

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Trézia Ieda Ballerini Bruno

“INFECÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* COM *Angiostrongylus*

costaricensis: DESENVOLVIMENTO LARVAL

E

RESPOSTA HEMOCITÁRIA”

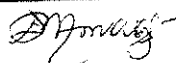
Tese apresentada ao Instituto de Biologia,

Este exemplar corresponde à redação final da Universidade Estadual de Campinas, SP,
da tese defendida pelo(a) candidato (a)

para a obtenção do título de Doutor em

Parasitologia.

e aprovada pela Comissão Julgadora.


Orientador: Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães

CAMPINAS, SP
2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

B836i

Bruno, Trézia Ieda Ballerini
Infecção de *Biomphalaria glabrata* com
Angiostrongylus costaricensis: desenvolvimento larval e
resposta hemocitária / Trézia Ieda Ballerini Bruno. --
Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Eliana Maria Zanotti-Magalhães.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Angiostrongylus costaricensis*. 2. *Biomphalaria
glabrata*. 3. Hemócitos. 4. Fases do ciclo de vida. I.
Zanotti-Magalhães, Eliana Maria. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Infection of *Biomphalaria glabrata* by *Angiostrongylus costaricensis*: larval development and hemocyte response.

Palavras-chave em inglês: *Angiostrongylus costaricensis*; *Biomphalaria glabrata*; Hemocytes; Life cycle stages.

Área de concentração: Helminologia.

Titulação: Doutora em Parasitologia.

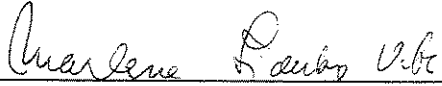
Banca examinadora: Eliana Maria Zanotti-Magalhães, Marlene Tiduko Ueta, Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo, Silmara Marques Allegretti, Thoshie Kawano.

Data da defesa: 29/11/2005.

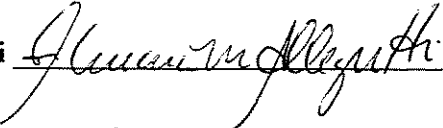
DATA DE DEFESA: 29/11/2005

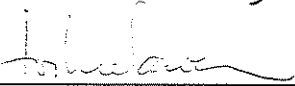
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães 

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta 

Profa. Dra. Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo 

Profa. Dr. Silmara Marques Allegretti 

Profa. Dra. Thoshie Kawano 

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo _____

Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes _____

Aos meus filhos:

João Pedro

e

João Paulo

Dedico.

Aos professores

Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães e Dr. Luiz Augusto Magalhães, pela amizade, pelo aprendizado, aos quais muito devo em minha formação acadêmica e profissional; pela dedicação e exemplos como professores e pesquisadores em Parasitologia.

Minha homenagem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os professores do Departamento de Parasitologia pelos conhecimentos oferecidos ao longo destes anos;

A profa. Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães pela orientação, amizade, compreensão, dedicação e conhecimentos oferecidos;

Ao prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães, pelo incentivo, amizade e sugestões recebidas no decorrer do trabalho;

Ao prof. Dr. Arício Xavier Linhares pela execução da análise estatística;

Aos professores: Dra. Silmara Marques Allegretti, Dr. João Tadeu Ribeiro Paes e Dra. Toshie Kawano pela colaboração na análise prévia e pelas sugestões oferecidas;

Aos técnicos do Departamento de Parasitologia: Ivo Gonçalves Pereira, João Batista Alves de Oliveira, Rubens Riscala Madi, Marina Bragatto Vasconcelos e Sr. Geraldo do Nascimento pela imensa ajuda no laboratório, manutenção dos moluscos, do parasita e dos camundongos;

Ao Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino de São João da Boa Vista – UNIFAE, pela impressão deste trabalho;

Ao meu esposo Paulo Sérgio Giannelli Bruno que muito me incentivou e me apoiou no decorrer destes anos;

A minha sogra Maria Tereza Giannelli Bruno e meu pai Antonio Ballerini por cuidar dos meus filhos, nos momentos de minha ausência.

ÍNDICE

I – Introdução	1
II – Objetivos	10
III – Planejamento experimental	11
IV – Material e Métodos	13
V – Resultados	18
VI – Discussão	45
VII – Conclusões	58
VIII – Referências bibliográficas	60
IX – Apêndice estatístico	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Números de larvas, médias e taxa de infecção por <i>A. costaricensis</i> observadas em <i>B. glabrata</i> infectada após 15, 22 e 29 dias de exposição a 120 larvas L ₁ .	19
Tabela 2. Número de larvas de <i>A. costaricensis</i> observado em cortes histológicos de <i>B. glabrata</i> infectadas com 120 larvas.	38
Tabela 3. Número médio e desvio padrão de hialinócitos na hemolinfa de <i>B. glabrata</i> infectada ou não com <i>A. costaricensis</i> , em diferentes dias pós infecção.	40
Tabela 4. Número médio e desvio padrão de granulócitos na hemolinfa de <i>B. glabrata</i> infectada ou não com <i>A. costaricensis</i> , em diferentes dias pós infecção.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico. Números médios de larvas de <i>A. costaricensis</i> recuperados em <i>B. glabrata</i> .	20
Figura 2 A: Foto. Larva L ₁ de <i>A. costaricensis</i> recuperada de <i>B. glabrata</i> com quatro dias de infecção.	23
Figura 2 B: Foto. Larva L ₂ de <i>A. costaricensis</i> recuperada de <i>B. glabrata</i> com 13 dias de infecção.	23
Figura 3 A: Foto. Larva L ₂ de <i>A. costaricensis</i> recuperada de <i>B. glabrata</i> com 17 dias de infecção.	24
Figura 3 B: Foto. Larva L ₃ de <i>A. costaricensis</i> recuperada de <i>B. glabrata</i> com 18 dias de infecção.	24
Figura 4 A: Foto. Larva L ₃ de <i>A. costaricensis</i> recuperada de <i>B. glabrata</i> com 24 dias de infecção.	25
Figura 4 B: Foto. Larva L ₃ de <i>A. costaricensis</i> recuperada de <i>B. glabrata</i> com 30 dias de infecção.	25
Figura 5 A: Foto. Larva L ₁ de <i>A. costaricensis</i> penetrando pela região cefalopodal de <i>B. glabrata</i> (dois dias de infecção).	28
Figura 5 B: Foto. Intensa reação hemocitária no tentáculo de <i>B. glabrata</i> sem a presença da larva de <i>A. costaricensis</i> (dois dias de infecção).	28
Figura 6 A: Foto. Larva L ₁ de <i>A. costaricensis</i> na região cefalopodal de <i>B. glabrata</i> (dois dias de infecção).	29
Figura 6 B: Foto. Larva L ₁ de <i>A. costaricensis</i> na região da vesícula seminal de <i>B. glabrata</i> (dois dias de infecção).	29
Figura 7 A: Foto. Larva L ₁ de <i>A. costaricensis</i> na região do ovotestis de <i>B. glabrata</i> , com intensa reação hemocitária (seis dias de infecção).	30
Figura 7 B: Foto. Mesma foto anterior com maior aumento.	30
Figura 8 A: Foto. Larva L ₁ de <i>A. costaricensis</i> na região da próstata de <i>B. glabrata</i> , com intensa reação hemocitária (nove dias de infecção).	31

Figura 8 B: Foto. Larva L ₁ de <i>A. costaricensis</i> na região intestinal de <i>B. glabrata</i> (nove dias de infecção).	31
Figura 9 A: Foto. Extremidade anterior da larva L ₁ de <i>A. costaricensis</i> localizada na região intestinal de <i>B. glabrata</i> (nove dias de infecção).	32
Figura 9 B: Foto. Larva L ₂ de <i>A. costaricensis</i> localizada na mufla de <i>B. glabrata</i> , mostrando cutícula residual e grânulos no momento da muda (13 dias de infecção).	32
Figura 10 A: Foto. Larva L ₂ de <i>A. costaricensis</i> na região cefalopodal de <i>B. glabrata</i> , acompanhada de intensa reação hemocitária (13 dias de infecção).	33
Figura 10 B: Foto. Larvas L ₂ de <i>A. costaricensis</i> na região cefalopodal de <i>B. glabrata</i> , envolvidas por reação hemocitária (13 dias de infecção).	33
Figura 11 A: Foto. Larva L ₃ de <i>A. costaricensis</i> na região pulmonar de <i>B. glabrata</i> , acompanhada de intensa reação hemocitária (27 dias de infecção).	34
Figura 11 B: Foto. Larva L ₃ de <i>A. costaricensis</i> na região intestinal de <i>B. glabrata</i> (30 dias de infecção).	34
Figura 12: Gráfico. Número total de larvas de <i>A. costaricensis</i> detectadas em diferentes tecidos e órgãos de <i>B. glabrata</i> expostos individualmente a 120 larvas L ₁ .	35
Figura 13: Gráficos. Número médio de larvas de <i>A. costaricensis</i> em <i>B. glabrata</i> em diferentes dias após infecção.	36
Figura 13: Gráficos. Número médio de larvas de <i>A. costaricensis</i> em <i>B. glabrata</i> em diferentes dias após infecção.	37
Figura 14: Gráfico. Número médio de hemócitos na hemolinfa de <i>B. glabrata</i> não infectados com <i>A. costaricensis</i> .	42
Figura 15: Gráfico. Número médio de hemócitos na hemolinfa de <i>B. glabrata</i> infectados com <i>A. costaricensis</i> .	43
Figura 16: Gráfico. Número médio de hemócitos na hemolinfa de <i>B. glabrata</i> infectados e não infectados com <i>A. costaricensis</i> .	44

Experimentalmente, *Biomphalaria glabrata* pode ser utilizada como hospedeiro intermediário do nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, responsável pela angiostrongilíase abdominal. Esta zoonose, descrita no Brasil principalmente nos estados sulinos, pode acometer acidentalmente o homem, sendo que a infecção ocorre através da ingestão de moluscos parasitados ou água e alimentos contaminados com larvas de 3º estágio, eliminadas no muco dos moluscos hospedeiros.

O objetivo deste trabalho foi estudar o desenvolvimento dos estágios larvais e o comportamento dos hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata* infectada.

Um total de 168 moluscos foi infectado com 120 larvas L₁ de *A. costaricensis* extraídas das fezes de camundongos *Swiss* albinos previamente infectados via oral sob tubagem esofágica com 6 larvas L₃. Larvas de *A. costaricensis* foram recuperadas de 45 moluscos *B. glabrata* após 15, 22 e 29 dias de exposição ao parasita, através do método de Baermann, utilizando tecidos digeridos dos moluscos com solução de pepsina e ácido clorídrico. Constatou-se maior recuperação de larvas de *A. costaricensis* dos moluscos aos 29 dias de infecção.

Para o estudo do desenvolvimento de *A. costaricensis*, 60 moluscos infectados foram destinados a recuperação larval durante 30 dias consecutivos. Foi observada a mudança larval de L₁ para L₂ aos 13 dias de infecção e L₂ para L₃ aos 18 dias de infecção.

Hemolinfa de 45 moluscos infectados e não infectados com *A. costaricensis* foi coletada para verificação da resposta hemocitária durante 4 semanas. Os hemócitos foram distinguidos em hialinócitos e granulócitos. Enquanto nos moluscos não infectados predominaram os hialinócitos, naqueles infectados os granulócitos foram mais evidentes, principalmente entre o 18º ao 25º dia de infecção.

Foi confirmada a ocorrência tanto da infecção percutânea como por via oral. Os locais mais parasitados foram: região cefalopodal, a preferida pelo nematódeo, seguida do intestino, rim e pulmão. Todas as larvas encontradas estavam viáveis e rodeadas por reação do tipo granulomatosa, independentes de sua localização.

Biomphalaria glabrata can be experimentally used as an intermediate host of the nematode *Angiostrongylus costaricensis*, responsible for abdominal angiostrongyliasis. This zoonosis, found in Brazil mainly in the southern states, can accidentally infect man through the ingestion of parasitized mollusks or contaminated water and food containing third-stage larvae, eliminated in the mucous secretion of the mollusks.

The objective of this work was to study the development of larval stages and the behavior of hemocytes in the hemolymph of infected *B. glabrata*.

A total of 168 mollusks were infected with 120 L₁ larvae of *A. costaricensis*, extracted from excrement of albino Swiss mice previously infected via the oral route by esophageal tube with 6 L₃ larvae. The *A. costaricensis* larvae had been recovered from 45 *B. glabrata* mollusks at 15, 22 and 29 days after exposure to the parasite, by means of the method of Baermann, using molluscan tissues digested with pepsin and hydrochloric acid solution. A larger recovery of *A. costaricensis* larvae from the mollusk was found at 29 days after infection.

For the study of the development of *A. costaricensis*, 60 infected mollusks were allocated for larval recovery during a period of 30 consecutive days. It was observed that there was a larval stage change, from L₁ to L₂, at the 13th day after infection and from L₂ to L₃ on the 18th day after infection.

The hemolymph of 45 mollusks, both infected and not infected with *A. costaricensis*, was collected for verification of the hemocyte response during 4 weeks. The hemocytes were differentiated into hyalinocytes and granulocytes. While in the non infected mollusks the hyalinocytes had predominated, in those infected granulocytes were more evident, mainly between the 18th and the 25th day after infection.

The occurrence of infection, both via percutaneous and via oral routes, was confirmed. The most parasitized sites were the cephalopodan mass, preferred by the nematodes, followed by the intestines, kidneys and lungs. All the larvae found were viable and surrounded by reaction of the granulomatous type, independent of their situation.

I - Introdução

Das muitas espécies de metastrongilídeos do gênero *Angiostrongylus*, duas foram encontradas habitando as artérias do homem: *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), agente etiológico da meningite eosinofílica, observado no sudoeste da Ásia e em algumas ilhas do Pacífico (Jindrak *et al.*, 1970; Alicata, 1991); e *Angiostrongylus costaricensis*, de conhecimento relativamente recente, descrito inicialmente na Costa Rica (Morera & Cespedes, 1971a) e causador da angiostrongilíase abdominal.

A angiostrongilíase abdominal é considerada uma zoonose, que tem como hospedeiros definitivos naturais roedores silvestres e como hospedeiros intermediários, algumas espécies de moluscos terrestres que são naturalmente infectados. A distribuição é própria do Continente Americano, estendendo-se desde a Costa Rica até o norte da Argentina. Nos Estados Unidos (Ubelaker & Hall, 1979) e na África (Baird *et al.*, 1987) o parasita também já foi relatado.

Esta parasitose pode ocasionalmente acometer o homem, sendo que a infecção humana ocorre através da ingestão de pequenos moluscos parasitados, ou mesmo alimento e água contaminados com larvas de terceiro estágio, eliminadas no muco dos moluscos hospedeiros.

Casos humanos no Brasil foram descritos nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e principalmente no Rio Grande do Sul (Zillioto *et al.*, 1975; Agostini *et al.*, 1983; Ayala, 1987). Foram também relatados casos no Distrito Federal (Barbosa *et al.*, 1980; Magalhães *et al.*, 1982), em Minas Gerais (Rocha *et al.*, 1991) e no Espírito Santo (Pena *et al.*, 1995).

As manifestações clínicas são abdominais, simulando geralmente uma apendicite, com quadro muitas vezes agudo de evolução rápida. A maioria das lesões ocorre no íleo, no apêndice e no ceco. O quadro patológico é caracterizado pela exuberante eosinofilia tecidual, edema da parede do intestino, granulomas em torno dos ovos do nematódeo, alguns com desenvolvimento larval, consistindo de macrófagos, poucos linfócitos e abundantes eosinófilos (Céspedes *et al.*, 1967; Graeff - Teixeira *et al.*, 1991a)

Em decorrência da infecção do homem, mesmo que de forma acidental, nos últimos anos a angiostrongilíase abdominal tem merecido a atenção de alguns pesquisadores. Ela foi observada pela primeira vez por Céspedes *et al.* (1967), que a descreveram como granuloma entérico com intensa eosinofilia tissular, trombose arterial ou venosa em vasos pequenos e médios. Esta trombose desencadeava infartos intestinais que ocasionavam os quadros clínicos mais graves e agudos, com peritonite e morte. A intensa reação inflamatória retém os ovos do parasita na parede intestinal e impede a eliminação de larvas (L₁) nas fezes (Morera & Céspedes, 1971b).

Segundo Graeff-Teixeira *et al.* (1991b), o quadro patológico dessa parasitose é caracterizado pelo comprometimento vascular, visto que os vermes adultos habitando as artérias causam trombose, necrose tecidual, granulomas periovulares e alta eosinofilia, devido a eliminação de antígenos das fases ovular, larval e adulta do parasita.

Hospedeiros definitivos naturais incluem vários roedores: *Sigmondon hispidus* (Say & Ord, 1825), *Rattus rattus* (Linné, 1758), *Zygodontomys microtinus* (Lund, 1884), *Liomys adspersus* (Peters, 1874), *Oryzomys fulvescens* (Musser, 1989) (Tesh *et al.*, 1973); *O. caliginosus* (Tomes, 1860) (Makek, 1981); *O. nigripes* (Olfers, 1818), *O. ratticeps* (Hensel, 1837) (Graeff-Teixeira *et al.*, 1990); *Proechimys* sp (Moojen, 1948) (Santos, 1985) e outros mamíferos tais como: *Saguinus mystax* (Spix, 1823) (Sly *et al.*, 1982); *Nasua narica bullata*

(Linné,1766) (Monge *et al.*,1978). Recentemente foi relatado que *Canis familiaris* (Linné,1758) pode ser hospedeiro reservatório de *A. costaricensis* (Rodriguez *et al.*, 2002). No Brasil, *O. nigripes* é o responsável pela manutenção do ciclo na natureza (Graeff-Teixeira, *et al.*, 1990).

Em geral, nos roedores silvestres o verme habita as artérias da região ileocecal, mais precisamente os ramos das artérias do mesentério (Morera, 1973). Ali deposita seus ovos que são arrastados pelo sangue para a mucosa intestinal, onde embrionam e eclodem. As larvas do primeiro estágio atravessam a mucosa e caem na luz do intestino, sendo eliminadas para o exterior com as fezes do roedor. Estas larvas são ingeridas por moluscos suscetíveis, onde sofrem duas mudas, dando origem às larvas infectantes de terceiro estágio no tecido fibromuscular e são eliminadas com o muco dos moluscos infectados. No cão, Rodriguez *et al.* (2002) não verificaram manifestações clínicas ou lesões significantes nos intestinos, indicando que esse animal pode ser hospedeiro reservatório do *A. costaricensis*.

São considerados como os hospedeiros intermediários principais os moluscos veronicelídeos, sendo *Sarasinula plebleia* (Fisher,1868) a espécie naturalmente infectada encontrada na Costa Rica (Morera & Ash, 1971).

De acordo com os estudos de Graeff-Teixeira *et al.* (1989; 1990), no Brasil foram encontradas as seguintes espécies naturalmente infectadas no Rio Grande do Sul: *Phyllocaulis variegatus* (Semper,1885), *Lymax flavus* (Linné,1758), *L. maximus* (Linné,1758), *Bradybaena similaris* (Férussac,1822) e *Belocaulus angustipes* (Heynemann,1885). Foi também verificado por Thiengo *et al.* (1993) a infecção natural de *P. soleiformis* (Orbigny,1835) e *Helix aspersa* (Mueller,1774). Outros moluscos terrestres são capazes de se infectar e eliminar larvas L₃ em infecções experimentais, tais como: *Veronicella occidentalis* (Gambetta,1923) (Malek, 1981), *Sarasinula marginata*

(Semper,1885) (Lima *et al.*, 1992a), *P. boraceiensis* (Thomé,1972) (Bonetti & Graeff-Teixeira, 1998) e *Megalobulimus* sp (Morretes,1952) (Graeff-Teixeira *et al.*, 1989). Os planorbídeos de água doce, *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny,1835), *B. straminea* (Dunker,1848) e *B. glabrata* (Say,1818) sob condições laboratoriais, mostraram-se susceptíveis à infecção, sendo os dois últimos considerados os melhores hospedeiros (Lima *et al.*, 1992b).

Morera & Céspedes (1971b) fizeram as primeiras observações sobre o ciclo do *A. costaricensis* no hospedeiro invertebrado. Esses autores relataram que os moluscos ingerem larvas L₁, eliminadas com as fezes dos hospedeiros vertebrados, e após a ingestão, estas larvas sofrem duas mudas: L₂ e L₃. As larvas L₃ constituem a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. No interior do molusco estas larvas movimentam-se pouco, mas, quando liberadas, tornam-se ativas e aptas a infectarem o hospedeiro vertebrado.

Thiengo (1996) relatou pela primeira vez a infecção percutânea de *Sarasinula marginata* por larvas L₁ de *A. costaricensis*.

Quanto à suscetibilidade dos moluscos, Gerichter (1948) relatou a aparente falta de especificidade dos metastrongilídeos em relação aos seus hospedeiros intermediários. De acordo com este autor, muitas espécies de moluscos podem servir como hospedeiros intermediários e quando mantidas sob as mesmas condições, a intensidade da infecção e o tempo de desenvolvimento das larvas mostram-se distintos.

