

DEBORAH REGINA SERRANO

ACÇÃO DA HIDROCORTISONA NO DESENVOLVIMENTO DE

Schistosoma mansoni EM *Biomphalaria glabrata*

Este exemplar corresponde à relação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Deborah Regina Serrano
e aprovada pela Comissão Julgadora

29/09/98 *Agmag-*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia,
Depto. de Parasitologia da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Biológicas,
Área de Concentração Parasitologia
Concentração Parasitologia.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães

CAMPINAS/S.P.

1998

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TIJUNICAMP
	S68a
V.º	35 506
P.º	395/98
	0 K
P.º	R\$ 11,00
DATA	22/10/98
N.º CPD	

CM-00117469-B

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Serrano, Debora Regina

S68a Ação da hidrocortisona no desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* EM *biomphalaria glabrata*/Deborah Regina Serrano. --
Campinas, SP: [s.n.], 1998.
112f.:ilus.

Orientadora: Eliana Maria Zanotti Magalhães

Co-orientador: Luiz Augusto Magalhães

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1.Biomphalaria glabrata. 2.Schistosoma mansoni. 3.Hidroocortisona.
I. Magalhães, Eliana Maria Zanotti. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Titulo.

CAMPINAS, 29 DE SETEMBRO DE 1998.

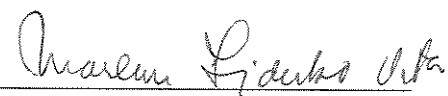
BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

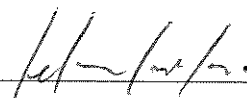
Prof. Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães


Assinatura

Prof. Dra. Marlene Tiduko Ueta


Assinatura

Prof. Dra. Selma Giorgio


Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dra. Silmara Marques Allegretti

Assinatura

AGRADECIMENTOS

A Deus Nosso Pai pela força que sempre me foi dada para a conquista de meu objetivo.

Aos meus pais, em especial, por toda a força, apoio e incentivo à minha luta tanto nesta como em tantas outras situações.

Ao Instituto de Biologia da UNICAMP, Departamento de Parasitologia, pela oportunidade e recursos para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de estudo.

A Prof^ª. Dra. Eliana Maria Zanotti Magalhães pela oportunidade que me deu de levar à frente este projeto e pela orientação oferecida.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães pela contribuição fundamental tanto no projeto quanto no desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. José de Carvalho pela realização da análise estatística.

Aos Prof. Drs. participantes do exame de qualificação (Nelson, Odair, Marlene) e aos componentes da pré-banca (Marlene, Silmara, Selma) pelas sugestões.

A todos os professores do Departamento de Parasitologia, em especial Prof^ª. Dra. Marlene Tiduko Ueta e Prof^ª. Dra. Urara Kawazoe amizade e apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Parasitologia, Ivo, Rubens, João, Sr. Geraldo, Marina, Sirene, Daniel, Nilson, Andrea, Mariclen, Neusa, Margareth, por todo o apoio, incentivo e ajuda nas atividades laboratoriais, nas de ordem informática, etc.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pertencentes ou não à minha turma, pela amizade, apoio, incentivo e colaboração em geral sempre que por mim solicitada; agradeço em especial a Alcione, Angélica, Edson, Eleuza, Fabíola, Guido, Jandui, Marcelo, Maria, Maria Cristina, Marisa, Odair, Patrícia, René, Sérgio, Simone.

Aos meus irmãos Josely, Simone, Ricardo, Fabiana, Luciano e Paulo, à Izildinha, ao Carlos, à Alexandra e a tantos outros parentes e amigos pela vibração positiva a meu favor, visando o sucesso deste trabalho.

Ao Dr. Lindomar dos Santos Franco pelo acompanhamento médico a mim dispensado nos últimos 11 anos.

Ao Dr. Fernando Antonio Barreiro pela contribuição na pesquisa bibliográfica.

Tenha firmeza em suas atitudes e persistência em seu ideal. Mas seja paciente, não pretendendo que tudo lhe chegue de imediato. Há tempo para tudo. E tudo o que é seu virá às suas mãos, no momento oportuno. Saiba esperar o momento exato em que receberá os benefícios que pleiteia. Aguarde com paciência que os frutos amadureçam para que possa apreciar devidamente sua doçura.

C. TORRES PASTORINO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	15
MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
1- Planejamento experimental.....	16
2- Manutenção em laboratório de <i>Biomphalaria glabrata</i> e tratamento com hidrocortisona.....	19
3- Infecção de moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i> com <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e determinação da taxa de infecção.....	20
4- Sobrevivência dos moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i>	21
5- Verificação do número de cercárias liberadas pelos moluscos.....	21
6- Contagem diferencial dos amebócitos circulantes na hemolinfa dos moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i>	22
7- Verificação de reação amebocitária em torno dos esporocistos.....	23
7.1- Preparação de lâminas com cortes histológicos.....	23
7.2- Observação dos esporocistos nos cortes histológicos.....	24
RESULTADOS	
1- Sobrevivência dos moluscos.....	25
2- Infecção de moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i> por <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH.....	28
3- Número de cercárias eliminadas pelos moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i>	30
4- Número de amebócitos circulantes na hemolinfa dos moluscos <i>Biomphalaria glabrata</i>	33
5- Reação amebocitária em torno dos esporocistos.....	44
DISCUSSÃO.....	76
CONCLUSÃO.....	87
SUMMARY.....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-.....	26
Número de moluscos sobreviventes nos Grupos I, II, III e IV	
TABELA 2-.....	29
Número de moluscos positivos dos Grupos III e IV verificados semanalmente	
TABELA 3-	29
Taxa de infecção dos moluscos tratados (Grupo IV) ou não (Grupo III) com hidrocortisona e expostos ao <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH	
TABELA 4-	31
Número de cercárias eliminadas a cada semana por moluscos do Grupo III	
TABELA 5-	32
Número de cercárias eliminadas a cada semana por moluscos do Grupo IV	
TABELA 6-	36
Número médio de amebócitos circulantes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> não infectada e não submetida ao tratamento com hidrocortisona (Grupo I)	
TABELA 7-	37
Número médio de amebócitos circulantes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> não infectada e tratada com hidrocortisona (Grupo II)	
TABELA 8-	38
Número médio de amebócitos circulantes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> e não tratada com hidrocortisona (Grupo III)	
TABELA 9-	39
Número médio de amebócitos circulantes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratada com hidrocortisona (Grupo IV)	

TABELA 10-.....	49
Número de esporocistos primários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e não tratada com hidrocortisona (Grupo III)	
TABELA 11-	50
Número médio de esporocistos primários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e não tratada com hidrocortisona (Grupo III)	
TABELA 12-	51
Número de esporocistos primários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e tratada com hidrocortisona (Grupo IV).	
TABELA 13-	52
Número médio de esporocistos primários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e tratada com hidrocortisona (Grupo IV).	
TABELA 14-	61
Reação amebocitária em torno dos esporocistos primários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e não tratada com hidrocortisona (Grupo III).	
TABELA 15-	62
Avaliação da reação amebocitária em torno dos esporocistos primários de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH presentes em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios e não tratada com hidrocortisona (Grupo III).	

TABELA 16-.....	63
Reação amebocitária em torno de esporocistos primários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e tratada com hidrocortisona (Grupo IV).	
TABELA 17-	64
Avaliação da reação amebocitária em torno dos esporocistos primários de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH presentes em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios e tratada com hidrocortisona (Grupo IV).	
TABELA 18-	72
Presença de esporocistos secundários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e não tratada com hidrocortisona (Grupo III).	
TABELA 19-	73
Presença de esporocistos secundários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e tratada com hidrocortisona (Grupo IV).	
TABELA 20-	74
Avaliação dos esporocistos secundários, quanto à maturidade, presentes em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e não tratada com hidrocortisona (Grupo III).	
TABELA 21-	75
Avaliação dos esporocistos secundários, quanto à maturidade, em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídios de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e tratada com hidrocortisona (Grupo IV).	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-.....	27
Moluscos sobreviventes nos Grupos I (não infectados, não tratados), II (não infectados, tratados com hidrocortisona), III (infectados, não tratados) e IV (infectados, tratados com hidrocortisona).	
FIGURA 2-.....	35
Granulócitos na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH. Contraste e fase. 430X.	
FIGURA 3-.....	35
Hialinócito na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH. Contraste e fase. 430X.	
FIGURA 4-.....	40
Número médio de granulócitos circulantes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> não exposta ao <i>Schistosoma mansoni</i> e tratada ou não com hidrocortisona (Grupos II e I, respectivamente).	
FIGURA 5-.....	41
Número médio de granulócitos circulantes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratada ou não com hidrocortisona (Grupos IV e III, respectivamente).	
FIGURA 6-.....	42
Número médio de hialinócitos circulantes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> não exposta à infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratada ou não com hidrocortisona (Grupos II e I, respectivamente).	

FIGURA 7-.....	43
Número médio de hialinócitos circulantes na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> infectada por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratada ou não com hidrocortisona (Grupos IV e III, respectivamente).	
FIGURA 8-.....	53
Número médio de esporocistos primários observados em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i> e não tratada com hidrocortisona (Grupo III).	
FIGURA 9-.....	54
Número médio de esporocistos primários observados em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i> e tratada com hidrocortisona (Grupo IV).	
FIGURA 10-.....	55
Número médio de esporocistos primários viáveis observados em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i> , tratada ou não com hidrocortisona (Grupos IV e III, respectivamente).	
FIGURA 11-.....	56
Número médio de esporocistos primários degenerados observados em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i> , tratada ou não com hidrocortisona (Grupos IV e III, respectivamente).	
FIGURA 12-	57
Corte histológico da região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> não tratada com hidrocortisona (Grupo III) 3,5 dias após a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> .	
FIGURA 13-.....	58
Corte histológico da região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> tratada com hidrocortisona (Grupo IV) 3,5 dias após a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> .	

FIGURA 14-.....	59
Corte histológico da região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> não tratada com hidrocortisona (Grupo III) 4 dias após a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> .	
FIGURA 15-.....	60
Corte histológico da região cefalopodal de <i>Biomphalaria glabrata</i> tratada com hidrocortisona (Grupo IV) 5 dias após a infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> .	
FIGURA 16-.....	65
Reação amebocitária em torno dos esporocistos primários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e não tratada com hidrocortisona (Grupo III).	
FIGURA 17-.....	66
Reação amebocitária em torno dos esporocistos primários em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e tratada com hidrocortisona (Grupo IV).	
FIGURA 18-.....	67
Número médio de esporocistos primários com reação amebocitária ao seu redor, encontrados em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e tratada ou não com hidrocortisona (Grupos IV e III, respectivamente)	
FIGURA 19-.....	68
Número médio de esporocistos primários sem reação amebocitária ao seu redor, encontrados em <i>Biomphalaria glabrata</i> exposta a 100 miracídeos de <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem BH e tratada ou não com hidrocortisona (Grupos IV e III, respectivamente).	

FIGURA 20-.....	69
-----------------	----

Corte histológico do ovotestis de *Biomphalaria glabrata* tratada com hidro cortisona (Grupo IV) 10 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*.

FIGURA 21-.....	70
-----------------	----

Corte histológico do ureter de *Biomphalaria glabrata* não tratada com hidro cortisona (Grupo III) 31 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*.

FIGURA 22-.....	71
-----------------	----

Corte histológico do tentáculo de *Biomphalaria glabrata* tratada com hidro cortisona (Grupo IV) 31 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*.

RESUMO

Os corticosteróides, hormônios do córtex da supra-renal com formação esteróide ou composto qualquer que possua atividades similares, tem como exemplo principal a hidrocortisona (cortisol), que nos mamíferos apresenta efeito anti-inflamatório e imunossupressivo, atuando principalmente sobre as células de defesa. É por isso usada em casos de infecção e alergia, inibindo melhor a resposta primária do que secundária.

Os moluscos apresentam sistema de defesa interno constituído por mecanismo de origem celular e humoral. Os amebócitos, células de defesa, podem ser de dois tipos: hialinócito e granulócito, sendo o segundo semelhante aos macrófagos dos mamíferos e responsáveis pela atividade fagocitária.

