusco teria sido induzida pelo parasita, na tentativa de suprir a necessidade desse aminoácido, possivelmente como intermediário metabólico. O Aspartato, bem como a Ornitina são indicadores da atividade metabólica do ciclo da uréia.

Além da Asparagina, a Glutamina, a Ornitina e a Lisina tiveram sua concentração aumentada na hemolinfa de moluscos de ambas as espécies, infectados por *S. mansoni*. A Glutamina é considerada como doador de nitrogênio. Esse aminoácido exerce um papel importante na biossíntese de amino-açúcares, purinas e pirimidinas, na síntese de proteínas e também na transferência de substrato entre tecidos para a gluconeogênese e possivelmente no tamponamento da produção de ácido na urina. Os níveis de Glutamina nos tecidos e hemolinfa de moluscos pulmonados variam consideravelmente nas condições de jejum e estivação e possivelmente, de infecção pelo *S. mansoni*. A Ornitina, bem como o Aspartato são normalmente intermediários metabólicos, indicadores da atividade metabólica do ciclo da uréia; pode ser um modo de excretar o nitrogênio; o aumento ou a diminuição desses componentes indicam haver um metabolismo proteico. A maioria dos moluscos podem

produzir a Ornitina à partir da Arginina, por ação da arginase. A Lisina é um aminoácido básico, faz parte do grupo Aspartato de aminoácidos, e sabe-se fazer parte do esqueleto estrutural das paredes celulares bacterianas.

O aminoácido Alanina apresentou aumento de sua concentração na hemolinfa de *B. glabrata* infectada pelo *S. mansoni* e uma diminuição de sua concentração na hemolinfa de *B. tenagophila* infectada, não foi assinalado na SCW de *B. glabrata* infectada e somente foi encontrado na SCW de *B. tenagophila* infectada, não tendo sido encontrado em nenhuma das amostras de glândula do albúmen. Sabe-se que a infecção aumenta a taxa glicolítica (quebra da glucose) e ao mesmo tempo ocorrem excedentes de equivalentes redutores (H^+), que serão "absorvidos" pelo piruvato, originando como produtos finais, principalmente sob anaerobiose, Lactato, Alanina (Bivalves), etc. O aumento da concentração de Alanina na hemolinfa de *B. glabrata* infectada fornece indícios para esse raciocínio. Quanto à *B. tenagophila*, não existem estudos sobre seu metabolismo.

Ao compararmos o conteúdo de aminoácidos livres presentes na SCW de *B. glabrata* e *B. tenagophila* observamos haver uma diminuição do número de aminoácidos livres na SCW de ambos os moluscos infectados por *S. mansoni*. Embora tenhamos verificado uma diminuição do conteúdo de aminoácidos livres na SCW de ambos os moluscos infectados por *S. mansoni*, alguns aminoácidos apresentaram concentrações aumentadas em relação à SCW dos moluscos sadios. O aminoácido livre Tyr (Tirosina) foi encontrado na concentração de 957,64 μ moles/250 ml de água na SCW de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* e na concentração de 3,5 μ moles/250 ml de água na SCW de *B. tenagophila* sadias. Na SCW de *B. glabrata* sadias ou infectadas por *S. mansoni* não foi encontrado. Nas amostras de hemolinfa de moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* sadios ou infectados por *S. mansoni*, o aminoácido Tirosina foi encontrado em menor concentração nas amostras correspondentes aos moluscos infectados, de ambas as espécies. Nos extratos de glândula do albúmen de moluscos de ambas espécies, infectados ou não pelo *S. mansoni* esse aminoácido não foi encontrado em nenhuma das amostras.

A Tirosina é um aminoácido aromático, formado a partir do aminoácido essencial fenilalanina, em uma reação de hidroxilação catalisada pela fenilalanina-4-monoxigenase (fenilalanina - hidroxilase). A Fenilalanina e a Tirosina são aminoácidos cetogênicos e glicogênicos. São chamados cetogênicos porque produzem o acetoacetato livre e glicogênicos, porque o acetoacetato livre pode ser ativado às expensas de succinil - CoA, formando Acetoacetyl - CoA. Quatro dos cinco átomos remanescentes são recuperados como ácido fumárico, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico. As descarboxilases e amino-oxidases, mediadoras da produção desse aminoácido tem sido encontrado nos tecidos dos moluscos e tem sido associado com a produção e inativação de neurotransmissores ou componentes de venenos. A formação de melanina e processos de coloração de proteínas com tirosinase e fenoloxidasas tem sido estudados, com relação à pigmentação das conchas dos moluscos, melanóforos e melanócitos e formação da concha, entre outros aspectos.

É interessante notar que o aminoácido Tirosina ocorreu em menor concentração na hemolinfa dos moluscos infectados por *S. mansoni* e por outro lado, observamos um grande aumento de sua concentração na SCW de *B. glabrata* e na SCW de *B. tenagophila*, infectadas. Ao mesmo tempo, esse aminoácido não ocorreu em nenhuma das amostras de glândula do albúmen. Podemos inferir que o aminoácido Tirosina tenha sido liberado pelo molusco na água de condicionamento (SCW), uma vez que se encontrava em baixa concentração na hemolinfa ou ausente na glândula do albúmen. Por outro lado, podemos sugerir que a Tirosina poderia estar sendo utilizada como fonte energética pelo *S. mansoni*, e que a liberação desse aminoácido poderia estar sendo requisitada por ser necessária na fase do desenvolvimento em que se encontrava o parasita. Além disso, podemos sugerir que possivelmente o aminoácido Tirosina seja um agente quimioatraente, que tenha tido participação na alta atração miraxonal encontrada em moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni*, sua SCW e sua hemolinfa.

Observamos que vários aminoácidos livres encontrados em baixa concentração ou ausentes na SCW de *B. tenagophila* sadias foram encontrados em maior concentração na

SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* (Tabela 29). Os aminoácidos livres P-Ser (Fosfoserina), Ser (Serina), ASN (Asparagina), Gly (Glicina), NH₃ (Amônio), Thr (Treonina), Ala (Alanina), Hyls-1 (Hidroxilisina), presentes na amostra de SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* estiveram ausentes na amostra de SCW de *B. tenagophila* sadias.

A Fosfoserina é um produto da oxidação e transaminação do 3-fosfoglicerato, formando a Serina livre através da hidrólise pela fosfoserina- fosfatase. A Serina, bem como a Glicina e a Cisteína são derivados de um intermediário glicolítico, o ácido 3-fosfoglicérico. A Serina é sintetizada por diversos helmintos; no entanto, segundo a literatura, não foi verificada sua síntese em *S. mansoni*. Glicina e Serina podem ser interconvertidas via serina-hidroximetil transferase; ambos são precursores para a biossíntese de purina em moluscos pulmonados. Tem sido verificado que a Glicina e a Serina seriam importantes contribuidores para a reserva de carbono 1. A Treonina, bem como o Aspartato, Asparagina, Lisina e Metionina formam o grupo aspartato de aminoácidos, sintetizados pela transaminação do oxalacetato, catalizados por transaminases ligadas ao oxalacetato, amplamente distribuídas em helmintos. Esse aminoácido pode participar do processo de degradação, que tem como produto final, o succinil-CoA. A Alanina, bem como a Leucina, a Valina e a Isoleucina, são aminoácidos formados do piruvato. A Alanina é formada pela transaminação direta do piruvato e as transaminases que catalizam essas reações tem sido encontradas em todos os parasitas estudados, incluindo o *S. mansoni*. (Garson & Williams ,1957; Coles, 1973; Goldberg et alii., 1979, 1980). A Hidroxilisina corresponde ao derivado 5-hidroxi da Lisina, está presente no colágeno, e sua ocorrência é relativamente rara. O amônio (NH₃) é um produto da degradação do nitrogênio. Da análise dos resultados encontrados, podemos inferir que a infecção pelo *S. mansoni*, já conhecida por alterar o metabolismo de carboidratos de seu hospedeiro, veio a requisitar a síntese desses aminoácidos, como intermediários importantes ao metabolismo de carboidratos.

Observamos que RG-2 foi encontrado na concentração de 359,16 μ moles/250 ml de água na SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* (WBtI) e na concentração de 54,95 μ moles/250 ml de água na SCW de *B. tenagophila* sadias (WBtS). Em consulta à Waters, fornecedora do Analisador Pico-Tag de aminoácidos, verificamos que provavelmente RG-2 e mesmo RG-1 sejam reagentes de derivatização.

O aminoácido livre ASN (Asparagina) foi encontrado na concentração de 206,82 μ moles/250 ml de água na WBtI e esteve ausente na WBtS (Tabela 29, Figuras 36 e 37).

A Análise automática de aminoácidos livres do extrato de glândula de albúmen de ambas espécies de moluscos, sadios ou infectados revelou um número total de aminoácidos reduzido em relação às amostras de hemolinfa e de SCW (Tabelas 28, 29 e 30). No extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias (GABgS) foram encontrados 4 aminoácidos livres e nos moluscos infectados da mesma espécie, 5 aminoácidos. Em *B. tenagophila* o mesmo ocorreu: no extrato de moluscos sadios foram encontrados 7 aminoácidos livres e nos infectados, 6 (Tabela 30).

Comparando o conteúdo de aminoácidos livres nos extratos de glândula de albúmen nas quatro amostras de glândula de albúmen, de moluscos sadios ou infectados, observamos que apenas os aminoácidos P~~S~~er (Fosfo~~S~~erina) e Asp (Aspartato) foram encontrados em todas as amostras. Os demais aminoácidos foram diferentes entre si.

É interessante notar que o aminoácido livre Asp (Aspartato) apresentou uma concentração maior na amostra GABgI (glândula de albúmen de *B. glabrata* infectada) que em GABgS (glândula de albúmen de *B. glabrata* sadia), ou seja, 8,49 μ moles/100 mL em GABgS e 57,65 μ moles/100 mL em GABgI. O mesmo aminoácido foi encontrado com concentração diminuída em GABtI (glândula de albúmen de *B. tenagophila* infectada) em relação à GABtS, ou seja, 6,96 μ moles/100 mL em GABtI e 46,56 μ moles/100 mL em GABtS. O Aspartato é sintetizado pela transaminação do oxalacetato, as transaminases que catalizam essa reação são amplamente encontradas em helmintos, são utilizados como fonte de energia, sobretudo durante a anaerobiose em moluscos.

Não podemos afirmar que os aminoácidos livres dessas amostras seriam importantes na atração ou repelência dos miracídeos. No caso particular das amostras de glândulas de albúmen, talvez existam outros fatores que possam estar contribuindo para que exista maior atração miraxonal de *S. mansoni* comparada às amostras de hemolinfa e do próprio molusco. O conteúdo de aminoácidos encontrados nos extratos da glândula do albúmen nos leva à hipótese de que houve uma metabolização proteica e os aminoácidos foram mobilizados para outros órgãos, durante a infecção pelo *S. mansoni*.

Segundo Crews & Yoshino (1990, 1991), a síntese de polissacarídeos e galactogênio da glândula do albúmen de moluscos *B. glabrata* é reduzida com a infecção pelo *S. mansoni*. Os autores sugerem que estas alterações metabólicas da glândula do albúmen poderiam refletir em alterações nas concentrações de aminoácidos ou proteínas específicas na hemolinfa. Discutem que possivelmente os efeitos da infecção por larvas de trematódeo poderiam ser mediadas através de alterações na regulação endócrina da reprodução do molusco hospedeiro.

Os resultados obtidos na análise de aminoácidos livres parecem complementar os resultados obtidos no estudo da atração miraxonal. Havíamos observado na presença do molusco *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni*, bem como de sua SCW ou de sua hemolinfa uma média superior de atração miraxonal em relação aos moluscos sadios, sua SCW e sua hemolinfa. A análise de aminoácidos livres, sobretudo da SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*, mostrou que vários aminoácidos ausentes na SCW de *B. tenagophila* sadias estavam presentes em concentrações elevadas na SCW desses moluscos infectados. Possivelmente, esses aminoácidos livres possam ser considerados como quimioatraentes para os miracídeos.

Para podermos fazer uma análise mais específica, deveríamos verificar cada aminoácido isoladamente, estudando sua capacidade de atração miraxonal. Para isso, utilizaríamos aminoácidos sintéticos. Desta forma teríamos condições reais de identificar os possíveis agentes quimioatraentes. Devido à impossibilidade de realizar essas análises

procuramos avaliar nosso conjunto de dados, os resultados do estudo de atração miraxonal e os resultados da análise automática de aminoácidos, sob a luz da literatura atual.

4.3) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page):

A hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, bem como de outros moluscos hospedeiros de esquistossomas tem sido estudada sob diversos aspectos. No entanto, ainda há uma falta de informação sobre os valores basais dos vários constituintes da hemolinfa ou de suas propriedades físico-químicas, sobretudo de espécies de moluscos como a *Biomphalaria tenagophila*. Alguns aspectos vem sendo estudados, dando ênfase às variações da composição de aminoácidos e a atividade sorológica da hemolinfa. Tem sido demonstradas alterações do conteúdo de aminoácidos e atividade hemaglutinante da hemolinfa, apresentando diferenças quanto à localização geográfica do molusco *B. glabrata* (Gilbertson et alii, 1967; Gilbertson & Etges, 1967). Moluscos *B. glabrata* infectados por *S. mansoni* apresentaram alterações na composição e na mobilidade eletroforética de sua hemolinfa (Targett, 1962; Dusanic & Lewert, 1963; Pan, 1965; Gilbertson et al., 1967; Cheng & Lee, 1971). A hemoglobina tem sido demonstrada ser a principal proteína existente na hemolinfa de moluscos hospedeiros de *S. mansoni* (Lee & Cheng, 1972; Figueiredo et al., 1973; Almeida & Neves, 1974; Nascimento et al., 1982; Granath et al., 1987; Granath, 1988). Segundo os autores, a hemoglobina corresponde de 70 a 97 % do conteúdo de proteína total em *B. glabrata*. A Eletroforese da hemolinfa mostrou um número variável de frações não identificadas, além da hemoglobina e o ponto isoelétrico desse pigmento localizou-se entre o pH 3.8 e 4.5. Foi purificada através de cromatografia em coluna de DEAE - Celulose. Segundo Figueiredo et al. (1973), a hemoglobina de *B. glabrata* foi facilmente precipitada através do ajuste de suas soluções para pH 5.3 e diálise contra água destilada. A quantidade de ferro encontrada na hemoglobina purificada foi de 0,315 % e seu peso molecular mínimo calculado foi de 17,700..

Nascimento et al. (1982) verificaram que a hemoglobina de *B. glabrata* apresentou ausência de grupos sulfidril (SH), presença de pontes dissulfeto (SS), formado pelos seus dois resíduos de cisteinil, cada um com a massa molecular de $3,4 \times 10^2$ daltons. Não foi possível dissociar completamente a molécula, e não houve evidências de separação de cadeias. A osmolalidade da hemolinfa dos moluscos mantidos no laboratório foi de $0,085 \pm 0,003$ osmolales.

Granath et al. (1987) constataram que a maioria das proteínas compreendidas na hemolinfa livre de células (soro) de moluscos *B. glabrata* correspondiam à hemoglobina (Hb) e as demais frações encontradas, a subunidades de Hb, ou produtos da clivagem da hemoglobina. Os autores estudaram a composição da hemolinfa de *B. glabrata* através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page), cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) e imunoblotting. Na SDS-Page, observaram uma banda maior, correspondente à um polipeptídeo de PM 160 Kda, presumidamente a hemoglobina (Hb), proteína predominante, e a presença de outros polipeptídeos de 31 a 116 Kda, citadas como subunidades de Hb. Granath (1988), dando prosseguimento à esses estudos, procedeu a identificação das hemoproteínas na hemolinfa de *B. glabrata* através de método específico de coloração para heme, descoloração e recoloração com Comassie Brilliant Blue (CBB). O método foi aplicado ao soro total (hemolinfa livre de células) e ao soro ultracentrifugado para produção de frações compostas de Hb e frações cuja Hb foi eliminada. Os resultados indicaram que quase todas as frações estavam associadas à heme; a exceção deveu-se à dois polipeptídeos, de peso molecular na faixa de 50 Kda, na fração depletada de hemoglobina. Nos dois métodos de coloração (heme e CBB) o polipeptídeo dominante tinha o peso molecular de 200 Kda, com outras bandas na faixa de 50 a 190 Kda. Segundo os autores, a discrepância encontrada quanto ao peso molecular da banda predominante deveu-se à ausência de um agente redutor (2 - Mercaptoetanol) nesse estudo.

Ao realizarmos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectadas ou não pelo *S. mansoni* observamos que:

- Em *B. glabrata*, a hemolinfa de moluscos infectados por *S. mansoni* não apresentou perfil diferente ao encontrado na hemolinfa de moluscos sadios;

- Em *B. tenagophila*, a hemolinfa dos moluscos infectados por *S. mansoni* apresentou ausência de pelo menos duas bandas proteicas de PM por volta de 45 Kda, em relação ao encontrado na hemolinfa de moluscos sadios. Balan et. alii (1993) ao estudarem aspectos imunológicos e parasitológicos em *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* e outros *Digenea*, observaram através de imuno eletroforese a existência de diferenças qualitativas e quantitativas na hemolinfa dos moluscos parasitados com relação aos não parasitados, quanto ao número de bandas de precipitação e seu deslocamento em direção ao polo catódico ou anódico. Em todos os testes foi observada uma banda mais densa, que provavelmente abrigava vários agregados antígeno-anticorpo sobrepostos.