Infecções experimentais (Thiengo, 1995) de moluscos com *A. costaricensis*, mostraram que *B. glabrata* é suscetível, possuindo vantagens quanto a manutenção e reprodução em laboratório. Porém, de acordo com a autora, esta espécie apresentou grande índice de mortalidade após infecção, ao contrário do que foi observado em outras espécies

tais como : *Sarasinula marginata* (Semper,1885), *Bradybaena similaris* (Férussac,1821) e *Leptinaria unilamellata* (Orbigny,1835).

O mecanismo pelo qual o sistema de defesa dos moluscos elimina materiais estranhos ou assegura sua integridade contra agentes externos, tem sido alvo de muitos estudos e vem recebendo maior atenção dos pesquisadores nos últimos anos. Segundo van Der Knaap & Loker (1990) o sistema usado pelos moluscos para combater organismos invasores é chamado de Sistema de Defesa Interno, termo mais apropriado que Sistema Imune, devido à falta de linfócitos e imunoglobulinas. Apesar da ausência destes elementos, o sistema de defesa interno consegue discriminar entre o que é próprio e o que não é próprio. Ele compreende tanto elementos celulares como humorais que cooperam, no processo de discriminação e na defesa.

A principal linha de defesa dos moluscos contra materiais estranhos é a celular. As células da hemolinfa, denominadas de amebócitos ou hemócitos, reconhecem e reagem à invasão de materiais estranhos, tanto pela fagocitose como pela encapsulação (Cheng & Auld, 1977). Estas células são semelhantes aos macrófagos dos mamíferos, circulando livremente e movimentando-se na hemolinfa pelo sistema vascular aberto e, conseqüentemente, para os tecidos dos moluscos (Loker & Bayne, 1986; Sminia & van Der Knaap,1987; Lie *et al.*,1987; van Der Knaap & Loker, 1990).

Cheng & Garrabrant, (1977); Lie *et al.*, (1987); Ottavian & Franchini, (1988) descreveram dois tipos de hemócitos circulantes na hemolinfa dos moluscos: os granulócitos e os hialinócitos. Os granulócitos medem cerca de 7 a 8µm de diâmetro e correspondem a praticamente 90% do total de células encontradas na hemolinfa. Exercem a função fagocitária de agentes estranhos e, para essa finalidade, possuem pequenos pseudópodos.

Os hialinócitos correspondem a 10% dos hemócitos restantes encontrados na hemolinfa, apresentando-se menores que os granulócitos, variando de 4 a 8µm de diâmetro, porém não emitem pseudópodos quando em contato com superfície de vidro. Seu papel no sistema de defesa dos moluscos ainda é desconhecido.

Além da função fagocitária, os hemócitos fazem transporte de cálcio, desempenhando papel semelhante ao fibrinogênio, em casos de ferimentos dos moluscos impedindo, assim, extravasamento de hemolinfa (Wagge, 1955; Ratcliffe, 1985).

Vários autores consideram essas duas células, granulócitos e hialinócitos, como células distintas, porém, para alguns elas representam diferentes estágios de desenvolvimento em uma mesma linhagem de célula (Sminia, 1972; Santana *et al.*, 1985; Lie *et al.*, 1987; Sminia & van Der Knaap, 1987; Seta *et al.*, 1996).

Pan (1996) sugeriu que hialinócitos de *B. glabrata* podem se transformar em granulócitos sob estimulação. Segundo o mesmo autor, os granulócitos capazes da emissão de pseudópodes ficam livres, vagando pelo organismo do molusco, enquanto os hialinócitos estão fixados nas fibras colagenosas dos tecidos.

Muitos pesquisadores têm reconhecido a existência de subpopulações de hemócitos, dependendo da idade de sua célula (Dikkeboom *et al.*, 1984), do seu conteúdo enzimático (Granath & Yoshino, 1983) ou de seus determinantes de superfície (Yoshino & Granath, 1985).

Segundo Matricón-Gondran & Letocart (1999), a ativação de hemócitos é acompanhada pela mobilização de fibras protéicas da célula, resultando na formação de pseudópodes e na fagocitose. O reconhecimento de materiais estranhos pelo molusco estimularia a mobilização de fibras proteicas no processo de polimerização dos filamentos tubulares helicoidais dos hemócitos. Esta ativação pode resultar na interação entre resíduos

sacarídicos e lectinas, os quais são essenciais no reconhecimento do “non-self” em invertebrados. Observações “in vivo” em *B. glabrata*, mostraram que esses filamentos helicoidais formam uma rede intrínseca, nos quais partículas estranhas são presas, lembrando um processo de coagulação.

Os hemócitos no molusco são produzidos em um órgão chamado “Amebocytes Producing Organ” - APO - Órgão Produtor de Amebócitos (Lie *et al.*, 1975; Sima & Vetvicka, 1990). Este órgão está localizado na região renopericárdica dos planorbídeos, entre células epiteliais da região posterior do manto e da camada epitelial do pericárdio, contendo tanto células jovens, imaturas, chamadas ameboblastos, quanto hemócitos maduros.

O APO é semelhante a um órgão linfóide de vertebrado no qual células de defesa são formadas. Não está bem certo se a produção de hemócitos nos moluscos é restrita apenas ao APO. Sminia *et al.* (1974) concluíram que hemócitos podem ser formados também no tecido conjuntivo, tanto como no APO, conforme observado em *Lymnaea truncatula* (Mueller, 1774) infectada com *Fasciola hepática* (Linné, 1757) e em *Marisa cornuarietis* (Gray, 1824) e *Lymnaea palustris* (Mueller, 1774), infectada pelo *Angiostrongylus cantonensis*.

Em moluscos não estimulados pela infecção, esse órgão é plano, contendo somente poucos grupos de células ou nódulos. Quando o molusco é desafiado pela infecção, esse órgão exibe hiperplasia conseqüente à multiplicação celular. Esta resposta é específica e mantida pela segunda ou terceira exposição ao mesmo agente, revelando memória imunológica (Lie *et al.*, 1975).

Machado (1990) verificou resistência à infecção em *Biomphalaria tenagophila* submetida à inoculação de hemolinfa proveniente de moluscos infectados com *S. mansoni*

(Sambon, 1907). Quando expostas novamente ao mesmo parasita, evidenciaram a memória imunológica.

Os hemócitos produzem substâncias que são encontradas na hemolinfa, e a produção de tais substâncias está na dependência da presença de agentes estranhos, como, por exemplo, parasitos (Sminia & van Der Knaap, 1987). De acordo com vários autores (Renwarantz & Cheng, 1957; Kock & Nielsen, 1984; Bride *et al.*, 1986) lectinas, enzimas, fatores inibidores de proteases, fibrolectinas e até mesmo ativadores de complemento dos vertebrados parecem contribuir e participar nos mecanismos de defesa dos moluscos.

As lectinas são proteínas sintetizadas pelos hemócitos e liberadas no soro. Unem-se especificamente a carboidratos atuando como opsoninas sobre material estranho (van der Knaap *et al.*, 1981; Richards & Renwranztz, 1991).

Por meio do mecanismo de fagocitose, os moluscos são capazes de encapsular parasitos, sendo que esta atividade não envolve a participação de hialinócitos (Lie *et al.*, 1987). A eficiência do sistema de defesa dos moluscos é mantida pelo processo de fagocitose e fatores humorais, juntamente com a concha e o muco, evitando assim a entrada de agentes estranhos (Ratcliffe, 1985; Bayne, 1990). Peróxido de hidrogênio, oxigênio simples e radicais hidroxila são produzidos pelas células fagocitárias, formando um sistema altamente tóxico que atua na destruição de microorganismos (Sminia & van der Knaap, 1987; Dikkeboom *et al.*, 1987 e 1988).

Nos moluscos a reação de encapsulação do esporocisto de *S. mansoni* pode ser considerada semelhante à reação granulomatosa em torno do ovo de *S. mansoni*, por isolar o parasita, impedindo a ocorrência de danos aos tecidos do hospedeiro. Segundo Harris & Cheng (1975a), esta reação teria início devido a produtos tóxicos provenientes do parasito.

De acordo com os mesmos autores, a encapsulação de *A. cantonensis* por *B. glabrata* ocorre em duas fases: uma fase inicial, por volta de 24 horas após infecção e que se estende até 6 dias, que corresponde ao envolvimento, infiltração e agregação de células da hemolinfa ao redor do 1º estágio larval; e a 2ª fase, que envolve a conversão de pequenos agregados celulares em agregados compactos, formando nódulos fibrosos. Estes nódulos contêm células alongadas, que resultam em uma cápsula com aparência fibrosa. Tripp (1961) verificou que as cápsulas que incorporavam partículas estranhas em *B. glabrata* consistiam em hemócitos e células, designadas por ele como fibroblastos.

O encapsulamento de parasitos pode, na realidade, resultar na sua destruição, devido o alto nível de enzimas atuantes nas cápsulas, ou não exercer nenhum efeito sobre o invasor. O tipo de reação difere com a espécie do parasito e do hospedeiro. Em *Angiostrongylus costaricensis*, por exemplo, Sima & Vetvicka (1990) constataram esse fato, quando conseguiram recuperar larvas viáveis em *B. glabrata* até um ano após a infecção inicial. Da mesma forma, Richards & Merritt (1967) verificaram em *B. glabrata* infectada com grande número de larvas de *A. cantonensis* que estas larvas podiam sobreviver até 12 meses dentro do molusco, envolvidas por reações teciduais que consistiam de hemócitos e fibroblastos.

Neste trabalho, nos propusemos estudar a infecção do *Angiostrongylus costaricensis* em *Biomphalaria glabrata*, através da verificação do desenvolvimento dos estágios larvais e da resposta hemocitária frente à infecção pelo nematódeo.

II - Objetivos

No presente trabalho tivemos como objetivo estudar em *Biomphalaria glabrata* o comportamento de *Angiostrongylus costaricensis*, observando: a suscetibilidade do molusco ao *A. costaricensis*, o desenvolvimento das larvas nos moluscos infectados, o número de hemócitos na hemolinfa, as reações hemocitárias decorrentes da presença de larvas no molusco, o número de larvas de *A. costaricensis* e sua localização nos diferentes órgãos do molusco.

III – Planejamento experimental

Os planorbídeos utilizados na pesquisa foram *Biomphalaria glabrata*, melânicas, originadas de populações coletadas em Belo Horizonte (MG). Os moluscos foram mantidos em tanques com água decolorada e alimentação diária consistindo de folhas frescas de alface fornecidas *ad libitum*.

A linhagem de *Angiostrongylus costaricensis*, proveniente de Crissiumal (RS), cujo ciclo é mantido em moluscos *B. glabrata* e camundongos *Swiss* albinos no Departamento de Parasitologia, foi cedida pela Profa. Dra. Silvana Thiengo do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro.

Foram formados dois grupos experimentais, chamados de A e B.

No grupo A foram utilizados 168 moluscos submetidos à infecção com *A. costaricensis*. O grupo B foi constituído por 45 moluscos não submetidos à infecção, destinados à contagem de hemócitos em períodos pré-estabelecidos.

O grupo A foi subdividido em grupos menores, conforme descrito abaixo:

- A1 - 45 moluscos destinados à recuperação de larvas L₃;
- A2 - 60 moluscos destinados à recuperação de larvas durante 30 dias consecutivos;
- A3 - 45 moluscos destinados à contagem de hemócitos em períodos pré-estabelecidos;
- A4 - 18 moluscos destinados a cortes histológicos para verificação de reação hemocitária intramolusco em períodos pré-estabelecidos.

Os seguintes parâmetros foram observados:

- A) Suscetibilidade de *B. glabrata* exposta ao *A. costaricensis*;
- B) Desenvolvimento das larvas nos moluscos;
- C) Número de hemócitos na hemolinfa dos moluscos;
- D) Reações hemocitárias decorrentes da presença de larvas no molusco;
- E) Número de larvas de *A. costaricensis* no molusco.

IV – Material e métodos

A) Manutenção dos moluscos em laboratório.

Os exemplares de *B. glabrata* utilizados nos experimentos foram variante melânica. Foram criados no moluscário do Departamento de Parasitologia da UNICAMP sendo originados de exemplares provenientes de Belo Horizonte (MG).

Os moluscos, selecionados aleatoriamente para os experimentos, mediam de 7 a 8 mm de diâmetro e foram mantidos em aquários com água filtrada e decolorada, recebendo alface "*ad libitum*". A água dos moluscos foi trocada duas vezes por semana e os moluscos foram infectados logo após a montagem dos grupos experimentais. Os moluscos foram mantidos a uma temperatura de aproximadamente 25°C.

B) Infecção dos moluscos.

Para a infecção dos moluscos foram utilizados larvas L₁ de *A. costaricensis* da linhagem de Crissiumal, Rio Grande do Sul, BR. Estas larvas foram coletadas das fezes de camundongos *Swiss* albinos infectados por via oral, com 6 larvas L₃.

Decorridos 21 dias, as fezes coletadas dos camundongos pela manhã, foram homogeneizadas, envoltas em gaze, colocadas numa peneira plástica e depositadas por 24 horas na superfície de um cálice de sedimentação, contendo água decolorada a 37 °C. O sedimento de cada cálice foi submetido a centrifugação. Utilizou-se centrífuga de bancada

FANEM, modelo 206-R a 178.770g durante 5 min. O sobrenadante foi desprezado. Este procedimento foi repetido até que obtivesse um concentrado de larvas. A contagem das larvas L₁ foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópico em placa de Petri, contendo água decolorada e 1 ml do concentrado de larvas, previamente homogeneizadas.

Os moluscos foram isolados individualmente em pequenos frascos de vidro contendo 2 ml de água decolorada e foram expostos a 120 larvas (L₁) de *A. costaricensis* na presença de luz e a temperatura de 28°C, durante 24 h.

C) Obtenção de larvas L₃ e verificação da suscetibilidade do molusco.

Foram utilizados 45 moluscos (subgrupo A 1) que foram divididos em subgrupos de 15 moluscos, após 15, 22 e 29 dias de infecção para obtenção de larvas L₃. A técnica utilizada para obtenção de larvas foi a de Wallace & Rosen (1969), com modificações. Os moluscos foram sacrificados separadamente, quebrando-se suas conchas e sendo sua massa corporal fragmentada em pequenos pedaços. Estes fragmentos foram transferidos para pequenos frascos contendo solução digestiva (pepsina 4 mg% e 0,7% HCl) e deixados em banho-maria a 42°C durante duas horas. O conteúdo de cada frasco com o material digerido foi transferido para funil de Baermann com água decolorada a 37°C por duas horas para se obter no sedimento as larvas L₃. Um concentrado de larvas L₃ foi obtido pela centrifugação (178.770g) por 5 min. de 10 ml do sedimento formado no funil de Baermann. Após centrifugação, foi retirado 0,1ml do sedimento com pipeta automática e depositado em lâmina quadriculada para a contagem do número de larvas, com microscópio de luz.

D) Recuperação de larvas em períodos pré-estabelecidos para verificação do estágio de desenvolvimento.

Foram utilizados, nesta etapa do experimento 60 moluscos infectados, destinados a recuperação de larvas durante 30 dias consecutivos. Esse grupo foi dividido em subgrupos de dois moluscos, os quais foram sacrificados e digeridos individualmente do 1º ao 30º dia de infecção. Para obtenção das larvas e estudo do estágio de desenvolvimento, foi utilizada a técnica descrita anteriormente para obtenção das larvas L₃.

As larvas recuperadas foram fotografadas desde o primeiro dia de infecção, para o estudo do estágio e da ocorrência de muda.

E) Contagem de hemócitos na hemolinfa circulante dos moluscos.

Nesta fase do experimento foram utilizados 45 moluscos do grupo A (infectados) e 45 moluscos do grupo B (não infectados), para a contagem de hemócitos nos 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 28 e 32 dias após infecção.

Para cada período de tempo, a hemolinfa de cinco moluscos de cada grupo foi coletada individualmente para contagem do número de hemócitos. As amostras foram colhidas, mediante punção da região cefalopodal com auxílio de pipeta Pasteur esterilizada (Michelson, 1966) e depositadas em câmara de Neubauer e observadas em microscópio de contraste de fase, para diferenciação em granulócitos e hialinócitos.

Para os moluscos não infectados, os dias de contagens foram os mesmos do grupo infectado.

F) Verificação de reação hemocitária decorrente da presença de larvas em períodos pré-estabelecidos.

O estudo das reações hemocitárias decorrentes da presença de larvas foi feito em cortes histológicos. Foram utilizados 18 moluscos infectados, subdivididos em grupos de dois moluscos para cada dia pré-determinado. Os moluscos foram sacrificados e levados à fixação por Bouin aquoso após 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 e 30 dias da infecção. Após 48 h de fixação, a concha do molusco foi removida e o corpo foi incorporado em parafina, para posteriormente ser submetido a cortes seriados de 5µm de espessura. Estes cortes foram corados por tricrômico de Gomori (Guaraldo *et al.* 1981) e montados em bálsamo do Canadá.

As larvas e as reações foram contadas e anotadas de acordo com a região no molusco.

G) Análise estatística.

Os dados obtidos referentes à localização das larvas de *A. costaricensis* no molusco *B. glabrata* foram comparados e analisados estatisticamente para confirmar a existência ou não de diferenças significativas.

Foi utilizada análise de variancia (ANOVA) e para verificação de possíveis diferenças entre as médias de cada fator a ser estudado, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de DUNCAN.

A análise estatística foi feita através do programa estatístico S.A.S. System for Windows versão 6.12 (S.A.S. Inst. Inc., 1996). O procedimento de Modelos Lineares Gerais (PROC GLM) foi utilizado para a análise de variancia. Mais detalhes sobre a análise estatística encontram-se no Apêndice Estatístico.

V - Resultados

A) Susceptibilidade de *B. glabrata* ao *A. costaricensis*

Na tabela 1 e figura 1 estão apresentados os dados referentes a números e médias de larvas de *A. costaricensis* presentes em *B. glabrata* contadas após 15, 22 e 29 dias de infecção.

Aos 15 dias, recuperamos apenas duas larvas que se encontravam no 2º estágio larval. Dos 15 moluscos examinados, em apenas um, foram recuperadas larvas (6,7% de infecção).

Aos 22 dias de infecção, foram recuperadas larvas em 40% dos moluscos. Todas as larvas observadas neste período eram L₃ e apresentavam grande motilidade.

Aos 29 dias de infecção, foram recuperadas larvas em 100% dos moluscos. Todas as larvas observadas eram L₃, estavam vivas e apresentavam-se muito ativas.

Tabela 1 - Números de larvas de *Angiostrongylus costaricensis* recuperadas em *Biomphalaria glabrata* após 15, 22 e 29 dias de exposição a 120 larvas L₁.

Molusco	Números de larvas		
	15 dias de infecção	22 dias de infecção	29 dias de infecção
1	0	0	5
2	0	0	29
3	0	4	10
4	0	2	46
5	2	0	7
6	0	1	2
7	0	0	3
8	0	2	36
9	0	0	6
10	0	1	15
11	0	2	17
12	0	0	14
13	0	0	24
14	0	0	4
15	0	0	27
Média ± DP	0,133 ± 0,516	0,8 ± 1,207	16,3 ± 13,37
Taxa de infecção	6,7%	40%	100%

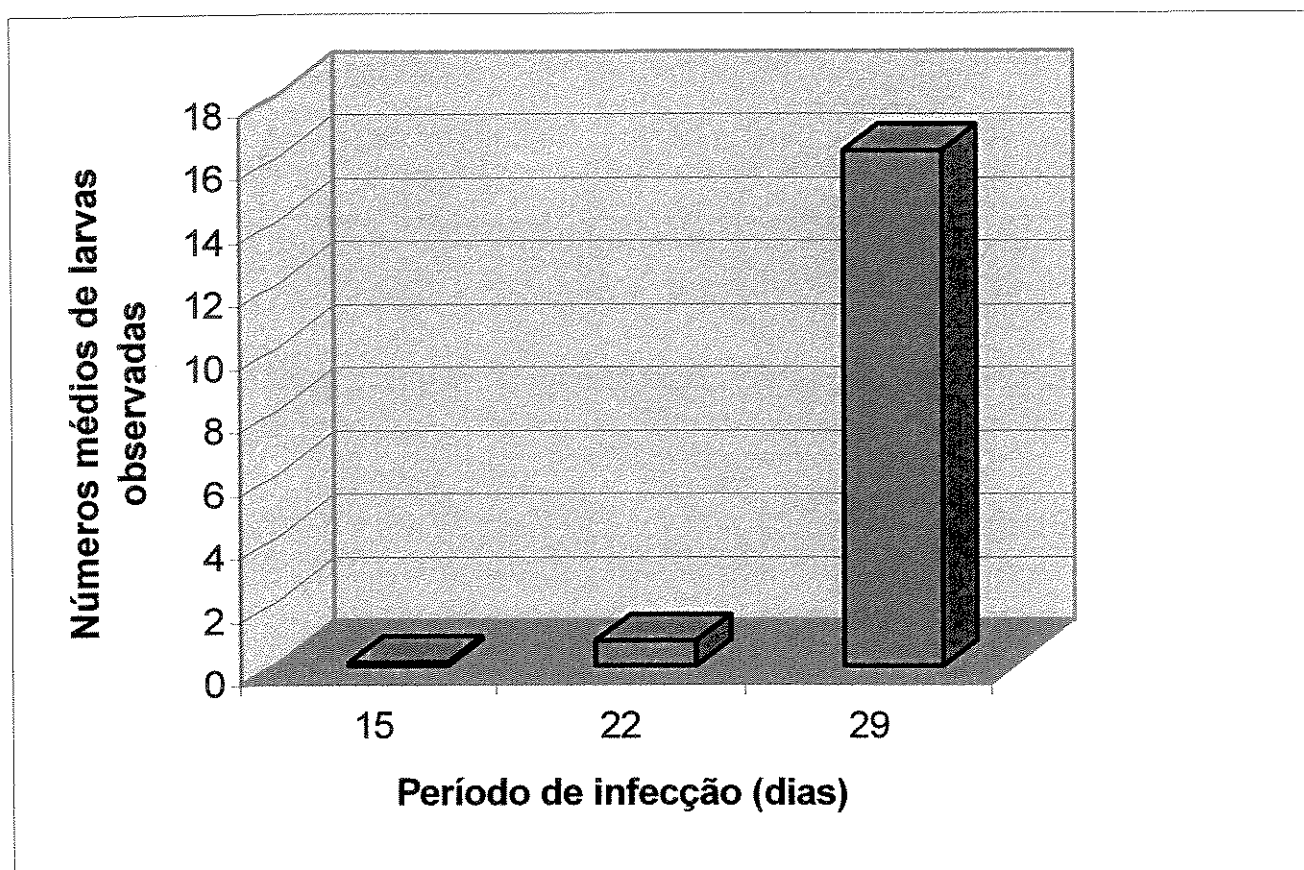


Figura 1: Números médios de larvas de *Angiostrongylus costaricensis* recuperados em *Biomphalaria glabrata*.