Com o objetivo de verificar a ação da hidrocortisona sobre os componentes da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada com miracídios de *Schistosoma mansoni* da linhagem BH e sua influência no desenvolvimento do trematódeo em seu hospedeiro intermediário, realizamos vários experimentos: verificação da sobrevivência dos moluscos, taxa de infecção, número de cercárias liberadas, verificação da reação amebocitária em torno dos esporocistos. Os resultados mostraram que os moluscos tratados com hidrocortisona apresentaram menor quantidade de amebócitos circulantes na hemolinfa, maior suscetibilidade à infecção, precocidade na liberação de cercárias, liberação de cercárias em maior número, predominância de esporocistos viáveis sem reação amebocitária ao seu redor, precocidade no aparecimento dos esporocistos secundários. Tais dados, compatíveis entre si, sugerem atuação da hidrocortisona sobre o sistema de defesa interno dos moluscos *Biomphalaria glabrata* de modo semelhante ao que ocorre no ser humano, ou seja, causando imunossupressão. Tal atuação facilitaria o desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* em seu hospedeiro intermediário.

INTRODUÇÃO

Dentre os corticóides, hormônios do córtex da supra-renal ou qualquer outro composto natural ou sintético que possua atividade similar, realçamos aqueles que apresentam formação esteróide, os chamados corticosteróides, possuidores de 21 carbonos e derivados do metabolismo do colesterol. Os corticosteróides, em geral, possuem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressivos, sendo amplamente usados em doses terapêuticas para reduzir a resposta inflamatória observada nas infecções, nos estados alérgicos e no choque anafilático. As atividades imunossupressiva e anti-inflamatória dos corticosteróides podem ser agrupadas convenientemente em três categorias gerais: o efeito dessas drogas na circulação de leucócitos, sua habilidade para alterar funções celulares específicas e várias outras atividades anti-inflamatórias (STITES *et al.*, 1997). Em geral, os corticóides inibem a sensibilização ou resposta primária melhor do que as tardias ou anamnéticas (HARPER, 1977; EISEN, 1979).

Esteróides cristalinos, como cortisona, corticosterona e hidrocortisona (cortisol) quando em altas concentrações, reduzem as reações celulares de proteção e, em particular, retardam a migração de polimorfonucleares para as áreas traumatizadas, impedindo a vaso dilatação e consequente aumento da permeabilidade vascular (HARPER, 1977; FERRI *et al.*, 1977). Inibem a mobilização de macrófagos e sua habilidade de penetrar nas áreas de inflamação. Este efeito pode ser atribuído a modificações na membrana dos macrófagos e na permeabilidade dos pequenos vasos. Segundo FERRI *et al.* (1977) as membranas lisossômicas de polimorfonucleares

tornam-se “estabilizadas” pela ação dos corticosteróides, postulando ser este o mecanismo pelo qual os esteróides inibem a inflamação. No homem e em animais de laboratório as concentrações terapêuticas usadas pouco afetaram as membranas lisossômicas dos polimorfonucleares.

Os glicocorticóides são os corticóides conhecidos por exercerem, nos mamíferos, efeitos sobre o metabolismo dos hidratos de carbono, proteínas e gorduras, sobre o balanço da água e eletrólitos e nos processos inflamatórios. Entre os efeitos podemos citar o aumento da gliconeogênese, com acentuado acúmulo de glicogênio no fígado. Sobre as proteínas, promove sua quebra e inibe seu anabolismo e síntese, interferindo na cicatrização de feridas e inibindo a produção de anticorpos (HAYNES, 1962; LANDAU *et al*, 1962).

A administração de glicocorticóides resulta numa série complexa de mudanças nas ações das células envolvidas em reações inflamatórias, podendo levar a neutrofilia devida a uma diminuição da passagem dos neutrófilos para os espaços perivasculares (neutrofilia por “represamento”). Esse represamento interfere com a entrada de neutrófilos nos exsudatos, caindo a 10% das cifras normais. Estes fatos explicam, em parte, a razão pela qual os corticosteróides favorecem a infecção, apesar de induzir uma neutrofilia no sangue periférico, a qual resulta apenas no acúmulo de neutrófilos nesse setor (OLIVEIRA, 1977)

Devido ao seu efeito imunossupressivo, muitas vezes os corticóides são usados com o objetivo de reprimir a formação de anticorpos. A ação primária dos esteróides ao deprimir a reação imune pode ocorrer nos locais de síntese de ácido nucleico e proteínas, nas células imunologicamente ativas, suprimindo a síntese de DNA e RNA, as

mitoses e alterando os precursores intracelulares do DNA (HARPER, 1977; FERRI *et al*, 1977). Possuem efeito linfocitolítico. Estudos, pesquisas clínicas tem muitas vezes sido confusos, por uma falha para reconhecer que linfócitos de diferentes espécies animais variam em sua suscetibilidade à lise induzida por esteróides. Em camundongos, ratos e coelhos, tais hormônios causam extensiva destruição linfóide. Por outro lado, linfócitos normais de cobaias, macacos e seres humanos são altamente resistentes à linfólise induzida por esteróides, sendo que os linfócitos T, *in vitro*, são os mais resistentes à ação dessas drogas. Essas drogas efetivamente “matam” células de leucemia linfoblástica aguda e são moderadamente citotóxicas a células neoplásticas B em leucemia linfocítica crônica e linfomas (STITES *et al.*, 1997). As pequenas células T sobreviventes parecem ser extraordinariamente ativas em algumas reações, por exemplo, na reação ENXERTO X HOSPEDEIRO e talvez mesmo na cooperação com células B na indução da formação de anticorpos (FERRI *et al*, 1977; EISEN, 1979).

O efeito da redução da recirculação de linfócitos (em camundongos as células T imunocompetentes ficam sequestradas na medula óssea) poderia explicar a linfocitopenia que ocorre em seres humanos quando tratados com esteróides. Tais drogas possuem ainda surpreendente efeito sobre os eosinófilos (FERRI *et al*, 1977).

A descoberta dos corticosteróides foi o maior avanço no tratamento de doenças inflamatórias. Desde o primeiro uso bem sucedido de hidrocortisona (cortisol) em 1948, o principal glicocorticóide da supra-renal (córtex-adrenal), para controle de manifestações clínicas de artrite reumatóide, vários compostos com atividade glicocorticóide tem sido sintetizados e são atualmente terapia padronizada de muitas imunológicas e não imunológicas doenças inflamatórias (STITES, *et al.*, 1997).

No processo inflamatório, a hidrocortisona é capaz de inibir o depósito de fibrina, a dilatação capilar, a migração de células fagocitárias, bem como as manifestações tardias do processo inflamatório, como a proliferação capilar e de fibroblastos, o depósito de colágeno e a cicatrização (HARPER, 1977; EISEN, 1979).

Os corticosteróides são muito mais eficazes em bloquear as respostas primárias do que as secundárias: ou as células de memória são mais resistentes do que as células sensíveis ao antígeno ou então o número aumentado de células aptas à resposta eleva a probabilidade de que algumas delas iniciem a formação de anticorpos antes de serem bloqueadas. Apesar disso, se administrados imediatamente antes do antígeno os corticosteróides inibem a formação de anticorpos em algumas espécies (ratos, camundongos, coelhos). Nas doses clínicas usadas, porém, não tem sido observada uma supressão significativa no homem, ou seja, no ser humano mesmo podendo tais drogas diminuir os níveis de auto anticorpos, não inibem a produção de anticorpos para antígenos

De acordo com VAN DER KNAAP & LOKER (1990), o sistema usado pelos caramujos para combater organismos invasores é chamado Sistema de Defesa Interno, nomenclatura mais correta que Sistema Imune, devido à falta de linfócitos, imunoglobulinas e respostas de aparência clínica a antígenos específicos. Tal sistema é composto de células que diferem das que compõem tal sistema nos vertebrados. RATCLIFFE (1985) assinalou o papel dos mecanismos de defesa celular e humoral presentes nos moluscos. Os moluscos, assim como outros invertebrados, possuem células amebóides que participam das respostas de defesa interna do hospedeiro. Essa célula representam a principal arma de defesa interna desses animais (SHIFF, 1994; SÍMA & VETVICKA, 1990). Em gastrópodes a resposta celular foi demonstrada por

SMINIA(1972), CHENG & RIFKI (1970), TRIPP (1970), MICHELSON (1975) , ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980a, 1980b). As mais importantes dessas células nos gastrópodos levam o nome de AMEBÓCITOS (PAN, 1958) ou HEMÓCITOS. São células que se assemelham aos macrófagos de mamíferos, circulando livremente na hemolinfa desses animais; e como os moluscos possuem sistema vascular aberto, os amebócitos também movimentam-se livremente para e pelos tecidos (LOKER & BAYNE, 1986; SMINIA & VAN DER KNAAP, 1986; LIE *et al*, 1987; VAN DER KNAAP & LOKER, 1990).

Basicamente dois tipos de amebócitos são descritos na hemolinfa: GRANULÓCITOS responsáveis pela atividade fagocitária e enzimática nos mecanismos de defesa que perfazem 90% do total das células encontradas na hemolinfa, apresentando forma levemente circular (7 a 8µm de diâmetro) e pequenos pseudópodos (CHENG & GARRABRANT, 1977; LIE *et al*, 1987; OTTAVIAN & FRANCHINI, 1988). Os grânulos citoplasmáticos, produtores de enzimas, existentes nos granulócitos são tidos como verdadeiros lisossomos (CHENG & GARRABRANT, 1977; CHENG & BUTLER, 1979). A outra sub-população (10% dos amebócitos) é constituída dos chamados HIALINÓCITOS, esféricos, de menor tamanho, variando de 4 a 8 µm de diâmetro, com citoplasma brilhante, não apresentam emissão de pseudópodos, quando em contacto com superfícies de vidro. O papel de defesa dos hialinócitos é ainda desconhecido, existindo evidências de que estas células reagem contra antígenos solúveis (CHENG & GARRABRANT, 1977). Não existem evidências concretas de que ocorram apenas duas

ou mais populações de amebócitos circulantes ou de que uma delas se transforme na outra (SETA *et al*, 1996). Alguns autores consideram as duas categorias de amebócitos como tipos de células distintos, enquanto outros acreditam que elas representam diferentes estágios de desenvolvimento em uma mesma linhagem de células (SMINIA, 1972; SMINIA & VAN DER KNAAP, 1986; SMINIA & VAN DER KNAAP, 1987; LIE *et al*, 1987; SANTANA *et al*, 1985). Os resultados obtidos nos experimentos de SETA *et al* (1996) sugerem essa possibilidade. PAN (1996), de acordo com suas observações anteriores (1965), sugeriu que os hialinócitos de *Biomphalaria glabrata* podem, sob devida estimulação, transformar-se em granulócitos. Segundo ele, os amebócitos encontrados livres, vagando pelo organismo do molusco, correspondem aos GRANULÓCITOS, possuidores de pseudopodia; os amebócitos fixados nos tecidos de tal molusco com numerosas fibras colagenosas, seriam os HIALINÓCITOS.

Os amebócitos presentes na hemolinfa e nos tecidos são produzidos em um órgão denominado “Amebocyts Producing Organ” – APO - Órgão Produtor de Amebócitos (LIE *et al*, 1975; SÍMA & VETVICKA, 1990). Em *Biomphalaria glabrata* a estrutura do APO foi descrita por JEONG *et al*. (1983); localizado na região renopericárdica dos planorbídeos entre células epiteliais do manto posterior e a camada epitelial do pericardio, contendo ameboblastos primários e secundários, tanto quanto amebócitos maduros. As novas células se originaram predominantemente de células precursoras (ameboblastos), amebócitos imaturos ou maduros, células epiteliais e endoteliais ou fibroblastos (MULLER, 1956 ap. RATCLIFFE, 1985). Nesse órgão nunca foram encontrados parasitos (JOKY *et al*, 1985).