- A hemoglobina talvez seja a proteína predominante em todas as amostras. Além disso, foram observadas várias bandas, correspondentes à baixos pesos moleculares (Figura 43). Para uma análise mais detalhada deveríamos repetir a eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando marcadores de PM até 200 Kda, com e sem o uso de 2-Mercaptoetanol como agente redutor. Consideramos a eletroforese (SDS- Page) realizada, como análise preliminar das amostras de hemolinfa, e que possivelmente daremos continuidade posteriormente, não somente através da SDS-Page da hemolinfa, mas também do extrato da glândula do albúmen de moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectados ou não pelo *S. mansoni*.

4.5) Cromatografia de exclusão molecular:

A cromatografia de exclusão molecular, também conhecida como filtração em gel ou cromatografia de peneira molecular, é um método útil e eficaz para a separação de proteínas umas das outras, em função de seu tamanho molecular. Ela difere da cromatografia de troca iônica, que separa os solutos de acordo com suas cargas elétricas e propriedades ácido-básicas. Na cromatografia de exclusão molecular, a mistura das proteínas, dissolvidas em um tampão adequado, flui por gravidade através de uma coluna cheia de esferas microscópicas de um material polimérico altamente hidratado e inerte, previamente lavado e equilibrado somente com o tampão. Os materiais usados nessas colunas são o Sephadex (nome comercial, derivado de polissacarídeo), o Bio-Gel (derivado comercial da poliacrilamida) e a agarose (polissacarídeo); todos eles podem ser preparados com diferentes graus de porosidade interna. Nas colunas, as proteínas de tamanhos moleculares diversos penetram nos poros internos das esferas em diferentes graus, percorrendo, dessa forma, a coluna em velocidades específicas. Moléculas proteicas muito grandes, por não poderem penetrar nos poros das esferas são ditas "excluídas", permanecendo assim no volume excluído da coluna, o eluato. As moléculas muito pequenas penetram nos poros das microesferas livremente. As proteínas pequenas tem seu percurso na coluna retardado, enquanto que as proteínas maiores passam com maior rapidez, uma vez que não podem penetrar nas partículas hidratadas do polímero. A partir de medidas da concentração proteica em pequenas frações do eluato, pode-se obter uma curva de eluição.

Utilizamos esse método de cromatografia como um passo inicial da identificação da composição proteica da hemolinfa de moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* sadios ou infectados pelo *S. mansoni*. Existem vários estudos da composição proteica da hemolinfa de *B. glabrata*, o mesmo não ocorre com *B. tenagophila*, onde poucos estudos já foram realizados, sobretudo bioquímicos.

Algumas pesquisas tem demonstrado que a infecção pelo *S. mansoni* pode levar à diminuição da concentração proteica da hemolinfa de seu molusco hospedeiro e de seu conteúdo de aminoácidos livres. Rupprecht et alii. (1989), ao estudarem as alterações dos

componentes da hemolinfa de *B. glabrata* observaram que durante a infecção pelo *S. mansoni*, as mudanças metabólicas ocorreram até o período de quatro a seis semanas após a infecção. Depois desse período, observaram valores dos componentes estudados semelhantes aos encontrados em moluscos não infectados. Somente o nível de glicose permaneceu baixo durante todo os períodos de infecção analisados. Na primeira semana de infecção o conteúdo de glicoproteína (hemoglobina excluída) aumentou significativamente, mas diminuiu significativamente na segunda semana. O conteúdo de lipoproteína aumentou quatro vezes nesse período, diminuindo por volta da terceira semana, atingindo valores semelhantes aos encontrados em moluscos não infectados. A quantidade de proteína total diminuiu nas quatro primeiras semanas da infecção. Os autores observaram não haver alterações significativas nas infecções pelo *S. mansoni* por longos períodos de tempo. Ao estudarem as possíveis alterações na hemolinfa de moluscos no período de 12 semanas após a infecção, verificaram não haver alterações significativas, indicando haver uma relação de equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita, que deve ter seu início à partir da sexta semana de infecção.

A cromatografia de exclusão molecular das amostras de hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* nos pareceu condizente com pesquisas anteriores. Utilizamos para essa análise amostras de hemolinfa livre de células dos moluscos citados, no período de duas horas após a infecção pelo *S. mansoni*. Observamos uma nítida presença da hemoglobina em todas as amostras, além das diversas frações encontradas (Figuras 30 à 33). A eletroforese em gel de poliacrilamida das frações de cromatografia da hemolinfa de *B. glabrata* sadias (HBgS) demonstraram a presença das frações proteicas separadas por seus pesos moleculares correspondentes. Para obtermos resultados mais consistentes deveríamos possivelmente repetir as análises e a eletroforese (SDS-PAGE) das demais amostras, correspondentes à cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa. Além disso, ao darmos continuidade à esses estudos, faríamos também a cromatografia de exclusão molecular dos extratos da glândula do albúmen, seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Poderíamos fazer o isolamento da hemoglobina contida na hemolinfa desses moluscos sadios ou infectados por *S. mansoni*. Após a eliminação da hemoglobina, seguido do processo de purificação, poderíamos prosseguir no estudo dos demais componentes, verificando possíveis alterações em decorrência da infecção, no mesmo período estudado, de duas horas após a infecção, período imediatamente após a penetração do miracídio em seu molusco hospedeiro. Tais dados seriam de grande valia, devido à escassa literatura existente nesse sentido, sobretudo em *B. tenagophila*, molusco hospedeiro de *S. mansoni* responsável pela manutenção da esquistossomose no estado de São Paulo, Brasil.

Quanto aos testes de atividade biológica das frações da cromatografia de exclusão molecular, encontramos a atividade de atração miraxonal em todas as frações isoladas. Ao realizarmos nossos grupo-controle, testamos a atração miraxonal frente: 1) à OVA (Ovoalbumina); 2) ao tampão fosfato; 3) à Agarose. Observamos haver 75% de atração miraxonal frente à OVA (Figura 70), esse resultado parece ser justificado pela presença da banda de peso molecular (45 Kda) correspondente à Ovoalbumina encontrada em todas as amostras de hemolinfa testadas, com exceção da amostra de hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* (Figura 28), verificada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Obtivemos também informações importantes sobre a dosagem de albumina na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* sadia ou infectada por *S. mansoni* de linhagem simpátrica e observações sobre o comportamento eletroforético dessas amostras, através de eletroforese em acetato (comunicação pessoal com Maria Lectícia P. S. Oliveira, aluna de mestrado em Imunologia). Segundo os resultados encontrados pela aluna, em *B. tenagophila* a albumina foi encontrada na concentração de 15 mg/mL, e a concentração de proteína total foi de 19 mg/mL; a eletroforese em acetato revelou a presença de albumina em todas as amostras de hemolinfa testadas, de moluscos sadios ou infectados, baseada na mobilidade eletroforética de acordo com o ponto isoelétrico, e a densidade de carga elétrica livre. Essas informações parecem complementar nossos resultados do teste de atividade biológica, levando à conclusão de que os miracídios são

atraídos em direção à OVA, devido à presença da fração proteica homóloga na hemolinfa desses moluscos. Os miracídios de *S. mansonii*, nesta situação, foram incapazes de discriminar a natureza da fração proteica, por esse motivo migraram preferencialmente em direção à OVA (Albumina de ovo).

5) Conclusões:

5.1) Estudo da atração miraxonal:

1) Em síntese, nossos resultados mostraram que tanto moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni* como sua SCW e sua hemolinfa atraíram mais miracídios SJ que esses moluscos não infectados, sua SCW e sua hemolinfa.

2) Em *B. glabrata* observamos que sua SCW atraiu mais miracídios BH que o próprio molusco. Moluscos sadios atraíram mais miracídios que os moluscos infectados. O mesmo ocorreu com a sua hemolinfa.

3) Em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*, observamos haver uma nítida repelência aos miracídios. Encontramos um comportamento oposto em *B. tenagophila* infectada;

3) Utilizando o extrato de glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadios e infectados observamos resultados semelhantes aos obtidos anteriormente com essa espécie de molusco. O extrato da glândula do albúmen de moluscos infectados atraiu mais miracídios SJ que o extrato de moluscos sadios.

4) Ao compararmos a capacidade de atração miraxonal do extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadios e infectados com a SCW desses moluscos, podemos sugerir:

* Que os componentes do extrato da glândula do albúmen de moluscos *B. tenagophila* são quimioatraentes para os miracídios de *S. mansoni* SJ;

* Que o extrato da glândula do albúmen atrai mais miracídios SJ que sua SCW, independente da SCW ser de moluscos sadios ou infectados.

5) Essas conclusões foram confirmadas pela análise estatística (Anexo 1, páginas 1 a

6).

5.2) Análise automática de aminoácidos livres:

1) Os resultados da análise de aminoácidos livres parecem complementar os resultados obtidos no estudo da atração miraxonal. Observamos que vários aminoácidos, ausentes na SCW de *B. tenagophila* sadia estavam presentes em concentrações elevadas na SCW de moluscos infectados.

2) Na hemolinfa de *B. glabrata* sadias e infectadas observamos haver um aumento da concentração de aminoácidos livres nos moluscos infectados por *S. mansoni*.

3) Na hemolinfa de *B. tenagophila* observamos uma redução no conteúdo de aminoácidos livres em *B. tenagophila* infectadas, em relação aos moluscos sadios.

4) Na SCW de *B. glabrata* houve uma diminuição do conteúdo de aminoácidos livres, nos moluscos infectados por *S. mansoni*.

5) Não houve correspondência entre o conteúdo de aminoácidos livres da hemolinfa e da SCW.

5.3) Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE):

Ao realizarmos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das amostras de hemolinfa de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* infectadas ou não pelo *S. mansoni* concluímos que :

- A hemolinfa de *B. glabrata* infectada pelo *S. mansoni* não apresentou um perfil proteico diferente ao encontrado na hemolinfa dos moluscos sadios, na faixa de peso molecular analisada;

- A hemolinfa de *B. tenagophila* infectada pelo *S. mansoni* apresentou uma diferença visível em relação ao perfil proteico encontrado na hemolinfa dos moluscos sadios. A

hemolinfa de *B. tenagophila* infectada apresentou ausência de pelo menos duas bandas proteicas de PM por volta de 45 Kda;

- A hemoglobina parece ser a proteína predominante. No entanto, para fazer essa afirmação, seria conveniente a repetição da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), utilizando padrão de peso molecular mais amplo. Encontramos várias bandas, que possivelmente sejam sub-frações da hemoglobina.

5.4) Cromatografia de Exclusão Molecular:

Ao analisarmos os resultados obtidos da Cromatografia de exclusão molecular das amostras de hemolinfa livre de células de *B. glabrata* e de *B. tenagophila* concluímos que:

- Em todas as amostras houve uma nítida presença da hemoglobina, que parece ser a proteína predominante, além de diversas outras frações encontradas;

- A Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações cromatográficas confirmou a presença das frações encontradas, separadas por seu peso molecular, embora sem a possibilidade de identificação precisa, devido a utilização da coloração por prata, formando uma mancha sobre a faixa do padrão de peso molecular.

- Todas as frações de peso molecular apresentaram a atividade biológica de atração miraxonal, confirmada pela análise estatística (Anexo 1, páginas 7 a 13).

- Quanto à atividade de atração miraxonal encontrada nos grupos - controle dos testes de atividade biológica, chegamos às seguintes conclusões:

- 1) A Ovoalbumina (OVA) exerceu uma atração de 75% sobre os miracídios de *S. mansoni* BH, provavelmente pela presença de fração proteica homóloga na hemolinfa da maioria dos moluscos estudados;

2) A agarose (AGA), substrato nos testes de atração miraxonal e o tampão fosfato, diluente usado na cromatografia de exclusão molecular, não apresentaram atração miraxonal sobre os miracídios;

3) Tais conclusões foram confirmadas pela análise estatística (Anexo 1, página 7 (AGA, no anexo, Tipo= A); página 9 (OVA, no anexo, Tipo= O e tampão fosfato, no anexo, Tipo= T).

5.5) Considerações finais:

O presente trabalho teve por objetivo geral procurar elucidar alguns aspectos parasitológicos e bioquímicos envolvidos na relação hospedeiro (molusco planorbídeo) x parasita trematódeo (*S. mansoni*). Demos continuidade aos estudos de atração miraxonal que vem sendo realizado por nossa equipe de trabalho, na tentativa de identificar os mecanismos envolvidos na atração existente entre miracídios e moluscos. Aspectos bioquímicos como a análise do conteúdo de aminoácidos livres bem como do conteúdo de proteínas na hemolinfa, SCW e extrato da glândula do albúmen de moluscos planorbídeos hospedeiros de *S. mansoni* podem contribuir à abertura de novas linhas de pesquisa, tendo por base nossos resultados. Quanto à análise de aminoácidos livres, consideramos ser importante o conhecimento de seu conteúdo, visto que são possíveis candidatos à quimioatraentes. Ao darmos prosseguimento a esse trabalho, faríamos testes de atração miraxonal utilizando aminoácidos sintéticos, naturalmente aqueles com os quais obtivemos resultados importantes, tais como: 1) **Tyr** (Tirosina), que foi encontrado na SCW de *B. tenagophila* sadia (WBtS) na concentração de 3,50 $\mu\text{moles}/250\text{ mL}$ de água e na SCW de moluscos infectados da mesma espécie (WBtI) na concentração de 957,64 $\mu\text{moles}/250\text{ mL}$; e 2) **Cys** (Cistina): 5,87 $\mu\text{moles}/250\text{ mL}$ na SCW de *B. tenagophila* sadia (WBtS) e 107,20 $\mu\text{moles}/250\text{ mL}$ na SCW desses moluscos, infectados (WBtI).

Um outro aspecto a ser estudado seria a análise cromatográfica e eletroforética dos extratos da glândula do albúmen, com o objetivo de identificar os possíveis quimioatraentes,

pois foram as amostras que apresentaram maior atração miraxonal, em nosso trabalho. Seria importante dar continuidade à esse estudo, procurando responder o porque desta grande atração miraxonal encontrada.

Além disso, seria conveniente repetir a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando padrão de peso molecular mais amplo, com o objetivo de comprovar a presença da hemoglobina, já conhecida como sendo a maior proteína encontrada na hemolinfa de *B. glabrata*, e observada na cromatografia de exclusão molecular, em nossos resultados. Seria interessante repetir a cromatografia de exclusão molecular utilizando outra solução tampão, pois utilizamos o tampão fosfato, e tivemos dificuldades em diluir as frações isoladas para a realização da eletroforese (SDS-PAGE).

Podemos observar que nosso trabalho, embora aparentemente denso e inconclusivo, abre novos caminhos para a continuidade das pesquisas de substâncias quimioatraentes e dos mecanismos envolvidos na atração miraxonal, e também para o estudo das alterações bioquímicas no molusco hospedeiro em decorrência da infecção por *S. mansoni*.

RESUMO

Estudamos a atração miraxonal frente à moluscos *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* infectados ou não pelo *Schistosoma mansoni*, sua água de condicionamento (SCW), sua hemolinfa e seu extrato da glândula do albúmen.

Em síntese, pudemos observar que moluscos *B. tenagophila* infectados atraíram mais miracídios de *S. mansoni* SJ que os moluscos não infectados. O mesmo ocorreu com sua SCW, sua hemolinfa e também seu extrato da glândula do albúmen. O mesmo não ocorreu em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*, que apresentou uma nítida repelência aos miracídios BH.

Em *B. glabrata* observamos que sua SCW atraiu mais miracídios de *S. mansoni* BH que o próprio molusco. Moluscos *B. glabrata* sadios atraíram mais miracídios que os moluscos infectados.

Ao compararmos a atração miraxonal frente ao extrato da glândula do albúmen de moluscos sadios e infectados com sua SCW pudemos verificar que: 1) Os componentes do extrato da glândula do albúmen seriam quimioatraentes para os miracídios de *S. mansoni*; 2) O extrato da glândula do albúmen atraiu mais miracídios que sua SCW, independente dessa SCW ser de moluscos sadios ou infectados por *S. mansoni*.

Paralelamente analisamos o conteúdo de aminoácidos livres da hemolinfa, da SCW e do extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectadas ou não pelo *S. mansoni*.

Na hemolinfa de *B. glabrata* sadia (HBgS) foram encontrados 28 aminoácidos livres, e na hemolinfa de moluscos infectados (HBgl) foram encontrados 32. Na hemolinfa de *B. tenagophila* sadia (HBtS) foram encontrados 28 aminoácidos livres e na hemolinfa dos moluscos infectados foram encontrados 33.

Na hemolinfa de *B. glabrata* infectada houve um aumento geral da concentração de aminoácidos livres em relação ao encontrado na hemolinfa de moluscos sadios. Na hemolinfa de *B. tenagophila* infectada houve uma redução da concentração de aminoácidos livres em relação aos moluscos sadios.

Na água de condicionamento (SCW) de *B. glabrata* sadias foram encontrados 19 aminoácidos livres, enquanto que na SCW desses moluscos, infectados por *S. mansoni* foram encontrados 17. Na SCW de *B. tenagophila* sadias foram encontrados 19 aminoácidos livres, enquanto que na SCW de *B. tenagophila* infectados foram encontrados 16. Não houve correspondência entre o conteúdo de aminoácidos livres da hemolinfa e da SCW.

No extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadios foram encontrados 4 aminoácidos livres e nos moluscos infectados foram encontrados 5. No extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadia foram encontrados 7 aminoácidos livres e nos moluscos infectados foram encontrados 6. Analisamos o conteúdo de aminoácidos livres como possíveis quimioatraentes para os miracídios de *S. mansoni*.

Através da eletroforese em gel de poliacrilamida da hemolinfa verificamos haver uma redução de algumas frações proteicas na hemolinfa de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*, por volta de 45 Kda.

A cromatografia de exclusão molecular da hemolinfa apresentou em ambas espécies de moluscos sadios ou infectados uma característica nítida da presença da hemoglobina e as demais frações de menor peso molecular. Tal resultado foi confirmado na eletroforese (SDS-PAGE).