B) Recuperação e verificação do estágio de desenvolvimento de larvas de *A. costaricensis*.

Com o objetivo de verificar a mudança de estágio larval do *A. costaricensis* em *B. glabrata* foram infectados 60 moluscos, para a recuperação diária de larvas durante 30 dias consecutivos.

Após 24 horas de infecção, diariamente foram digeridos dois moluscos individualmente até o final do experimento, ou seja do 1º ao 30º dia de infecção.

Os três estágios das larvas de *A. costaricensis* podem ser observados nas figuras 2, 3 e 4. De maneira geral, as larvas no interior dos moluscos crescem de maneira significativa do 1º ao 30º dia de infecção, como pode ser observado nas figuras 2, 3 e 4.

A figura 2 A mostra uma larva L₁ recuperada de *B. glabrata* com quatro dias de infecção. Esta larva estava viva e pouco ativa no momento da observação e media aproximadamente 204µm de comprimento.

Foram medidas larvas com seis e dez dias após infecção. As larvas recuperadas com seis dias mediam 228µm de comprimento por 14,99µm de largura. Com 10 dias apresentavam-se bem maiores, atingindo 343µm de comprimento por 29µm de largura.

Na figura 2 B podemos observar uma larva L₂ recuperada de *B. glabrata* com 13 dias de infecção. Foi observada neste dia a mudança de estágio larval de L₁ para L₂. Comparando-se as fotos da figura 2 A e 2 B com o mesmo aumento (400X), podemos observar o aumento de tamanho da larva de quatro para 13 dias da foto 2 B em relação a foto 2 A. A larva da foto 2 B apresenta acúmulo de granulações por toda sua extensão, cutícula residual em decorrência da muda (seta). No momento da observação sua atividade era lenta e como pode ser observado na foto não são visíveis o esôfago e intestino da larva.

A figura 3 A mostra uma larva L₂ de *A. costaricensis* recuperada em *B. glabrata* aos 17 dias de infecção. Comparando-se as fotos das figuras 2 B e 3 A vê-se que, não há diferenciação nos tamanhos e sim na disposição das granulações. Foi evidente nesta etapa um maior adensamento de grânulos na parte mediana da larva e rarefação destes grânulos nas extremidades. O esôfago e intestino também não estavam visíveis neste período.

A figura 3 B mostra uma larva L₃ de *A. costaricensis* recuperada de *B. glabrata* após 18 dias de infecção. Esta larva apresenta diferenças significativas em relação à larva da figura 3 A. É bem evidente a diferenciação do esôfago e intestino, além das cutículas residuais dos estágios anteriores L₁ e L₂. Neste experimento foi verificada a mudança de estágio de L₂ para L₃ aos 18 dias de infecção. A partir deste dia, todas as larvas observadas apresentaram-se muito ativas, após a recuperação do molusco. Houve um relativo aumento de tamanho da larva no período de 18 a 30 dias de infecção (figuras 3 B e 4 A e B).

Na figura 4 A pode ser observada uma larva recuperada de *B. glabrata* com 24 dias de infecção. Em um aumento de 400X esta larva não pode ser vista na sua totalidade, devido o seu tamanho, o que ocasionou no momento da foto a redução do campo do microscópio para 100X. A larva observada é uma L₃, com observação do esôfago, intestino e asas laterais proeminentes (setas).

A figura 4 B mostra uma larva L₃ madura de *A. costaricensis* recuperada de *B. glabrata* com 30 dias de infecção. A larva neste período é muito ativa e devido ao crescimento dificulta a observação da cutícula. São bem visíveis o esôfago e o intestino.

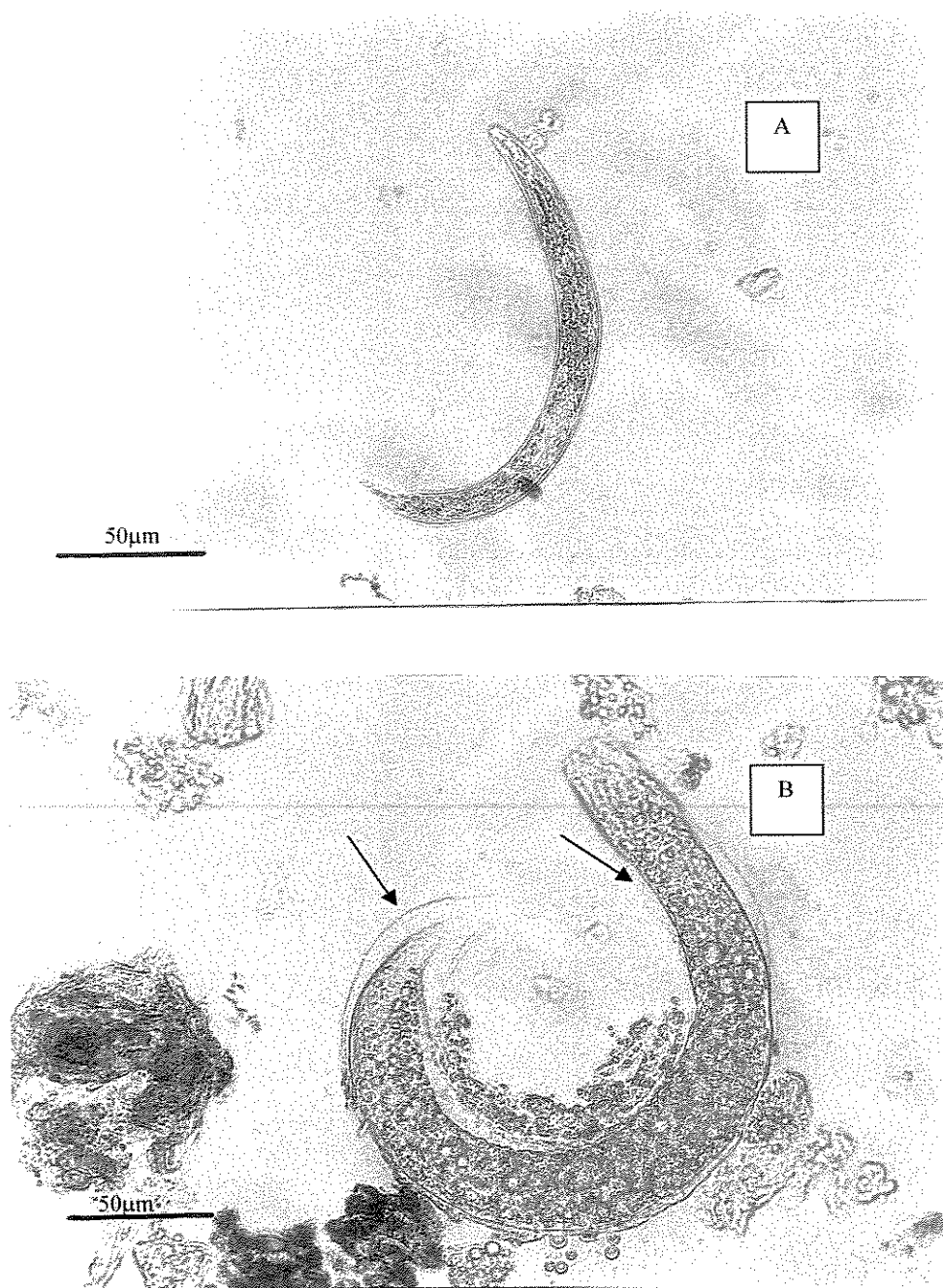


Figura 2: Larva de *Angiostrongylus costaricensis* recuperadas de *Biomphalaria glabrata*.
A – Larva L₁ de *A. costaricensis* recuperada de *B. glabrata* com 4 dias de infecção (400X).
B – Larva L₂ de *A. costaricensis* recuperada de *B. glabrata* com 13 dias de infecção (400X).
Observa-se em B a mudança do estágio larvar de L₁ para L₂ (seta).

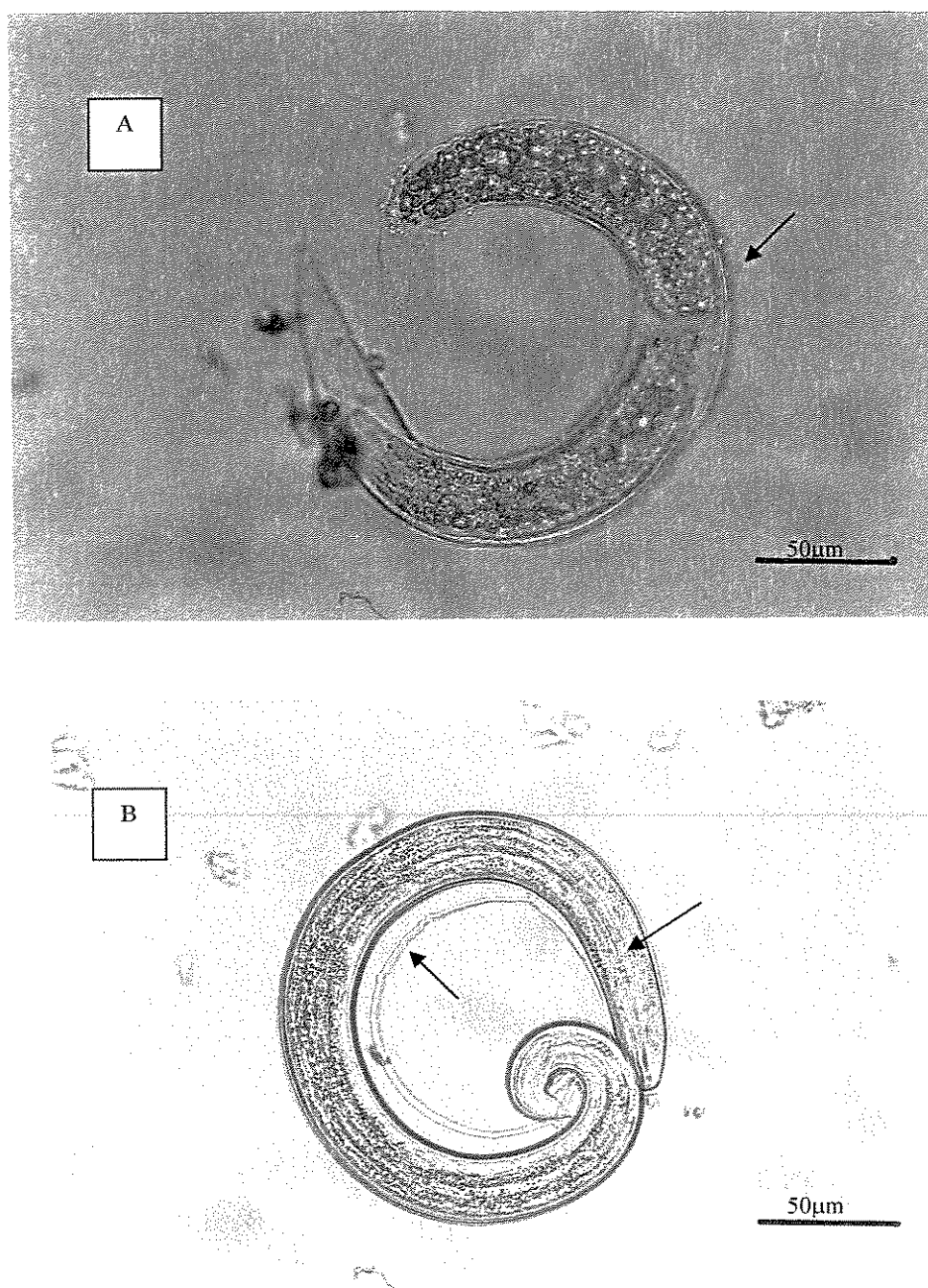


Figura 3: Larvas de *A. costaricensis* recuperadas de *Biomphalaria glabrata*.
A - Larva L₂ de *A. costaricensis* recuperada de *B. glabrata* com 17 dias de infecção (400X).
B - Larva L₃ de *A. costaricensis* recuperada de *B. glabrata* com 18 dias de infecção (400X).
 Observa-se em ambas as fotos a muda de L₂ para L₃.

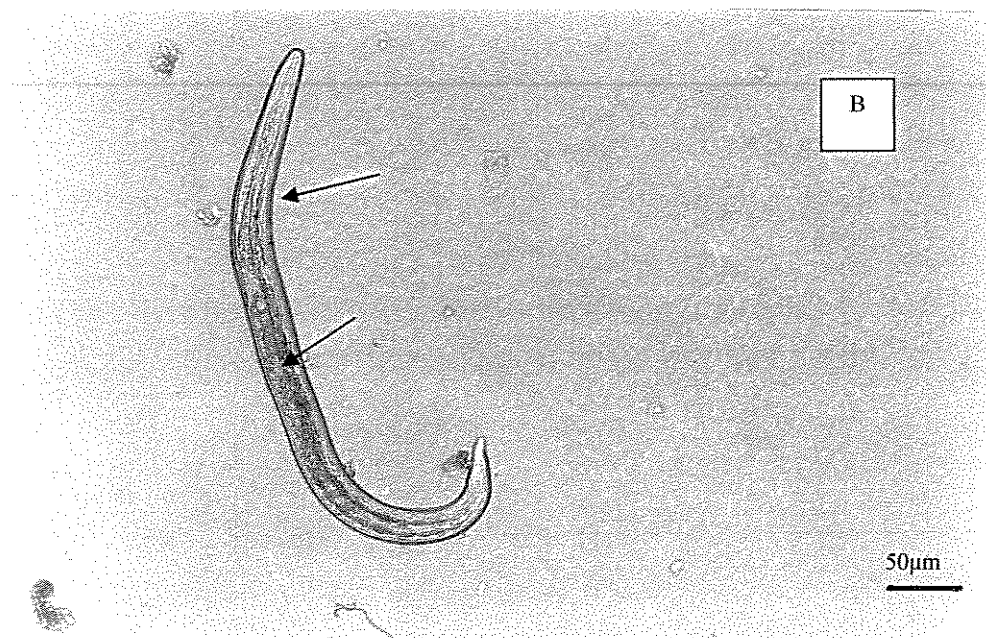
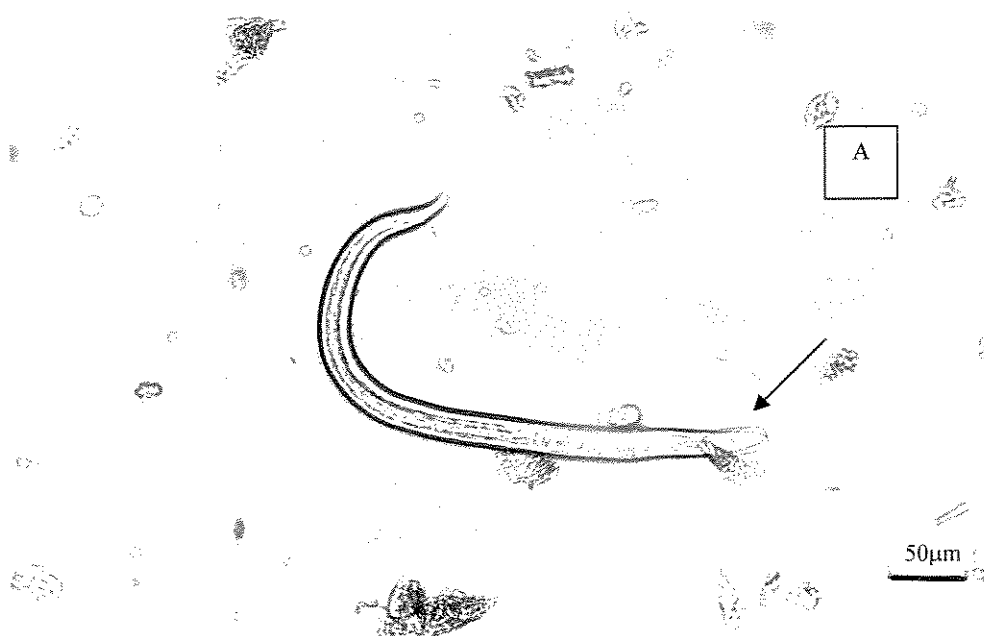


Figura 4: Larvas de *Angiostrongylus costaricensis* recuperadas de *Biomphalaria glabrata*.

A – Larva L₃ de *A. costaricensis* recuperada de *B. glabrata* com 24 dias de infecção (100X).

A seta indica as asas laterais na extremidade anterior.

B – Larva L₃ de *A. costaricensis* recuperada de *B. glabrata* com 30 dias de infecção (100X).

A setas indicam o esôfago filarioide da larva e o intestino.

C) Reações hemocitárias em torno de larvas de *A. costaricensis*

Para esta etapa do experimento foram utilizados 18 moluscos expostos ao *A. costaricensis*, subdivididos em grupos de dois moluscos que foram examinados nos dias 2, 6, 9, 13, 16, 20, 23, 27 e 30 após infecção. Os moluscos foram sacrificados e fixados em Bouin aquoso e submetidos a cortes histológicos seriados, corados pelo tricrômico de Gomori.

O objetivo deste experimento foi verificar a presença de reações hemocitárias, o número de larvas nos tecidos e sua localização nos moluscos.

Nos cortes histológicos foram visualizadas 729 larvas nos 18 moluscos expostos a 2.160 larvas L₁.

Na figura 5 A observa-se uma larva L₁ de *A. costaricensis*, após 48 horas de infecção penetrando pela região cefalopodal, envolvida por reação hemocitária. Reações hemocitárias intensas, sem a observação de larvas, foram observadas em *B. glabrata* aos dois dias de infecção (figura 5 B). No mesmo molusco e na mesma região foram observadas larvas vivas.

As reações hemocitárias apresentaram-se bem organizadas, com apenas granulócitos circundando as larvas e em algumas ocasiões as células constituintes destas reações apresentavam-se com o aspecto de fibroblastos, formando camadas concêntricas (figuras 7 A e 10 B).

Nas primeiras horas de infecção a larva L₁ apresentava-se nas regiões mais expostas do corpo do molusco, como a região cefalopodal, sendo que, neste caso, muitas vezes, as reações hemocitárias em torno das larvas apresentavam-se ora discretas ora abundantes (figuras 6 A e 6 B). Reações hemocitárias também foram observadas nos períodos posteriores da infecção (figuras

7, 8, 9, 10 e 11). A figura 11 B apresenta uma larva L_3 madura com 30 dias de infecção na região intestinal. Esta larva apesar de estar rodeada por uma resposta hemocitária intensa, está viável.

A figura 9 A mostra uma larva L_1 de *A. costaricensis* localizada no intestino do molusco. Provavelmente esta larva infectou o molusco pela via oral. Observando-se os gráficos da figura 13 e a tabela 2, o período de maior encontro de larvas no saco bucal, esôfago e intestino foi de 13 a 16 dias de infecção.

As figuras 9 B e 10 A mostram o momento da muda da larva L_1 para L_2 com 13 dias de infecção. As larvas apresentavam cutícula residual, com granulações de localização periférica, típica desta fase.

De acordo com a análise estatística as regiões mais parasitadas do molusco foram a região cefalopodal seguida do intestino, rim e pulmão. Outros órgãos foram fracamente parasitados (figuras 12, 13 e tabela 2). Todos os moluscos examinados estavam parasitados, conforme os dados apresentados na tabela 2.