As células citadas assumem muitas funções, incluindo a defesa interna do organismo, através de processos de pinocitose, fagocitose, encapsulação, formação de granulomas, coagulação de hemolinfa e cicatrização (WAGGE, 1955; CHENG & BUTLER, 1979). Sabe-se ainda que os amebócitos são responsáveis pelo transporte de cálcio, visando o reparo tecidual, (RATCLIFFE, 1985; WAGGE, 1951; WAGGE & MITTLER, 1953), participando também da distribuição de glicogênio e gordura (SÍMA & VETVICKA, 1990). A fagocitose de material estranho por células da hemolinfa é um importante aspecto do mecanismo de defesa interna de moluscos bivalvos (FOLEY & CHENG, 1975) e a mobilidade dos amebócitos é uma das características que facilita tal processo (ABDUL SALAM & MICHELSON, 1980 a b). A variação do comportamento cinético dos amebócitos nos moluscos pode ser influenciada por vários estímulos, como a presença de parasitos ou de material estranho (CHENG, 1987; VAN DER KNAAP *et al.*, 1987; SMINIA & VAN DER KNAAP, 1987; MOUKASSA & JOURDANE, 1990; SETA *et al.*, 1996). Junto à fagocitose, os moluscos são capazes de imobilizar parasitos através do processo de encapsulação (MULLER, 1956 ap. RATCLIFFE, 1985) sendo que a encapsulação de helmintos ocorre sem a participação de hialinócitos (LIE *et al.*, 1987).

As reações de encapsulação nos moluscos podem ser consideradas análogas às reações granulomatosas no fígado de vertebrados para isolar o parasita e impedir a ocorrência de danos maiores ao hospedeiro, ajudando a manter a integridade interna dos tecidos do molusco. Tais reações, provavelmente, tem como causa a ação de produtos tóxicos provenientes do parasito (HARRIS, 1975; CARTER & BOGITSH, 1975). A resposta varia muito de acordo com o grau de compatibilidade entre o hospedeiro e o

parasito e com a espécie do parasito encapsulado (MULLER, 1956 ap. RATCLIFFE, 1985). FRYER & BAYNE (1990) e BAYNE (1990) verificaram que amebócitos de moluscos suscetíveis tinham menor capacidade de fagocitar em relação aos moluscos resistentes, e os experimentos de SETA *et al.*(1996) mostraram que quando submetidos à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, moluscos *Biomphalaria glabrata*, mais suscetíveis apresentaram aumento imediato de amebócitos circulantes, enquanto que moluscos *Biomphalaria tenagophila*, mais resistentes, apresentaram aumento tardio, sugerindo modificação prévia de tais células para os tecidos. Tais resultados foram confirmados pela avaliação histopatológica, mostrando grande incidência de reações amebocitárias intensas, já nos períodos iniciais, em torno dos esporocistos.

O destino de parasitos encapsulados difere de acordo com o tipo de parasito. Algumas cápsulas retornam após a completa destruição de seu conteúdo, e algumas são excretadas através de rupturas da epiderme. Alto nível de enzimas nas cápsulas poderiam atuar na destruição de parasitos, mas algumas vezes não resulta em morte. A larva viável de *Angiostrongylus*, por exemplo, tem sido recuperada de *Biomphalaria* até um ano após a injeção inicial (SÍMA & VETVICKA, 1990).

Além dos amebócitos, componentes plasmáticos não celulares parecem também estar envolvidos na resposta dos moluscos quando expostos aos miracídios (LIE *et al.*, 1980; LOKER *et al.*, 1982; MICHELSON, 1964). CHENG & YOSHINO (1976), FOLEY & CHENG (1977), BALAN *et al.* (1993) e REIS (1996) afirmaram que a destruição dos organismos estranhos pode ocorrer com ou sem a presença de células na hemolinfa, sugerindo a participação de componentes humorais com liberação de substâncias citotóxicas.

Segundo SMINIA & VAN DER KNAAP (1987), amebócitos produzem substâncias que são encontradas na hemolinfa, sendo que a secreção e liberação dessas substâncias depende da presença de material estranho, como por exemplo, parasitos. Lectinas, algumas enzimas, fatores inibidores de proteases (RENWRANTZ & CHENG, 1977), ativadores de complementos de vertebrados (KOCK & NIELSEN, 1984) e fibronectinas (BRIDE *et al.*, 1986) parecem participar dos mecanismos de defesa dos moluscos. As lectinas, com capacidade aglutinante, produzidas por moluscos *Biomphalaria glabrata* podem ajudar a elucidar a relação caramujo-trematódeo, ficando sua atividade bem evidente em linhagens resistentes ao *Schistosoma mansoni*, sendo que essa característica está ausente em *Biomphalaria glabrata* suscetível (FRYER *et al.*, 1989). Os grânulos citoplasmáticos presentes nos granulócitos são tidos como verdadeiros lisossomos (CHENG & BUTLER, 1979) e as enzimas lisossomais presentes em tais lisossomos (CHENG & MOHANDAS, 1985) teriam como função a destruição de material estranho, ou seja, provocar a morte e lise desse material (SMINIA & VAN DER KNAAP, 1987). A liberação de tais substâncias ocasionaria a degranulação desses amebócitos, característica dos processos de fagocitose (FOLEY & CHENG, 1977; CHENG, 1975; CHENG & AULD, 1977). Segundo CHENG (1983 a ,b) após o reconhecimento do material estranho inicia-se a síntese de enzimas lisossomais; os lisossomos migram à superfície celular e a seguir se dá a extrusão dos grânulos. Para LOKER & BAYNE (1982) entretanto, a habilidade dos moluscos em destruir os esporocistos pode ser atribuída mais aos amebócitos (processo de defesa celular) do que aos componentes plasmáticos não celulares. Outros experimentos (BAYNE *et al.*, 1980) mostraram que os esporocistos em contato com o plasma de caramujos resistentes e suscetíveis permaneceram vivos enquanto os

amebócitos estavam ausentes. ALLEGRETTI (1994) também verificou que os fatores humorais sozinhos são incapazes de determinar a eliminação do parasito. Pode-se, assim, evidenciar a dependência existente entre os mecanismos de defesa celular e humoral.

Foi notado por REIS *et al.* (1995) que a maior resistência dos moluscos a infecção por *Schistosoma mansoni* resultou sempre em maior destruição dos esporocistos, quer por mecanismos predominantemente celular ou humoral; notou ainda que a reação amebocitária pareceu ser fator importante no sucesso do combate à infecção. No caso de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* discute-se a possibilidade de que as reações de defesa sejam direcionadas às placas ciliadas perdidas pelos miracídeos imediatamente após a penetração no molusco, e não propriamente ao parasito em desenvolvimento no esporocisto-mãe (esporocisto primário). Não se sabe ainda se os fatores humorais, que interferem na ativação e supressão do mecanismo de defesa, são derivados do parasito ou do molusco (SETA *et al.*, 1996).

Biomphalaria glabrata é espécie vetora por excelência, tanto na América Central como na América do Sul, sendo abundantemente encontrada no Brasil. Os experimentos de ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.* (1997) confirmam a excelência de vetor atribuída a *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte. Segundo FILES & CRAM (1949), PARAENSE & CORREA (1963 b), MAGALHÃES (1966), BALAN *et al.* (1993), *Biomphalaria glabrata* é considerada um modelo de agente transmissor, provavelmente por haver ocorrido uma adaptação fisiológica entre o molusco e a linhagem local do parasito. Pelos experimentos realizados por ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.* (1995) pode-se crer que a maior adaptação do parasito ao hospedeiro intermediário pode levar a um comportamento diferente deste mesmo parasito no hospedeiro definitivo. Essa hipótese

havia sido sugerida por SAOUD (1966) para explicar as diferenças de infectividade e patogenicidade de diferentes linhagens de *Schistosoma mansoni*. Sabe-se ainda que muitos fatores genéticos em *Biomphalaria glabrata* influenciam a resistência ou suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* (MILLER *et al.*, 1996). Os trabalhos de THÉRON (1997) levam a crer que o nível de suscetibilidade ou resistência dentro de uma amostra de população de caramujos é definida pela proporção de caramujos cujos genótipos permitem ou não o desenvolvimento do parasito, levando em conta a variabilidade genética existente entre a amostra de parasitos.

NEWTON (1953) referiu-se à influência da idade do hospedeiro sobre a suscetibilidade. Tal hipótese foi confirmada, 20 anos depois, pelos trabalhos elaborados por RICHARDS (1973) e posteriormente RICHARDS & MERRITT (1975), que provaram a possibilidade de caramujos jovens suscetíveis tornarem-se resistentes quando adultos. Há pouco tempo, FERNANDES (1997) confirmou o que já havia sido demonstrado antes, que o fator idade (estágio de desenvolvimento) do hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* influencia a suscetibilidade do molusco *Biomphalaria glabrata* cujos membros mais jovens são mais suscetíveis à infecção. Segundo SMINIA *et al.* (1981) isso ocorre porque os moluscos jovens possuem mais hialinócitos, menos granulócitos e menos enzimas lisossomais, o que reduz sua capacidade fagocítica. MAGALHÃES *et al.* (1997) verificaram ainda que os moluscos possuidores de esporocistos secundários perderam a capacidade de atrair miracídios.

Em 1963 (b), PARAENSE & CORRÊA publicaram os resultados dos estudos sobre a suscetibilidade de 23 populações de *Biomphalaria glabrata* de proveniências diversas, à infecção por miracídios oriundos de ovos colhidos em fezes de

pacientes em fase crônica, que haviam sido contaminadas em Belo Horizonte (MG). A maioria das populações de moluscos mostrou-se altamente suscetível, apresentando índices de infecção superiores a 50%. CONCEIÇÃO & COURA (1983) verificaram maior produção de cercárias em *Biomphalaria glabrata* quando expostas a miracidios oriundos de pacientes com formas clínicas mais graves da esquistossomose e, coincidindo com tais resultados, ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.* (1997) observaram maior patogenicidade do parasito da linhagem BH selecionado quando comparado com *Schistosoma mansoni* não selecionado, fato esse que tem como consequência sua maior capacidade de infectar o molusco.

Nos estudos de SOUZA *et al.* (1995), comparando o desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* em três espécies de hospedeiros (*Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata*), as taxas mais baixas de infecção e as médias menores de cercárias liberadas por *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* foram relacionadas aos sistemas internos de defesa eficientes dessas espécies. No entanto, mesmo em moluscos como esses, mais resistentes à infecção por *Schistosoma mansoni*, a atuação do mecanismo de defesa provavelmente ocorre sempre parcialmente, pois alguns esporocistos escapam à destruição e conseguem se desenvolver, dando origem às cercárias (SOUZA *et al.*, 1995).

Diante do que foi exposto acima, nos propusemos a verificar o efeito da hidrocortisona administrada durante quatro dias em *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni*. Os motivos que nos levaram a desenvolver este projeto estão baseados nas seguintes observações:

- Em estudos sobre os diferentes comportamentos das linhagens, NEWTON (1952), investigando a influência genética e de outros fatores sobre a suscetibilidade do hospedeiro intermediário, verificou em *Biomphalaria glabrata* de Porto Rico, suscetível ao *Schistosoma mansoni* da região, que o parasito se desenvolveu sem provocar qualquer reação de defesa por parte do caramujo. Ao contrário, em *Biomphalaria glabrata* de Salvador (BA), espécie refratária ao desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* de Porto Rico, o parasito foi destruído e removido vinte e quatro a vinte e oito horas após a penetração. Neste caso, a resposta do molusco foi marcada por infiltração celular em torno dos esporocistos.
- COELHO (1962) verificou o mesmo tipo de resposta, quando submeteu *Biomphalaria tenagophila* a infecção por *Schistosoma mansoni* de Belo Horizonte (MG). Posteriormente, KASSIN & RICHARDS (1979), SULLIVAN & RICHARDS (1981) e GUARALDO *et al.* (1981), confirmaram a observação de que o desenvolvimento dos esporocistos em moluscos suscetíveis era acompanhado por uma reação branda, enquanto em moluscos não suscetíveis os esporocistos eram circundados por células e rapidamente destruídos. A reação granulomatosa, que provoca a fagocitose e a morte das larvas poucas horas após a penetração, era constituída por amebócitos (granulócitos) com grande atividade fagocitária (PAN, 1965; LIE *et al.*, 1980; BAYNE *et al.*, 1980 b; GUARALDO *et al.*, 1981).
- Em moluscos não infectados, a atividade fagocitária de granulócitos de *Biomphalaria tenagophila* é maior do que aquela observada com granulócitos de *Biomphalaria glabrata*. Entretanto, em moluscos infectados há uma queda na atividade fagocitária dos granulócitos em *Biomphalaria tenagophila* observada um dia após a infecção. Em

Biomphalaria glabrata, nas mesmas condições, há um aumento da atividade fagocitária, passando a ser aproximadamente duas vezes maior do que em *Biomphalaria tenagophila* (SANTANA, 1990).