SUMMARY

We studied the miraxonal attraction in the snails *Biomphalaria glabrata* and *B. tenagophila*, both infected with *Schistosoma mansoni* and non infected, the snail conditioned water (SCW), the hemolymph and the albumen gland extract.

We were able to observe that infected *B. tenagophila* attracted more SJ *S. mansoni* miracidia than the non-infected snails. The same fact was observed with the SCW, the hemolymph and the albumen gland extract. The opposite results occur with infected *B. glabrata* snails, which showed a clear repellence to the BH *S. mansoni* miracidia.

In *B. glabrata* snails, we observed that their SCW attracted more BH *S. mansoni* miracidia than snails. Non infected *B. glabrata* attracted more miracidia than the infected ones.

The comparison of the miraxonal attraction to the albumen gland extracts of non infected and infected snails with their SCW, showed that: 1) The components of the albumen gland extract were chemoattractive to *S. mansoni* miracidia; 2) The albumen gland extracts attracted more miracidia than their SCW, regardless of the SCW being from infected or non infected snails.

In addition, we analysed the presence of free amino acids in the hemolymph, SCW and albumen gland extracts of infected by *S. mansoni* or non infected *B. glabrata* and *B. tenagophila*. In the hemolymph of non infected *B. glabrata* (HBgS), we found 28 free amino acids, and in the hemolymph of snails infected with *S. mansoni* (HBgI) we found 32. In the hemolymph of infected *B. glabrata*, there was a general increase in concentration of free amino acids when compared to the values observed in the hemolymph of non infected snails.

In the snail conditioned water (SCW) of non infected *B. glabrata* (WBgS) we found 19 free amino acids, while in the SCW of snails infected with *S. mansoni*, only 17 amino acids were found. In the SCW of non infected *B. tenagophila* 19 free amino acids were found, whereas in the the SCW of infected *B. tenagophila* 16 free amino acids were found. No relationship between the content of free amino acids of the hemolymph and SCW was detected.

In the albumen gland extract of non infected *B. glabrata* 4 free amino acids were found and 5 in the infected snails. In the albumen gland extract of non infected *B. tenagophila* we found 7 free amino acids and 6 in the infected snails.

Free amino acids were tested as possible chemoattractants to the *S.mansoni* miracidia.

Through polyacrilamide gell electrophoresis (SDS-PAGE) we verified a reduction of some protein fractions with molecular weight in the range of 45 Kda, in the hemolymph of *B. tenagophila* infected with *S. mansoni*.

The molecular exclusion cromatography of the hemolymph of both species of snails showed a clear presence of haemoglobin and other fractions with lower molecular weights. This result was confirmed by the electrophoresis (SDS-PAGE).

7.- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALMEIDA, A. P. & NEVES, A.G.A. The hemoglobin of *Biomphalaria glabrata*: Chemical composition and some physicochemical properties. **Biochem. Biophys. Acta**, 371: 140 - 146, 1974.
- ANTESON, R.K. & WILLIAMS, J.F. Selective depletion of hemolymph proteins of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, 61 (1): 149 - 151, 1975.
- BARRET, J. Amino acid metabolism in helminths. **Adv. Parasitol.**, vol. 30: 39 - 105, 1991.
- BAYOMY, M. F. F.; VAN ELK, R. & JOOSE, J. Infection of *Lymnaea stagnalis* with *Trichobilharzia ocellata* inhibits the growth, synthetic activity and dorsal body hormone response of the albumen gland. **Proc. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Series C** 92: 153 - 163, 1989.
- BECKER, W. Metabolic interrelationships of parasitic trematodes and molluscs, especially *Schistosoma mansoni*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 76: 215 - 219, 1980.
- BECKER, W. & SCHMALE, H. The nitrogenous products of degradation ammonia, urea and uric acid - in the hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 51 A: 407-411, 1975.
- BECKER, W. & SCHMALE, H. The ammonia and urea excretion of *Biomphalaria glabrata* under different physiological conditions: starvation, infection with *Schistosoma mansoni*, dry keeping*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 59 B: 75 - 79, 1978.
- BISHOP, S.H.; ELLIS, L.L.; BURCHAM, J.M. **The Mollusca**, vol. 1, Academic Press. Inc., 1983, cap. 6, pp 243 - 327.
- BOSWELL, C. A. & BAYNE, C. J. Isolation, characterization and functional assesment of a hemagglutinin from the plasma of *Biomphalaria glabrata* intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Dev. Comp. Immunol.** 8: 559 - 568, 1984.
- BRASIO, B. C.; MAGALHÃES, L. A.; MILLER, J.; CARVALHO, J. F. Verificação da resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos planorbídeos (Pesquisa de substâncias quimiotáticas). **Rev. Saúde Públ.**, São Paulo, 19:154-170, 1985.

- CHENG, T. C. & BUTLER, M. S. Experimentally induced elevations in phosphatase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA). *J. Inv. Pathol.*, **34**: 119-129, 1979.
- CHENG, T. C.; CHORNEY, M. J.; YOSHINO, T. P. Lysozymelike activity in the hemolymph of the *Biomphalaria glabrata* challenged with bacteria. *J. Inv. Pathol.*, **29**: 170-174, 1977.
- CHENG, T. C. & LEE, F. O. Glucose levels in the mollusc *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Inv. Pathol.* **18**: 395 - 399, 1971.
- CHENG, T. C.; LIE, K. J.; HEYNENEMAN, D; RICHARDS, C. S.
Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA) parasited by *Echinostoma lindaense* (TREMATODA). *J. Inv. Pathol.*, **31**:57, 1978.
- CHRISTIE, J. D.; FOSTER, W.B. & STAUBER, L. A. ^{14}C uptake by *Schistosoma mansoni* from *Biomphalaria glabrata* exposed to [^{14}C] glucose. *J. Invert. Pathol.* **23**: 297 - 302, 1974.
- CHRISTIE, J. D. & MICHELSON, E. H. Transaminase levels in the digestive gland - gonad of *Schistosoma mansoni* - infected *Biomphalaria glabrata*. *Comp. Biochem. Physiol.* **50B**: 233 - 236, 1975.
- COLES, G. C. The metabolism of schistosomes: A review. *Int. J. Biochem.* **4**: 319 - 337, 1973.
- COUSIN, C.; OFORI, K.; ACHOLONU, S.; MILLER, A.; RICHARDS, C.; LEWIS, F. & KNIGHT, M. *Schistosoma mansoni*: changes in the albumen gland of *Biomphalaria glabrata* snails selected for nonsusceptibility to the parasite. *J. Parasitol.* **81**(6): 905 - 911, 1995.
- CREWS, A. E. & YOSHINO, T. P. Influence of larval schistosomes on polyssaccharide synthesis in albumin glands of *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol.* **101**: 351 - 359, 1990.
- CREWS, A. E. & YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: Influence of infection on levels of translatable mRNA and on polypeptide synthesis in the ovotestis and albumen gland of *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* **72**: 368 - 380, 1991.

- DEJONG-BRINK, M. The effects of dessication and starvation upon the weight, histology and ultrastructure of the reproductive tract of *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Zeitschrift für Zellforschung* 136: 229 - 262, 1973.
- DOGTERON, G. E. S.; BOHLKEN, S. & JOOSE, J. Effect of the photoperiod on the schedule of egg mass production in *Lymnaea stagnalis*, as induced by ovulation hormone injections. *Gen. Comp. Endocrinol.* 49: 255 - 260, 1983.
- DUSANIC, D. G. & LEWERT, R. M. Alterations of proteins and free amino acids of *Australorbis glabratus* hemolymph after exposure to miracidia. *J. Inf. Dis.*, 112: 243-246, 1963.
- FIGUEIREDO, E. A.; GOMEZ, M. V.; HENEINE, I. F.; SANTOS, I. O.; HARGREAVES, F. B. Isolation and physiochemical properties of the hemoglobin of *Biomphalaria glabrata* (MOLLUSCA, PLANORBIDAE). *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 44:481-491, 1973.
- GARSON, S. & WILLIAMS, J. S. Transamination in *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 43, supplement, 27 - 28, 1957.
- GILBERTSON, D. E. & ETGES, F. J. Haemagglutinins in the haemolymph of planorbid snails. *Ann. J. Trop. Med. Parasitol.*, 61:144-147, 1967.
- GILBERTSON, D. E.; ETGES, F. J.; OGLE, J. D. Free amino acids of *Australorbis glabratus* hemolymph = Comparison of four geographic strains and effect of infection by *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 53(3):565-568, 1967.
- GOLDBERG, M.; FLESCHER, E. & LENGY, J. *Schistosoma mansoni*: Partial purification and properties of ornithine- δ - transaminase. *Exp. Parasitol.* 47: 333 - 341, 1979.
- GOLDBERG, M.; FLESCHER, E.; GOLD, D. & LENGY, J. Ornithine - δ - transaminase from the liver fluke *Fasciola hepatica* and the blood fluke *Schistosoma mansoni*: A comparative study. *Comp. Biochem. Physiol.* 65B: 605 - 613, 1980.
- GRAFF, H. P.; HAGG, A.; KARGER, B. L. High pressure liquid chromatography. *Anal. Lett.* 6: 505 - 509, 1978.

- GRANATH, W. O.; SPRAY, F. J. & JUDD, R. C. Analysis of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemolymph by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, high -performance liquid chromatography, and immunoblotting. **J. Inv. Pathol.** 49: 198 - 208, 1987.
- GRANATH, W. O. Identification of hemeproteins in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (GASTROPODA) separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Inv. Pathol.** 52: 43-48, 1988.
- GRESS, F. M.; CHENG, T. Alterations in total serum proteins and protein fractions in *Biomphalaria glabrata* parasited by *Schistosoma mansoni*. **J. Inv. Pathol.**, 22:382-390, 1973.
- HERBERTS, C.; DeFRESCHVILLE, J.; QUIGNON, M.; GALVAN, Y. J. Composition protéique de l'hémolymph de *Biomphalaria glabrata* (Mollusque, gasterópode) - Influence de la méthode de prélèvement et relation avec la composition protéique des different organs. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**; 63(2): 165-168, 1988.
- HERBERTS, C.; QUIGNON, M.; GOLVAN, Y. J.; FRESCHVILLE, J. Étude des réactions de *Biomphalaria glabrata* à l'infestation par *Schistosoma mansoni*. I. Composition protéique de l'hémolymph de mollusques sains. Comparaison entre les populations sauvages et les souches de laboratoire. **Ann. Parasitol. Comp.**, 61:227-233, 1986.
- JEONG, K. H.; SUSSMAN, S.; ROSEN, S. D.; LIE, K. J. & HEYNEMAN, D. Distribution and variation of hemagglutination activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*. **J. Inv. Pathol.** 38: 256 - 263, 1981.
- LEE, F. O. & CHENG, T. *Schistosoma mansoni*: Alterations in total protein and hemoglobin in the hemolymph of infected *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, 31:203-216, 1972.
- LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**; tradução da 2ª Edição americana, 4ª reimpressão, supervisão: José Reinaldo Magalhães, vols 1 a 3, 1984.
- LIE, K.J.; JEONG, K. H. & HEYNEMAN, D. in SOULSBY, E. J. L., **Protozoa, Arthropods and Invertebrates**, Chapter 7, 211-270, vol. IV, CRC Press, Florida, USA, 1987.
- LOOKER, D. L. & ETGES, F. J. Effect of *Schistosoma mansoni* infection on fecundity and perivitelline fluid composition in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.** 65: 880 - 885, 1979.

- MAGALHÃES, L.A. Técnica para avaliação da viabilidade de penetração de cercária de *Schistoma mansonii* em *Mus musculus*. **Hospital**, 75(5): 1663-1666, 1969.
- MAGALHÃES, L. A. - Estudo do comportamento da cepa de *S. mansonii* de Brasília. "O Hospital" 77 (2): 273 - 282, 1970.
- MAGALHÃES, L.A.; ZANOTTI MAGALHÃES, E.M.; CARVALHO, J.F.; FARAONE, M. Atração miraxonal exercida pela *Biomphalaria straminea*, *Lymnaea columella* e *Physa sp* sobre miracídios de *Schistosoma mansonii* da linhagem BH. **Rev. Saúde Públ. S. Paulo**, 25(1): 23-27, 1991.
- MAGALHÃES, L. A.; ZANOTTI MAGALHÃES, E. M. & CARVALHO, J. F. Observações sobre o comportamento de *Biomphalaria glabrata* infantil e adulta exposta ao *Schistosoma mansonii*. I. Atração miraxonal. XII Congresso de Parasitologia da Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 2 (2): M3, 81, 1993.
- MALEK, E. A. in **Snail-transmitted parasitic diseases**. Chapter 1, 143-144, Vol. 1, CRC Press, Florida, USA, 1980.
- MEYER, R. & BECKER, W. Induced urea production in *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansonii*. **Comp. Biochem. Physiol.** 66 A: 673 - 677, 1980.
- McINNIS, A.J.; BETHEL, W.M.; CORNFORD, E.M. Identification of chemicals of snail origin that attract *Schistosoma mansonii* miracidia. **Nature** 248: 361-363, 1974.
- MELLO, M. T. & PARAENSE, W. L. Geographical differences in lectinic activity of albumen gland extracts of planorbid snails *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 20(2): 115-120, 1978.
- MICHELSON, E. H. & DUBOIS, L. Increased alkaline phosphatase in the tissues and hemolymph of the snail *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansonii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 44B: 763-767, 1973.
- MICHELSON, E.H. & DUBOIS, L. Intraspecific variations in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansonii*. **Malacologia**, 15(1): 105 - 111, 1975.
- MICHELSON, E. H. & DUBOIS, L. Agglutinins and lysins in the molluscan family Planorbidae: A survey of haemolymph, egg-masses and albumen glands extracts. **Biological Bulletin** 153: 219 - 227, 1977.

- NASCIMENTO, M. C. S.; DANIEL, J. P. & HENEINE, I. F. The hemoglobin of the snail *Biomphalaria glabrata*, the absence of sulfhydryl groups (SH), presence of disulfide bonds (SS), and their relation to ligand properties. **Comp. Biochem. Physiol.** **73B**: 251 - 256, 1982.
- NODA, S. & LOKER, E. S. - Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating haemocyte population of the host snail *Biomphalaria glabrata*. **Parasitol.** **98**: 35 - 41, 1989.
- PARAENSE, W. L. & CORREA, L.R. - Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **5**: 15 - 22, 1963a.
- PARAENSE, W. L. & CORREA, L.R. - Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Med. Trop. S. Paulo** **5**: 23 - 29, 1963b.
- PARAENSE, W. L. & CORREA, L. R. - Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.** **64**: 822 - 826, 1978.
- PAN, C. T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** **14**: 931 - 976, 1965.
- REGNIER, F. E. **Meth. Enzimol.** **91**: 137 - 190, 1983.
- REIS, S. M. P. M. Estudo do mecanismo de ação da hemolinfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). Tese de Mestrado, área de Parasitologia. Instituto de Biologia, UNICAMP, 1990.
- RICHARDS, C. S. - Influence of snail age on genetic variations in susceptibility of *Biomphalaria glabrata* for infection with *Schistosoma mansoni*. **Malacol.** **25** (2): 493 - 502, 1980.
- RUPPRECHT, H.; BECKER, W.; SCHWANBECK, A. Alterations in hemolymph components in *Biomphalaria glabrata* during long-term infection with *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Res.**, **75**:233- 237, 1989.
- SANTANA, J. V. ; MAGALHÃES, L. A. & RANGEL, H. A. Quantificação da atividade fagocitária de amebócitos de moluscos *Biomphalaria glabrata* livres da infecção e infectados por *Schistosoma mansoni*. **Resumos do XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **58**: 63, 1985.

- SARWAR, G. & BOTTING, H.G. Rapid analysis of nutritionally important free amino acids in serum and organs (Liver, Brain, and Heart) by liquid chromatography of precolumn phenylisothiocyanate derivatives. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, **73** (3): 470-475.
- SCHMALE, H. & BECKER, W. Die Ammonium - und Harnstoff - konzentration in der Hämolymphe von *Biomphalaria glabrata* unter dem Einfluß einer Infektion mit *Schistosoma mansoni*. **Z. Parasitenkd** **45**: 237 - 241, 1975.
- SCHMALE, H. & BECKER, W. Studies on the urea cycle of *Biomphalaria glabrata* during normal feeding activity, in starvation and with infection of *Schistosoma mansoni*. **Comp. Biochem. Physiol.** **58 B**: 321 - 330, 1977.
- SHAPIRO, A. L.; VINUELA, E.; MAEZEL, J. V. Molecular weight estimation of polypeptide chain by electrophoresis in SDS polyacrylamide gels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **28**: 815 - 819, 1967.
- SOUZA DIAS, L. C.; UETA, M. & GUARALDO, A. M. - Susceptibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **29** (4): 205 - 212, 1987.
- STANDEN, O. D. - The effects of temperature, light and salinity upon the hatching ova of *Schistosoma mansoni*. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** **45** (2): 221 - 241, 1951.
- STANISLOWSKI, E. & BECKER, W. Alterations of the free amino acid content in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata) in starvation and after infection with *Schistosoma mansoni* (Trematoda). **Comp. Biochem. Physiol.** **63B**: 477 - 482, 1979.
- STEIN, P. C. & BASCH, P. F. Purification and binding properties of hemagglutinin from *Biomphalaria glabrata*. **J. Inv. Pathol.**, **33**:10-18, 1979.
- TARGET, G. A. T. The amino acid composition from snail hosts of schistosomiasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **56**:61-66, 1962.
- THOMPSON, S. N. Metabolic integration during the host associations of multicellular animal endoparasites. **Comp. Biochem. Physiol.** **81B**: 21 - 42, 1985.
- VAN DER KNAAP, W. P. W. & LOKER, E. S. Immune mechanisms in trematode - snails interactions. **Parasitol. Today**, vol. **6** (6): 175 - 182, 1990.