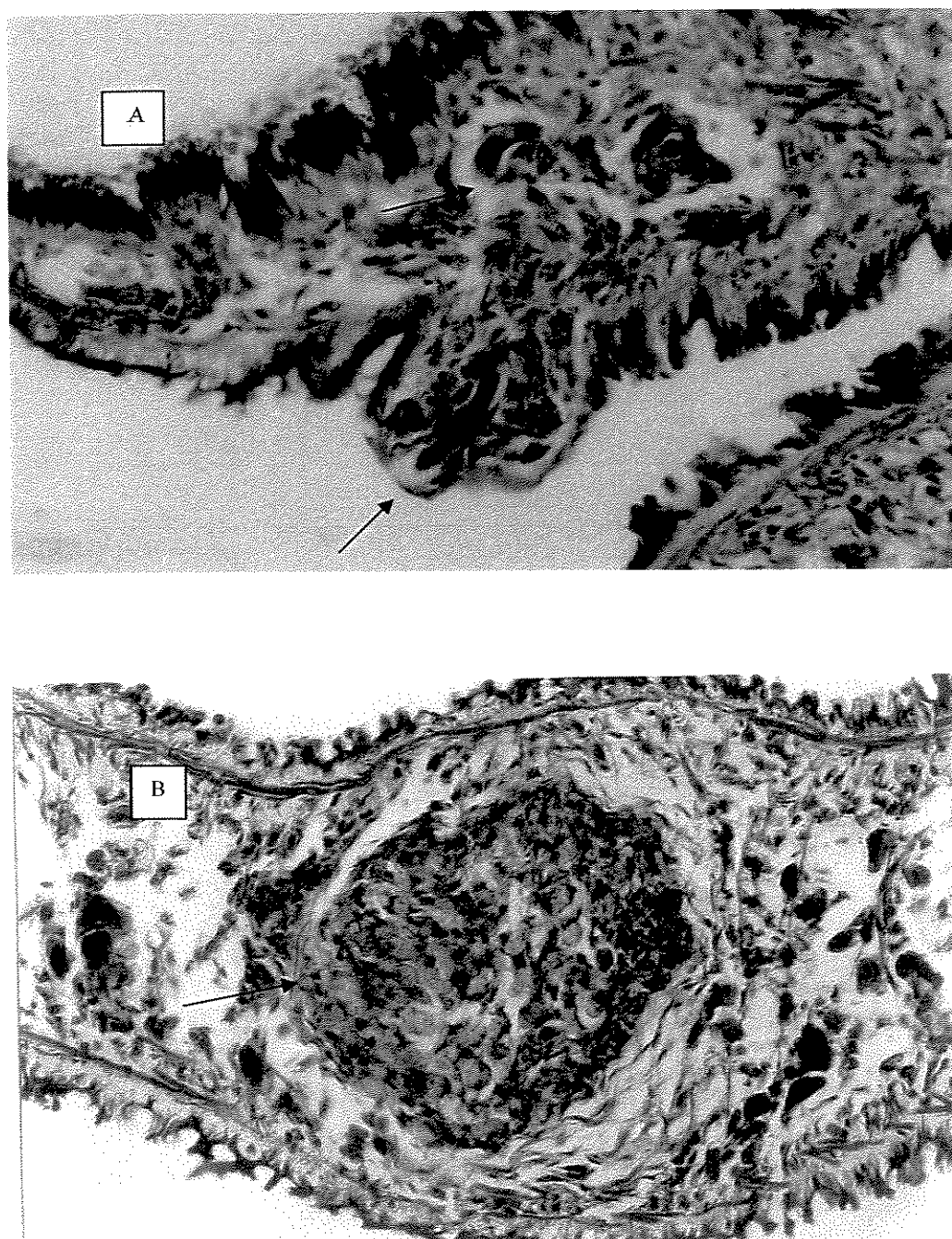


Figura 5: Corte histológico de *Biomphalaria glabrata* com dois dias de infecção, após exposição a 120 larvas L₁ de *Angiostrongylus costaricensis* oriundas de camundongos *Swiss*. Coloração tricrômico de Gomori. 400X.

- A** - Larva L₁ de *A. costaricensis* penetrando pela região cefalopodal do molusco (seta).
B - Intensa reação hemocitária no tentáculo, sem a presença da larva.

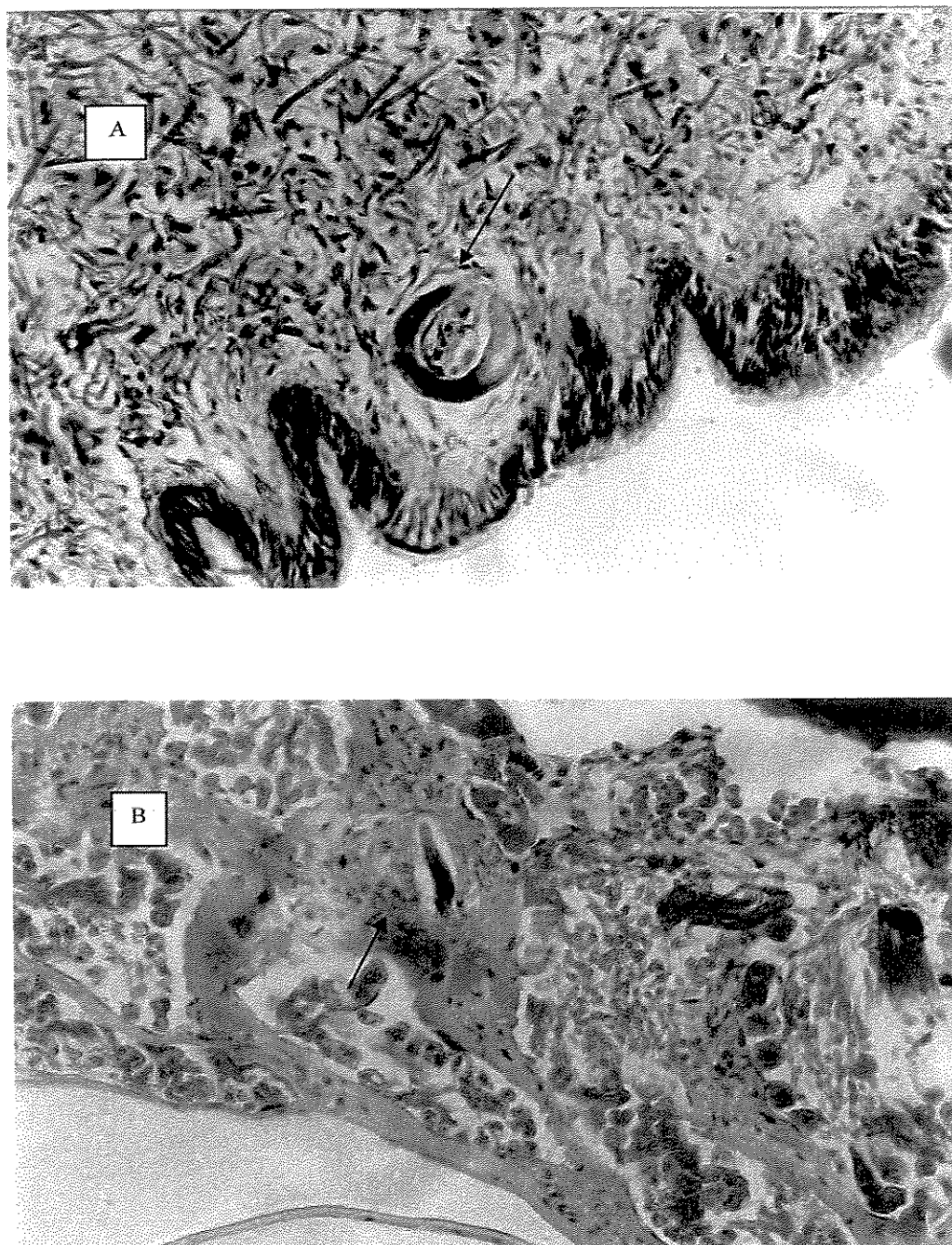


Figura 6: Corte histológico de *Biomphalaria glabrata* com dois dias de infecção, após exposição a 120 larvas L₁ de *Angiostrongylus costaricensis* oriundas de camundongos *Swiss*. Coloração tricrômico de Gomori. 400X.

A - Larva L₁ de *A. costaricensis* (seta) na região cefalopodal do molusco.

B - Larva L₁ de *A. costaricensis* (seta) na região da vesícula seminal do molusco, mostrando reação hemocitária.

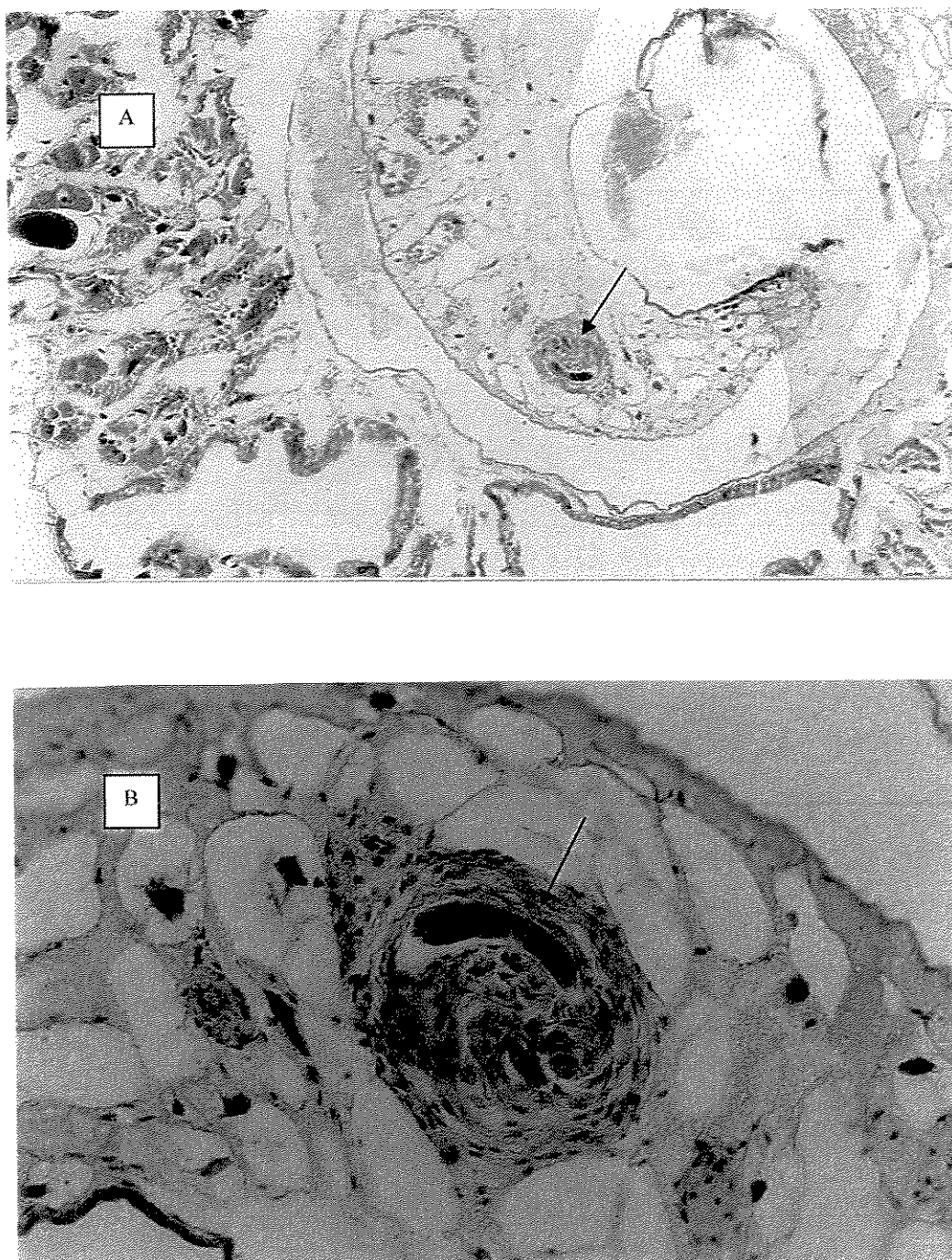


Figura 7: Corte histológico de *Biomphalaria glabrata* com 6 dias de infecção, após exposição a 120 larvas L₁ de *Angiostrongylus costaricensis* oriundas de camundongos Swiss. Coloração tricrômico de Gomori.

A - Larva L₁ de *A. costaricensis* (seta) na região do ovotestis do molusco, com intensa reação hemocitária. 100X .

B - Mesma foto anterior. 400X.

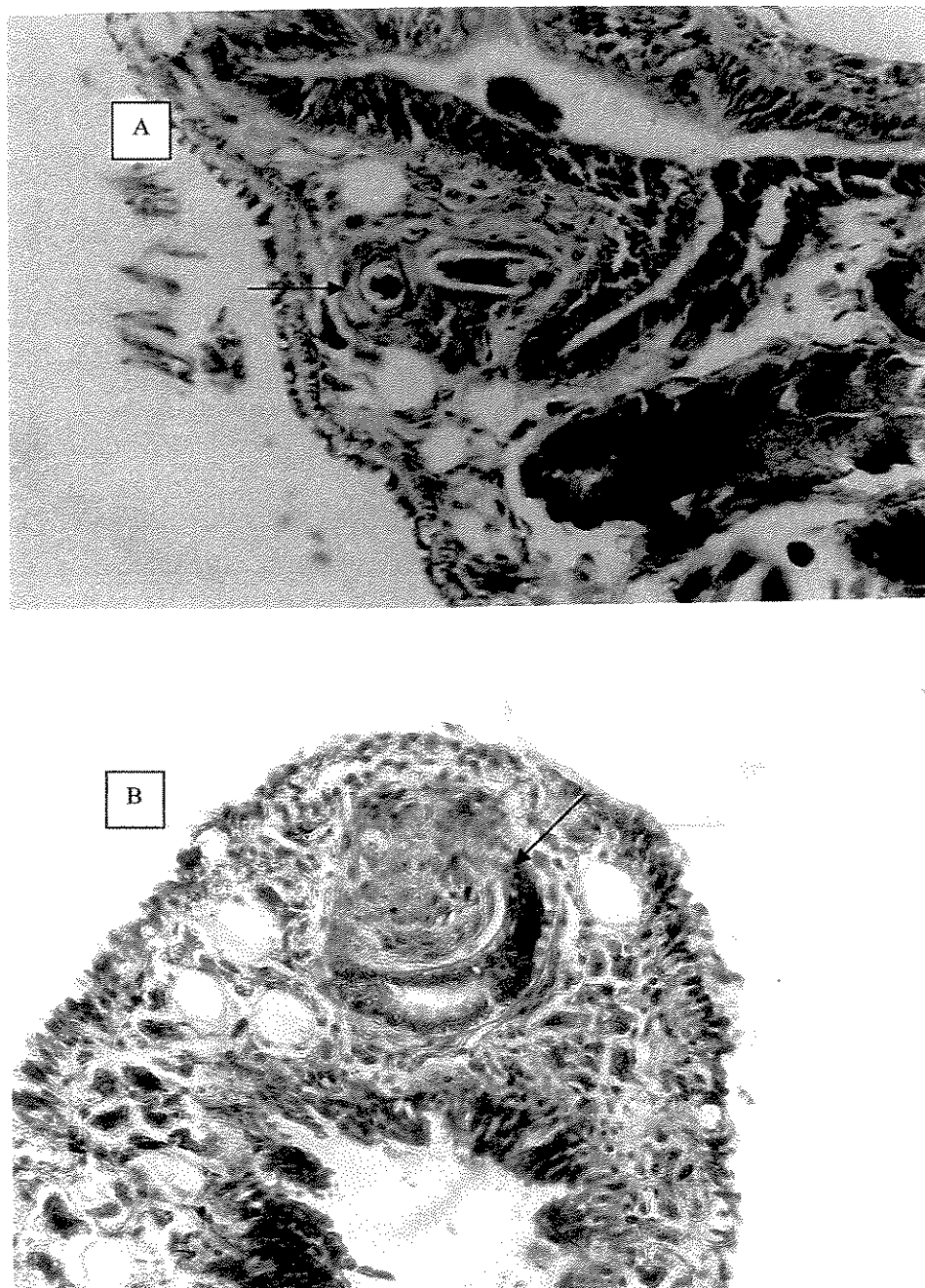


Figura 8: Corte histológico de *Biomphalaria glabrata* com 9 dias de infecção, após exposição a 120 larvas L₁ de *Angiostrongylus costaricensis* oriundas de camundongos *Swiss*. Coloração tricrômico de Gomori. 400X.

A - Larva L₁ de *A. costaricensis* (seta) na região da próstata do molusco, acompanhada de intensa reação hemocitária .

B - Larva L₁ de *A. costaricensis* na região intestinal do molusco.

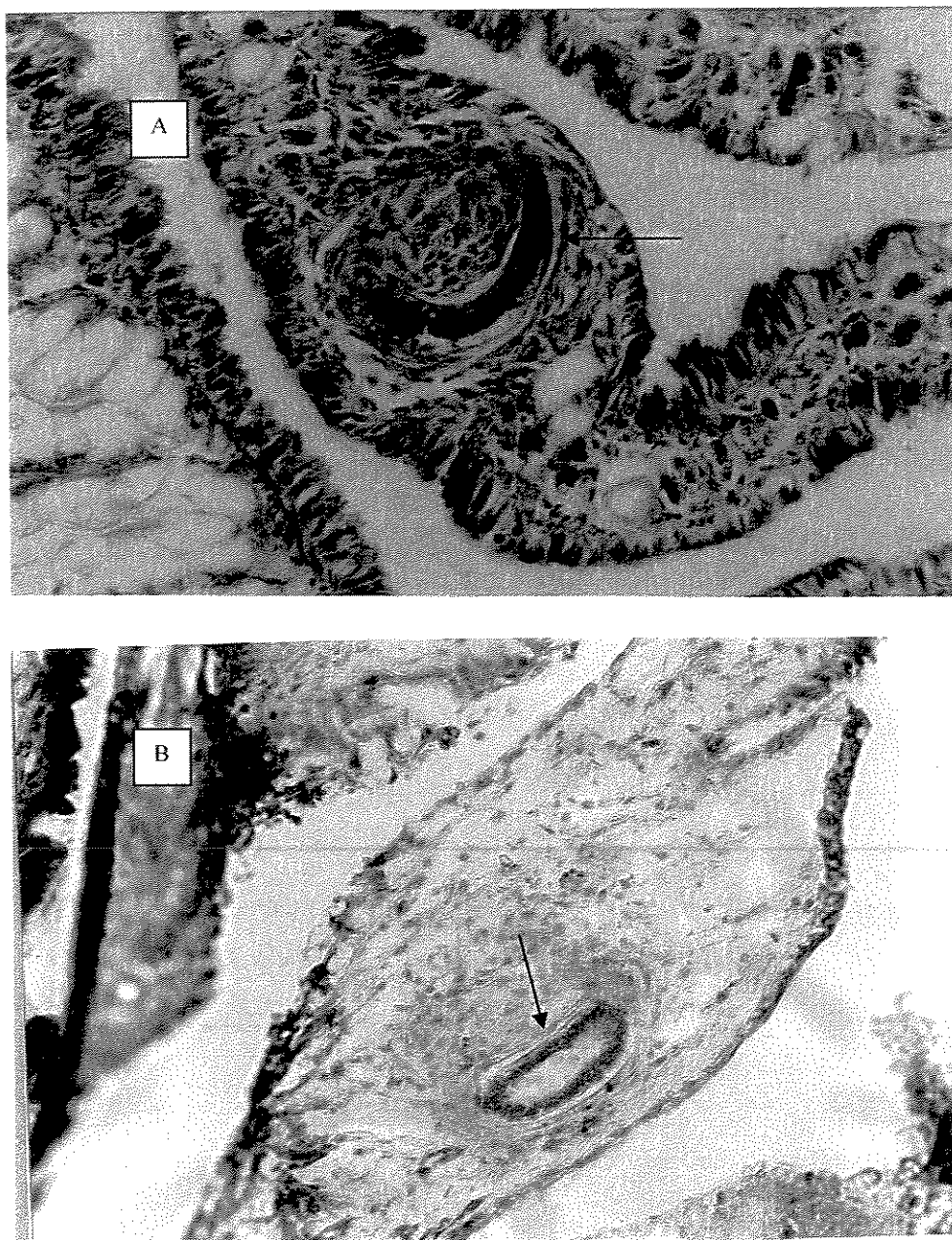


Figura 9: Corte histológico de *Biomphalaria glabrata*, após exposição a 120 larvas L₁ de *Angiostrongylus costaricensis* oriundas de camundongos Swiss. Coloração tricrômico de Gomori. 400X.

A - Extremidade anterior da larva L₁ de *A. costaricensis* localizada na região intestinal do molusco (Período de infecção: 9 dias)

B - Larva L₂ de *A. costaricensis* localizada na mufla do molusco, mostrando cutícula residual e grânulos no momento da muda (Período de infecção: 13 dias).