- Em *Biomphalaria tenagophila* selecionada geneticamente para o caráter suscetibilidade, os granulócitos apresentam atividade fagocitária menor, enquanto em *Biomphalaria tenagophila* resistente, grande número de granulócitos foi observado vinte e quatro horas após a infecção, concomitantemente a completa degeneração das larvas intramolusco e da maior atividade fagocitária dos amebócitos (ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993 a).
- Granulócitos foram encontrados em maior número em *Biomphalaria glabrata* adulta infectada por *Schistosoma mansoni*. *Biomphalaria glabrata* infantil foi mais suscetível à infecção esquistossomótica do que exemplares adultos, observando-se maior número de esporocistos viáveis setenta e duas horas após a infecção pelo trematódeo (ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.*, 1993 b).

Depreende-se ,portanto, que os três primeiros dias de infecção dos moluscos são fundamentais para o desenvolvimento do trematódeo intramolusco e que os mecanismos de defesa estão intimamente associados a este fato. Exerceria a hidrocortisona o mesmo efeito apresentado em mamíferos, sobre os granulócitos dos moluscos vetores do *Schistosoma mansoni*, evitando a reação amebocitária em torno das larvas do trematódeo e facilitando o desenvolvimento do parasita intramolusco?

OBJETIVOS

Verificar a ação da hidrocortisona sobre os componentes da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada com miracídios de *Schistosoma mansoni* da linhagem BH e sua influência no desenvolvimento do trematódeo em seu hospedeiro intermediário.

MATERIAIS E MÉTODOS:

1) PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL:

Os moluscos utilizados nos experimentos foram da espécie *Biomphalaria glabrata* albina com diâmetro variando de 7 a 8 mm.e originados de populações colhidas em Belo Horizonte. A linhagem de *Schistosoma mansoni* utilizada foi a BH (Belo Horizonte) (PARAENSE & CORRÊA, 1963), que foi mantida no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP através de passagens sucessivas em *Mus musculus* Swiss, SPF, proveniente do Centro de Bioterismo da UNICAMP

Foram os seguintes, os grupos experimentais:

GRUPO I: Moluscos não infectados, não tratados com hidrocortisona

GRUPO II: Moluscos não infectados, tratados com hidrocortisona

GRUPO III: Moluscos infectados, não tratados com hidrocortisona

GRUPO IV: Moluscos infectados, tratados com hidrocortisona

A hidrocortisona usada (Solu-Cortef), apresentava-se em frascos de 500mg de succinato sódico de hidrocortisona e ampolas de 4ml de diluente “Água para Injeção Bacteriostática” (álcool benzílico e água destilada), sendo mantida em geladeira após aberta.

Vários experimentos foram realizados:

- 1) No primeiro experimento, utilizaram-se 20 moluscos para cada grupo experimental com a finalidade de se verificar a sobrevivência dos moluscos, a taxa de infecção dos moluscos dos grupos III e IV e o número de cercárias eliminadas por estes moluscos. Numa segunda etapa, novos grupos experimentais, constituídos de 40 exemplares de *Biomphalaria glabrata*, igualmente distribuídos nos grupos III e IV, foram utilizados para verificação da taxa de infecção e sobrevivência, totalizando 80 exemplares (40 para cada grupo).
- 2) No segundo experimento, 80 exemplares de *Biomphalaria glabrata* distribuídos em igual número entre os 4 grupos experimentais foram utilizados para a determinação do número de amebócitos circulantes na hemolinfa.
- 3) No terceiro experimento, 48 exemplares de moluscos pertencentes aos grupos III e IV foram utilizados para o estudo histológico do desenvolvimento do esporocisto e das reações amebocitárias.

(vide esquema a seguir)

EXPERIMENTOS	Nº DE CARAMUJOS NOS GRUPOS				OBSERVAÇÕES
	I	II	III	IV	
1ª etapa	20	20	20	20	Sobrevivência, taxa de infecção, nº de cercárias eliminadas
1º					
2ª etapa (complementar p/ taxa de infecção)			20	20	Taxa de infecção
2º					
	20	20	20	20	Nº de amebócitos circulantes na hemolinfa
3º					
			24	24	Estudos histológicos (desenvolvimento dos esporocistos e reações amebocitárias)

A seguir, todos os dados foram analisados estatisticamente, considerando conforme o caso, os grupos infectados tratados ou não com hidrocortisona e na análise da sobrevivência dos moluscos foi também considerada a infecção ou não dos moluscos. Os dados foram analisados utilizando-se o “Software” SAS (Statistical Analysis System) pelo Prof. Dr José Ferreira de Carvalho e a metodologia empregada está descrita nos resultados para cada parâmetro analisado.

2) MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO DE *Biomphalaria glabrata* E TRATAMENTO COM HIDROCORTISONA

Os moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* albina utilizados nos experimentos foram provenientes de uma população de Belo Horizonte (MG) criados e mantidos no moluscário do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Os moluscos constituintes dos grupos II e IV foram divididos em subgrupos de 4 exemplares, em recipientes com 100ml de água deionizada e 0,3ml de solução de hidrocortisona, a qual corresponde a 37,5mg da substância.. A água contendo hidrocortisona foi trocada a cada 24hs durante um período de 04 dias. A cada troca adicionava-se nova dose de solução de hidrocortisona, na mesma concentração utilizada inicialmente. Vinte e quatro horas após a 4ª dose de hidrocortisona (início do 5º dia) a água contendo hidrocortisona foi substituída por água deionizada. Optou-se por aplicar a hidrocortisona na água, uma vez que a injeção na região cefalopodal do molusco poderia provocar aumento do número de amebócitos, conforme verificado por SETA *et al.* (1996).

No 2º dia de tratamento os moluscos dos grupos III e IV foram infectados com miracídeos de *Schistosoma mansoni* da linhagem BH (Belo Horizonte, MG).

Após o término do tratamento com hidrocortisona, os moluscos de cada um dos grupos experimentais foram mantidos em recipiente de vidro de 2000 ml de volume, em água deionizada à temperatura ambiente de 22-25 ° C. A alimentação foi feita utilizando-se folhas de alface fresca ad libitum, sendo feita troca de água de cada grupo 2 vezes por semana.

3) INFECCÃO DE MOLUSCOS *Biomphalaria glabrata* COM *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E DETERMINAÇÃO DA TAXA DE INFECCÃO

Os miracídios de *Schistosoma mansoni* foram obtidos das fezes de camundongos fêmeos, Swiss, infectados por cercárias de *Schistosoma mansoni* da linhagem BH. A passagem das fezes pelo processo de sedimentação (HOFFMAN *et al.*, 1934), lavagem de sedimento e exposição a luz e calor (STANDEN, 1951) ocasionou a eclosão e a liberação dos miracídios.

A determinação da taxa de infecção dos moluscos tratados ou não com hidrocortisona (Grupos III e IV, respectivamente) foi realizada em 2 etapas. Em cada etapa foram utilizados 40 exemplares de *Biomphalaria glabrata* (20 exemplares para cada grupo) que foram expostos individualmente a 10 miracídios do *Schistosoma mansoni* da linhagem BH em frascos contendo 2 ml de água dechlorada, sendo levados ao foco de luz e calor por 2 horas para a penetração dos miracídios (STANDEN, 1951). Após a infecção, os moluscos voltaram ao recipiente contendo água dechlorada (Grupo III) ou a segunda dose de hidrocortisona (Grupo IV).

Após 4 semanas de exposição aos miracídios os moluscos dos Grupos III e IV (grupos de moluscos infectados) foram examinados semanalmente após a exposição a foco de luz e calor, em recipientes individuais contendo 2 ml de água dechlorada durante 2 horas para verificação da liberação de cercárias (PELLEGRINO & MACEDO., 1955). Os moluscos positivos foram mantidos individualmente em frascos até o final do experimento, a fim de acompanharmos a liberação de cercárias. Somente foram considerados moluscos positivos aqueles em que se observaram eliminações de cercárias.

4) SOBREVIVÊNCIA DOS MOLUSCOS *Biomphalaria glabrata* :

Os moluscos foram observados durante 23 semanas, sendo anotada semanalmente a ocorrência de mortalidade.

5) VERIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CERCÁRIAS ELIMINADAS PELOS MOLUSCOS

Nos moluscos dos Grupos III e IV que apresentaram eliminação de cercárias procedeu-se a contagem das larvas eliminadas segundo a técnica de PARAENSE & CORRÊA (1989). Tais moluscos foram, daí por diante, mantidos em beakers individualmente identificados.

A determinação do número de cercária foi realizada somente com os moluscos utilizados no primeiro experimento para determinação da taxa de infecção (vide esquema de experimentos, pág. 18).

6) CONTAGEM DIFERENCIAL DOS AMEBÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DOS MOLUSCOS *Biomphalaria glabrata*.

No segundo experimento, 80 exemplares de *Biomphalaria glabrata* distribuídos entre os 4 grupos experimentais foram utilizados para coleta da hemolinfa e determinação do número de amebócitos circulantes

Para cada período de tempo a hemolinfa de 2 exemplares de moluscos de cada grupo foi colhida para a contagem do número de amebócitos circulantes, diferenciando-se tais células segundo critério morfológico em 2 tipos: GRANULÓCITOS e HIALINÓCITOS. As amostras da hemolinfa de cada molusco, obtidas mediante punção cefalopodal com pipeta Pasteur devidamente esterelizada (MICHELSON, 1966) foram depositadas em câmara de Neubauer e observadas em microscópio de contraste e fase. Foram contados os amebócitos existentes nos 4 quadrados laterais da câmara e o resultado foi expresso em número de amebócitos/mm³.

As contagens foram feitas aos 30 min., 1, 3, 5, 7, 9, 11, 24, 48 e 72 horas após o término do tratamento dos moluscos com hidrocortisona. Para os moluscos de grupos não tratados os horários de contagens foram semelhantes aos dos outros grupos.

7) VERIFICAÇÃO DE REAÇÃO AMEBOCITÁRIA EM TORNO DOS ESPOROCISTOS:

7.1) PREPARAÇÃO DE LÂMINAS COM CORTES HISTOLÓGICOS

Foram constituídos 2 grupos de 24 exemplares de *Biomphalaria glabrata* infectados individualmente com 100 miracídeos de *Schistosoma mansoni* cada e que receberam ou não tratamento com hidrocortisona (grupos IV e III, respectivamente).

Cada grupo foi dividido em subgrupos de 3 moluscos, os quais foram sacrificados e levados à fixação em Bouin aquoso às 12, 24, 48, 72hs e 7, 14, 21 e 28 dias após o final do tratamento com hidrocortisona (Grupo IV), sendo que os moluscos do grupo de não tratados (Grupo III) também foram sacrificados e levados à fixação em horários semelhantes aos do grupo dos moluscos tratados. Esses períodos correspondem, respectivamente, a 3,5, 4, 5, 6, 10, 17, 24 e 31 dias de infecção.

Após 48 horas de fixação, cada molusco teve sua concha removida. Nos 4 primeiros subgrupos (12 moluscos) de cada grupo apenas a região cefalopodal foi utilizada, enquanto que nos outros subgrupos todo o corpo foi submetido ao corte histológico.

Cada peça foi incluída em parafina e foram realizados cortes seriados de 5µm de espessura. Os cortes foram montados em albumina e corados por Tricrômico de Gomori. As preparações foram montadas em bálsamo do Canadá.

7.2) OBSERVAÇÃO DOS ESPOROCISTOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS

As lâminas com cortes histológicos foram observadas em microscopia óptica comum onde puderam ser verificados esporocistos primários e secundários. Os esporocistos primários foram contados e classificados quanto a sua viabilidade (viáveis ou degeneradas), as reações amebocitárias em torno das larvas (presentes ou ausentes) e o tipo de célula nas reações amebocitárias. No caso dos esporocistos secundários, observou-se sua localização, viabilidade e maturidade, sendo que aqueles que apresentaram cercárias no seu interior foram considerados maduros. Dessa maneira puderam ser verificadas e comparadas as reações amebocitárias em moluscos que receberam hidrocortisona e os que não receberam tal tratamento.