- VELDHUIJZEN, J. P. & CUPERUS, R. Effects of starvation, low temperature and the dorsal body hormone on the in vitro synthesis of galactogen and glycogen in the albumen gland and the mantle of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Neth. J. Zool.** 26: 119 - 135, 1976.
- WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of a molecular weight determination by sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem.** 211: 4406 - 4410, 1969.
- WIJDENES, J.; VAN ELKE, R. & JOOSE, J. Effects of two gonadotropic hormones on polysaccharide synthesis in the albumen gland of *Lymnaea stagnalis*, studied with the organ culture technique. **Gen. Comp. Endocrinol.** 51: 263 - 271, 1983.
- WOLMARANS, C.T.; MIENIE, L.J.; STRYDOM, D. An investigation into the amino acid content of haemolymph and excreta products of six freshwater snail species. **Comp. Biochem. Physiol.**, 84A:335-337, 1986.
- WOLMARANS, C.T. & FARRELL, Z. The amino acid composition of the excretion products collected at 4°C and 25°C from five freshwater snail species: *Bulinus globosus*, *Bulinus tropicus*, *Biomphalaria glabrata*, *Lymnaea natalensis* and *Helisoma duryi*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 84A: 773-776, 1987.

ANEXO 1:

RELATÓRIO DA ANÁLISE STATÍSTICA:

- ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL	Págs. 1 a 6
- TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	Págs. 7 a 13
- GRUPOS - CONTROLE:	
* AGAROSE (A)	Pág. 7
* OVALBUMINA (O)	Pág. 9
* TAMPÃO FOSFATO (T)	Pág. 9

RELATÓRIO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ESTUDO DA ATRAÇÃO MIRAXONAL

Objetivo

Este trabalho foi desenvolvido com o intuito de detectar fatores que influenciam na atração de miracídeos de *Schistosoma mansoni*. Os fatores considerados, tipo, espécie e infecção se restringem a duas espécies de caramujos, *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*. O trabalho se deteve no estudo de quatro tipos de substâncias relativas aos caramujos, considerando essas duas espécies e o fato de estarem infectados ou não. Essas substâncias são:

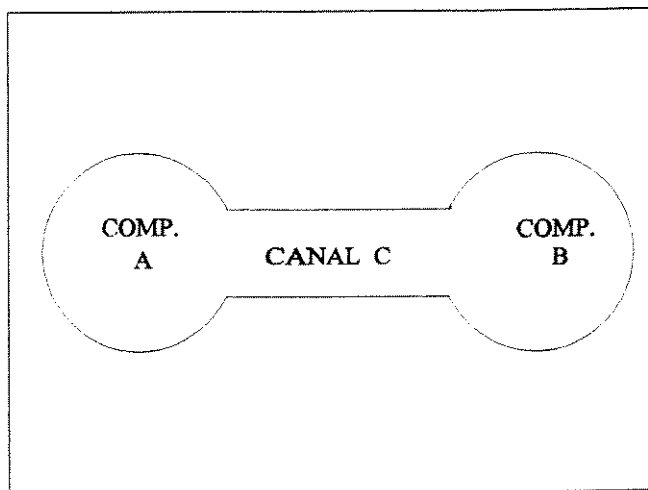
- Hemolinfa, sangue do caramujo;
- Snail Conditioned Water, água onde o caramujo é colocado durante algum tempo e depois é retirado;
- Extrato de Glândula de Albumen, substância produzida pelo caramujo;
- Molusco, o próprio caramujo.

Resumindo e apresentando a codificação utilizada para representar os fatores e seus respectivos níveis, tem-se a seguinte tabela:

TIPO	ESPÉCIE	INFECÇÃO
A - Ext. glândula de Albumen	G - <i>Biomphalaria glabrata</i>	N - Não infectado
H - Hemolinfa	T - <i>Biomphalaria tenagophila</i>	S - Infectado
S - Snail Conditioned Water		
M - Molusco		

Descrição do Experimento

O aparelho empregado na realização dos experimentos constituía-se de dois compartimentos, A e B, ligados por um canal C, como mostra a ilustração a seguir.



O experimento foi conduzido em 2 etapas. Na primeira etapa, combinações dos níveis dos 3 fatores eram colocadas no compartimento **A** deixando o compartimento **B** com água de tanque. Numa segunda etapa do experimento, duas combinações dos níveis dos três fatores eram comparadas no mesmo aparelho, colocando-se uma delas no compartimento **A** e a outra no compartimento **B**.

Cada experimento foi conduzido com um número de 10 miracídios, que eram colocados no canal **C**, e depois de um determinado tempo, observava-se o número de miracídios que se encontravam em cada compartimento e também no canal **C**.

Dez replicações foram realizadas para cada experimento, isto é, para cada combinação dos níveis dos fatores utilizados no estudo, dez experimentos foram feitos.

Na primeira etapa, descrita acima, foi conduzido um fatorial completo, ou seja, todas as combinações possíveis dos níveis dos 3 fatores foram colocadas no compartimento **A**, somando um total de 16 grupos a serem analisados, cada um com dez replicações. Assim, 160 experimentos foram conduzidos nesta etapa.

Na segunda etapa, fez-se uma comparação entre as combinações que atraíam maior quantidade dos miracídios, segundo critérios estabelecidos pelo pesquisador com base nos resultados do experimento anterior.

Análise Estatística

Foi utilizado o software *SAS*[®] (Statistical Analysis System) versão 6.08, para a obtenção das estatísticas de interesse. O procedimento específico do SAS usado neste trabalho foi o *CATMOD* (**C**ategorical **M**odeling).

Como o objetivo do trabalho é saber as substâncias que atraem os miracídios, optou-se pela exclusão do canal **C** da análise estatística. Dessa forma, restringiu-se a atenção aos compartimentos **A** e **B**, onde o último serviu como controle na primeira etapa do experimento, já que em seu conteúdo havia apenas água de tanque, que não possui nenhum atrativo relacionado com os caramujos.

A análise estatística revelou a existência de interação entre os fatores tipo, espécie e infecção, o que significa que não é possível analisar cada fator isoladamente, ou seja, não se pode dizer qual espécie, ou qual substância ou se o fato de estar infectado ou não atrai mais miracídios. Só se pode tirar conclusões quando se consideram as combinações de todos os fatores conjuntamente. A significância da interação dos três fatores é inferior a 0.0005%. O significado de uma interação de dois fatores é que o efeito de um fator depende dos níveis do outro fator. Agora, uma interação de três fatores significativa, como nesse caso, indica que o efeito de interação entre dois dos fatores depende dos níveis do terceiro fator. Para interpretar a interação, fez-se uma análise gráfica, onde plotou-se a interação dos fatores espécie e infecção para cada nível do fator TIPO.

O comportamento da interação é semelhante nos níveis Snail Conditioned Water e Molusco, ou seja, o efeito na proporção de miracídios que migram para o compartimento A quando se muda da espécie G para T é praticamente o mesmo, tanto no caso infectado como no não infectado. Já no nível Hemolinfa, apenas o caso infectado é similar ao dos outros dois descritos acima. No caso não infectado, quase não há efeito provocado pela mudança de espécie. Nesses três níveis, o efeito para o caso infectado quando se muda da espécie G para T é um aumento na proporção de miracídios no compartimento A. Entretanto, no nível Extrato de Glândula de Albumen, o efeito é uma pequena redução nesta proporção.

Para o caso não infectado no nível Extrato de Glândula de Albumen, o comportamento do efeito é similar aos níveis Snail Conditioned Water e Molusco. Vale ressaltar que o efeito para esse caso em todos os quatro níveis representa um decréscimo na proporção de miracídios no compartimento A quando se muda da espécie G para T.

Gráfico 1.

EXT. GLÂNDULA DE ALBUMEN

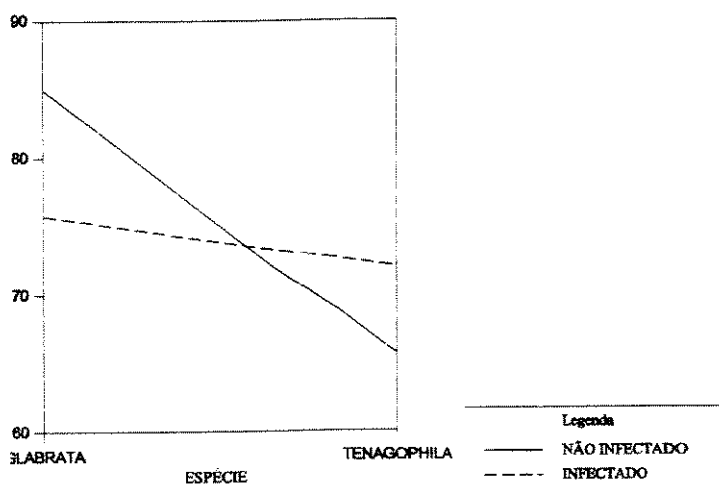


Gráfico 2.

HEMOLINFA

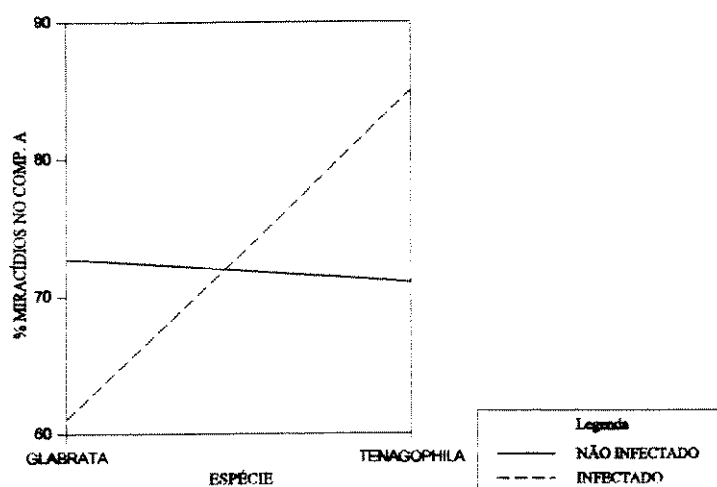


Gráfico 3.

SNAIL CONDITIONED WATER

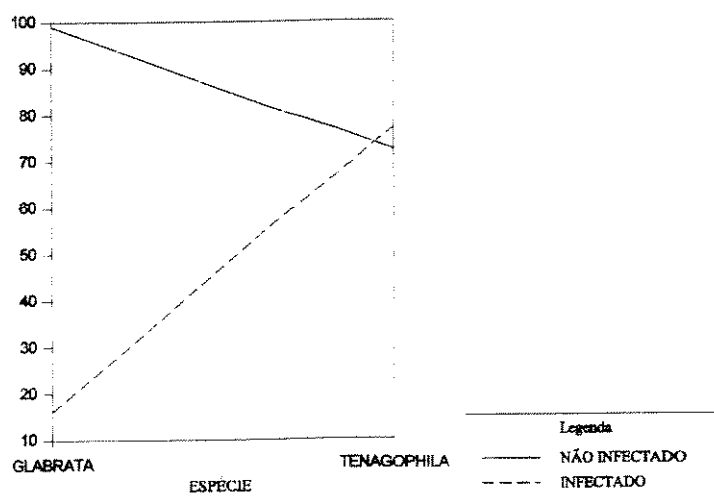
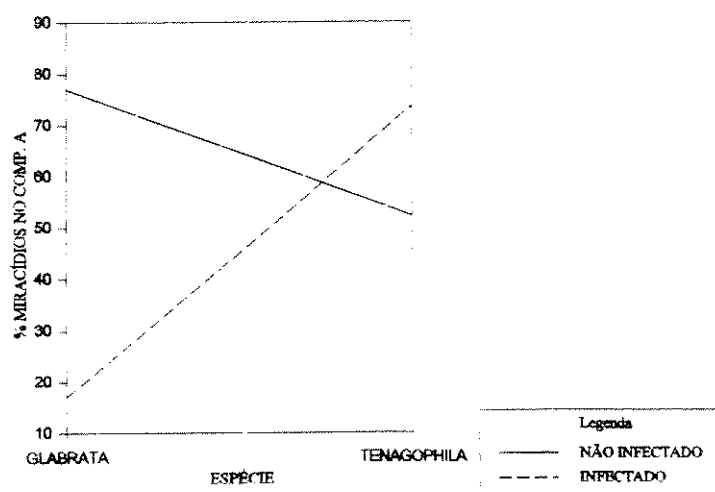


Gráfico 4.

MOLUSCO



Os gráficos 5, 6 e 7 apresentados abaixo se referem à segunda etapa do experimento. Analisando esses gráficos, pode-se obter mais detalhes sobre as possíveis substâncias que influem na atração dos miracídios.

No gráfico 7, onde considera-se os experimentos com Snail Conditioned Water, tanto no compartimento **A** como no **B**, nota-se que o fator infecção do caramujo da espécie *Biomphalaria glabrata* é importante quando comparado com a espécie *Biomphalaria tenagophila* infectada. Em outras palavras, quando o caramujo da espécie **G** não está infectado, esta combinação atrai mais os miracídios que a combinação espécie **T** infectada. Agora, quando ele está contaminado, a combinação espécie **T** infectada atrai mais. Também percebe-se que a espécie **T**, independente de estar infectada ou não, atrai mais que a espécie **G** infectada.

No gráfico 5, onde considera-se os experimentos realizados com a espécie **T** nos dois compartimentos, nota-se que o Extrato de Glândula de Albumen atrai mais que Snail Conditioned Water. A mesma conclusão estende-se para o caso em que é analisada a espécie **G** em ambos os compartimentos. (vide gráfico 6).

Gráfico 5.

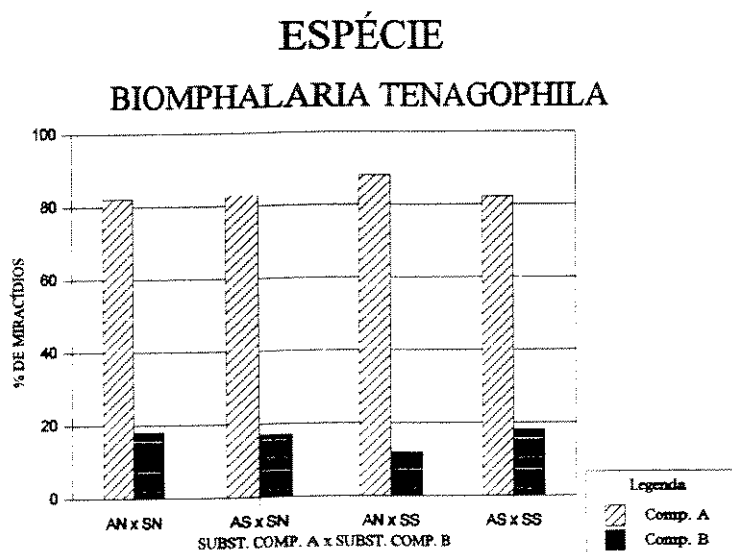


Gráfico 6.

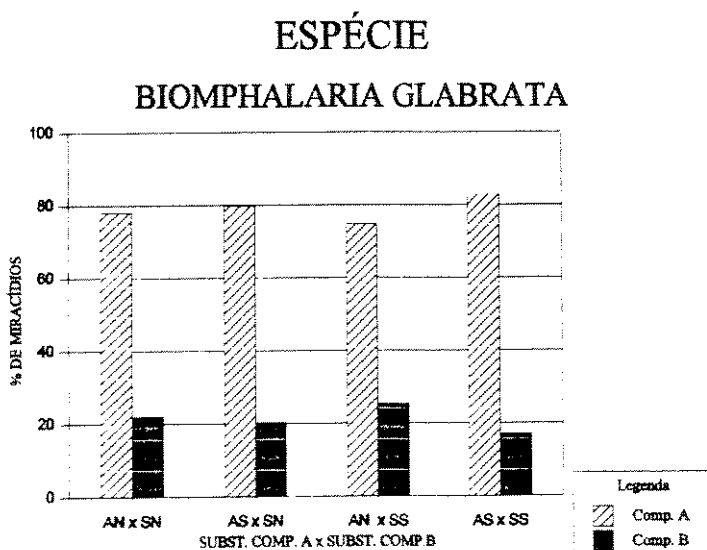
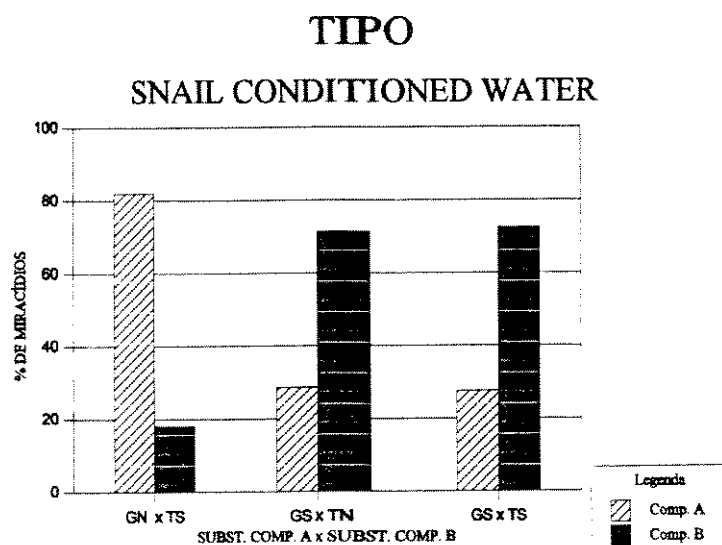


Gráfico 7.