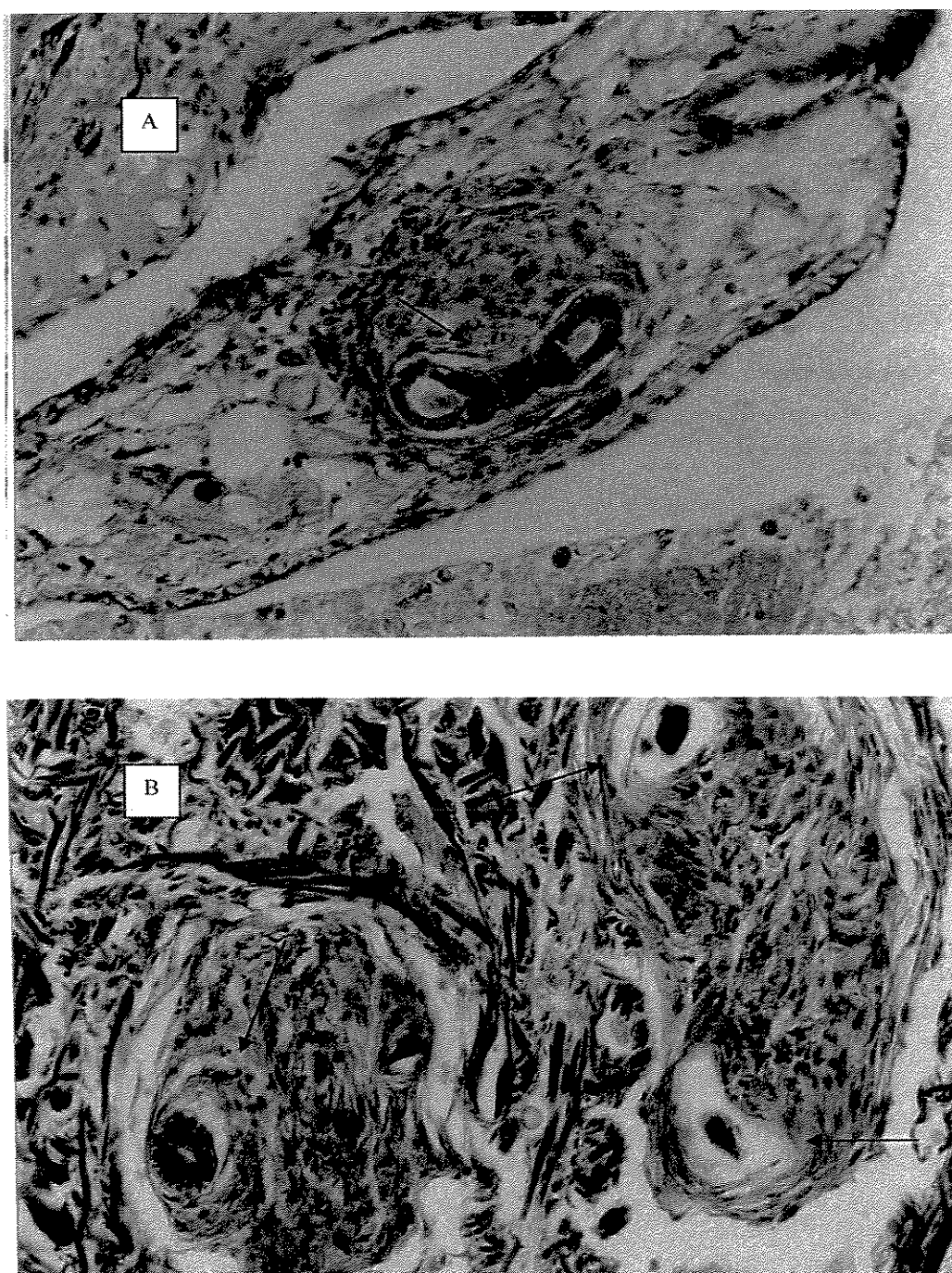


Figura 10: Corte histológico de *Biomphalaria glabrata*, após exposição a 120 larvas *L*₁ de *Angiostrongylus costaricensis* oriundas de camundongos Swiss.

Coloração tricrômico de Gomori. 400X. (Período de infecção: 13 dias)

A - Larva *L*₂ de *A. costaricensis* (seta) na região cefalopodal do molusco, acompanhada de intensa reação hemocitária.

B - Larvas *L*₂ de *A. costaricensis* na região cefalopodal do molusco envolvidas por reação hemocitária.

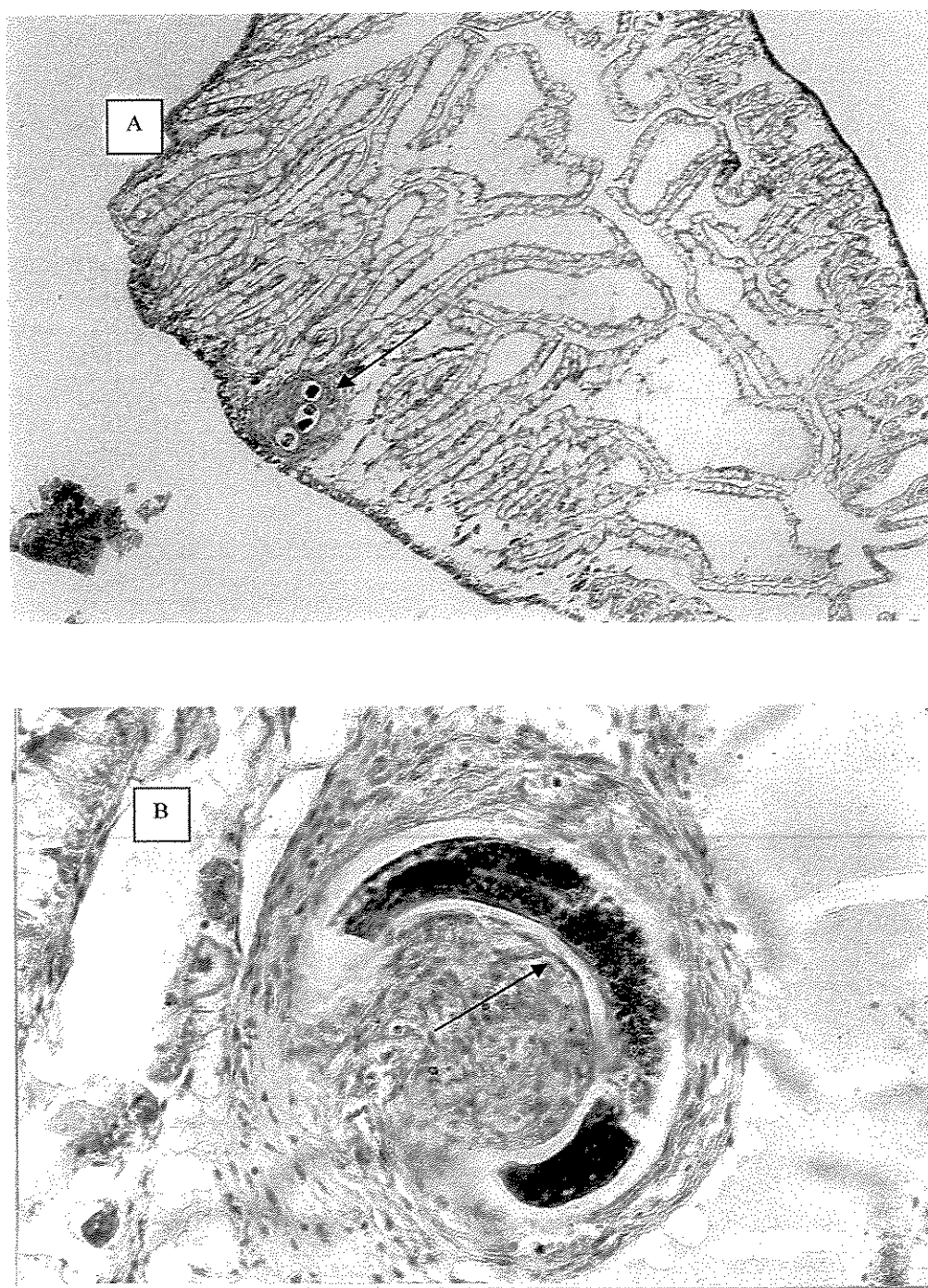


Figura 11: Corte histológico de *Biomphalaria glabrata*, após exposição a 120 larvas L₁ de *Angiostrongylus costaricensis* oriundas de camundongos Swiss.

Coloração tricrômico de Gomori.

A - Larva L₃ de *A. costaricensis* na região pulmonar do molusco, acompanhada de intensa reação hemocitária. 100X (Período de infecção: 27 dias)

B - Larva L₃ de *A. costaricensis* na região intestinal do molusco. 400X (Período de infecção: 30 dias).

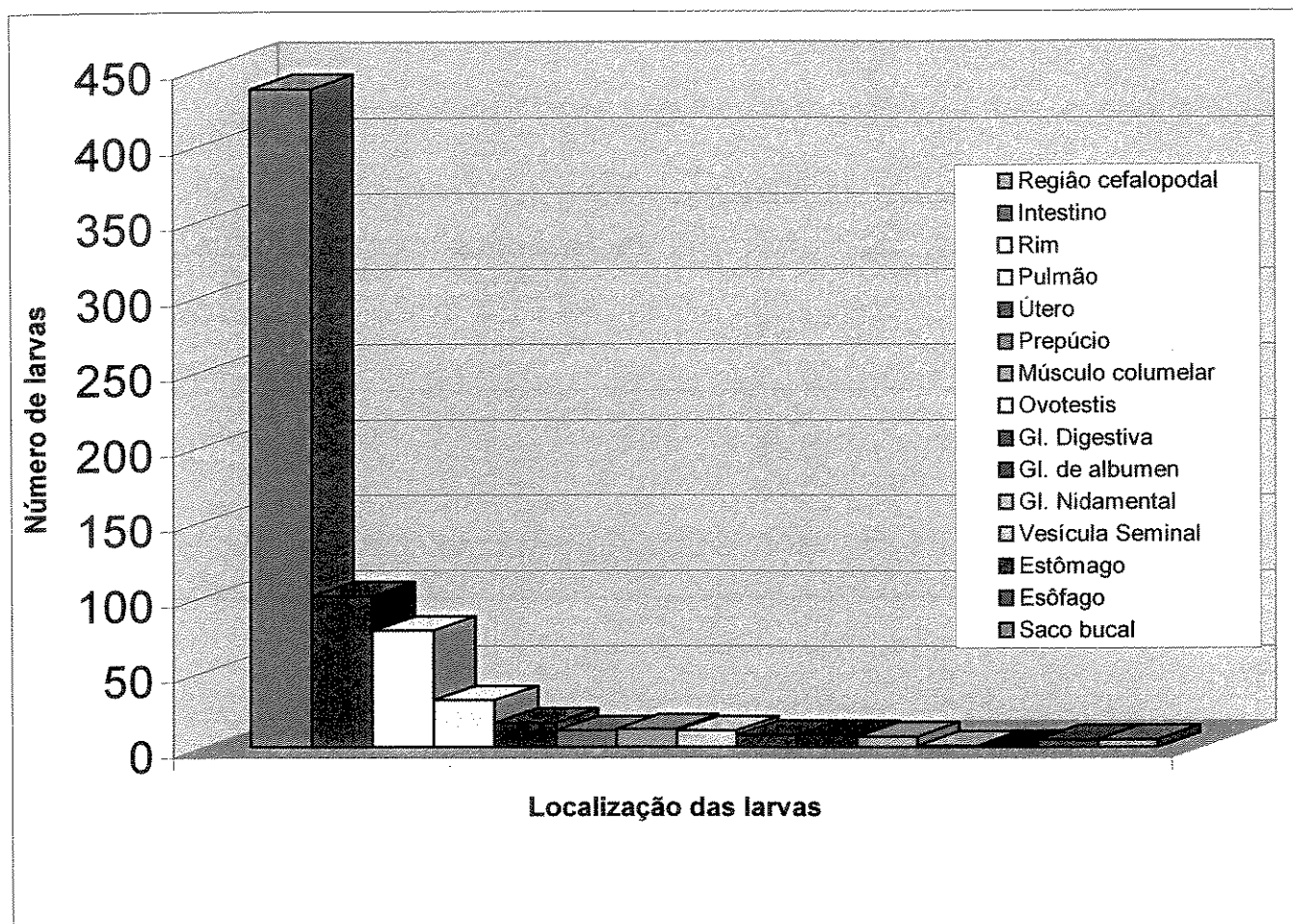


Figura 12: Número total de larvas de *A. costaricensis* detectadas em diferentes tecidos e órgãos de *B. glabrata* expostos individualmente a 120 larvas L_1 (n=18).

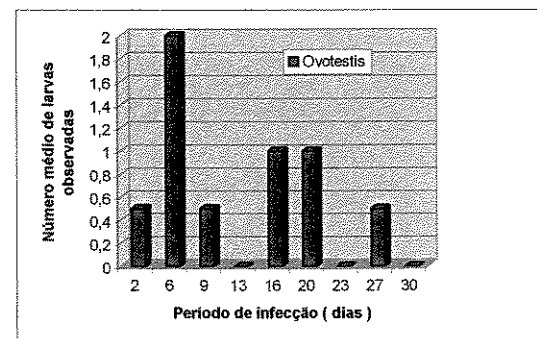
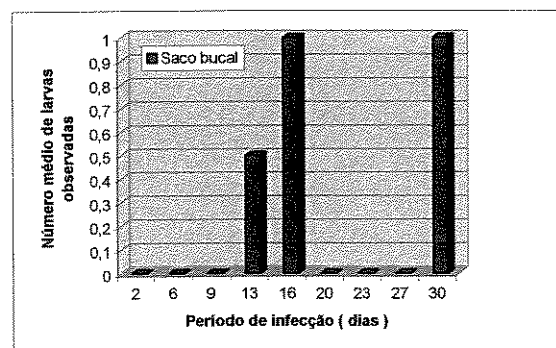
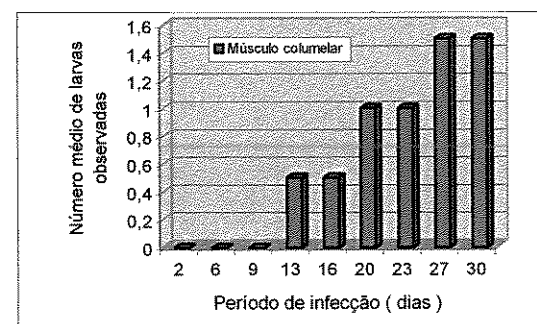
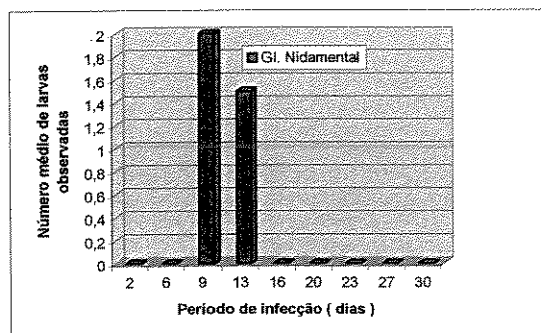
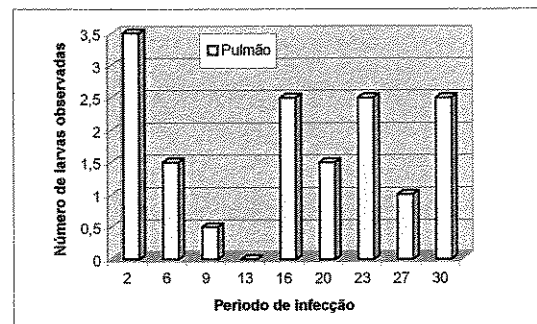
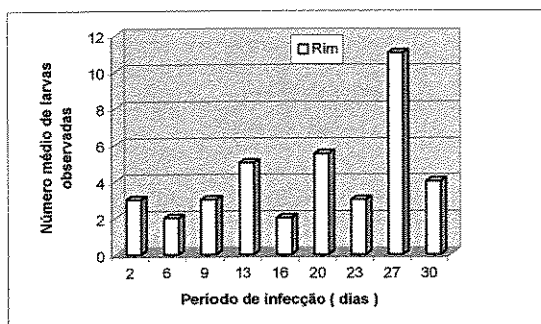
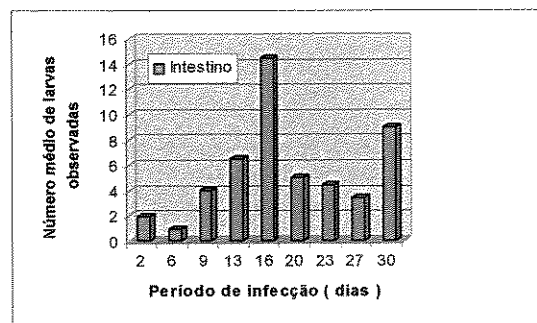
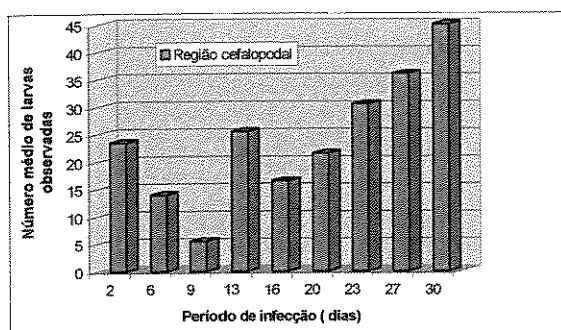


Figura 13: Número médio de larvas de *A. costaricensis* em *B. glabrata*, em diferentes dias após infecção.

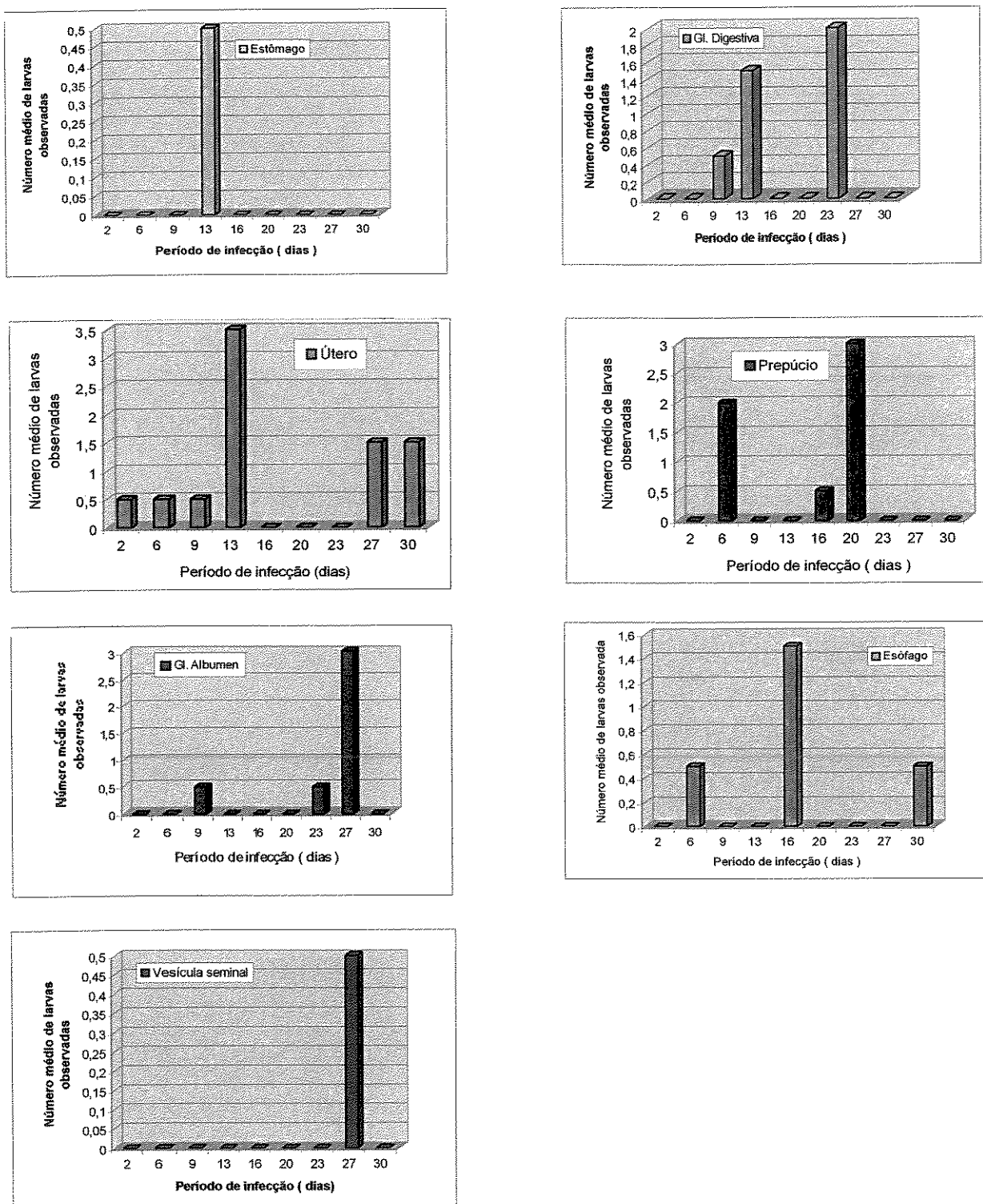


Figura 13: Número médio de larvas de *A. costaricensis* em *B. glabrata*, em diferentes dias após infecção.