RESULTADOS

1) SOBREVIVÊNCIA DOS MOLUSCOS

Na Tabela 1 e na Figura 1 encontram-se os dados da sobrevivência de *Biomphalaria glabrata* tratadas ou não com hidrocortisona e infectadas ou não por *Schistosoma mansoni* (Grupos I, II, III e IV).

A análise estatística considerando os moluscos infectados ou não e tratados ou não pela hidrocortisona (em um esquema fatorial 2x2) comparou as medianas das curvas de sobrevivência (estatística Log Rank) e concluiu pela existência de diferença significativa entre estas curvas de sobrevivência. A sobrevivência dos moluscos infectados foi significativamente menor ($p=0,03$) do que a dos grupos não infectados. Entretanto, verificou-se que no grupo de moluscos infectados tratados com hidrocortisona alguns permaneciam vivos após a 19ª semana, o que não ocorreu em nenhum dos outros grupos. Comparando-se o grupo de moluscos tratados com hidrocortisona com os não tratados, verificou-se que os que receberam hidrocortisona sobreviveram mais.

TABELA 1: NÚMERO DE MOLUSCOS SOBREVIVENTES NOS GRUPOS I, II, III E IV
(N=20 MOLUSCOS POR GRUPO)

SEMANAS	NÚMERO DE MOLUSCOS VIVOS			
	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
0	20	20	20	20
1	19	20	20	20
2	19	20	20	18
3	18	20	19	16
4	16	20	17	16
5	15	19	15	15
6	14	19	14	14
7	13	18	12	12
8	13	16	11	12
9	13	15	08	11
10	12	14	07	11
11	11	14	06	11
12	10	13	05	11
13	10	13	05	11
14	07	09	04	11
15	07	06	04	10
16	07	05	04	10
17	05	04	04	10
18	0	0	04	09
19	0	0	04	08
20	0	0	0	07
21	0	0	0	07
22	0	0	0	05
23	0	0	0	05

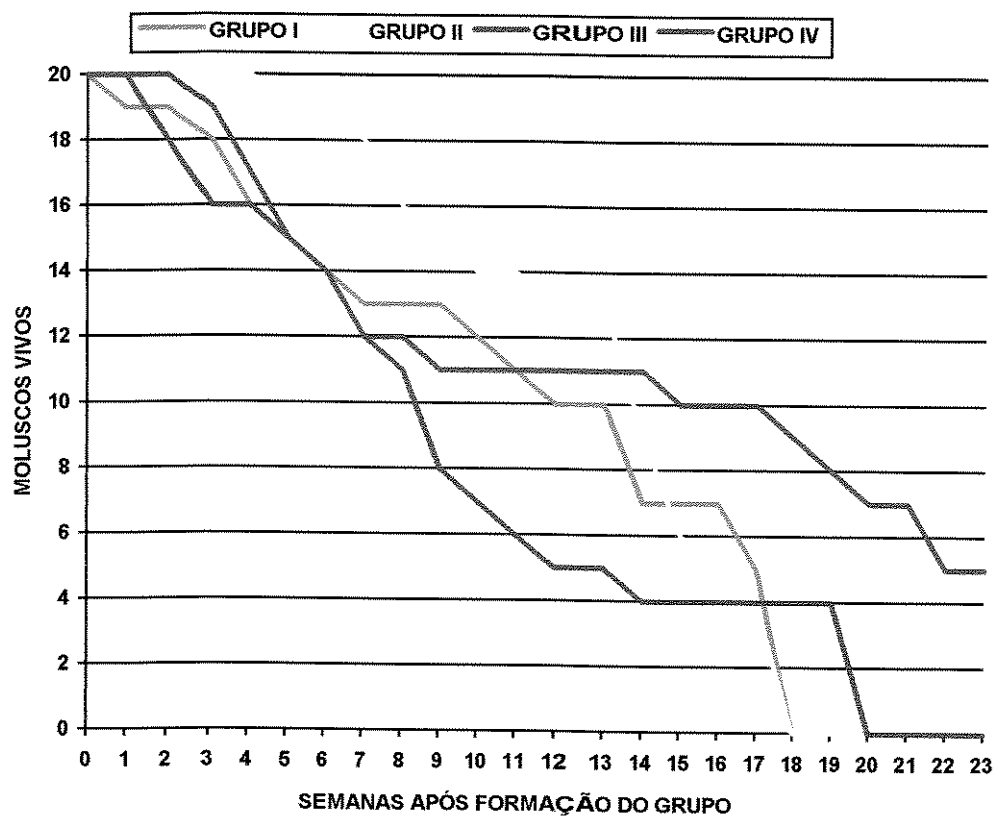


FIGURA 1 –MOLUSCOS SOBREVIVENTES NOS GRUPOS I (NÃO INFECTADOS, NÃO TRATADOS), II (NÃO INFECTADOS, TRATADOS COM HIDROCORTISONA), III (INFECTADOS, NÃO TRATADOS COM HIDROCORTISONA), IV (INFECTADOS, TRATADOS COM HIDROCORTISONA)

2) INFEÇÃO DE MOLUSCOS *Biomphalaria glabrata* POR *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH

Quatro semanas após os moluscos terem sido submetidos à exposição aos miracídeos de *Schistosoma mansoni*, iniciou-se a verificação da eliminação de cercárias, examinando-se os moluscos semanalmente. Os dados referentes à infecção dos moluscos encontram-se nas Tabelas 2 e 3.

Os moluscos do Grupo III (infectados, sem hidrocortisona) começaram a liberar cercárias na 6ª semana após a exposição dos mesmos aos miracídeos de *Schistosoma mansoni*, enquanto que os do Grupo IV (infectados, com hidrocortisona) já liberavam cercárias na 5ª semana (Tabela 2).

Ocorreu aparecimento de novo molusco positivo no Grupo III apenas na 7ª semana; já no Grupo IV, apesar do maior número de moluscos infectados ter surgido da 5ª à 8ª semana, houve aparecimento de um molusco positivo na 11ª e outro na 19ª semana.

Só até a 13ª semana haviam moluscos do Grupo III liberando cercárias. Já no Grupo IV ocorreu liberação de cercárias até a 19ª semana.

Os moluscos não tratados resultaram 7,5% infectados, e os tratados com hidrocortisona 22,5% (Tabela 3). O teste de qui-quadrado, em que se verificou a igualdade de proporções, mostrou nível de significância igual a 0,12, podendo-se concluir pela igualdade de proporções. O teste de Fisher que compara as pequenas proporções (as de respostas positivas) revelou um nível de significância de 0,057, ou seja, cerca de 6%. Este valor indica certa significância, mostrando que é razoável admitir que o tratamento com hidrocortisona favoreceu a infecção por *Schistosoma mansoni*.

TABELA 2 - NÚMERO DE MOLUSCOS POSITIVOS NOS GRUPOS III E IV VERIFICADOS SEMANALMENTE.
(N=40 MOLUSCOS POR GRUPO)

SEMANAS	Nº TOTAL DE MOLUSCOS VIVOS (GRUPO III)	Nº MOLUSCOS POSITIVOS (GRUPO III)	Nº TOTAL DE MOLUSCOS VIVOS (GRUPO IV)	Nº MOLUSCOS POSITIVOS (GRUPO IV)
4 ^a	35	0	35	0
5 ^a	34	0	33	04
6 ^a	33	02	32	06
7 ^a	31	03	29	03
8 ^a	29	02	27	04
9 ^a	26	01	26	06
10 ^a	25	01	26	05
11 ^a	24	01	26	06
12 ^a	23	01	26	06
13 ^a	21	01	26	06
14 ^a	19	0	23	03
15 ^a	19	0	21	02
16 ^a	18	0	21	02
17 ^a	16	0	21	02
18 ^a	14	0	20	01
19 ^a	13	0	17	01
20 ^a	09	0	14	0

TABELA 3: TAXA DE INFECÇÃO DOS MOLUSCOS TRATADOS (GRUPO IV) OU NÃO (GRUPO III) POR HIDROCORTISONA E EXPOSTOS AO *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH. (N=40 MOLUSCOS POR GRUPO)

GRUPO	Nº DE MOLUSCOS EXPOSTOS À INFECÇÃO	Nº DE MOLUSCOS POSITIVOS	TAXA DE INFECÇÃO
III	40	03	7,5%
IV	40	09	22,5%

3) NÚMERO DE CERCÁRIAS ELIMINADAS PELOS MOLUSCOS

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentados os dados referentes ao número de cercárias por moluscos dos Grupos III (não tratados com hidrocortisona) e IV (tratados com hidrocortisona).

A contagem de cercárias eliminadas pelos moluscos foi feita nos Grupos III e IV utilizados na primeira etapa do experimento em que se determinou a taxa de infecção e sobrevivência dos moluscos. Tal contagem mostrou o grande aumento na eliminação de cercárias obtido através do tratamento dos moluscos com hidrocortisona, visto que a quantidade máxima de cercárias eliminadas a cada semana pelo Grupo III não alcançou 1/5 da quantidade máxima eliminada pelo Grupo IV (produção em grupo). Além disso, o molusco do Grupo IV maior eliminador de cercárias (3BgIV) conseguiu sobreviver por muito mais tempo que qualquer outro do Grupo III, alcançando um limite máximo de eliminação de cercárias por semanas (4692) cinco vezes maior que o máximo alcançado pelo molusco 2BgIII (927), o maior produtor do Grupo III.

A análise de variância, realizada através das raízes quadradas dos valores observados de número de cercárias, revelou-se altamente significativa, visto que o nível de significância do teste ($F=33,51$, com 1 a 63 graus de liberdade) foi menor do que 0,0001).

TABELA 4 – NÚMERO DE CERCÁRIAS ELIMINADAS A CADA SEMANA POR MOLUSCOS DO GRUPO III

	S E M A N A S																
MO LUS COS	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a	14 ^a	15 ^a	16 ^a	17 ^a	18 ^a	19 ^a	TOTAL	
1 BgIII		523	738	326												1.587	
2 BgIII			927													927	
TOTAL		523	1.665	326												2.514	

TABELA 5 – NÚMERO DE CERCÁRIAS ELIMINADAS A CADA SEMANA POR MOLUSCOS DO GRUPO IV

	S															E															M															A															N															A															S																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a	14 ^a	15 ^a	16 ^a	17 ^a	18 ^a	19 ^a	TOTAL																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				

4) NÚMERO DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DOS MOLUSCOS *Biomphalaria glabrata*

Os amebócitos encontrados na hemolinfa foram diferenciados em GRANULÓCITOS (estrelados), Figura 2, e HIALINÓCITOS (não estrelados), Figura 3; Em todos os grupos e em todos os períodos de leitura a quantidade de granulócitos ultrapassou a quantidade de hialinócitos. Os resultados dessas contagens estão apresentados nas Tabelas 6 a 9 e nas Figuras 4 a 7.

Os granulócitos e os hialinócitos dos moluscos tratados com hidrocortisona (Grupos II e IV) mantiveram-se sempre em quantidade inferior à dos moluscos dos grupos não tratados (Grupos I e III). Os hialinócitos não ultrapassaram a média de 21,5 hialinócitos/mm³ no Grupo II (não infectados, com hidrocortisona) e 22 hialinócitos/mm³ no Grupo IV (infectados, com hidrocortisona), enquanto que no Grupo I (não infectados, sem hidrocortisona) alcançaram o máximo de 75 hialinócitos/mm³ e no Grupo III (infectados, sem hidrocortisona) 54 hialinócitos/mm³. A média máxima de granulócitos no Grupo I chegou a 161 granulócitos/mm³ e no Grupo III 310,5 granulócitos/mm³; no entanto, o Grupo II apresentou média máxima de 109,5 granulócitos/mm³ e o Grupo IV de 50 granulócitos/mm³.

Em relação aos granulócitos a análise estatística, realizada através de modelos de análise de variância, mostrou que a interação infecção-tratamento foi significativa ($p=0,0001$). Neste caso o efeito do tratamento nos moluscos não infectados foi menor do que nos infectados. Nenhum termo envolvendo tempo foi significativo, donde se conclui que este fator não teve efeito.