Referência

SAS Institute Inc., *SAS/STAT*® User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volume 1, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989, 943 pp.

**RELATÓRIO DA ANÁLISE ESTATÍSTICA
DOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA
DAS FRAÇÕES DA CROMATOGRÁFIA DE
EXCLUSÃO MOLECULAR**

Análise Estatística

Para avaliar a migração de miracídios para os compartimentos, utilizou-se o teste t-Student para amostras dependentes. Este teste foi aplicado sobre a variável $DIF = NA - (NB + NC)$.

Nas tabelas fornecidas aparecem para cada grupo de Espécie, Infecção e tipo, a média da variável DIF, o seu desvio padrão e o p-valor do teste. A hipótese do teste é de que não há diferença no número de miracídios que migram para o compartimento A em relação aos que permanecem no compartimento C ou os que migram para o B. Se o nível de significância adotado é maior que o p-valor apresentado, então rejeita-se a hipótese em questão; caso contrário, não há evidências estatísticas que levem à rejeição da hipótese.

Se a média da variável DIF for positiva indica que há um maior número de miracídios no compartimento A, significando que há uma tendência à atração para este compartimento. Se, no entanto, a média for negativa, indicará uma possível repulsão em relação ao compartimento A.

----- Espécie = G Infecção = N Tipo = A -----

Média	DP	P-valor
0.2000000	0.6324555	0.3434

----- Espécie = G Infecção = N Tipo = CH1 -----

Média	DP	P-valor
6.6000000	2.1186998	0.0001

----- Espécie = G Infecção = N Tipo = CH2 -----

Média	DP	P-valor
4.0000000	1.6329932	0.0001

-----Espécie = G Infecção = N Tipo = CH3 -----

Média	DP	P-valor
5.8000000	1.4757296	0.0001

-----Espécie = G Infecção = N Tipo = CH4 -----

Média	DP	P-valor
6.2000000	2.2010099	0.0001

-----Espécie = G Infecção = N Tipo = CH5 -----

Média	DP	P-valor
5.6000000	2.2705848	0.0001

-----Espécie = G Infecção = N Tipo = CH6 -----

Média	DP	P-valor
4.4000000	1.5776213	0.0001

-----Espécie = G Infecção = N Tipo = CH7 -----

Média	DP	P-valor
3.8181818	2.2723636	0.0002

-----Espécie = G Infecção = N Tipo = CH8 -----

Média	DP	P-valor
5.1111111	1.7638342	0.0001

----- Espécie = G Infecção = N Tipo = O -----

Média	DP	P-valor
5.0000000	1.4142136	0.0001

----- Espécie = G Infecção = N Tipo = T -----

Média	DP	P-valor
-2.2000000	2.5733679	0.0243

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH1 -----

Média	DP	P-valor
7.0000000	1.9436506	0.0001

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH2 -----

Média	DP	P-valor
3.2000000	1.9321836	0.0005

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH3 -----

Média	DP	P-valor
3.6000000	1.5776213	0.0001

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH4 -----

Média	DP	P-valor
3.2000000	1.0327956	0.0001

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH5 -----

Média	DP	P-valor
4.2000000	1.4757296	0.0001

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH6 -----

Média	DP	P-valor
5.2000000	1.0327956	0.0001

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH7 -----

Média	DP	P-valor
4.2000000	1.4757296	0.0001

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH8 -----

Média	DP	P-valor
4.6000000	1.3498971	0.0001

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH9 -----

Média	DP	P-valor
5.4000000	1.6465452	0.0001

----- Espécie = G Infecção = S Tipo = CH10 -----

Média	DP	P-valor
5.4000000	1.3498971	0.0001

----- Espécie = T Infecção = N Tipo = CH1 -----

Média	DP	P-valor
5.2727273	2.0538213	0.0001

----- Espécie = T Infecção = N Tipo = CH2 -----

Média	DP	P-valor
7.1111111	1.0540926	0.0001

----- Espécie = T Infecção = N Tipo = CH3 -----

Média	DP	P-valor
4.8000000	1.9321836	0.0001

----- Espécie = T Infecção = N Tipo = CH4 -----

Média	DP	P-valor
6.0000000	1.3333333	0.0001

----- Espécie = T Infecção = N Tipo = CH5 -----

Média	DP	P-valor
5.6000000	1.5776213	0.0001

----- Espécie = T Infecção = N Tipo = CH6 -----

Média	DP	P-valor
5.4000000	1.3498971	0.0001

----- Espécie = T Infecção = N Tipo = CH7 -----

Média	DP	P-valor
5.4000000	1.3498971	0.0001

----- Espécie = T Infecção = N Tipo = CH8 -----

Média	DP	P-valor
4.8000000	1.3984118	0.0001

----- Espécie = T Infecção = S Tipo = CH1 -----

Média	DP	P-valor
6.0000000	1.8856181	0.0001

----- Espécie = T Infecção = S Tipo = CH2 -----

Média	DP	P-valor
4.0000000	1.6329932	0.0001

----- Espécie = T Infecção = S Tipo = CH3 -----

Média	DP	P-valor
3.8000000	1.4757296	0.0001

----- Espécie = T Infecção = S Tipo = CH5-----

Média	DP	P-valor
4.4000000	1.8378732	0.0001

----- Espécie = T Infecção = S Tipo = CH6-----

Média	DP	P-valor
5.2000000	1.0327956	0.0001

----- Espécie = T Infecção = S Tipo = CH8-----

Média	DP	P-valor
5.2000000	1.3984118	0.0001

----- Espécie = T Infecção = S Tipo = CH10-----

Média	DP	P-valor
3.6000000	2.0655911	0.0004

----- Espécie = T Infecção = S Tipo =CH12-----

Média	DP	P-valor
3.8000000	1.1352924	0.0001

ANEXO 2:

**-TABELAS DO ESTUDO DE
ATRAÇÃO MIRAXONAL
- GRÁFICOS - PERFÍS DE
ELUIÇÃO DO CONTEÚDO
DE AMINOÁCIDOS LIVRES
NAS AMOSTRAS DE
HEMOLINFA**

Págs. 1 a 27

Págs. 28 a 40

TABELA 1.- Teste de atração miraxonal de miracídeos de *S. mansoni* frente à moluscos *B. glabrata* sadios

Molusco	Câmara A BgS	Canal C *	Câmara B (água)
1	8	0	2
2	10	0	0
3	9	0	1
4	6	0	4
5	8	0	2
6	7	0	3
7	8	0	2
8	7	0	3
9	6	0	4
10	8	0	2
Média=	7,7	0	2,3
D. padrão=	1,25	0	1,25

* 10 miracídeos BH

BgS = *B. glabrata* sadia (não infectada por *S. mansoni*)

TABELA 2.- Teste de atração miraxonal de miracídios de *S. mansoni* frente a moluscos *B. glabrata* infectados por *S. mansoni*

Molusco	Câmara A Bgl	Canal C *	Câmara B (água)
1	1	0	9
2	0	0	10
3	2	0	8
4	2	0	8
5	1	0	9
6	4	0	6
7	0	0	10
8	2	0	8
9	3	0	7
10	2	0	8
Média=	1,7	0	8,3
D. padrão=	1,25	0	1,25

* 10 miracídios BH

Bgl = *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*

TABELA 3.- Teste de atração miraxonal de miracídios de *S. mansoni* frente à SCW de *B. glabrata* sadias.

Molusco	Câmara A WBgS	Canal C *	Câmara B (água)
1	9	0	1
2	10	0	0
3	10	0	0
4	10	0	0
5	10	0	0
6	10	0	0
7	10	0	0
8	10	0	0
9	10	0	0
10	10	0	0
Média=	9,9	0	0,1
D. padrão=	0,31	0	0,31

* 10 miracídios BH

WBgS = SCW de *B. glabrata* sadia (não infectada)

TABELA 4.- Teste de atração miraxonal de miracídios de *S. mansoni* frente à SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*

Molusco	Câmara A WBGI	Canal C *	Câmara B (água)
1	0	0	10
2	2	0	8
3	1	0	9
4	0	0	10
5	2	0	8
6	3	0	7
7	2	0	8
8	2	0	8
9	1	0	9
10	3	0	7
Média=	1,6	0	8,4
D. padrão=	1,07	0	1,07

* 10 miracídios BH

WBGI = SCW de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*

TABELA 5.- Teste da atração miraxonal frente à moluscos *B. tenagophila* sadios

Molusco	Câmara A BtS	Canal C *	Câmara B (água)
1	3	3	4
2	4	2	4
3	4	3	3
4	5	2	3
5	5	2	3
6	4	0	6
7	5	1	4
8	5	0	5
9	5	0	5
10	4	2	4
Média=	4,4	1,5	4,1
D.padrão=	0,69	1,18	0,99

* 10 miracídios SJ

BtS = *B. tenagophila* sadia (não infectada por *S. mansoni*)

TABELA 6.- Teste de atração miraxonal frente à moluscos *B. tenagophila* infectados por *S. mansoni*

Molusco	Câmara A BtI	Canal C *	Câmara B (água)
1	6	1	3
2	8	0	2
3	9	0	1
4	7	0	3
5	3	4	3
6	7	0	3
7	6	0	4
8	8	0	2
9	9	0	1
10	7	1	2
Média=	7,0	0,6	2,4
D.padrão=	1,76	1,26	0,96

* 10 miracídeos SJ

BtI= *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*

TABELA 7.– Teste da atração miraxonal frente à SCW de *B. tenagophila* não infectadas por *S. mansoni*

Amostra de SCW	Câmara A WBtS	Canal C *	Câmara B (água)
1	2	2	6
2	6	2	2
3	4	1	5
4	8	1	1
5	8	0	2
6	8	0	2
7	8	0	2
8	9	0	1
9	7	0	3
10	8	0	2
Média=	6,8	0,6	2,6
D.padrão=	2,20	0,84	1,64

* 10 miracídios SJ

WBtS = SCW de *B. tenagophila* sadia (não infectada por *S. mansoni*)

TABELA 8.- Teste da atração miraxonal frente à SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*

Amostra de SCW	Câmara A WBtI	Canal C *	Câmara B (água)
1	6	0	4
2	7	0	3
3	9	0	1
4	9	0	1
5	6	0	4
6	9	0	1
7	6	0	4
8	9	0	1
9	9	0	1
10	7	0	3
Média=	7,7	0	2,3
D.padrão=	1,42	0	1,42

* 10 miracídeos SJ

WBtI = SCW de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*

TABELA 9. - Teste da atração miraxonal frente à SCW de *B. glabrata* sadias e à SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*

Amostra de SCW	Câmara A WBgS	Canal C *	Câmara B WBtI
1	2	1	7
2	8	0	2
3	7	1	2
4	9	1	0
5	1	0	9
6	4	0	6
7	8	0	2
8	2	0	8
9	3	0	7
10	3	0	7
Média=	4,7	0,3	5,0
D.padrão=	2,98	0,48	3,16

* 10 miracídeos BH

WBgS= SCW de *B. glabrata* sadia (não infectada por *S. mansoni*)

WBtI= SCW de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*

TABELA 10. - Teste da atração miraxonal frente à SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* e à SCW de *B. tenagophila* sadias

Amostra de SCW	Câmara A WBgI	Canal C *	Câmara B WBtS
1	3	0	7
2	3	0	7
3	3	0	7
4	4	0	6
5	2	0	8
6	3	1	6
7	2	1	7
8	2	0	8
9	2	0	8
10	4	0	6
Média=	2,8	0,2	7,0
D.padrão=	0,79	0,44	0,86

* 10 miracídios BH; WBgI = SCW de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*; WBtS= SCW de *B. tenagophila* sadia.

TABELA 11.- Teste da atração miraxonal frente à SCW de *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*

Amostra de SCW	Câmara A WBgI	Canal C *	Câmara B WBtI
1	3	0	7
2	1	1	8
3	3	0	7
4	3	0	7
5	4	0	6
6	2	0	8
7	3	0	7
8	2	0	8
9	3	1	6
10	3	0	7
Média=	2,7	0,2	7,1
D.padrão=	1,0	0	1,0

* 10 miracídios BH

WBgI: SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*

WBtI: SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*

TABELA 12.- Teste de atração miraxonal frente à hemolinfa de *B. glabrata* sadias

Amostra de hemolinfa	Câmara A HBgS	Canal C *	Câmara B (água)
1	6	0	4
2	7	0	3
3	7	0	3
4	7	0	3
5	8	0	2
6	8	0	2
7	7	0	3
8	8	0	2
9	6	1	3
10	8	0	2
Média=	7,2	0,1	2,7
D.padrão=	0,79	0,31	0,65

* 10 miracídios BH

HBgS: Hemolinfa de *B. glabrata* sadias

TABELA 13.– Teste da atração miraxonal frente à hemolinfa de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*

Amostra de hemolinfa	Câmara A HBgI	Canal C *	Câmara B (água)
1	6	0	4
2	6	0	4
3	5	0	5
4	6	0	4
5	7	0	3
6	6	0	4
7	6	0	4
8	6	0	4
9	7	0	3
10	6	0	4
Média=	6,1	0	3,9
D.padrão=	0,57	0	0,57

* 10 miracídeos BH

HBgI: Hemolinfa de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*

TABELA 14.- Teste da atração miraxonal frente à hemolinfa de *B. tenagophila* sadias

Amostra de hemolinfa	Câmara A HBtS	Canal C *	Câmara B (água)
1	7	0	3
2	8	0	2
3	7	0	3
4	8	0	2
5	6	0	4
6	7	0	3
7	6	0	4
8	7	0	3
9	8	0	2
10	7	0	3
Média=	7,1	0	2,9
D.padrão=	0,74	0	0,74

* 10 miracídios SJ

HBtS: Hemolinfa de *B. tenagophila* sadias

TABELA 15.- Teste da atração miraxonal frente à hemolinfa de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*

Amostra de hemolinfa	Câmara A HBtI	Canal C *	Câmara B (água)
1	10	0	0
2	7	0	3
3	9	0	1
4	8	0	2
5	8	0	2
6	8	0	2
7	8	0	2
8	9	0	1
9	9	0	1
10	9	0	1
Média=	8,5	0	1,5
D.padrão=	0,85	0	0,85

* 10 miracidios SJ

HBtI: Hemolinfa de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*

TABELA 16.- Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* sadias

Amostra	Câmara A GABtS	Canal C *	Câmara B (agua)
1	7	0	3
2	8	0	2
3	8	0	2
4	4	1	5
5	6	0	4
6	7	0	3
7	6	0	4
8	6	0	4
9	6	0	4
10	7	0	3
Média=	6,5	0,1	3,4
D.padrão=	1,18	0,31	0,96

* 10 miracídios SJ

GABtS = Extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* sadias.

TABELA 17.- Teste de atração miraxonal frente ao extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*

Amostra	Câmara A GABtI	Canal C *	Câmara B (agua)
1	7	0	3
2	8	0	2
3	8	0	2
4	7	0	3
5	8	0	2
6	9	0	1
7	6	0	4
8	5	0	5
9	8	0	2
10	6	0	4
Média=	7,2	0	2,8
D.padrão=	1,23	0	1,23

* 10 miracídeos SJ

GABtI = Extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*.

TABELA 18.- Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen e à SCW de *B. tenagophila* sadias.

Amostra	Câmara A GABtS	Canal C *	Câmara B WBtS
1	7	0	3
2	7	0	3
3	9	0	1
4	7	0	3
5	8	0	2
6	9	0	1
7	9	0	1
8	9	0	1
9	8	0	2
10	9	0	1
Média=	8,2	0	1,8
D.padrão=	0,92	0	0,92

* 10 miracídios SJ

GABtS = Extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* sadias.

WBtS = Água de condicionamento de *B. tenagophila* sadias.

TABELA 19.- Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* sadias e à SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*.

Amostra	Câmara A GABtS	Canal C *	Câmara B WBtI
1	9	0	1
2	8	0	2
3	10	0	0
4	9	0	1
5	10	0	0
6	7	0	3
7	10	0	0
8	9	0	1
9	7	0	3
10	9	0	1
Média=	8,8	0	1,2
D.padrão=	1,13	0	1,13

* 10 miracídios SJ

GABtS = Extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* sadias.

WBtI = Água de condicionamento de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*.

TABELA 20.- Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni* e ` SCW de *B. tenagophila* sadias.

Amostra	Câmara A GABtI	Canal C *	Câmara B WBtS
1	8	0	2
2	7	0	3
3	9	0	1
4	7	0	3
5	7	0	3
6	10	0	0
7	9	0	1
8	9	0	1
9	10	0	0
10	7	0	3
Média=	8,3	0	1,7
D.padrão=	1,25	0	1,25

* 10 miracídeos SJ

GABtI = Extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*.

WBtS = Água de condicionamento de *B. tenagophila* sadias.

TABELA 21.- Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen e à SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*.

Amostra	Câmara A GABtI	Canal C *	Câmara B WBtI
1	8	0	2
2	7	0	3
3	6	0	4
4	9	0	1
5	9	0	1
6	8	0	2
7	10	0	0
8	9	0	1
9	8	0	2
10	8	0	2
Média=	8,2	0	1,8
D.padrão=	1,13	0	1,13

* 10 miracídios SJ

GABtI = Extrato de glândula de albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*.

WBtI = Água de condicionamento de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*

TABELA 22.- Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias

Amostra	Câmara A GABgS	Canal C *	Câmara B (água)
1	9	0	1
2	8	0	2
3	8	0	2
4	9	0	1
5	9	0	1
6	9	0	1
7	7	0	1
8	8	0	2
9	9	0	1
10	9	0	1
Média=	8,5	0	1,3
D.padrão=	0,70	0	0,70

* 10 miracídeos BH.

GABgS = Extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias.