Tabela 2 - Número de larvas de *A. costaricensis* observado em cortes histológicos de *B. glabrata* infectadas com 120 larvas (2 exemplares em cada período)

Localização das larvas	Dias pós infecção									Média ± DP
	2	6	9	13	16	20	23	27	30	
Região cefalopodal	47	28	11	51	33	43	61	72	90	24,2 ± 23,81
Intestino	4	2	8	13	29	10	9	7	18	5,55 ± 8,19
Rim	6	4	6	10	4	11	6	22	8	4,27 ± 5,29
Pulmão	7	3	1	0	5	3	5	2	5	1,72 ± 2,24
Útero	1	1	1	7	0	0	0	3	3	0,88 ± 2,27
Prepúcio	0	4	0	0	1	6	0	0	0	0,61 ± 2,22
Músculo columelar	0	0	0	1	1	2	2	3	3	0,66 ± 1,22
Ovotestis	1	4	1	0	2	2	0	1	0	0,61 ± 1,30
Gl. digestiva	0	0	1	3	0	0	4	0	0	0,44 ± 1,53
Gl. Albúmen	0	0	1	0	0	0	1	6	0	0,44 ± 1,96
Gl. Nidamental	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0,38 ± 1,56
Vesícula seminal	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,05 ± 0,33
Estômago	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,05 ± 0,33
Esôfago	0	1	0	0	3	0	0	0	1	0,27 ± 1,01
Saco bucal	0	0	0	1	2	0	0	0	2	0,27 ± 0,88
Número Médio	33,0	23,5	17,0	45,0	40,0	38,5	44,0	58,5	65,0	
± DP	12,01	7,06	3,43	13,09	10,56	11,10	15,50	18,64	23,00	

D) Número de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata* exposta ao *A. costaricensis*.

Os hemócitos encontrados na hemolinfa foram diferenciados em granulócitos e hialinócitos pela capacidade de formação de pseudópodos pelos primeiros. Os dados obtidos, referentes ao número de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata* infectada ou não com *A. costaricensis*, estão apresentados nas Tabelas 3 e 4 e Figuras 14, 15 e 16. A análise estatística dos dados revelou que o número de hemócitos foi maior na hemolinfa dos moluscos não infectados ($p=0,0304$), (Figura 16, Tabelas 3 e 4).

Nos moluscos não infectados pelo *A. costaricensis* o número de hialinócitos foi significativamente maior do que o número de granulócitos ($p=0,0025$) (Figura 14). Como mostra a Tabela 3, o maior número de hialinócitos nos moluscos não infectados foi observado aos 25 dias ($238 \text{ hialinócitos/mm}^3$) que diferiu significativamente do número de hialinócitos no 4º dia de observação. O número de granulócitos nos moluscos não infectados por *A. costaricensis* foi semelhante estatisticamente, em todos os períodos observados ($p=0,7112$).

Nos moluscos infectados o número de granulócitos foi significativamente maior do que o número de hialinócitos ($p<0,0001$) (Tabelas 4 e 3, respectivamente e Figura 15). O número de granulócitos na hemolinfa dos moluscos infectados começou a aumentar aos 18 dias da infecção, sendo significativamente maior aos 21, 25 e 32 dias quando comparado aos 4 dias de infecção. Em relação aos hialinócitos, foram significativamente maiores nos dias 18 e 32 e menores aos 4, 11 e 28 dias de infecção (Tabelas 3 e 4 e Figura 15).

Tabela 3 - Número médio e desvio padrão de hialinócitos na hemolinfa de *B. glabrata* infectada ou não com *A. costaricensis*, em diferentes dias pós infecção.

Dias pós infecção	hialinócitos / mm ³	
	Não Infectada	Infectada
4	51,0 ± 17,6	20,0 ± 11,5
7	139,0 ± 184,0	34,8 ± 20,9
11	112,6 ± 68,1	9,0 ± 6,5
14	118,4 ± 42,8	34,6 ± 20,9
18	117,8 ± 138,2	67,6 ± 63,9
21	106,4 ± 87,8	27,0 ± 22,5
25	238,0 ± 144,9	46,0 ± 9,0
28	116,0 ± 95,1	15,8 ± 6,7
32	152,2 ± 119,9	68,2 ± 42,0

Tabela 4 - Número médio e desvio padrão de granulócitos na hemolinfa de *B. glabrata* infectada ou não com *A. costaricensis*, em diferentes dias pós infecção.

Dias pós infecção	granulócitos/ mm ³	
	Não Infectada	Infectada
4	125,6 ± 132,9	31,2 ± 24,3
7	83,0 ± 84,6	78,0 ± 40,0
11	106,6 ± 106,0	87,4 ± 99,2
14	113,4 ± 169,5	94,4 ± 75,8
18	43,4 ± 64,8	120,4 ± 96,4
21	91,4 ± 79,0	146,0 ± 72,9
25	31,4 ± 49,3	132,4 ± 51,6
28	68,8 ± 74,5	62,2 ± 46,5
32	142,8 ± 92,0	144,0 ± 69,8

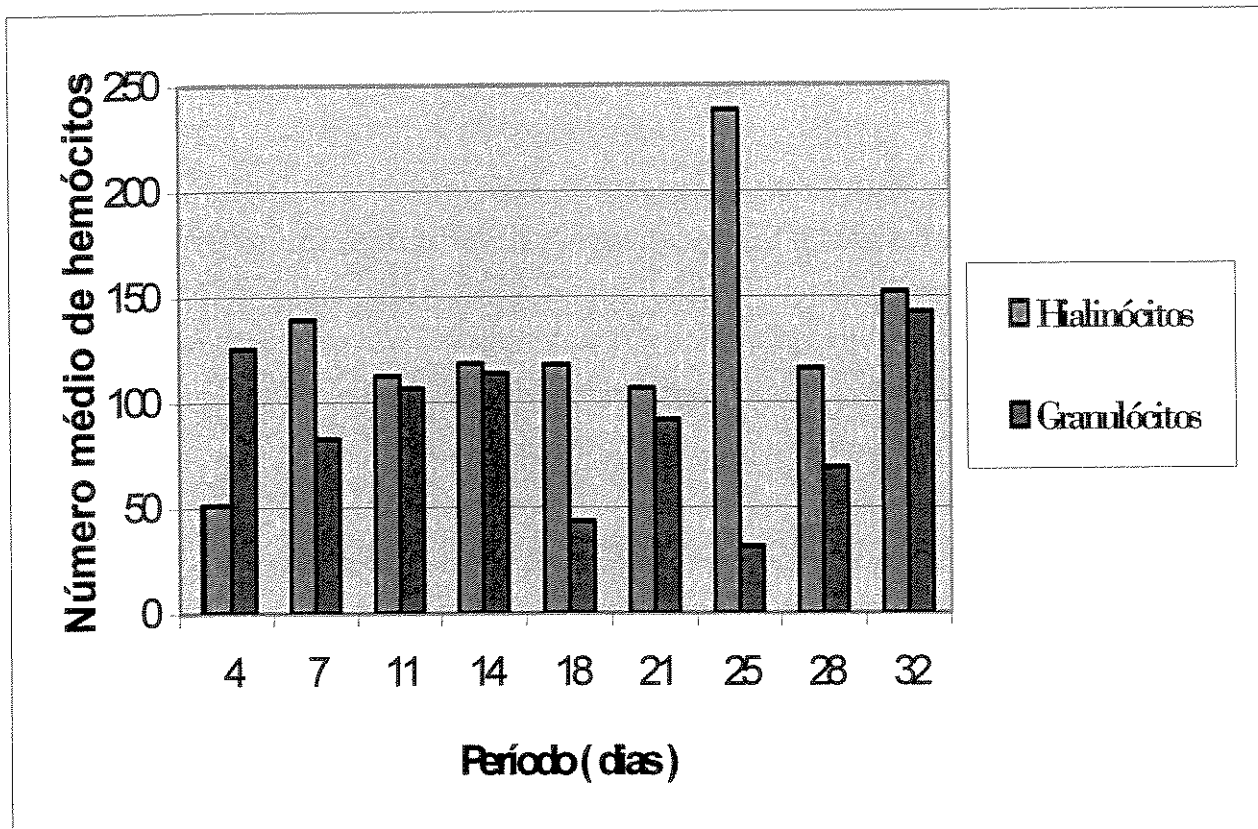


Figura 14: Número médio de hemócitos na hemolinfa de moluscos não infectados com *Angiostrongylus costaricensis*

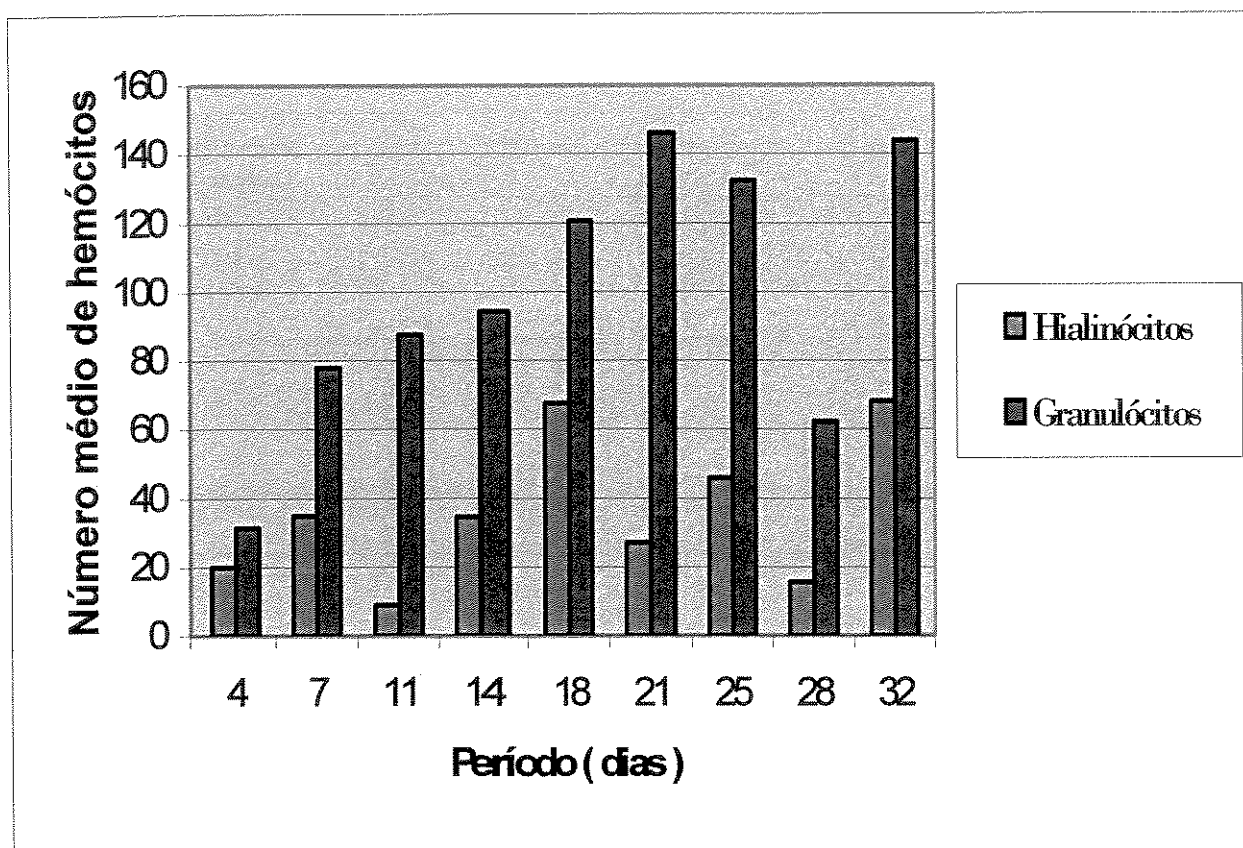


Figura 15: Número médio de hemócitos na hemolinfa de moluscos infectados com *Angiostrongylus costaricensis*

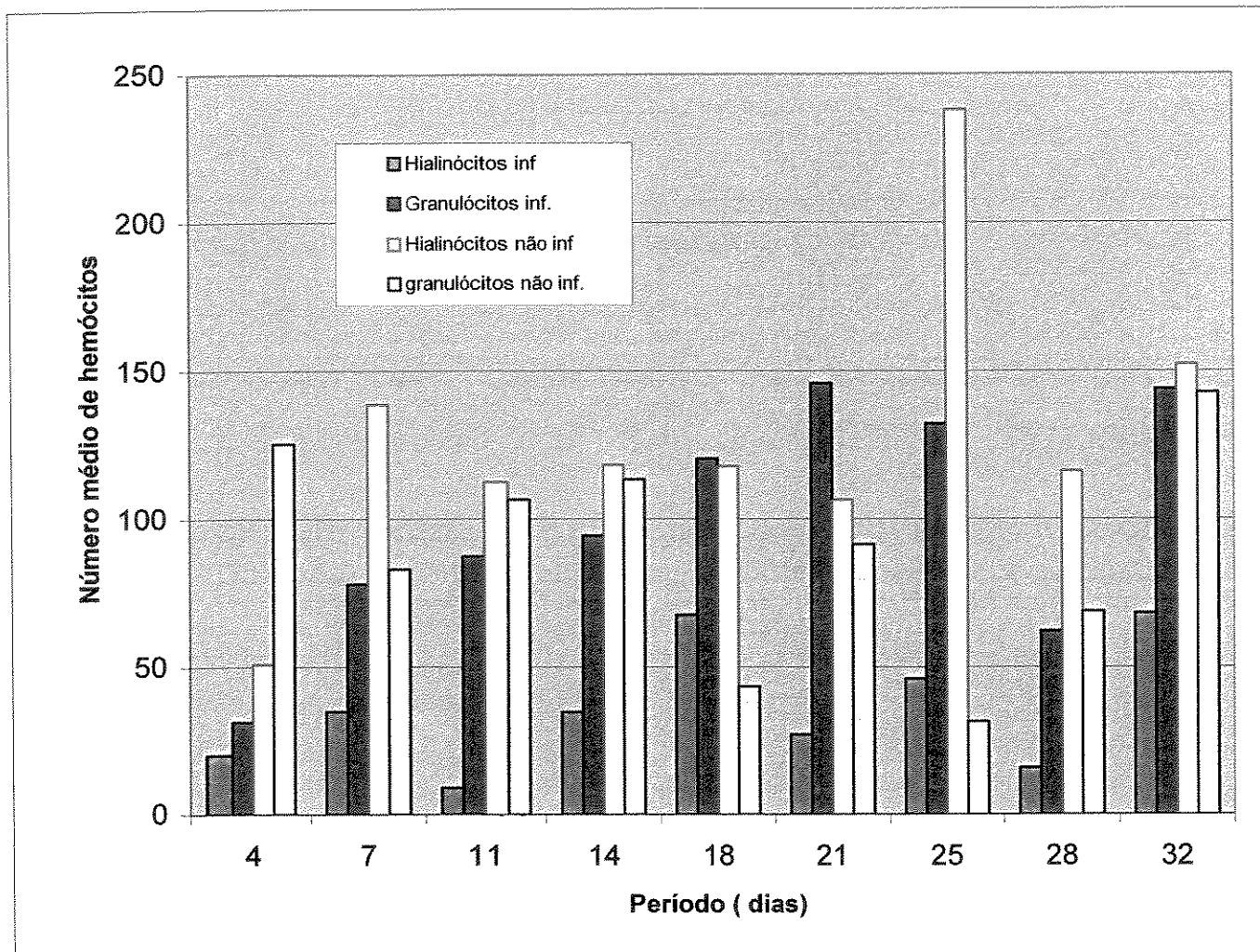


FIGURA 16: Número médio de hemócitos na hemolinfa de moluscos infectados e não infectados com *Angiostrongylus costaricensis*.

VI – Discussão

Neste trabalho, foi analisado o comportamento de *A. costaricensis* em moluscos planorbídeos *B. glabrata*, pesquisando a suscetibilidade, o desenvolvimento das larvas e a resposta hemocitária frente ao parasitismo.

Até o momento pouco se sabe das relações entre nematódeos e moluscos, incluindo-se aí *A. costaricensis* e *B. glabrata*, que neste caso se deve à alta suscetibilidade deste molusco ao *A. costaricensis* e a facilidade de sua manutenção nos moluscários.

Diversos fatores podem determinar a suscetibilidade dos moluscos ao parasitismo. Entre os fatores podem ser citados os genéticos, os dependentes de ajustes fisiológicos, a linhagem, a carga parasitária, a temperatura e as condições alimentares, como sendo de grande importância para o sucesso da infecção (Richards, 1973; Nieman & Lewis, 1990).

Em nossos estudos houve um acentuado aumento de larvas de *A. costaricensis* em *B. glabrata* com 29 dias de infecção. Esse resultado, não se deve à maneira pelo qual os moluscos foram infectados (120 larvas). Após a infecção não foram constatadas larvas não penetrantes ou ingeridas. Foi observado que *B. glabrata* infectada com *A. costaricensis* vai aumentando a eliminação larval assim que o parasita vai atingindo a maturidade com 29 dias. A primeira muda da larva dentro do molusco, a deixa com pouca atividade e, após a 2ª muda, a larva atinge sua maturidade com grande atividade, que associada aos movimentos do molusco, provavelmente facilitam seu escape para o meio externo. Como relatado por Morera & Céspedes (1971b), a eliminação larval seria devido a um fenômeno acidental e

mecânico que com as contrações musculares do molusco, a cápsula perilarval proveniente da reação hemocitária se romperia e as larvas seriam eliminadas principalmente pela região onde se encontram as glândulas mucosas, através dos ductos glandulares associadas a sua secreção.

É importante ressaltar que as larvas recuperadas com 29 dias apresentavam grande atividade. Como verificado por Mendonça *et al.* (1999) a migração de larvas L₁ e L₃ é um processo ativo, sendo que as larvas L₂ se apresentam imóveis, envolvidas por um espaço perilarval. A grande atividade apresentada pelas larvas L₃, pode justificar o maior número de larvas recuperadas de *A. costaricensis* no 29º dia de infecção e a baixa recuperação aos 15 e 22 dias de infecção, uma vez que as larvas não estavam maduras neste período e em condições favoráveis no tecido do molusco.

Quando Morera (1973), descreveu pela primeira vez o ciclo de *A. costaricensis* na lesma *Vaginulus (Sarasimula) plebeius*, verificou que as larvas L₁ ao penetrarem no molusco, transformavam-se rapidamente e ocorria a primeira muda por volta do 4º dia após infecção. Segundo esse autor do 4º ao 10º dia essa transformação é muito nítida, visto que as larvas apresentam-se com maior acúmulo de grânulos lipídicos e se tornam mais espessas, dificultando a visualização dos órgãos internos das mesmas. A segunda muda (L₂ → L₃) foi observada a partir do 11º até o 14º dia. O mesmo autor relata que estas larvas atingem a maturidade por volta do 16º ao 19º dia, quando se tornam infectantes para os hospedeiros vertebrados.

Mendonça *et al.* (1999) em seu trabalho utilizando *Sarasimula marginata* infectada com *A. costaricensis* observaram um aumento no período da segunda muda (L₂ → L₃), o qual se estendeu até o 28º dia após infecção. De acordo com os autores, este evento pode

estar relacionado à baixa temperatura ambiente em que o experimento foi realizado, que correspondia aos meses mais frios do ano (maio, junho e julho).

No presente trabalho, foi utilizado molusco aquático e os resultados obtidos não foram os mesmos. A larva recuperada com quatro dias de infecção (figura 2 A) ainda era uma larva de 1º estágio, jovem, pouco ativa e já apresentava a retenção de grânulos lipídicos. Algumas diferenças quanto ao tamanho das larvas de 1º estágio, quando comparadas ao tamanho das larvas medidas por Morera (1973), foram observadas. De acordo com as afirmações do autor, na 1ª muda com quatro dias de infecção a larva atinge 0,3mm de comprimento, ou seja, 300µm por 20µm de largura. A larva recuperada com quatro dias de infecção possuía 204µm de comprimento e, com seis dias de infecção, possuía 228µm de comprimento por 14,99µm de largura. Esta diferença no tamanho foi percebida também com 10 dias em que as larvas medidas por Morera (370µm por 36µm) ainda eram maiores que as larvas por nós recuperadas em *B. glabrata* (343µm por 29µm).