Considerando os hialinócitos, a análise estatística revelou que apenas o tratamento foi significativo ($p=0,0001$), não havendo diferença de ação da droga entre os infectados e os não infectados.

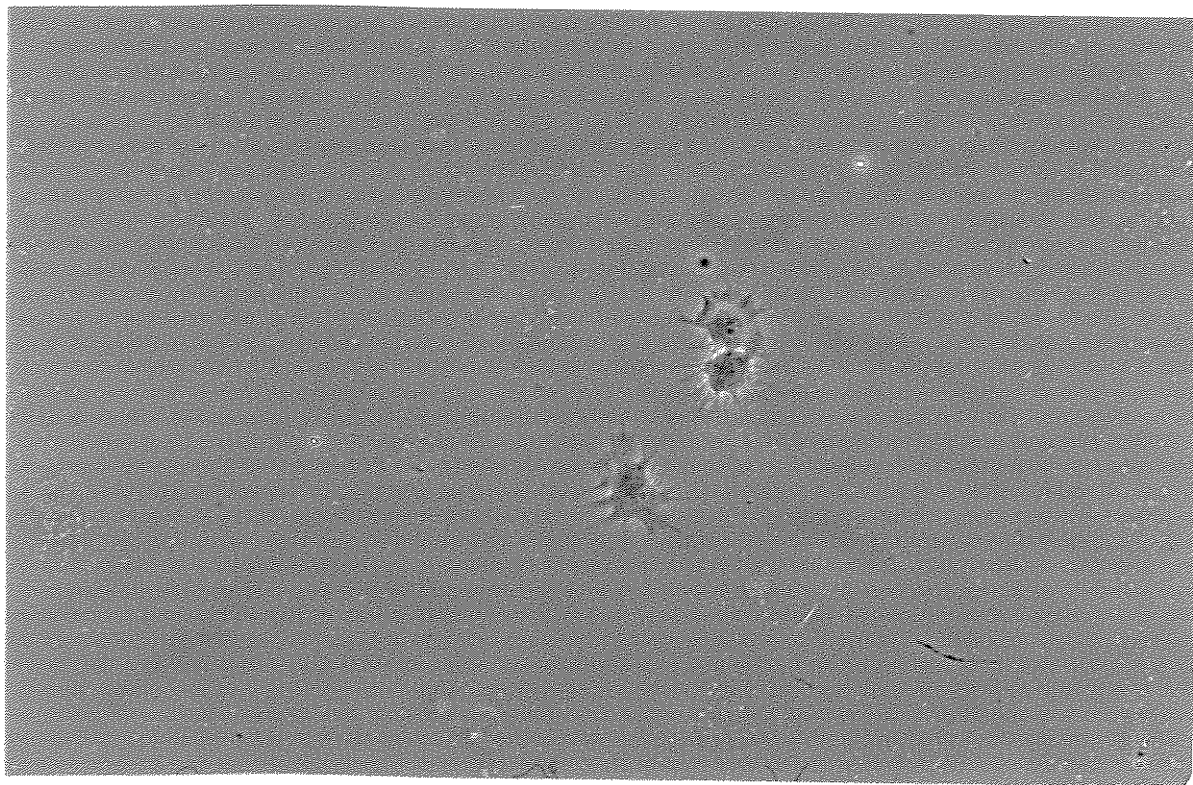


FIGURA 2 - Granulócitos na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* da linhagem BH. Contraste e fase. 430X

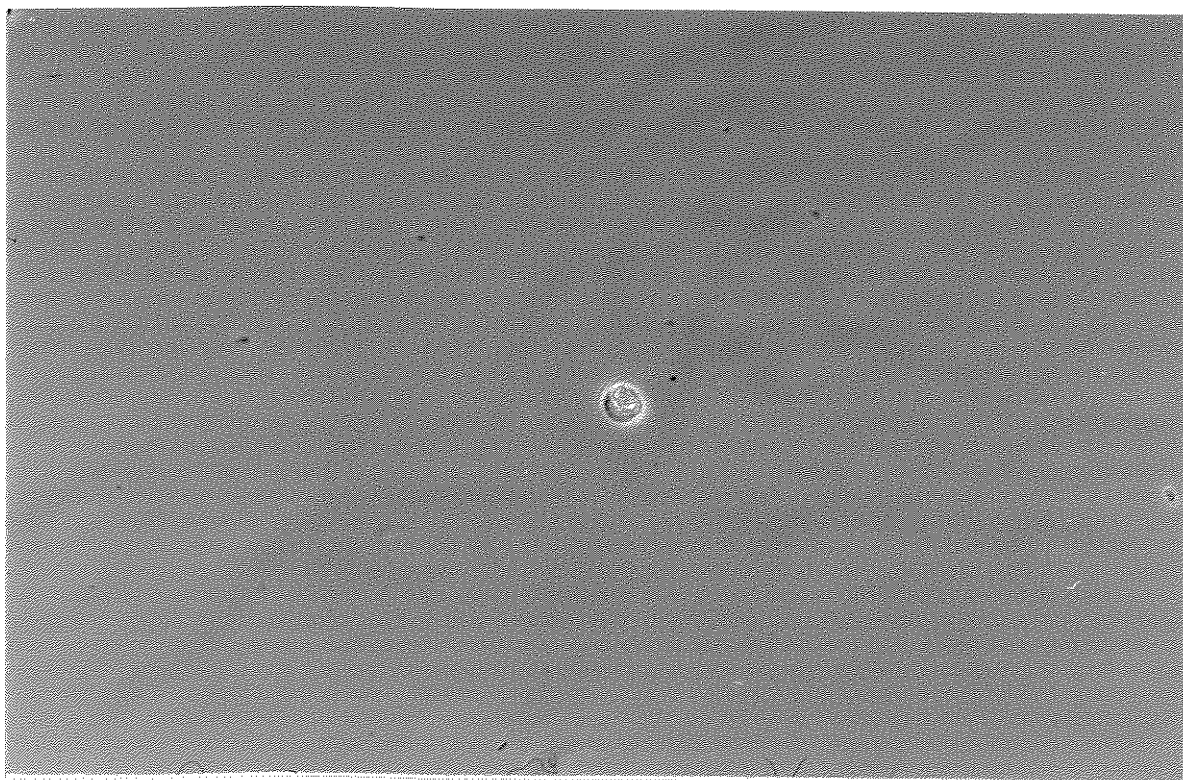


FIGURA 3 - Hialinócitos na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* da linhagem BH. Contraste e fase. 430X

TABELA 6 - NÚMERO MÉDIO DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* NÃO INFECTADA E NÃO SUBMETIDA AO TRATAMENTO COM HIDROCORTISONA (GRUPO I)

PERÍODO (+))	GRANULÓCITOS*	HIALINÓCITOS*	TOTAL*
30 min.	125,5	41,0	166,5
1 hora	97,5	31,0	128,5
3 horas	153,5	75,0	228,5
5 horas	131,5	40,0	171,5
7 horas	152,0	36,0	188,0
9 horas	80,5	39,0	119,5
11 horas	161,5	62,5	224,0
24 horas	126,0	58,0	184,0
48 horas	124,5	53,5	178,0
72 horas	91,0	32,0	123,0

* N⁰ DE CÉLULAS/mm³

(+) Tempo após o tratamento dos moluscos dos grupos II e IV

TABELA 7 - NÚMERO MÉDIO DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* NÃO INFECTADA E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO II)

PERÍODO (tempo após tratamento)	GRANULÓCITOS*	HIALINÓCITOS*	TOTAL*
30 min.	109,5	17,5	127,0
1 hora	45,5	21,5	67,0
3 horas	68,0	5,5	73,5
5 horas	48,5	8,5	57,0
7 horas	48,0	10,0	58,0
9 horas	39,5	17,5	57,0
11 horas	41,0	8,5	49,5
24 horas	73,5	16,0	89,5
48 horas	45,5	15,5	61,0
72 horas	30,5	21,5	52,0

* N^o DE CÉLULAS/ mm³

TABELA 8 - NÚMERO MÉDIO DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* INFECTADA POR *Schistosoma mansoni* E NÃO TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO III)

PERÍODO (+)	GRANULÓCITOS*	HIALINÓCITOS*	TOTAL*
30 min.	101,5	30,0	131,5
1 hora	123,0	54,0	177,0
3 horas	264,5	34,5	299,0
5 horas	139,0	33,5	172,5
7 horas	124,0	42,0	166,0
9 horas	183,0	27,5	210,5
11 horas	196,5	31,5	228,0
24 horas	144,5	30,5	175,0
48 horas	247,0	25,5	272,5
72 horas	310,5	31,0	341,5

* N⁰ DE CÉLULAS/mm³

(+) Tempo após o tratamento dos moluscos dos grupos II e IV

TABELA 9 - NÚMERO MÉDIO DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* INFECTADA POR *Schistosoma mansoni* E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO IV)

PERÍODO (tempo após tratamento)	GRANULÓCITOS*	HIALINÓCITOS*	TOTAL*
30 min.	31,0	9,0	40,0
1 hora	31,5	6,0	37,5
3 horas	46,5	8,5	55,0
5 horas	26,5	13,5	40,0
7 horas	42,0	16,5	58,5
9 horas	20,5	7,0	27,5
11 horas	25,0	7,5	32,5
24 horas	50,0	18,0	68,0
48 horas	38,5	22,0	60,5
72 horas	18,5	9,5	28,0

* N^o DE CÉLULAS/mm³

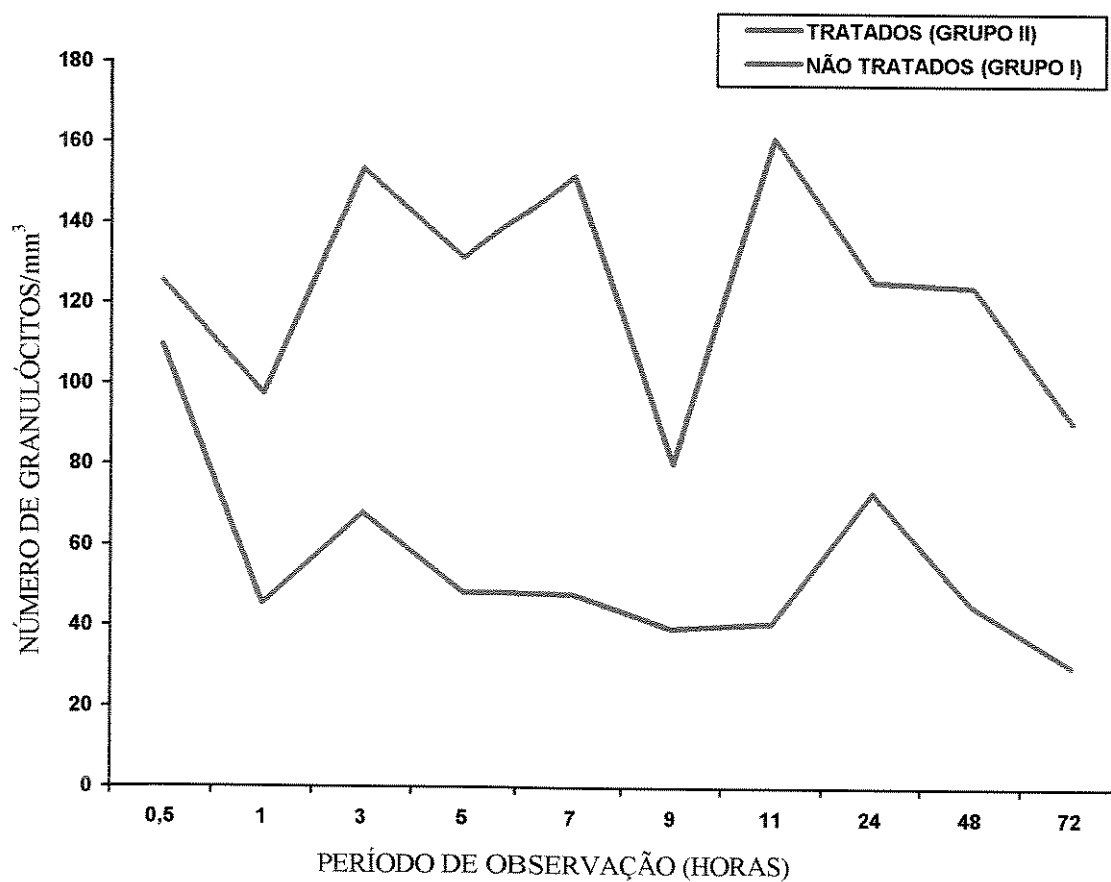


FIGURA 4 – NÚMERO MÉDIO DE GRANULÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* NÃO EXPOSTA AO *Schistosoma mansoni* E TRATADA OU NÃO COM HIDROCORTISONA (GRUPOS II E I, RESPECTIVAMENTE)