TABELA 23.- Teste de atração miraxonal frente ao extrato glândula de albúmen de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*

Amostra	Câmara A GABgI	Canal C *	Câmara B (água)
1	8	0	2
2	9	0	1
3	9	0	1
4	7	1	2
5	9	0	1
6	4	0	6
7	8	0	2
8	9	0	1
9	7	0	3
10	5	0	5
Média=	7,5	0,1	2,4
D.padrão=	1,8	0,31	1,77

* 10 miracídios BH.

GABgI = Extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*.

TABELA 24.- Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen e à SCW de *B. glabrata* sadias.

Amostra	Câmara A GABgS	Canal C *	Câmara B WBgS
1	9	0	1
2	7	0	3
3	8	0	2
4	7	0	3
5	7	0	3
6	7	0	3
7	8	0	2
8	8	0	2
9	9	0	1
10	8	0	2
Média=	7,8	0	2,2
D.padrão=	0,79	0	0,79

*10 miracídios BH.

GABgS = Extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias.

WBgS = Água de condicionamento de *B. glabrata* sadias.

TABELA 25.– Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni* e à SCW de *B. glabrata* sadias.

Amostra	Câmara A GABgI	Canal C *	Câmara B WBgS
1	8	0	2
2	7	0	3
3	7	0	3
4	8	0	2
5	9	0	1
6	9	0	1
7	8	0	2
8	9	0	1
9	7	0	3
10	7	0	3
Média=	7,9	0	2,1
D.padrão=	0,87	0	0,87

* 10 miracídeos BH.

GABgS = Extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias.

WBtI = Água de condicionamento de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*.

TABELA 26.- Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias e à SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*:

Amostra	Câmara A GABgS	Canal C *	Câmara B WBgI
1	9	0	1
2	6	1	3
3	9	0	1
4	8	0	2
5	7	0	3
6	6	0	4
7	8	0	2
8	7	0	3
9	8	0	2
10	6	0	4
Média=	7,4	0,1	2,5
D.padrão=	1,17	0,31	1,08

* 10 miracídios BH.

GABgS = Extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* sadias.

WBgI = Água de condicionamento de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*.

TABELA 27.- Teste da atração miraxonal frente ao extrato de glândula de albúmen e à SCW de *B. glabrata* infectadas por *S.mansoni*

Amostra	Câmara A GABgI	Canal C *	Câmara B WBgI
1	7	0	3
2	9	0	1
3	7	0	3
4	7	0	3
5	9	0	1
6	8	0	2
7	9	0	1
8	9	0	1
9	9	0	1
10	9	0	1
Média=	8,3	0	1,7
D.padrão=	0,95	0	0,95

* 10 miracídios BH.

GABgI = Extrato de glândula de albúmen de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*.

WBgI = Água de condicionamento de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*.

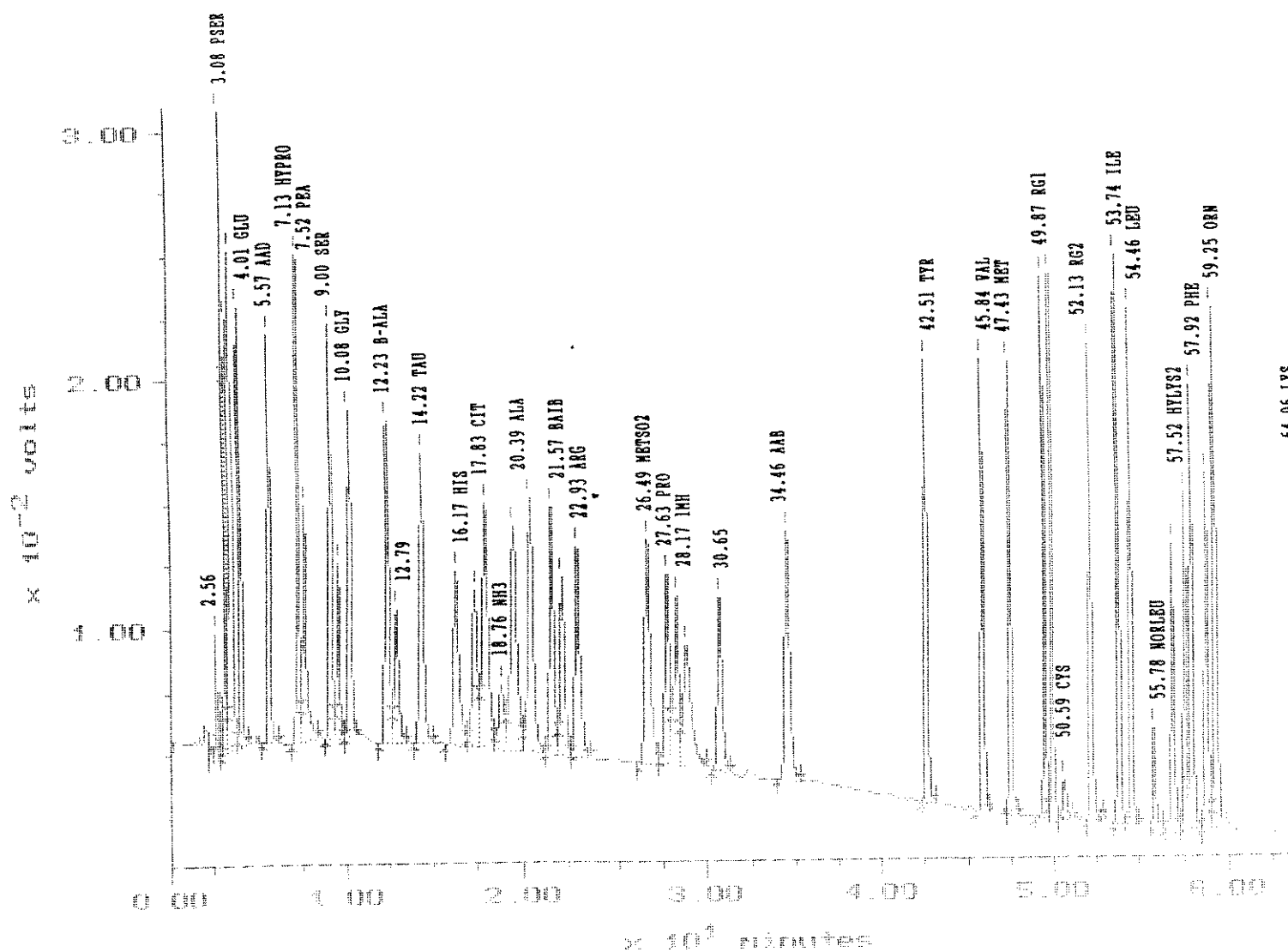


FIGURA 28: - Perfil de eluição do padrão de aminoácidos livres mostrando a resolução de cada aminoácido PTC por cromatografia líquida.

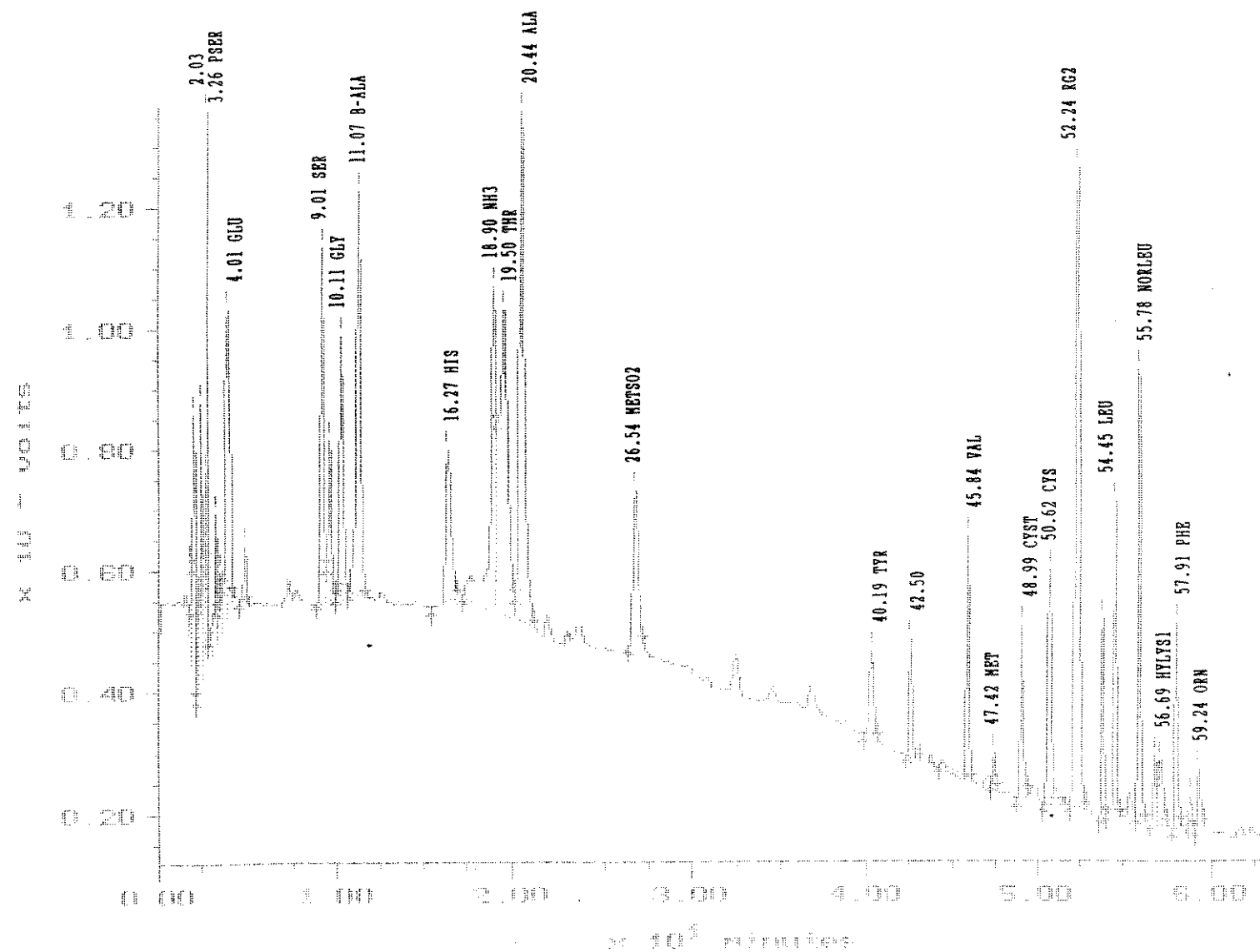


FIGURA 29: - Perfil de eluição da hemolinfa de *B. glabrata* sadias mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

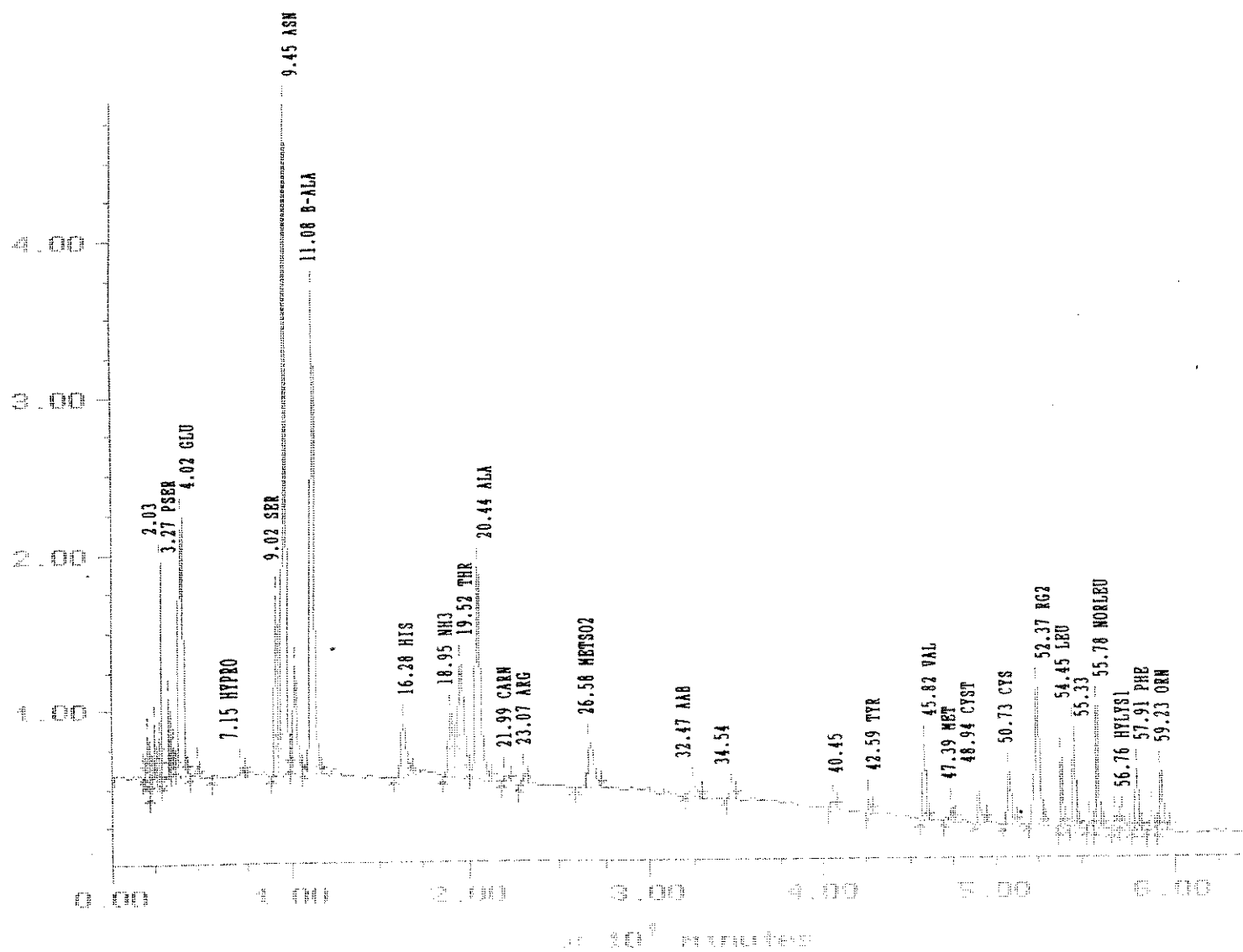


FIGURA 30: - Perfil de eluição da hemolinfa de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*, mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

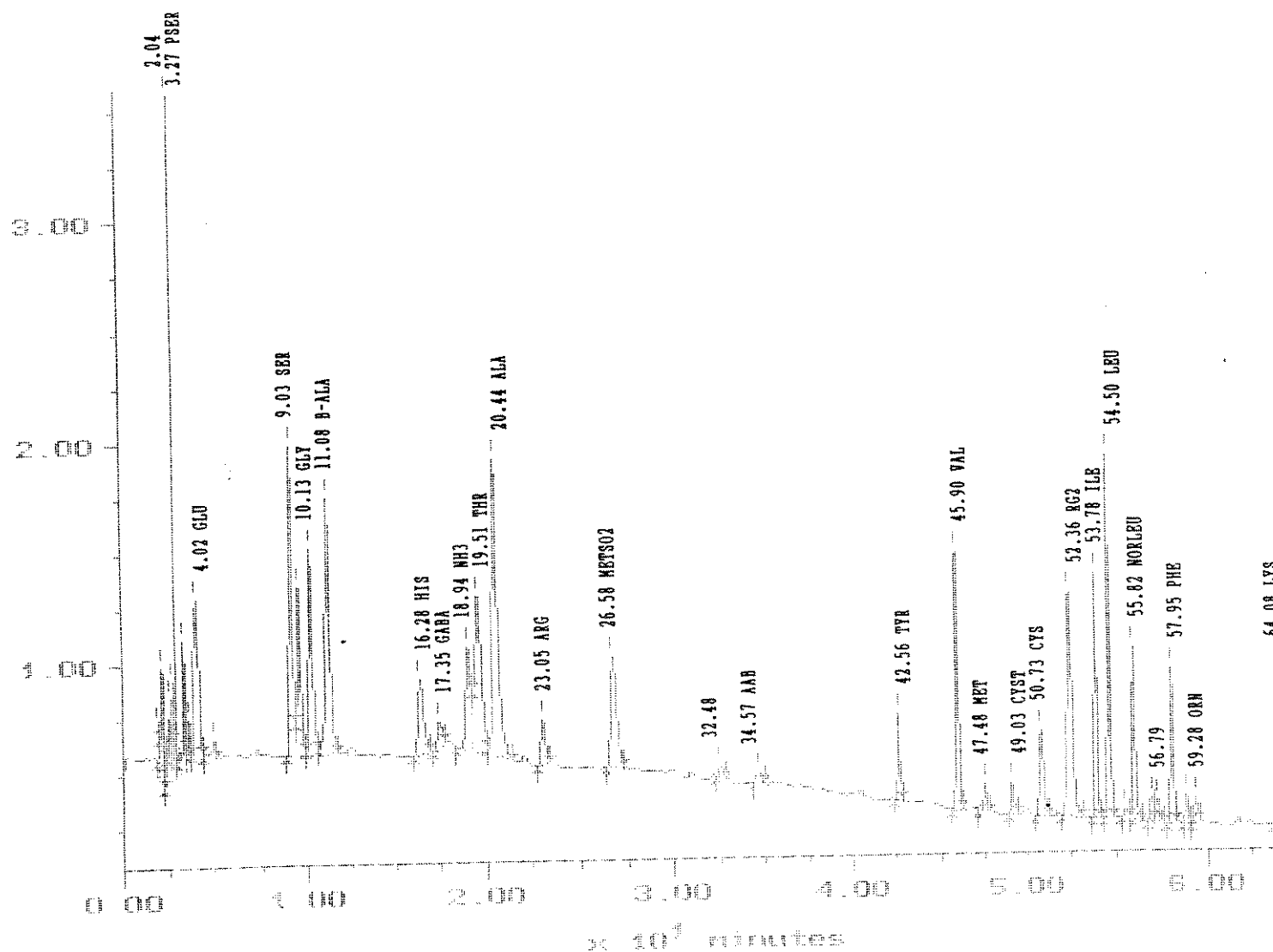


FIGURA 31: - Perfil de eluição da hemolinfa de *B. tenagophila* sadias, mostrando a resolução dos aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