A mudança de estágio das larvas de *A. costaricensis* em *B. glabrata* quando comparado com *Vaginulus (Sarasinula) plebeius* (Morera, 1973) foi mais tardia. Este fato provavelmente se deve a espécie de hospedeiro intermediário e mesmo pelo tamanho das larvas. Em nosso trabalho foi nítida a mudança para o 2º estágio (L₂) aos 13 dias após a infecção. Esta larva pode ser visualizada na figura 2 B, apresentando acúmulo por toda sua extensão de vacúolos de lipídios e cutícula residual.

Esse acúmulo de lipídios observado durante a mudança larval, possui grande importância para o seu desenvolvimento, visto que são substâncias essenciais para completar seu ciclo. Em larvas encapsuladas, a fonte energética utilizada é o lipídio

(Rey,1991). Em geral, as larvas de nematódeos, quando atingem o estágio infectante, não mais se alimentam, utilizando as reservas energéticas acumuladas durante a fase L₂.

Na figura 3 A, a transição de estágios L₂ → L₃ está demonstrada. A larva apresentava-se muito espessa, com maior adensamento de grânulos lipídicos no terço médio larval e rarefação desses grânulos nas extremidades, não sendo possível visualizar o esôfago e o intestino.

A mudança para o 3º estágio larval foi observada por volta do 18º dia após infecção (figura 3 B). Esta larva mostrou o início do aparecimento do esôfago e intestino, além das cutículas residuais de L₁ e L₂.

Pôde-se observar o completo desenvolvimento larval após o 20º dia de infecção. A partir daí, as larvas recuperadas apresentaram-se muito ativas, sendo possível a observação das asas laterais da cutícula, pouco visível pelo fato do acentuado crescimento, e novamente a visualização do esôfago e intestino (figura 4 A e 4 B).

Estas observações em *B. glabrata* foram semelhantes às de Ubelaker *et al.*(1980), com relação à emergência de larvas de 3º estágio de *A. costaricensis* provenientes de *B. glabrata*. Segundo esses autores, o segundo estágio de *A. costaricensis* em *B. glabrata*, ocorreu por volta do 15º e 16º dia de infecção e, após sete dias, as larvas amadureceram e emergiram dos moluscos.

Harris e Cheng (1975b) estudaram o processo de encapsulação em *B. glabrata* experimentalmente infectada com o metastrongilídeo *A. cantonensis*. Apesar de serem espécies diferentes, *A. costaricensis* apresenta muitas semelhanças com *A. cantonensis*. Foi verificado histologicamente, por esses autores, que a mudança do primeiro estágio para o segundo estágio larval de *A. cantonensis* se dá por volta do 11º dia após a infecção.

Lima *et al.* (1992b) observaram a suscetibilidade de moluscos do gênero *Biomphalaria* criados em laboratório ao *A. costaricensis* a partir de espécimes coletados na região metropolitana de Belo Horizonte (MG). Os autores evidenciaram que na infecção de *Biomphalaria glabrata*, individualmente com 300 larvas de *A. costaricensis*, nem todas as larvas recuperadas no processo de digestão do molusco, evoluíram para L₃ após o 25º dia de infecção e sim permaneciam ainda como L₂.

Comparando alguns aspectos de nossos resultados com a literatura (Morera,1973; Ubelaker *et al.*, 1980 e Mendonça *et al.*,1999) é possível sugerir que, como normalmente acontece nos demais ciclos de vida de helmintos que envolvem moluscos, as variações do desenvolvimento de *A. costaricensis* no molusco podem ser atribuídas à forma de infecção a que são submetidos os moluscos, seja pela quantidade de larvas utilizadas para a infecção ou se a infecção é individual ou em massa, ou outros fatores tais como: temperatura, tamanho, espécie do molusco e idade.

Segundo Mendonça *et al.* (1999) o desenvolvimento das larvas de *A. costaricensis* em *Sarasimula marginata* variou em consequência da baixa temperatura, ou seja, se tornou mais tardia a mudança de estágio (L₂ → L₃) dentro do molusco, que se deu por volta do 28º dia após a infecção e, às vezes, demorou até 40 dias para o aparecimento das larvas de 3º estágio. Esse dado é de importância prática principalmente na manutenção do ciclo em laboratório e na cautela da manipulação de *B. glabrata* infectada em aquários, como citam os autores Ubelaker *et al.*(1980).

Os processos de defesa em moluscos do gênero *Biomphalaria*, são de natureza celular, ou seja, células da hemolinfa reconhecem e reagem à invasão de materiais estranhos, mediante fagocitose e encapsulação. É possível que fatores humorais estejam

envolvidos nos mecanismos de defesa dos invertebrados, e que estimulem os granulócitos aumentando sua capacidade de fagocitose.

Cabe aqui ressaltar, a importância dos hemócitos circulantes em invertebrados na função além da defesa, tais como fagocitose ou encapsulação, na liberação de substâncias citotóxicas, transporte de cálcio nas situações de reparo tecidual e na produção de fator coagulante da hemolinfa (Lie *et al.*, 1987).

Foi verificado um número de hemócitos maior na hemolinfa dos moluscos não infectados do que nos moluscos infectados ($p=0,0304$).

Foi possível constatar uma significativa interação entre a infecção de *A. costaricensis* em *B. glabrata* e o número de hemócitos na hemolinfa dos moluscos. A infecção alterou tanto o número de hemócito como o tipo de hemócito. Em moluscos não infectados houve predominância de hialinócitos em comparação aos granulócitos (tabelas 3 e 4, figura 14) ($p=0,0025$). Aos quatro dias de observação o número de hialinócitos foi pequeno, em contrapartida houve aumento significativo aos 25 dias de observação. Comparando o número de granulócitos com os hialinócitos, em moluscos não infectados, o número de granulócitos foi semelhante em todos os períodos de observação ($p=0,7112$).

Menor número de hemócitos na hemolinfa dos moluscos infectados pode ser devido à migração dessas células para os tecidos, uma vez que foram observadas nos cortes histológicos larvas do *A. costaricensis* rodeadas por hemócitos (figuras 7, 8, 9, 10 e 11).

Em moluscos infectados foi observado que no início da infecção tanto granulócitos como hialinócitos apresentavam em valores baixos na hemolinfa (tabela 3 e 4, figura 15), provavelmente pela requisição destas células pelos tecidos nas funções de defesa, tais como: fagocitose, encapsulamento larvar, liberação de substâncias citotóxicas, reparação tecidual. Gradativamente o número de granulócitos aumentou sendo significativo aos 18,

21, 25 e 32 dias de infecção, enquanto o número de hialinócitos foi pequeno aos 4, 11 e 28 dias de infecção. Os hialinócitos poderiam estar contribuindo para o aumento de granulócitos se admitirmos que sejam células precursoras de granulócitos (Cheng & Auld, 1977). Como mencionado acima o declínio de hialinócitos foi percebido por volta do 11º dia de infecção, período este que corresponde à primeira muda da larva de *A. costaricensis*. Quando ocorre a 2ª muda, por volta do 18º dia de infecção, o número de hialinócitos aumentou de maneira significativa. Poderia ocorrer neste período uma maior síntese de hemócitos, visto que as larvas do parasita estão completando seu desenvolvimento e, conseqüentemente, as cápsulas de hemócitos em torno das larvas aumentam de tamanho, acompanhando o desenvolvimento larval. A necessidade de proteção e reparação tecidual produzida pela atividade larval provavelmente seria o motivo do seqüestro destas células da hemolinfa. Com a grande atividade das larvas infectantes de 3º estágio e sua tendência de abandonar o molusco, fica nítida a relação que ocorre com o decréscimo dos hemócitos, tanto hialinócitos como granulócitos, na hemolinfa por volta do 28º dia de infecção (figura 16).

Nos cortes histológicos, a presença de um grande número de hemócitos foi observado envolvendo as larvas de *A. costaricensis* (figuras 5 A, 6 B, 7 A, 8 A e B, 9 A e B, 10 A e B, 11 A e B)

Estes resultados estão de acordo com as observações feitas por muitos pesquisadores (Michelson, 1975; Granath & Yoshino, 1984; Santana *et al.*, 1985; Allegretti, 1994; Seta *et al.*, 1996) que visualizaram um rápido aumento no número de hemócitos em *B. glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*. Serrano *et al.* (2002) demonstraram que o número de granulócitos sofre um aumento na hemolinfa de *B. glabrata* já nas primeiras 72 horas após exposição ao *S. mansoni*. Lie & Heyneman (1976)

verificaram aumento de hemócitos em *B. glabrata* exposta a *Echinostoma lindoense* (Sandgroud & Bonne, 1940) e Balan *et al.* (1993) constataram aumento de hemócitos em *B. tenagophila*, parasitadas por *S. mansoni*.

Um grande número de hialinócitos foi observado na hemolinfa de moluscos não infectados (figuras 14 e 15). Nos moluscos infectados predominaram os granulócitos, indicando a participação dessas células nos mecanismos de defesa do molusco frente à infecção por *A. costaricensis*.

Podemos propor a hipótese de que com a infecção, os hialinócitos reagiram com antígenos larvares ou mesmo que estas células pudessem se transformar em granulócitos para mais eficientemente combater as larvas do parasita.

Reações teciduais decorrentes da presença de larvas em períodos pré-determinados nos moluscos foram observadas através de cortes histológicos seriados, corados pelo tricrômico de Gomori. Estes resultados foram de grande importância, pois foi possível estabelecer relação sobre o desenvolvimento do *A. costaricensis* e as reações hemocitárias. Algumas vezes a reação hemocitária estava presente, sem a visualização da larva, porém foi mais frequente a observação de larvas encapsuladas por intensa reação celular (figuras 8 e 10).

De acordo com diversos autores (Richards & Merritt 1967, Harris & Cheng 1975a), a reação hemocitária que envolve o parasita tem sido considerada como um processo de formação de cápsulas, ou de “granulomas” (Cheng & Garrabrant 1977), ou de massa de amebócitos (Conejo & Morera 1988), ou de “estruturas granulomatosas” (Pan, 1965; Souza *et al.* 1995, 1997).

O processo de encapsulação em *B. glabrata* infectada com *A. cantonensis* foi observado por Harris & Cheng (1975a). Os autores observaram que as larvas L₁

encontravam-se preferencialmente na região do pé do molusco e nas primeiras 24 horas de exposição já apresentavam reação de hemócitos em torno do parasita. Essa reação intensificava-se após seis dias. A cápsula assumia um aspecto arredondado, na sua parte externa, enquanto a interna apresentava um aspecto mais “frouxo”.

Segundo Mendonça *et al.*(1999) a reação em torno do *A. costaricensis* em *Sarasinula marginata* foi observada após duas horas de infecção, ao redor da larva, localizada preferencialmente na camada fibromuscular do corpo. A reação consistia inicialmente de hemócitos que envolviam a larva formando uma monocamada de células e, após formação de camadas subseqüentes, caracterizando a reação “pré-granulomatosa”. Estas lesões se organizaram em “granulomas”, formando extratos definidos: 1º extrato – formado de várias camadas concêntricas de hemócitos, e o 2º formado pelas células achatadas, semelhantes a fibroblastos, as quais, segundo a autora, constituem a pseudocápsula. Em seu trabalho as larvas sempre apareceram muito bem preservadas independentemente do estágio de desenvolvimento e parasitas degenerados não foram observados.

Como relatado por Richards & Merritt (1967) *B. glabrata* é capaz de servir como um hospedeiro intermediário de *A. cantonensis* e as larvas encapsuladas não são destruídas pela reação hemocitária. Harris & Cheng (1975a) também observaram que larvas de *A. cantonensis* não foram destruídas pelos hemócitos de *B. glabrata* e, ao contrário elas completaram com sucesso sua metamorfose apesar da rápida encapsulação.

Foi possível em nosso trabalho a observação de reações típicas granulomatosas, bem desenvolvidas constituídas por agregados compactos e organizados de hemócitos, mostrando ao redor fibroblastos. Essa reação foi observada tanto na presença da larva, como no 2º dia de infecção quando observamos reações sem a presença larval (figura 5 B).

Essa reação granulomatosa não afetou o desenvolvimento larval, favorecendo o seu desenvolvimento. Esse fenômeno já foi estudado e demonstra mais uma vez a utilização da resposta celular do hospedeiro pelo parasita, permitindo seu desenvolvimento e a perpetuação do seu ciclo de vida (Doenhoff *et al.* 1986; Damian, 1987; Lenzi *et al.*, 1997).

De acordo com as observações de Harris & Cheng (1975b) no interior das células que formam as cápsulas, existe uma alta concentração de fosfatase ácida, de β -glicosidase e de esterase não específica. Os autores acreditam que devido a esse alto nível de atividade enzimática, o processo de encapsulação seja altamente dinâmico e ativo e que uma possível explicação para a não destruição das larvas de *A. cantonensis* pela *B. glabrata* é que, por alguma razão, a concentração de hidrolases existentes nas células de encapsulação não é liberada na superfície do parasita, propiciando desta forma a sua sobrevivência. A cutícula dos nematódeos, em geral, possui uma estrutura complexa. É constituída na grande maioria de 75% de água, associada a proteínas, carboidratos e lipídios. Possivelmente, a cutícula deve contribuir de alguma forma para impedir a absorção da larva por fagocitose e propiciar o desenvolvimento do parasita.

Das 2160 larvas L₁ utilizadas na infecção de 18 moluscos para verificação de reações hemocitárias, apenas 729 larvas foram observadas nos cortes histológicos. A região mais parasitada foi a cefalopodal, seguida do intestino, rim e pulmão. Não foi constatada nenhuma larva restante nos frascos de infecção. Todos os moluscos sobreviveram à infecção e foram sacrificados somente no dia estipulado para estudo.

No presente trabalho encontramos poucas larvas com dois dias de infecção no trato digestivo (figura 13), a grande maioria estava localizada na região cefalopodal e demais órgãos. Todas as larvas já estavam envolvidas com reações hemocitárias. Provavelmente, o

menor número de larvas observado nos tecidos em relação ao número de larvas infectantes, deveu-se ao fato destas larvas serem eliminadas pelo molusco muito rapidamente, processo este que antecedeu o período de observação dos cortes histológicos com dois dias de infecção. As larvas que conseguiram transpor a membrana basal e se localizar em outras regiões foram aprisionadas pelas reações hemocitárias, sendo então visualizadas nos cortes histológicos.

A resposta para este fato talvez seria a atividade fagocitária dos hemócitos ou mesmo o rápido percurso das larvas que provavelmente foram ingeridas e passaram pelo tubo digestivo sendo eliminadas antes mesmo de serem visualizadas nos cortes histológicos. Mendonça *et al.* (1999) descreveram a via migratória das larvas de *A. costaricensis* em *Sarasinula marginata* e observaram esta seqüência a partir de 30 minutos de infecção. No início da infecção (30') as larvas L₁, após penetração oral, já se encontravam localizadas na luz do saco bucal, esôfago, glândula digestiva, papo, estômago e intestino. Após uma hora de infecção, as larvas L₁ encontravam-se localizadas nas mesmas regiões, porém, eventualmente, foram encontradas larvas no interior dos vasos periféricos. Com duas horas de infecção, as larvas, em sua maioria foram encontradas na luz do trato digestivo, começando a transpor a membrana basal e invadindo a camada conjuntiva dos órgãos. A partir de quatro horas de infecção o número de larvas diminuiu na luz do trato digestivo, sendo comum encontrá-las na musculatura. Com oito horas de infecção praticamente todas as larvas encontravam-se cercadas por reações celulares, independentes da sua localização.

Com dois dias de infecção, foi verificada em *B. glabrata* reações hemocitárias intensas (figura 5 B) sem a observação de larvas. Tal constatação, demonstra a imediata

capacidade de reação do molusco quando submetido à infecção pelo *A.costaricensis* na eliminação do parasita através do processo de encapsulamento e fagocitose.

Já nas primeiras horas de infecção houve um decréscimo de hemócitos na circulação que, provavelmente, contribuíram, além da encapsulação larval nos tecidos, também no processo de fagocitose e absorção das larvas. Não foi constatado em nenhum momento larvas mortas; sempre encontramos larvas vivas com reações intensas ou reações somente, sem a presença larval (figuras 5 A e B).

Foi constatada as duas vias de infecção tanto oral como percutânea (Figura 5 A). Pela observação e contagem de larvas nos cortes histológicos foi verificada maior quantidade de larvas na região cefalopodal do molusco. A presença de grande número de larvas nesta região pode indicar uma preferência pela infecção percutânea.

Uma pequena proporção de larvas foram detectadas no esôfago e saco bucal com dois, seis e nove dias de infecção.

Segundo Mendonça *et al.* (1999), a infecção oral em *Sarasinula marginata* foi constatada 30 minutos após a infecção, e após quatro horas de infecção estas larvas foram encontradas em outras localidades.

A rota preferida de infecção pelo nematódeo constatada no nosso trabalho foi a de invasão de regiões mais expostas através da infecção percutânea. Rapidamente estas larvas foram encapsuladas permanecendo na região cefalopodal ou migraram para outros órgãos. Em nenhum momento foram constatadas larvas dentro de vasos sangüíneos.

Como mencionado por Mendonça *et al.* (1999), provavelmente, o intestino e o rim façam parte da rota migratória de infecção oral. Em nossos experimentos muitas larvas foram encontradas no intestino e rim após o 16º dia de infecção. A presença de grande número de larvas em órgãos que compõem o sistema reprodutor, pode indicar um outro

local de preferência, além do tecido fibromuscular, para o desenvolvimento larval do *A. costaricensis*.

A invasão larval nos tecidos do molusco se dá por contato direto de órgão a órgão, através de ductos anátomo-fisiológicos ou da cavidade do corpo. Os órgãos invadidos funcionam como passagem para o habitat final, a camada fibromuscular; que é a preferida pelo parasita no processo de mudas, por possuir intensa vascularização, um exuberante tecido fibromuscular e abundância de células secretoras (Mendonça *et al.*, 1999).

Concluindo, confirmamos mais uma vez que a infecção de *B. glabrata* por *A. costaricensis* pode ser simultaneamente ativa e passiva. Essa infecção foi seguida de uma intensa mobilização de células hemocitárias, seguida de encapsulação larval. As larvas permaneceram vivas e completaram seu desenvolvimento no interior do molusco, sendo constatada a 2ª muda por volta do 13º dia e a 3ª muda a partir do 18º dia onde completaram seu desenvolvimento de preferência na região cefalopodal do molusco.

VII – Conclusões

□ Foi constatada maior recuperação larval em *B. glabrata* infectada com *A. costaricensis* no 29º dia de infecção.

□ Os estágios larvares de *A. costaricensis* no molusco *B. glabrata* foram observados no estudo. A transição de L₁ para L₂ (1ª muda) ocorreu no 13º dia de infecção e a transição de L₂ para L₃ (2ª muda) ocorreu no 18º dia de infecção.

□ Observou-se que ocorreu, simultaneamente, as duas vias de transmissão:

- Passiva – oral – pela ingestão da L₁ através do encontro de larvas no saco bucal, esôfago e intestino.
- Ativa – percutânea – a preferencial pelo parasita no molusco, através da região cefalopodal.

□ Nos moluscos não infectados o número de hemócitos na hemolinfa foi maior em relação aos moluscos infectados.

□ Nos moluscos não infectados pelo *A. costaricensis* o número de hialinócitos foi superior ao de granulócitos:

- A quantidade de hialinócitos foi pequena aos quatro dias de infecção e apresentou um aumento significativo no 25º dia de infecção;
- Estatisticamente os granulócitos apresentaram-se em número constante em todos os períodos observados.

□ Nos moluscos infectados pelo *A. costaricensis* o número de granulócitos foi superior ao de hialinócitos:

- Os granulócitos aumentaram gradativamente, sendo percebido um maior número a partir do 18º dia de infecção;

- A quantidade de hialinócitos no 4º, 11º e 28º dia de infecção foi pequena e aumentou no 18º e 32º dia de infecção.

□ De acordo com o estudo histológico e estatístico, as localidades mais parasitadas foram:

- Região cefalopodal;
- Intestino;
- Rim;
- Pulmão.

□ Todas as larvas encontradas nos moluscos estavam vivas e rodeadas por intensa reação hemocitária.

□ Ocorreram apenas duas manifestações de reações hemocitárias intensas, sem a presença do parasita.

□ A reação presente no molusco em torno da larva de *A. costaricensis* é do “tipo granulomatosa”, com presença de hemócitos circundando as larvas assumindo aspecto tipo-fibroblasto, constituindo camadas de células bem distintas.

VIII – Referências bibliográficas

Agostini AA, Peixoto A, Caleffi AL, Dexhaimer A, Camargo RR 1983. Angiostrongilíase abdominal. Três casos observados no Rio Grande do Sul. *Rev Ass Méd Rio Grande do Sul* 27: 200-203.

Alegretti SM 1994. *Estudo da ação dos componentes celulares e não celulares da hemolinfa de B. glabrata melânica na infecção por Schistosoma mansoni*. Campinas. Tese (Doutoramento) UNICAMP. Instituto de Biologia.

Alicata JE 1991. The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis. *Parasitol Today* 7: 151-153.

Ayala M 1987. Angiostrongiloidose abdominal nos estados do Paraná e Santa Catarina: apresentação de cinco casos e revisão da literatura. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 8: 29-36.