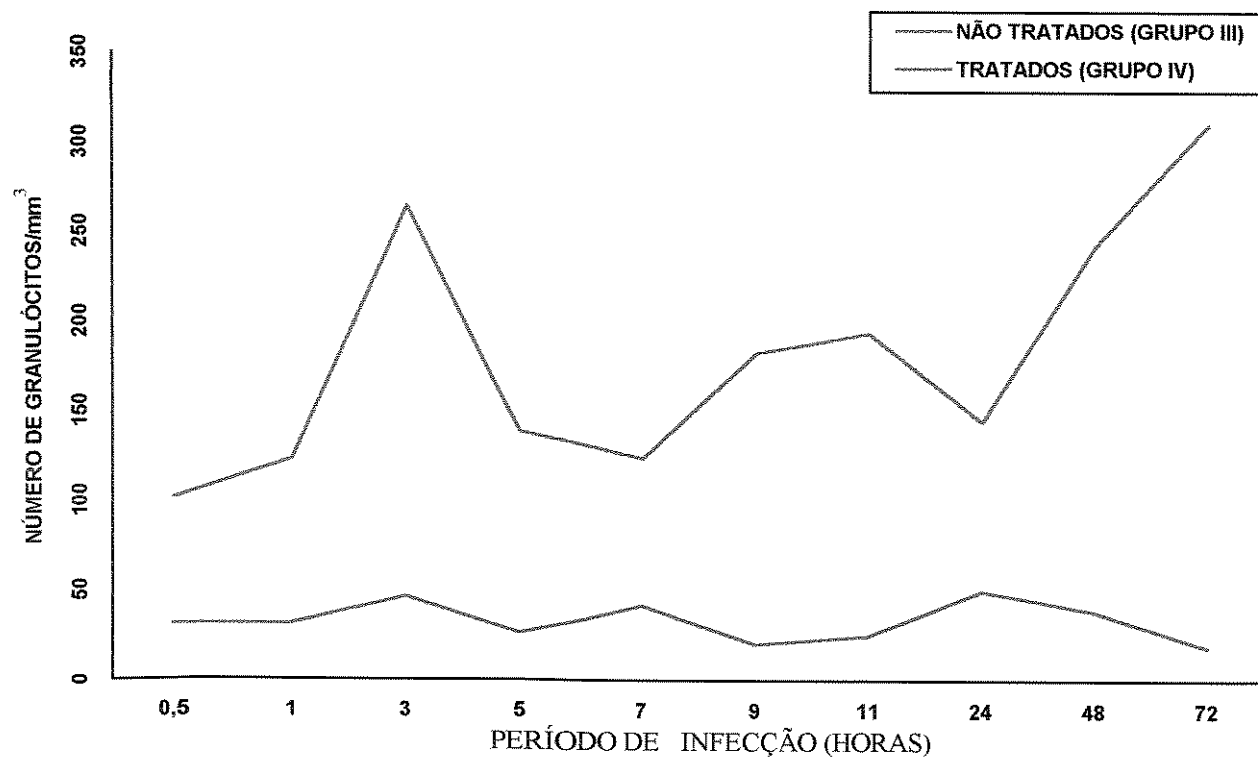


FIGURA 5 - NÚMERO MÉDIO DE GRANULÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* INFECTADA POR *Schistosoma mansoni* E TRATADA OU NÃO COM HIDROCORTISONA (RESPECTIVAMENTE, GRUPOS IV E III)

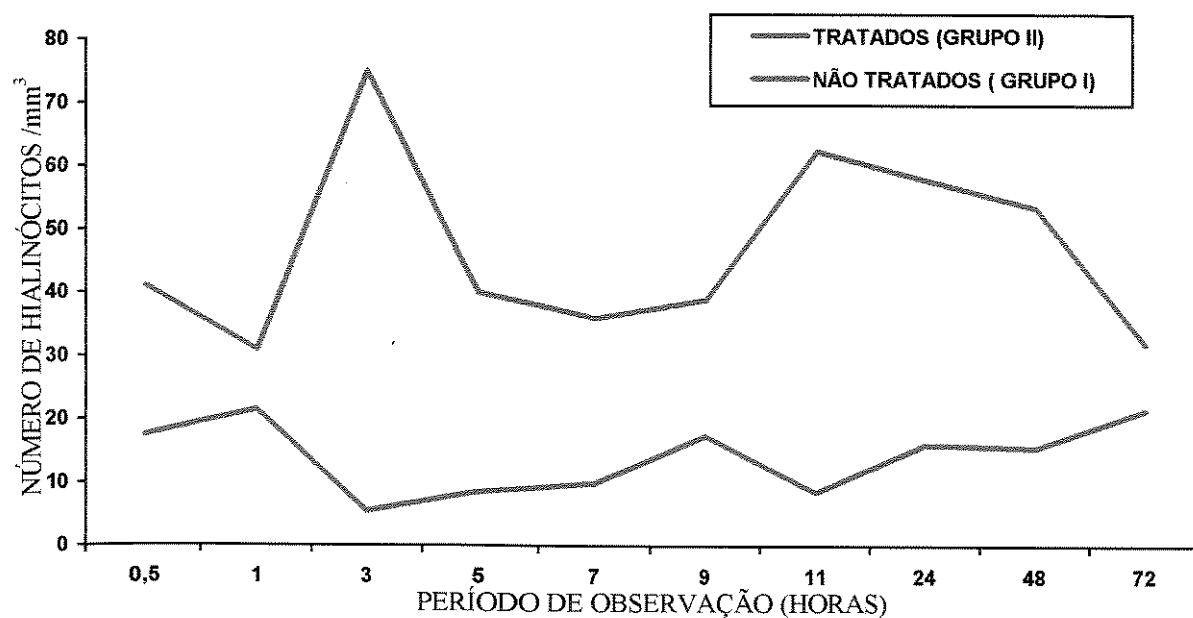


FIGURA 6 - NÚMERO MÉDIO DE HIALINÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* NÃO EXPOSTA À INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* E TRATADA OU NÃO COM HIDROCORTISONA (GRUPOS II E I, RESPECTIVAMENTE)

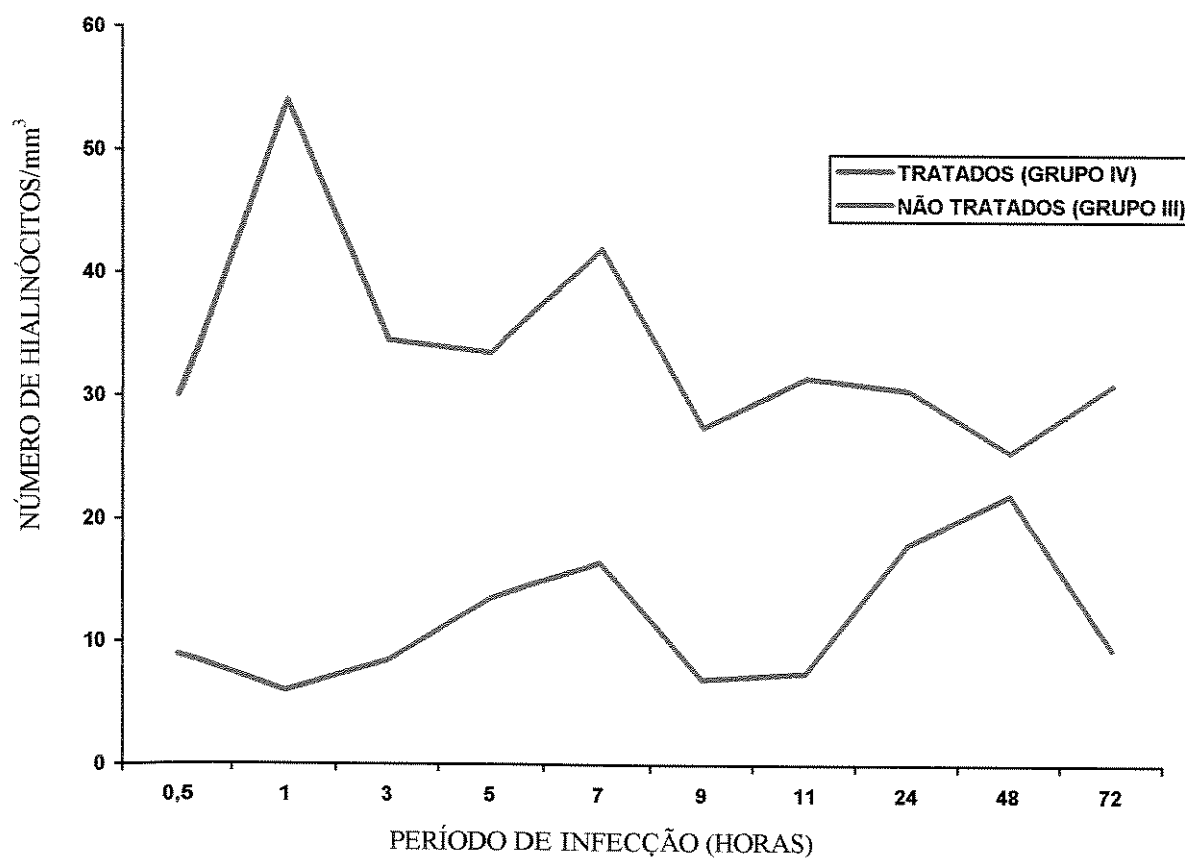


FIGURA 7 – NÚMERO MÉDIO DE HALINÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *Biomphalaria glabrata* INFECTADA POR *Schistosoma mansoni* E TRATADA OU NÃO COM HIDROCORTISONA (GRUPOS IV E III, RESPECTIVAMENTE)

5) REAÇÃO AMEBOCITÁRIA EM TORNO DOS ESPOROCISTOS

Os cortes histológicos dos moluscos foram realizados com o objetivo de quantificar os esporocistos primários, avaliar a viabilidade das larvas de *Schistosoma mansoni*, verificar a existência ou não de reação amebocitária em torno dos esporocistos e localizar os esporocistos secundários, avaliando sua viabilidade e maturidade. Os dados referentes aos esporocistos primários observados em moluscos tratados ou não com hidrocortisona (Grupos IV e III, respectivamente) estão apresentados nas Tabelas de 10 a 13 e Figuras 8 a 11.

Conforme pode ser verificado nas Tabelas 10 e 11 e Figuras 8 e 11, houve uma predominância de esporocistos degenerados em moluscos não tratados com hidrocortisona (Grupo III), enquanto que em moluscos tratados (Grupo IV), o número de esporocistos primários foi maior e predominaram esporocistos viáveis (Tabelas 12 e 13 e Figuras 9 e 10). As Figuras 12 e 13, respectivamente, mostram exemplos de esporocistos em processos de degeneração (Grupo III) e viáveis (Grupo IV).

Em 4 exemplares de *Biomphalaria glabrata* do Grupo III (não tratadas com hidrocortisona) não foi observada a presença de esporocistos primários (Tabela 10), fato este não verificado em moluscos do Grupo IV, tratados com hidrocortisona (Tabela 12).

Nas Tabelas 14 a 17 estão demonstradas as avaliações da reação amebocitária em torno dos esporocistos presentes em moluscos dos Grupos III e IV. Como pode ser melhor visualizado nas Figuras 16 e 18, em *Biomphalaria glabrata* não tratada com hidrocortisona a maioria dos esporocistos primários estava envolvida por uma reação

amebocitária. Em moluscos tratados com hidrocortisona predominaram esporocistos sem reação amebocitária (Figuras 17 e 19). As Figuras 12 e 14 mostram exemplos de reações amebocitárias em torno dos esporocistos em moluscos não tratados com hidrocortisona (Grupo III). Nas Figuras 13 e 15 estão demonstradas a ausência de reações amebocitárias em torno dos esporocistos, aspecto esse comumente observado em moluscos tratados com hidrocortisona (Grupo IV).