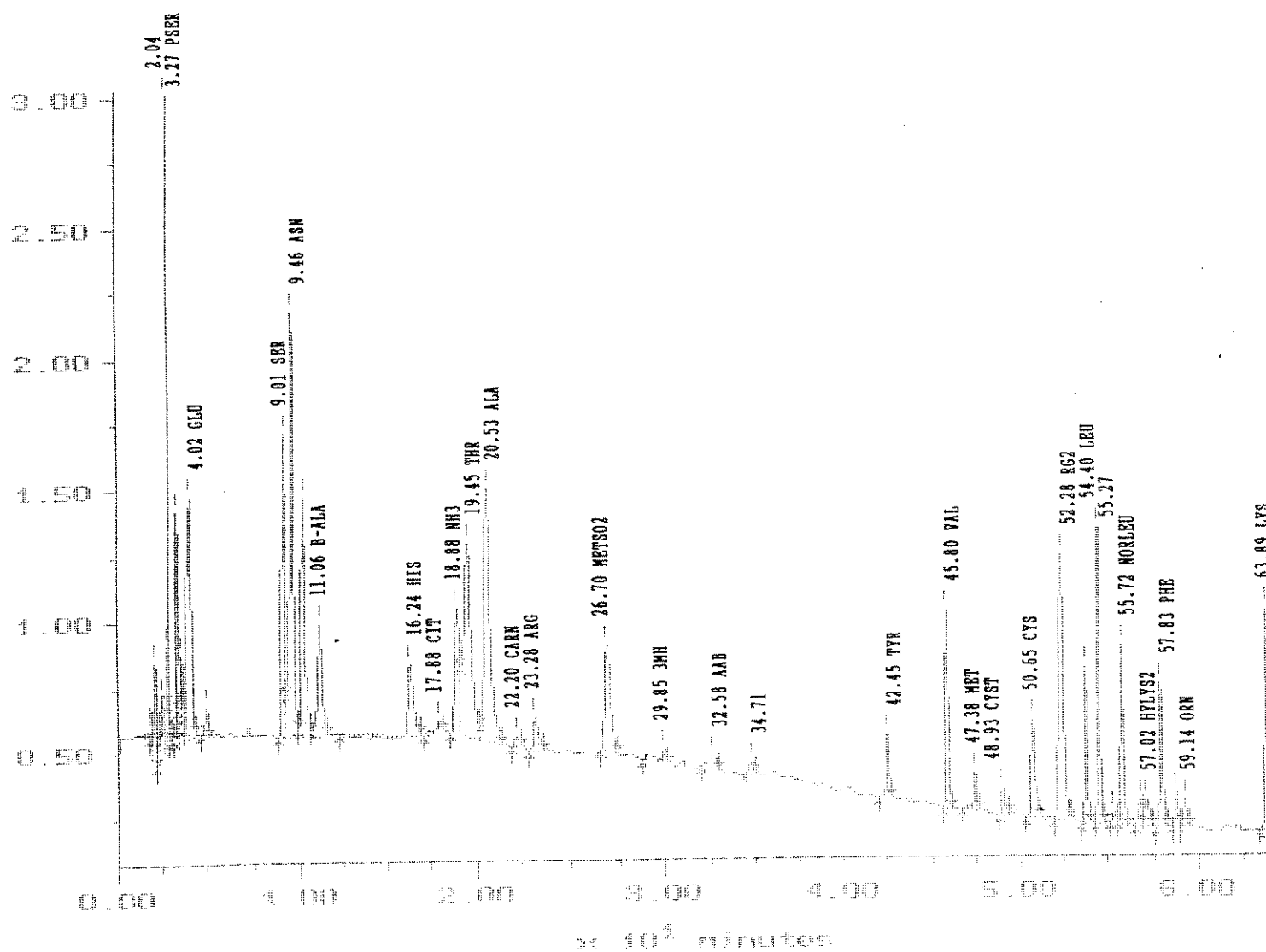


FIGURA 32: - Perfil de eluição da hemolinfa de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*, mostrando a resolução dos aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

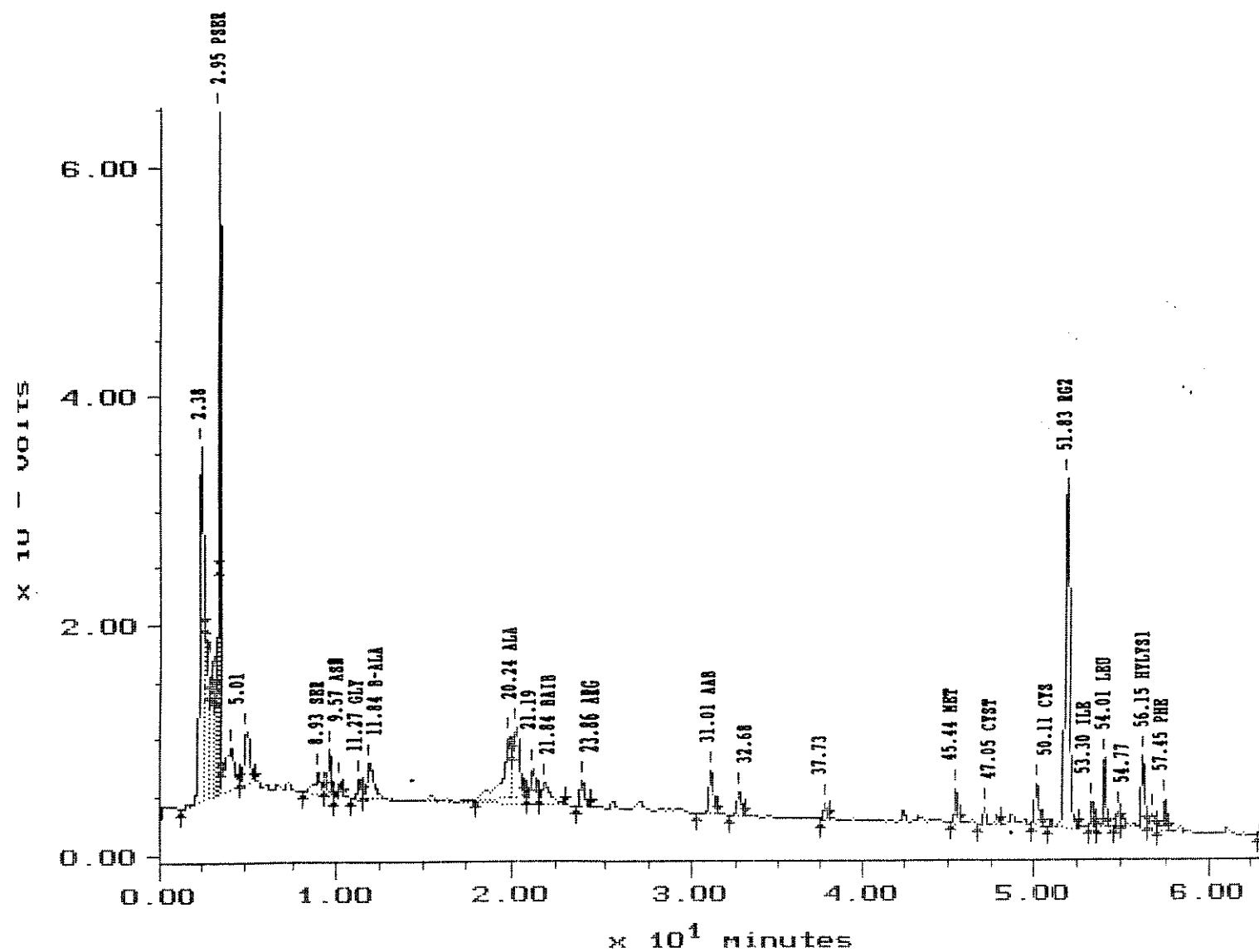


FIGURA 33: - Perfil de eluição da SCW de *B. glabrata* sadias, mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

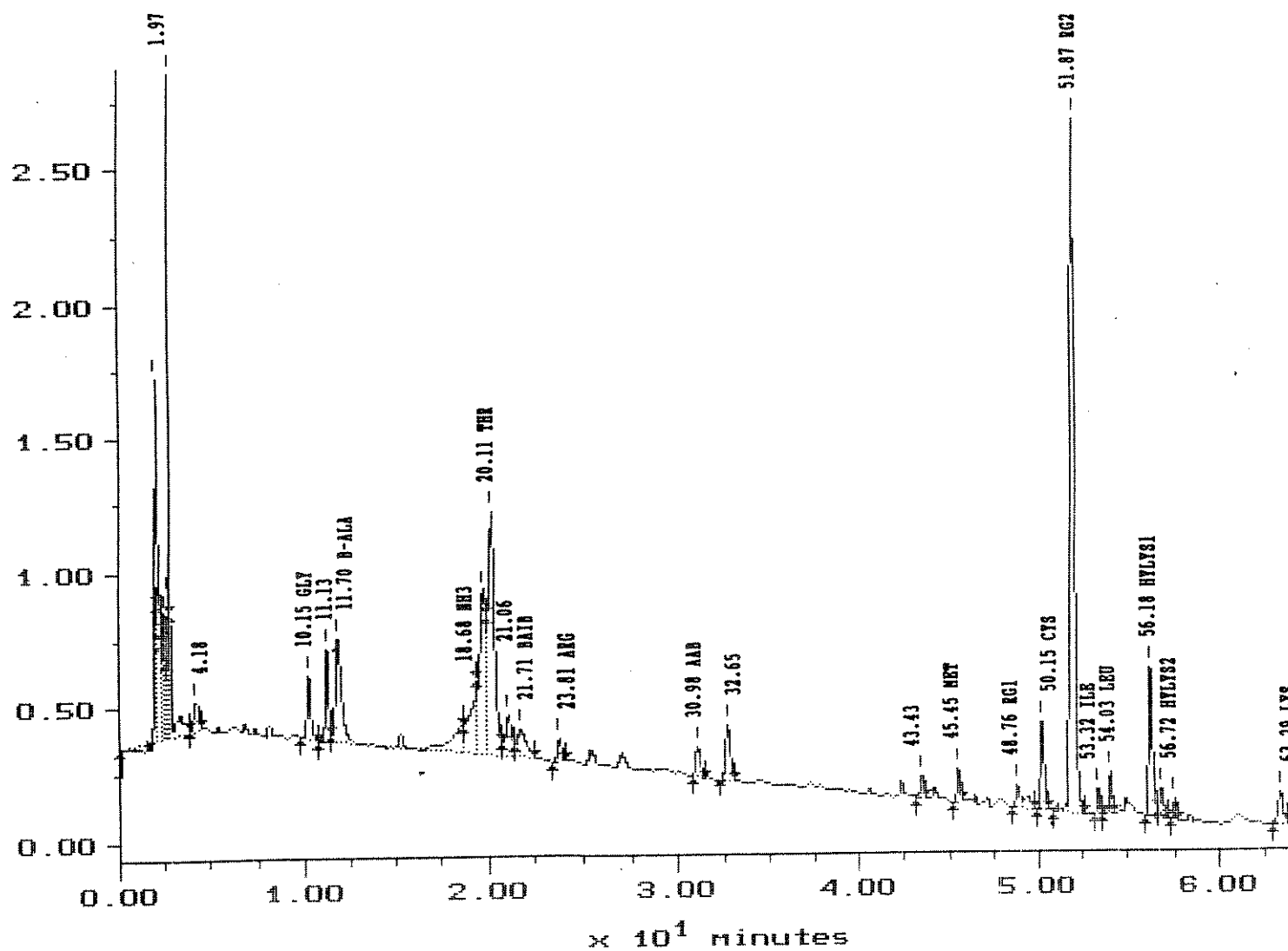


FIGURA 34: - Perfil de eluição da SCW de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*, mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

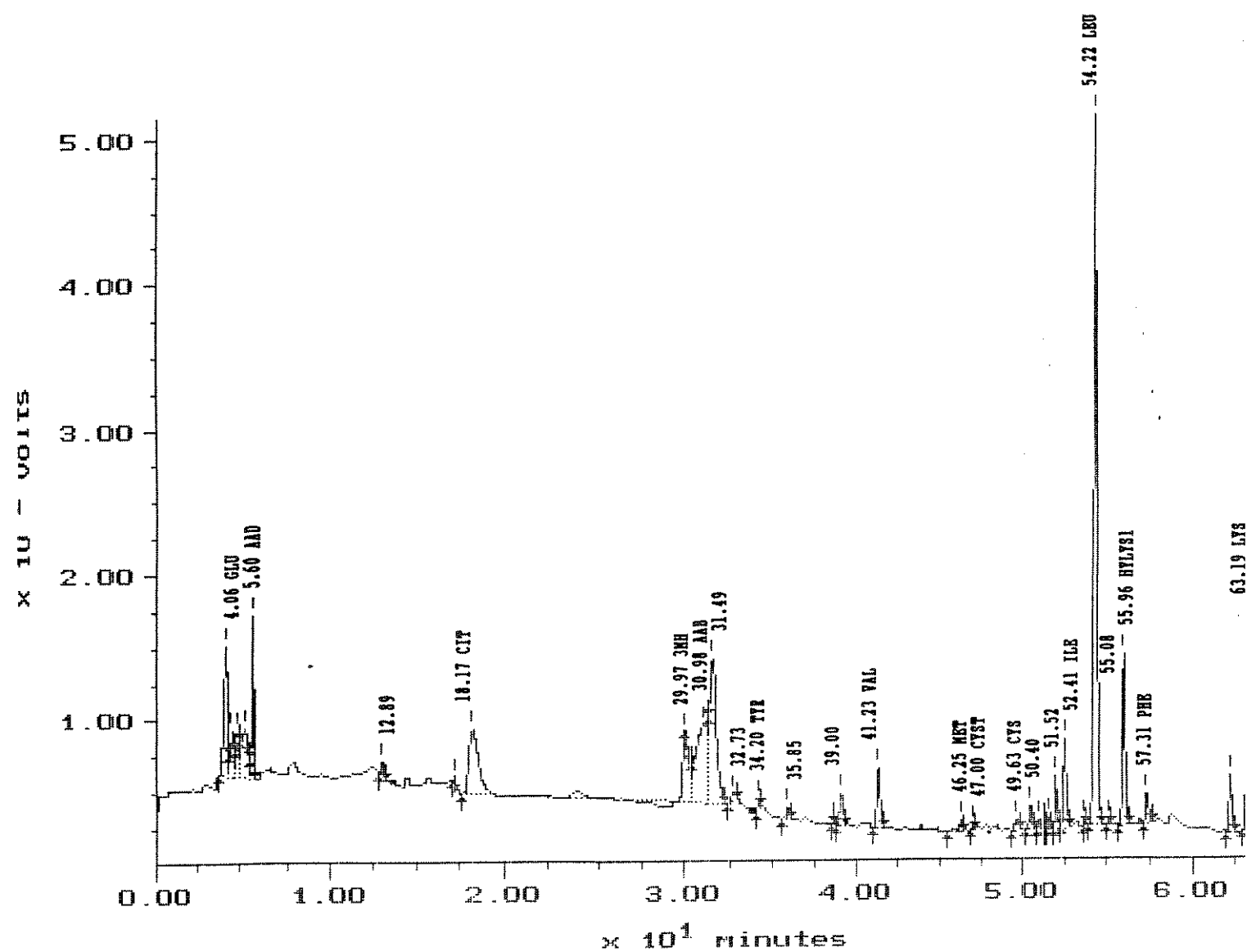


FIGURA 35: - Perfil de eluição da SCW de *B. tenagophila* sadias, mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