Baiard JK, Neafie RC, Lanoie L, Connor DH 1987. Abdominal angiostrongylosis in an African man: case study. *Am J Trop Med Hyg* 37: 352-356.

Balan DSL, Magalhães LA, Piedrabuena AE 1993. Aspectos imunológicos e parasitológicos em *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* e outros Digenea. *Rev Saúde Pública* 27(6): 421-429.

Barbosa H, Raick AN, Magalhães AV, Otero PMF 1980. Angiostrongilose abdominal. *Rev Ass Méd Bras* 226:178-180.

Bayne CJ 1990. Phagocytosis and non self recognition in invertebrates. *Bio Science* 40(10): 723-731.

Bonetti VCBDO, Graeff-Teixeira C 1998. *Angiostrongylus costaricensis* and the intermediate hosts: observations on elimination of L₃ in the mucus and inoculation of L₁ through the tegument of molluscs. *Rev Soc Bras Med Trop* 31(3): 289-294.

Bride M, Barre P, Griffond B 1986. Fibronectin and ovotests development in the snail *Helix aspersa*: comparative immunology. *Dev Comp Immunol* 10: 177.

Céspedes R, Salas J, Mekbel S, Troper L, Mullner F, Morera P 1967. Granulomas entéricos y linfáticos com intensa eosinofilia tisular producidos por un estrongilídeo (Strongylata). *Acta Médica Cost* 10(3): 235-255.

Cheng TC, Auld KR 1977. Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. *J Invertebr Pathol* 30: 119-122.

- Cheng TC, Garrahan TA 1977. Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 77: 467-472.
- Conejo ME, Morera P 1988. Influência de la edad de los veronicelideos en la infección con *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev Biol Trop (S. José)* 36(2B): 519-526.
- Damian RT 1987. The exploitation of host immune responses by parasites. *J Parasitol* 73: 3.
- Dikkeboom R, Van Der Knaap WPW, Meuleman E, Sminia T 1984. Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res* 238: 43-47.
- Dikkeboom R, Tunagel JMGH, Mulder EC, Van Der Knaap WPW 1987. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. *J Invertebr Pathol* 49: 321-331.
- Dikkeboom R, Van Der Knaap WPW, Van Den Bovenkamp W, Tunagel JMGH, Bayne CJ 1988. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. *Dev Comp Immunol* 12: 509-520.
- Doenhoff MJ, Hassounah O, Murare H, Bain J, Lucas S 1986. The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 503-514.
- Gerichter CB 1948. Observations on the life history of lung nematodes using snails intermediate hosts. *Am J Vet Res* 9: 109-112.
- Guaraldo AMA, Magalhães LA, Rangel HA, Pareja G 1981. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). *Rev Saúde Pública* 15: 436-448.
- Graeff-Teixeira C, Thomé JW, Pinto SC, Camillo-Coura L, Lenzi H 1989. *Phyllocaulis variegatus* an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 65-68.
- Graeff-Teixeira C, Ávila-Pires FD, Machado RCC, Camillo-Coura L, Lenzi HL 1990. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros intermediários do *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 32: 147-150.
- Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL 1991a. Histopathological criteria for the diagnosis on abdominal angiostrongyliasis. *Parasitol Res* 77: 606-611.

- Graeff-Teixeira C, Camillo-Coura L, Lenzi HL 1991b. Clinical and Epidemiological studies on abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 33: 375-380.
- Granath Jr WO, Yoshino TP 1983. Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. *J Exp Zool* 226: 205-210.
- Granath Jr WO, Yoshino TP 1984. *Schistosoma mansoni*: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Expl Parasitol* 58: 188-193.
- Harris KR, Cheng TC 1975a. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*. Light microscopy. *Int J Parasitol* 5: 521-528.
- Harris KR, Cheng TC 1975b. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with metastrongylid *Angiostrongylus cantonensis*. Enzyme histochemistry. *J Invertebr Pathol* 26: 367-374.
- Jindrak K, Alicata JE 1970. Angiostrongylosis in the Pacific and Southeast Asia.. Springfield, C. C. Thomas.
- Kock C, Nielsen HE 1984. Activation of vertebrate complemente by *Helix pomatia* hemolymph. *Dev Comp Immunol* 8: 15-19.
- Lenzi HL, Pacheco RG, Pelajo-Machado M, Panasco MS, Romanha WS, Lenzi JA 1997. Immunological system and *Schistosoma mansoni*: co- evolutionary immunobiology. What is the eosinophil role in parasite – host relationship? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92 (Supl. II): 19-32.
- Lie KJ, Heyneman D, Yan P 1975. The origen of amoebocytes in *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 63(3): 574-576.
- Lie KJ, Heyneman D 1976. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata* Snails. *J Parasitol* 62(1): 51-58.
- Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D 1987. Molluscan host reactions to helminthic infection. Imune Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis. Vol. IV: Protozoa, Arthropodes and Invertebrates. Cap. 07. Ed. C.R.C. Press, INC. Florida, USA..
- Lima LC, Massara CL, Souza CP, Jannoti-Passos LK, Lenzi HL 1992^a. *Sarasinula marginata* (Semper, 1885) (Mollusca, Soleolifera) de Belo Horizonte (MG, Brasil) como hospedeira intermediária potencial do *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 34(2): 117-120.

- Lima LC, Massara CL, Souza CP, Vidigal TD, Lenzi HL, Carvalho OS 1992b. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (nematoda, Angiostrongylidae). *Rev Inst Méd Trop S Paulo* 34(5): 399-402.
- Loker ES, Bayne CJ 1986. *Immune mechanisms in invertebrate vectors*. Lackie A. Ed., Clarendon Press, 199-220.
- Machado SMPR 1990. *Estudo da ação da hemolinfa no mecanismo de defesa de Biomphalaria ternagophila* (Orbigny, 1835). Campinas Tese (Mestrado) Unicamp - Instituto de Biologia.
- Magalhães AV, Andrade GE, Koh IHJ, Soares MC, Alves E, Tubino P, Santos FAM, Raick AN 1982. Novo caso de Angiostrongilose Abdominal. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 24(4): 252-256.
- Malek EA 1981. Presence of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971 in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 30: 81-83.
- Matricon-Gondran M, Letocart M 1999. Internal Defenses of the Snail *Biomphalaria glabrata*. III. Observations on Tubular Helical Filaments Induced in the Hemolymph by Foreign Material. *J Invertebr Pathol* 74: 248-254.
- Mendonça CLG, Carvalho OS, Mota EM, Pelajo-Machado M, Caputo LFG, Lenzi HL 1999. Penetration Sites and Migratory Routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the Experimental Intermediate Host (*Sarasimula marginata*). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(4): 549-556.
- Michelson EH 1966. Specificity of hemolymph antigens in taxonomic discrimination of medically snail. *J Parasitol* 52(3): 466-472.
- Michelson EH 1975. *Celular defense mechanisms and tissue alterations in gastropod molluscs*, in: *Invertebrate Immunity* (K. Maramorosch and R. E. Shope, eds.) Academic Press, New York, 181-195.
- Monge E, Arroyo R, Solano E 1978. A new definitive natural host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera y Céspedes, 1971). *J Parasitol* 64: 34.
- Morera P, Ash LR 1971. Investigación del hésped intermediario de *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Céspedes, 1971). *Bol Chileno Parasitol* 25: 135.
- Morera P, Céspedes 1971a. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongylidae) a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 18: 173-185.

Morera P, Céspedes 1971b. Angiostrongilosis abdominal. Una nueva parasitosis humana. *Acta Med Costa* 14(3): 159-173.

Morera P 1973. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971. *Am J Trop Med Hyg* 22: 613-621.

Niemann GM, Lewis FA 1990. *Schistosoma mansoni*: Influence of *Biomphalaria glabrata* size on susceptibility to infection and resultant cercarial production. *Exp Parasitol* 70: 286-292.

Ottaviani E, Franchini A 1988. Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L). (Gastropoda, Pulmonata). *Acta Zoo* 69(3): 157-162.

Pan CT 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am J Trop Med Hyg* 14: 931-976.

Pan CT 1996. *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. *J Med Sci Biol* 49 (4): 129-149.

Pena GP, Andrade Filho JS, Assis SC 1995. *Angiostrongylus costaricensis*: First record of its occurrence in the state of Espírito Santo, Brazil, and a review of its geographic distribution. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 37(4): 369-374.

Ratcliffe NA 1985. Invertebrate Immunity-A primer for the uow specialist (review). *Immunology Letters* 10: 253-270.

Renwanz L, Cheng TC 1957. Identification of agglutinin receptors on hemocytes of *Helix pomatia*. *J Invertebr Pathol* 29: 97-100.

Rey L 1991. Parasitologia 2 ed. Ed Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 731.

Richards CS, Merritt JW 1967. Studies on *Angiostrongylus cantonensis* in molluscan intermediate hosts. *J Parasitol* 53: 382-388.

Richards CS 1973. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am J Trop Med Hyg* 22(6): 748-756.

Richards EH, Renwanz LR 1991. Two lectins on surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca^{2+} - dependent, GalNac - specific lectin and Ca^{2+} - independent, mannose 6 - phosphate - specific lectin which recognises activated homologous opsonins. *J Comp Physiol* 161: 43-54.

Rocha A, Sobrinho JM, Salomão LC 1991. Angiostrongilíase abdominal. Primeiro relato de caso autóctone de Minas Gerais. *Rev Soc Bras Med Trop* 24: 265-268.

Rodriguez R, Agostini AA, Porto SM, Olivaes AJO, Branco SL, Genro JP, Laitano AC, Maurer RL, Graeff-Teixeira C 2002. Dogs may be a reservoir host for *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 44(1): 1-5.

Santana JV, Magalhães LA, Rangel HA 1985. *Quantificação da atividade fagocitária de amebócitos de moluscos Biomphalaria glabrata livres de infecção e infectados por Schistosoma mansoni*. In Congresso da Soc Bras Méd Trop 21º, Baliero Edit., Resumo nº 58. São Paulo.

Santos CP 1985. Redescritção de *Angiostrongylus (Parastrongylus) costaricensis* iso lado de novo hospedeiro silvestre, *Proechimys sp*, na Venezuela (Metastrongyloidea, Angiostrongylidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 81-83.

Serrano DR, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Carvalho JF 2002. The influence of Hydrocortisone on Cellular Defence Mechanisms of *Biomphalaria glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (6): 881-885.

Seta L, Magalhães LA, Carvalho JF 1996. Comportamento de amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni*, inoculação de tinta nanquim e fratura da concha. *Rev Saúde Pública* 30(4): 332-340.

Sima P, Vetvicka V 1990. *Evolution of Immune Reactions* - 1ª edição – CRC Press, inc. Boca Taton, Flórida - USA.

Sly DL, Toft JD, Gardier CH 1982. London WT. Spontaneous occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* marmosets (*Saguinus mystax*). *Lab Anim Sci* 32: 286-288.

Sminia T, Van Der Knaap WPW 1987. Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev Comp Immunol* 11: 17-28.

Sminia T 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studies by the electrons microscopy and enzyme histochemistry. *Z Zellforsch* 13: 497-526.

Sminia T, Borghart-Reinders E, Van de Linde AW 1974. Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res* 153: 307-326.

Souza CP, Borges CC, Santana AG, Andrade ZA 1995. Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 517-522.

Souza CP, Cunha RCP, Andrade ZA 1997. Development of *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev Inst Med Trop* 37: 201-206.

Tesh RB, Ackerman LJ, Dietz WH, Williams JA 1973. *Angiostrongylus costaricensis* in Panamá. Prevalence and pathological findings in wild rodents infected with the parasite. *Am J Trop Med Hyg* 22: 348-356.

Thiengo SC, Amato SB, Aventino A, Araújo JLB 1993. Estudo sobre os hospedeiros intermediários do *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *Rev Bras Parasitol Ver 2 (supl 1)*: 64.

Thiengo SC 1995. Técnicas malacológicas In *Manual de Malacologia Médica*. F.S.Barbosa (Organizador), Ed. FIOCRUZ, (no prelo).

Thiengo SC 1996. Mode of Infection *Sarasimula marginata* (Mollusca) with larvae of *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 277-278.

Tripp MR 1961. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *J Parasitol* 47: 745-751.

Ubelaker JE, Hall NM 1979. First report of *Angiostrongylus costaricensis*. Morera and Céspedes, 1971 in the United States. *J Parasitol* 65: 307.

Ubelaker JE, Bullick GR, Caruso J 1980. Emergence of third - stage larvar of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes 1971 from *Biomphalaria glabrata* (Say). *J Parasitol* 66(5): 856-857.

Van Der Knaap WPW, Boerrigter-Barendsen LH, Hoeven Van Der DSP, Sminia T 1981. Immunocytochemical demonstration of a humoral defence factor in blood cells (amoebocytes) of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res* 219: 291-296.

Van Der Knaap WPW, Loker ES 1990. Immune Mechanism in Trematode-snail Interactions. *Parasitol Today* 6(6):175-182.

Wagge LE 1955. Amoebocytes. *Cytology* IV: 31-78.

Wallace GD, Rosen L 1969. Thecniques for recovering and identifying a larvae of *Angiostrongylus cantonensis* from molluscs. *Malacol* 7(2-3): 427-438.

Yoshino TP, Granath Jr WO 1985. Surface antins of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes. Functional heterogeneity in cel populations recognized by a monoclonal antibody. *J Invertebr Pathol* 45: 174-186.

Ziliotto Jr A, Kunzle JE, Rusfernandez LA, Prates-Campos JC, Britto-Costa R 1975. Angiostrongilíase: apresentação de um provável caso. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 17: 312-318.

IX – Apêndice estatístico

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

REALIZADA PELO

PROF. DR. ARÍCIO XAVIER LINHARES

1) Análise estatística referente à distribuição de larvas de *A. costaricensis* por região no molusco *B. glabrata*.

```

The GLM Procedure

Class Level Information

Class          Levels   Values
loc              5    CEF INT OUTROS PUL RIM
dia              9    13 16 2 20 23 27 30 6 9

Number of observations    270

The SAS System

The GLM Procedure

Dependent Variable: freq

Source          DF          Sum of Squares    Mean Square    F Value
Model              44      12255.01818        278.52314        13.00
Error             225      4821.68182         21.42970
Corrected Total   269      17076.70000

Source          Pr > F
Model              <.0001
Error
Corrected Total

R-Square      Coeff Var      Root MSE      freq Mean
0.717646      171.4527      4.629222      2.700000

Source          DF      Type I SS      Mean Square    F Value
loc              4      9567.412121      2391.853030      111.61
dia              8      247.800000       30.975000        1.45
loc*dia          32      2439.806061       76.243939        3.56

Source          Pr > F
loc              <.0001
dia              0.1787
loc*dia          <.0001

Source          DF      Type III SS      Mean Square    F Value
loc              4      9567.412121      2391.853030      111.61
dia              8      845.329517       105.666190        4.93
loc*dia          32      2439.806061       76.243939        3.56

Source          Pr > F

```

```

loc          <.0001
dia          <.0001
loc*dia      <.0001

```

The SAS System

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

```

Alpha          0.05
Error Degrees of Freedom    225
Error Mean Square    21.4297
Harmonic Mean of Cell Sizes    22

```

NOTE: Cell sizes are not equal.

Number of Means	2	3	4	5
Critical Range	2.750	2.895	2.992	3.063

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	loc
A	24.222	18	CEF
B	5.556	18	INT
B			
C	4.278	18	RIM
C			
C	1.722	18	PUL
D			
D	0.429	198	OUTROS

2) Análise estatística do número de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata* exposta ao *A. costaricensis*

```

The GLM Procedure

Class Level Information

Class          Levels      Values
trat            2      INF NINF
dia             9      11 14 18 21 25 28 32 4 7
tipo            2      G H

Number of observations      180

The SAS System

The GLM Procedure

Dependent Variable = freq

Source          DF          Sum of Squares      Mean Square      F Value
Model            27          349272.744          12936.028          1.79
Error            152          1097366.500           7219.516
Corrected Total  179          1446639.244

Source          Pr > F
Model            0.0150
Error
Corrected Total

R-Square          Coeff Var      Root MSE      freq Mean
0.241437          96.28678      84.96774      88.24444

Source          DF          Type I SS      Mean Square      F Value
trat            1          75809.0889      75809.0889      10.50
dia             8          73372.3444      9171.5431       1.27
tipo            1          7220.0000      7220.0000       1.00
trat*dia        8          25658.2111      3207.2764       0.44
trat*tipo        1          117045.0000     117045.0000     16.21
dia*tipo        8          50168.1000      6271.0125       0.87

Source          Pr > F
trat            0.0015 - significativa
dia             0.2629
tipo            0.3189
trat*dia        0.8927
trat*tipo       <.0001 - significativa
dia*tipo        0.5445

```

3) Análise estatística dos dados referente ao número de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata* não exposta ao *A. costaricensis*.

```

The GLM Procedure

Class Level Information

Class          Levels    Values
trat            2      INF NINF
dia             9      11 14 18 21 25 28 32 4 7
tipo            2      G H

Number of observations    180

The SAS System

The GLM Procedure

Dependent Variable: lfreq

Source          DF          Sum of Squares    Mean Square    F Value
Model              10        20.9705122        2.0970512        1.68
Error             169        211.4894005        1.2514166
Corrected Total   179        232.4599127

Source          Pr > F
Model              0.0900
Error
Corrected Total

R-Square         Coeff Var      Root MSE    lfreq Mean
0.090211         28.17251      1.118667      3.970776

Source          DF      Type I SS      Mean Square    F Value
trat              1      5.96650574      5.96650574      4.77
dia              8     14.56132096      1.82016512      1.45
tipo              1      0.44268552      0.44268552      0.35

Source          Pr > F
trat              0.0304 - significativa
dia              0.1775
tipo              0.5528

```

- tratamento = não infectado

tipo = granulócito

----- trat=NINF tipo=G -----

The GLM Procedure

Dependent Variable : freq

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	8	54914.0000	6864.2500	0.67
Error	36	366868.8000	10190.8000	
Corrected Total	44	421782.8000		

Source	Pr > F
Model	0.7112 - não foi significativa
Error	
Corrected Total	

----- trat=NINF tipo=G -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	10190.8

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9
Critical Range	129.5	136.1	140.5	143.6	145.9	147.8	149.3	150.6

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	dia
A	142.80	5	32
A			
A	125.60	5	4
A			
A	113.40	5	14
A			
A	106.60	5	11
A			
A	91.40	5	21
A			
A	83.00	5	7
A			
A	68.80	5	28
A			
A	43.40	5	18
A			
A	31.40	5	25

- tratamento = não infectado tipo = hialinócito

----- trat=NINF -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: lfreq

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	9	24.3343850	2.7038206	1.87
Error	80	115.5184236	1.4439803	
Corrected Total	89	139.8528085		

Source Pr > F

Model 0.0681

Error

Corrected Total

R-Square	Coeff Var	Root MSE	lfreq Mean
0.174000	28.93579	1.201657	4.152840

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
dia	8	10.24532390	1.28066549	0.89
tipo	1	14.08906105	14.08906105	9.76

Source Pr > F

dia 0.5314

tipo 0.0025 - significativa

----- trat=NINF tipo=H -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	12432.26

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9
Critical Range	143.0	150.4	155.1	158.6	161.2	163.2	164.9	166.3

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	dia
A	238.00	5	25
A			

B	A	152.20	5	32
B	A			
B	A	139.00	5	7
B	A			
B	A	118.40	5	14
B	A			
B	A	117.80	5	18
B	A			
B	A	116.00	5	28
B	A			
B	A	112.60	5	11
B	A			
B	A	106.40	5	21
B				
B		51.00	5	4

4) Análise estatística dos dados referente ao número de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata* exposta ao *A. costaricensis*.

----- tipo=G -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for lfreq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not
the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	80
Error Mean Square	1.505104

Number of Means	2
Critical Range	.5147

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	trat
A	4.2836	45	INF
B	3.7572	45	NINF

----- trat=INF -----

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
dia	9	11 14 18 21 25 28 32 4 7
tipo	2	G H

Number of observations 90

The SAS System

----- trat=INF -----

The GLM Procedure

Dependent Variable= lfreq

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value
Model	9	44.33294399	4.92588267	9.31
Error	80	42.30765447	0.52884568	
Corrected Total	89	86.64059846		

Source	Pr > F
Model	<.0001
Error	
Corrected Total	

R-Square	Coeff Var	Root MSE	lfreq Mean
0.511688	19.19432	0.727218	3.788712

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value
dia	8	22.29478864	2.78684858	5.27
tipo	1	22.03815535	22.03815535	41.67

Source	Pr > F
dia	<.0001 - significativa
tipo	<.0001 - significativa

-tratamento = infectado tipo = granulócito

----- trat=INF tipo=G -----

The GLM Procedure

Duncan's Multiple Range Test for freq

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	36
Error Mean Square	4676.622

Number of Means	2	3	4	5	6	7	8	9
Critical Range	87.7	92.2	95.1	97.3	98.9	100.1	101.1	102.0

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	dia
A	146.00	5	21