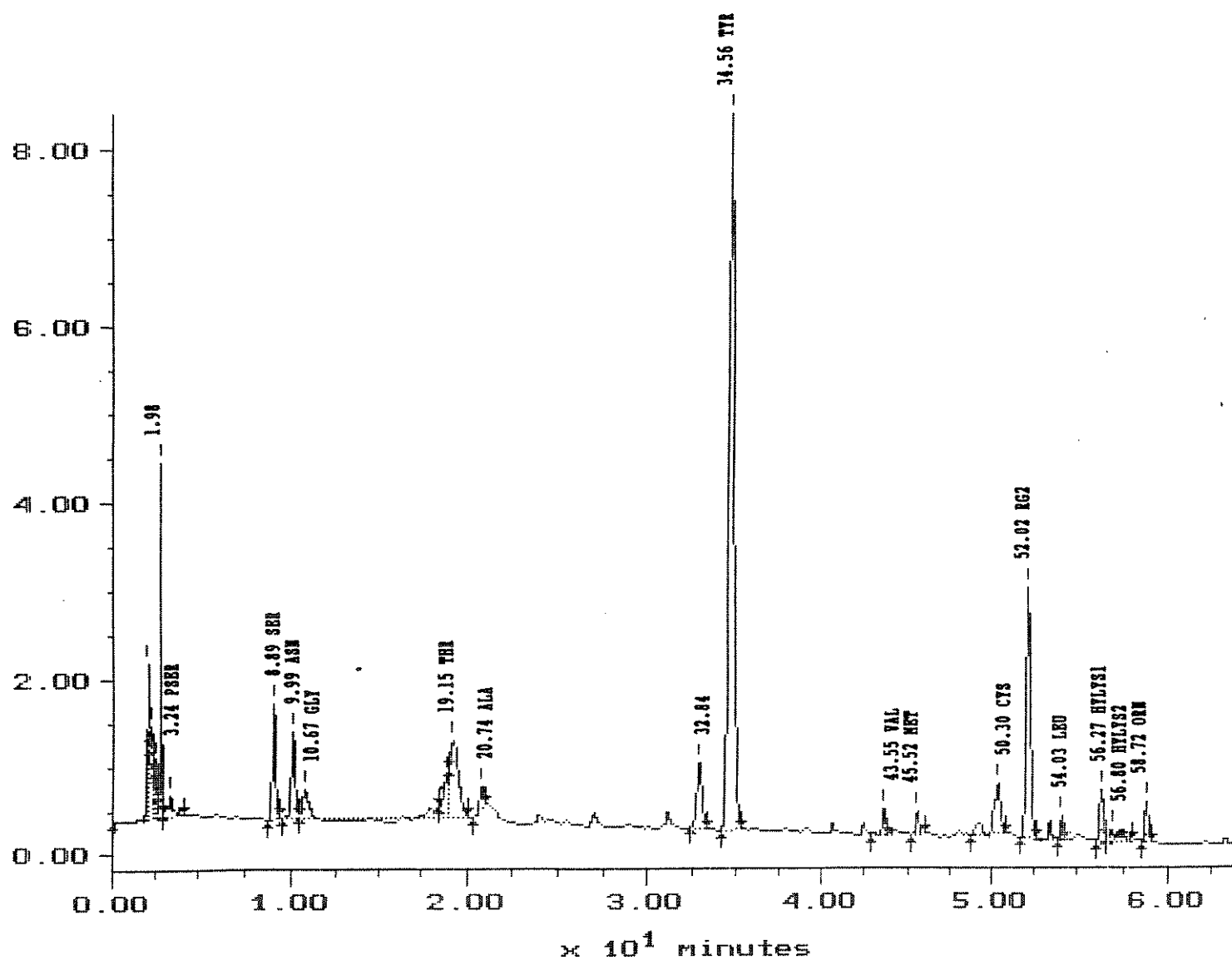


FIGURA 36: - Perfil de eluição da SCW de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*, mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

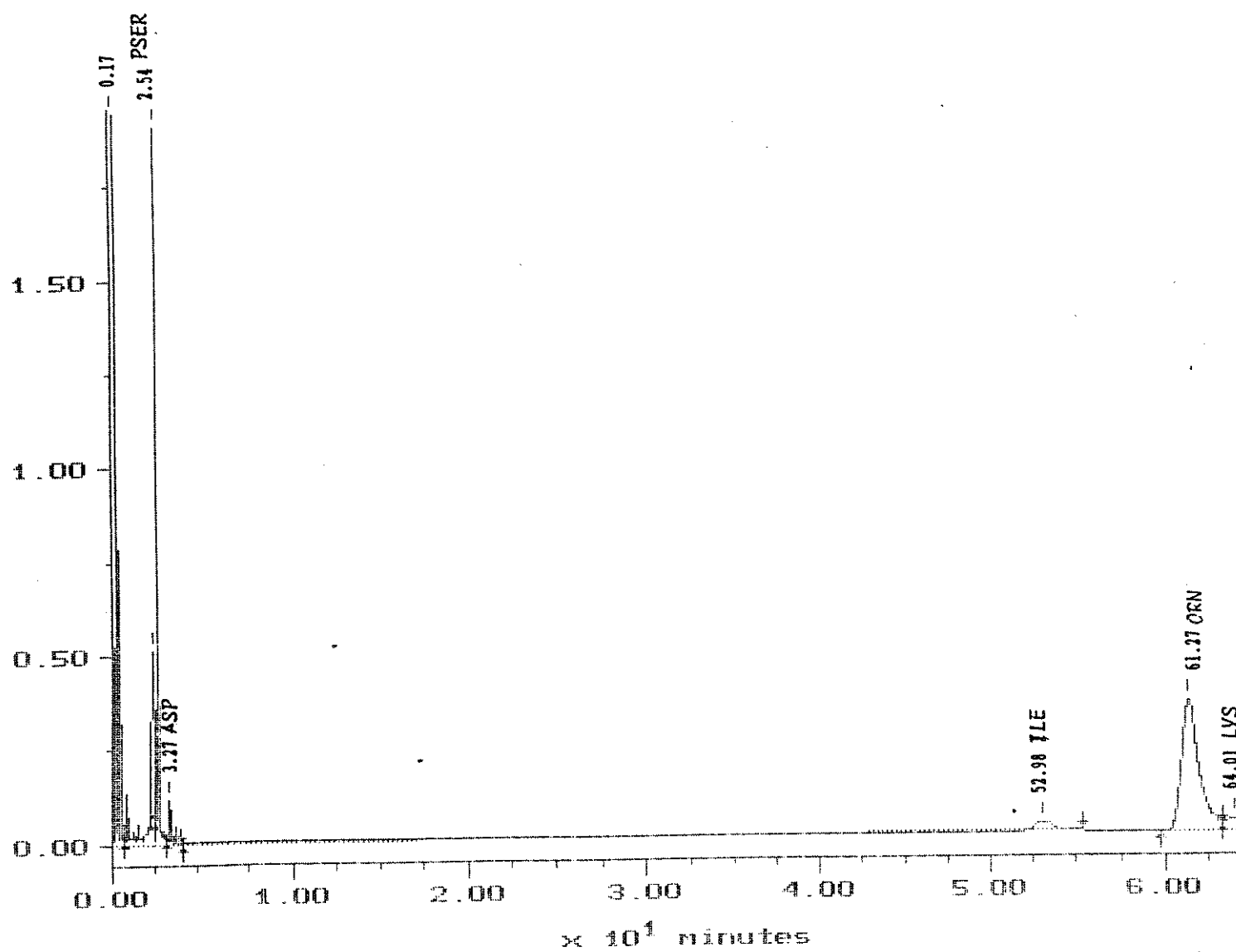


FIGURA 37: - Perfil de eluição do extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* sadias, mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

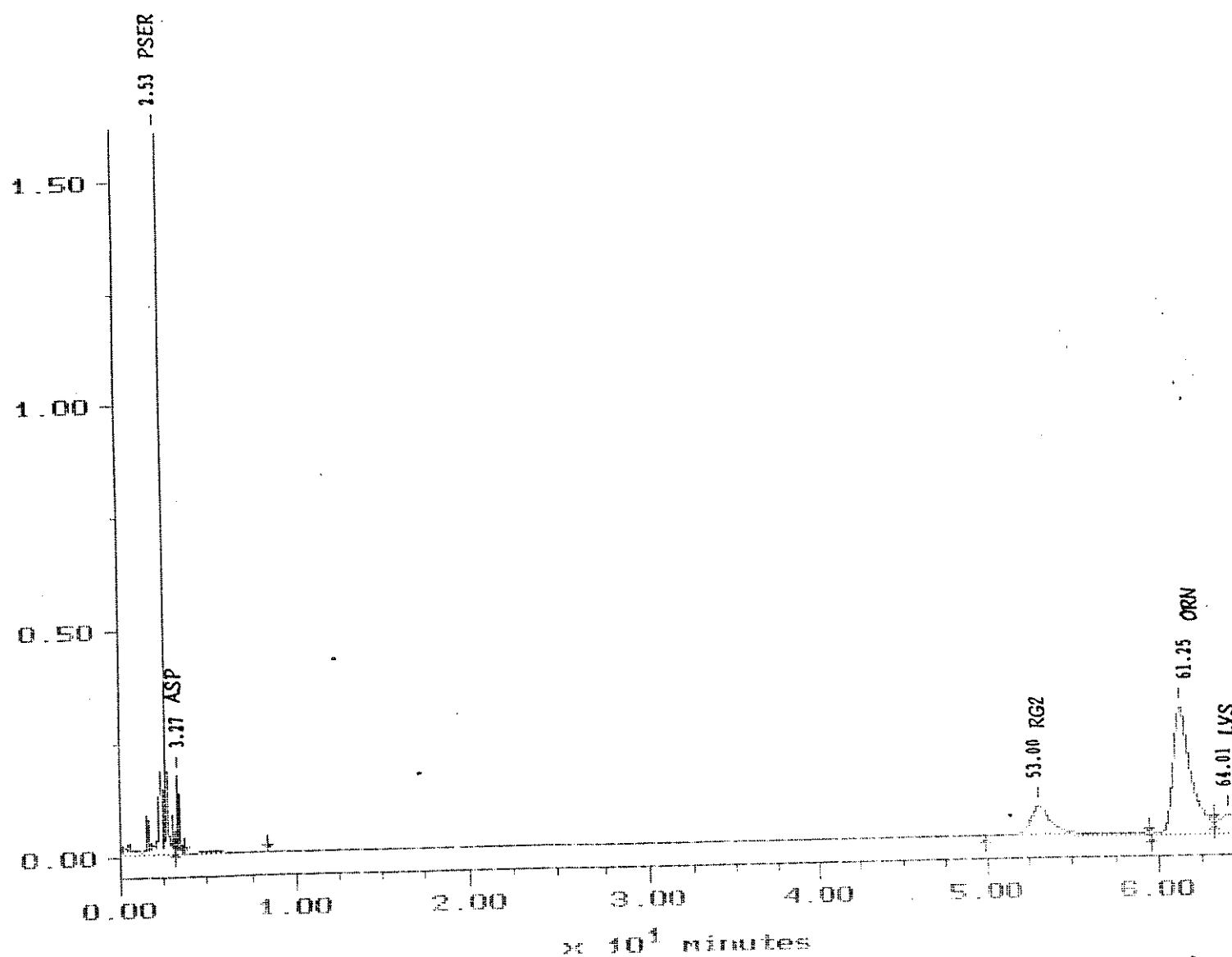


FIGURA 38: - Perfil de eluição do extrato da glândula do albúmen de *B. glabrata* infectadas por *S. mansoni*, mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

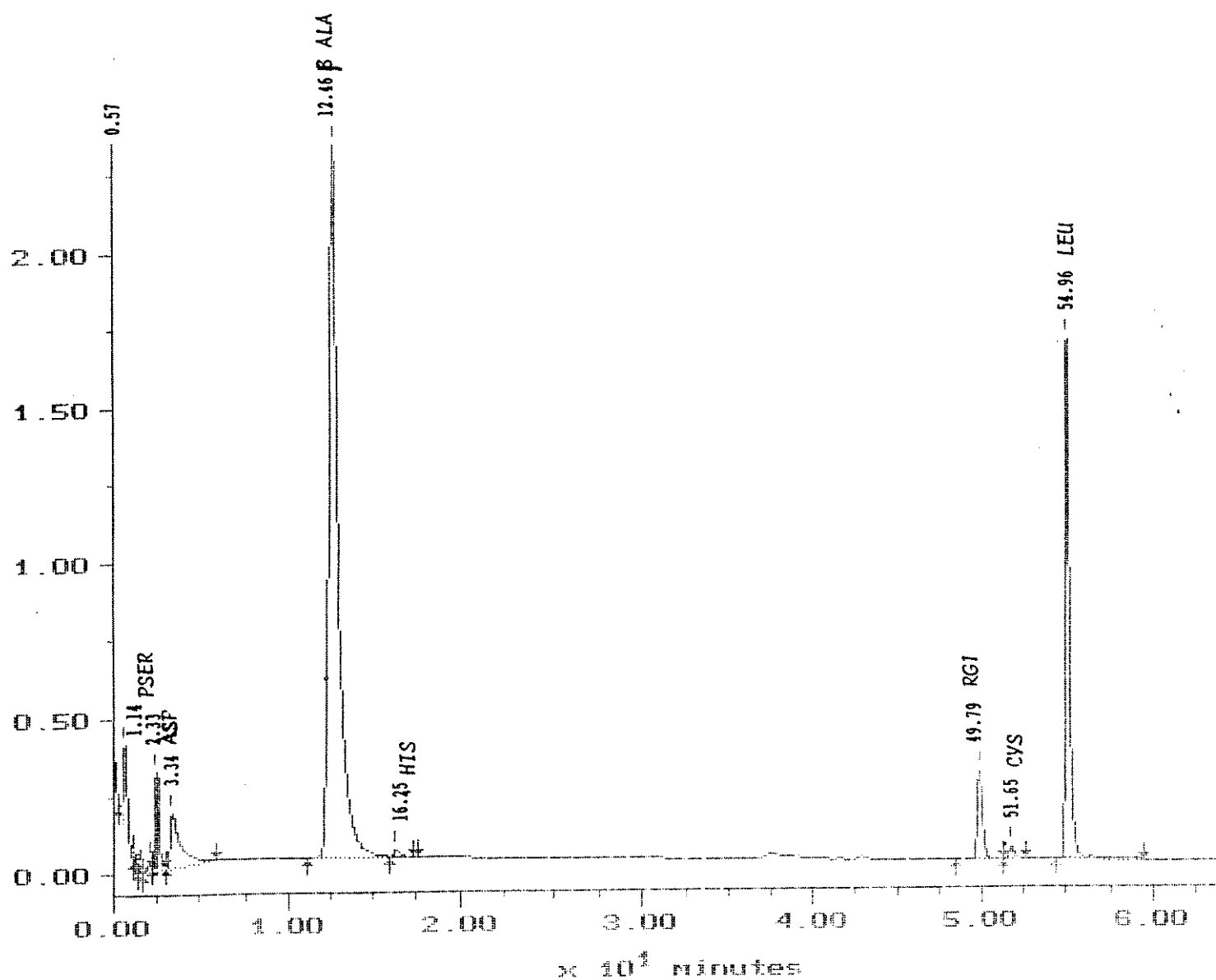


FIGURA 39: - Perfil de eluição do extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* sadias, mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.

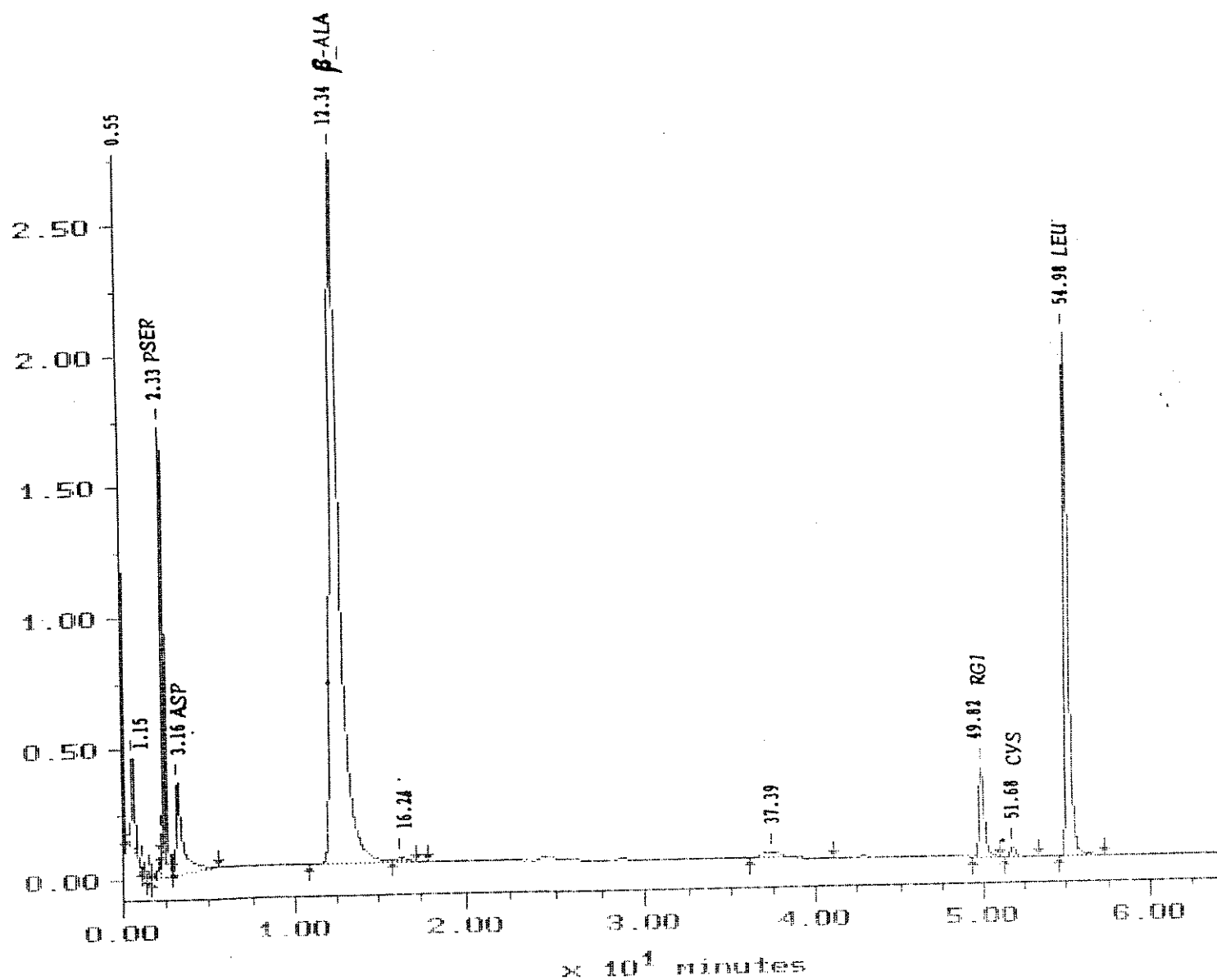


FIGURA 40: - Perfil de eluição do extrato da glândula do albúmen de *B. tenagophila* infectadas por *S. mansoni*, mostrando a resolução de aminoácidos PTC por cromatografia líquida.