Com algumas exceções, os amebócitos presentes nas reações em torno dos esporocistos apresentavam-se alongados, lembrando o aspecto de fibroblasto encontrado nos mamíferos (Figura 12 e 14).

A análise estatística realizada considerou os quarenta e oito moluscos participantes do experimento, sendo aleatoriamente selecionados três moluscos para cada combinação (tratamento ou não com hidrocortisona; tempo: 3,5, 4, 5, 6, 10, 17, 24 e 31 dias). Foram verificados os números de esporocistos primários viáveis e não viáveis e os números de esporocistos primários cercados por reação amebocitária e livres da reação.

Para o número de esporocistos primários viáveis e degenerados foram ajustados modelos lineares generalizados com erros distribuídos segundo a distribuição de Poisson e função de ligação logarítmo. O procedimento GENMOD do sistema SAS^R foi utilizado para o cálculo.

Considerando o número de esporocistos primários viáveis, a análise revelou que o tratamento e o tempo foram significantes ($p=0.0001$) e houve interação entre tratamento ($p=0.003$). Isto é, o efeito de tempo depende do tratamento. Efetuados os cálculos separadamente por tratamento, resultou para o tratamento com hidrocortisona tempo $p=0.0003$, sendo o seguinte o modelo ajustado: $\log(n) = 3.2288 - 0,0185 \text{ tempo}$,

onde n é o número de esporocistos viáveis e $\log$ representa a função logaritmo Neperiano. Para os moluscos não tratados o valor de p para o tempo foi de 0.0016 e o modelo ajustado $\log(n) = 1.2917 - 0.0924 \text{ tempo}$.

Para o número de esporocistos primários degenerados, não houve evidência de interação nem de efeito de tratamento ($p = 0.09$ e 0.08 , respectivamente). Apenas tempo foi significativo ($p = 0.005$). O modelo ajustado foi $\log(n) = 1.9543 + 0.0166 \text{ tempo}$.

Na análise estatística das reações amebocitárias (número de esporocistos primários cercados por reações amebocitárias e livres de reação) foi estudada a proporção de reação em função de tratamento e de tempo. O modelo empregado foi a regressão logística. A ferramenta de cálculo usada foi o procedimento LOGISTIC do sistema SAS^R. Ajustou-se a regressão logística separadamente para cada tratamento. Os modelos ajustados foram: $(y = \log \{p[t]/(1 - p[t])\})$, onde $p[t]$ é a proporção de respostas com reação em t dias). Para o tratamento com hidrocortisona $y = -0.7941 - 0.0210 \text{ tempo}$; e para moluscos não tratados $y = 1.2401$. Não se observou variação estatisticamente significativa na proporção de reação no tempo para os moluscos não tratados.

O tratamento com hidrocortisona fez *ab initio*, reduzir drasticamente a proporção de reações amebocitárias em torno dos esporocistos e ainda promoveu um pequeno aumento na redução, com o passar do tempo.

As estimativas das proporções de reação, por tempo, para moluscos tratados foram:

TEMPO	P
3,5	0,30
4,0	0,29
5,0	0,29
6,0	0,28
10,0	0,27
17,0	0,24
24,0	0,21
31,0	0,19

Os não tratados tiveram proporção de reação estimada em $p = 0.77$, para qualquer tempo.

Os primeiros esporocistos secundários maduros, isto é, aqueles em que é possível a visualização de cercárias no interior da larva (Figura 20) foram observados aos 10 dias de infecção em moluscos tratados com hidrocortisona, Grupo IV (Tabela 21), enquanto que no Grupo III (não tratados com hidrocortisona) o primeiro molusco a apresentar esporocistos secundários maduros tinha 24 dias de infecção (Tabela 20). Os locais onde os esporocistos secundários foram encontrados foram semelhantes em ambos os grupos; porém, quantitativamente, eles predominavam nos moluscos do Grupo IV (Tabelas 18 e 19).

Nas Tabelas 19 e 21 podemos observar que predominaram os esporocistos secundários viáveis (Figura 22) em moluscos tratados com hidrocortisona (Grupo IV). Nos moluscos não tratados com hidrocortisona (Grupo III), predominaram os esporocistos secundários em processo de degeneração (Tabelas 18 e 20, Figura 21).

Os esporocistos primários, tanto em moluscos que passaram por tratamento com hidrocortisona (Grupo IV) como em moluscos que não tiveram tal tratamento (Grupo III), foram encontrados na região cefalopodal do caramujo. Já os esporocistos secundários variaram bastante quanto a sua localização, tendo várias regiões anatômicas apresentado o parasita em tal fase de seu ciclo vital, como a região cefalopodal, tentáculo, colar do manto, ureter, hepatopâncreas, ovotestis, intestino, etc.

TABELA 10: NÚMERO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E NÃO TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO III)

Nº DO MOLUSCO	TEMPO DE INFECÇÃO (DIAS) *	ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS		
		V	D	T
01	3,5	0	0	0
02	3,5	01	24	25
03	3,5	10	05	15
04	04	01	06	07
05	04	06	0	06
06	04	0	17	17
07	05	01	07	08
08	05	04	13	17
09	05	07	02	09
10	06	0	0	0
11	06	0	13	13
12	06	0	03	03
13	10	02	11	13
14	10	0	0	0
15	10	0	0	0
16	17	0	46	46
17	17	0	18	18
18	17	01	34	35
19	24	01	02	03
20	24	03	13	16
21	24	0	28	28
22	31	0	13	13
23	31	0	04	04
24	31	0	07	07

V= ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS VIÁVEIS

D= ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS DEGENERADOS

T= TOTAL DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS OBSERVADOS

* Correspondem, repectivamente, a 12, 24, 48, 72 horas e 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento dos molusco do Grupo IV.

TABELA 11 - NÚMERO MÉDIO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E NÃO TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO III)

TEMPO DE INFECÇÃO *	ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS				
	VIÁVEIS		DEGENERADOS		TOTAL
	MÉDIA	%	MÉDIA	%	
(DIAS)					
3,5	3,67	27,46	9,67	72,54	13,33
4	2,33	23,3	7,67	76,7	10
5	4,0	35,3	7,33	64,7	11,33
6	0	0	5,33	100	5,33
10	0,67	15,24	3,67	84,76	4,33
17	0,33	1,0	32,67	99,0	33
24	1,33	8,49	14,33	91,51	15,67
31	0	0	8,0	100	8

* Correspondem, respectivamente, a 12, 24, 48, 72 horas e 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento dos moluscos do Grupo IV

TABELA 12 - NÚMERO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO IV)

Nº DO MOLUSCO	TEMPO DE INFECÇÃO (DIAS) *	ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS		
		V	D	T
01	3,5	21	3	24
02	3,5	23	3	26
03	3,5	20	5	25
04	4	4	1	5
05	4	22	6	28
06	4	11	8	19
07	5	45	16	61
08	5	28	6	34
09	5	23	4	27
10	6	37	12	49
11	6	18	1	19
12	6	18	3	21
13	10	11	1	12
14	10	24	17	41
15	10	19	8	27
16	17	42	13	55
17	17	35	7	42
18	17	14	3	17
19	24	18	10	28
20	24	16	8	24
21	24	8	4	12
22	31	18	1	19
23	31	13	7	20
24	31	0	10	10

V= ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS VIÁVEIS

D= ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS DEGENERADOS

T= TOTAL DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS OBSERVADOS

* Correspondem, respectivamente a 12, 24, 48, 72 horas e 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento

TABELA 13: NÚMERO MÉDIO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO IV)

TEMPO DE INFECÇÃO	ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS				
	VIÁVEIS		DEGENERADOS		TOTAL
	MÉDIA	%	MÉDIA	%	
* (DIAS)					
3,5	21,33	85,32	3,67	14,68	25
4	12,33	71,15	5,0	28,85	17,33
5	32,0	78,68	8,67	21,32	40,67
6	24,33	82,03	5,33	17,97	29,67
10	18,0	67,49	8,67	32,51	26,67
17	30,33	79,82	7,67	20,18	38
24	14,0	65,64	7,33	34,36	21,33
31	10,33	63,26	6,0	36,74	16,33

* Correspondem, respectivamente, a 12, 24, 48, 72 horas e 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento.

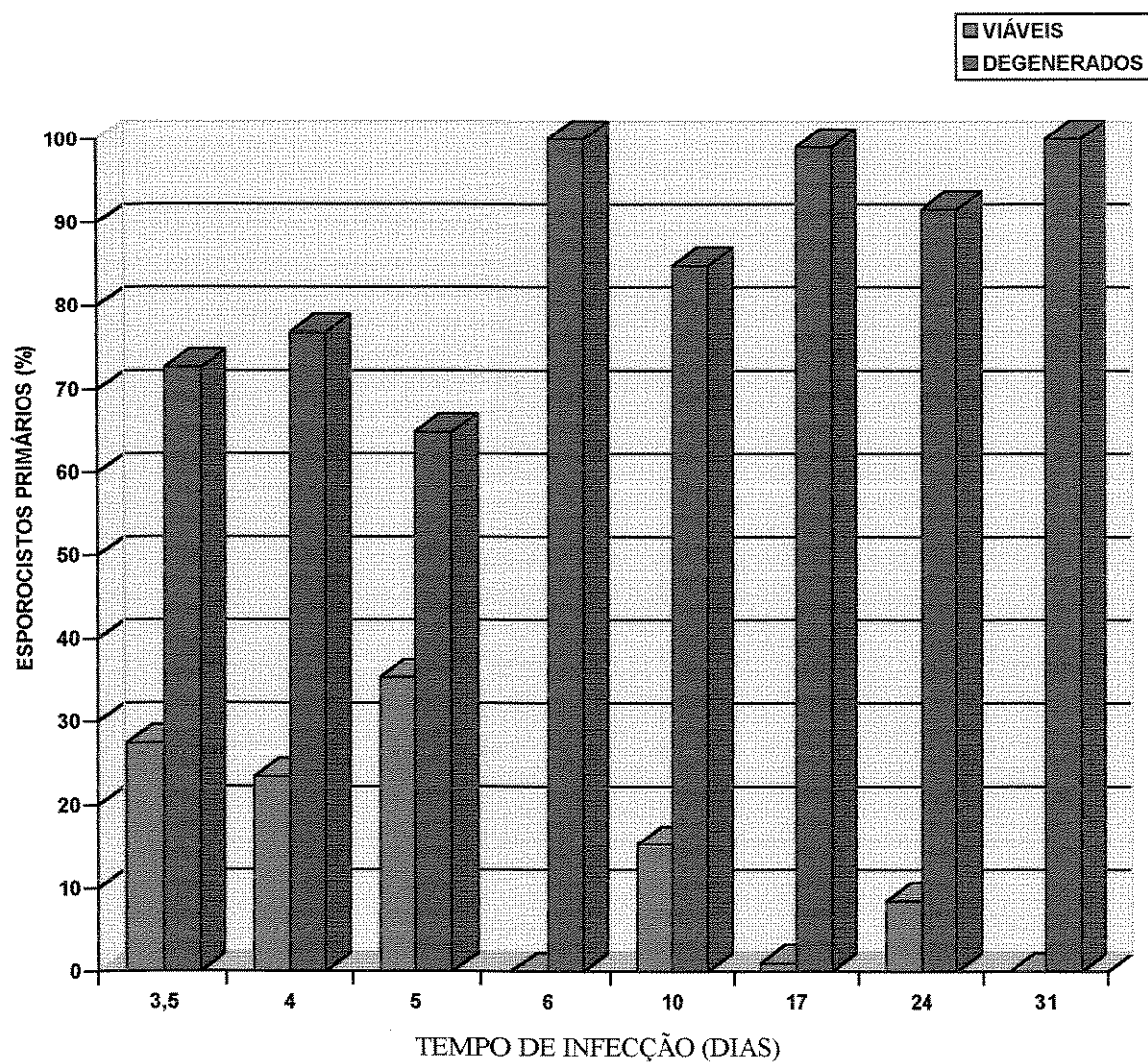


FIGURA 8 - NÚMERO MÉDIO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS OBSERVADOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* E NÃO TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO III)

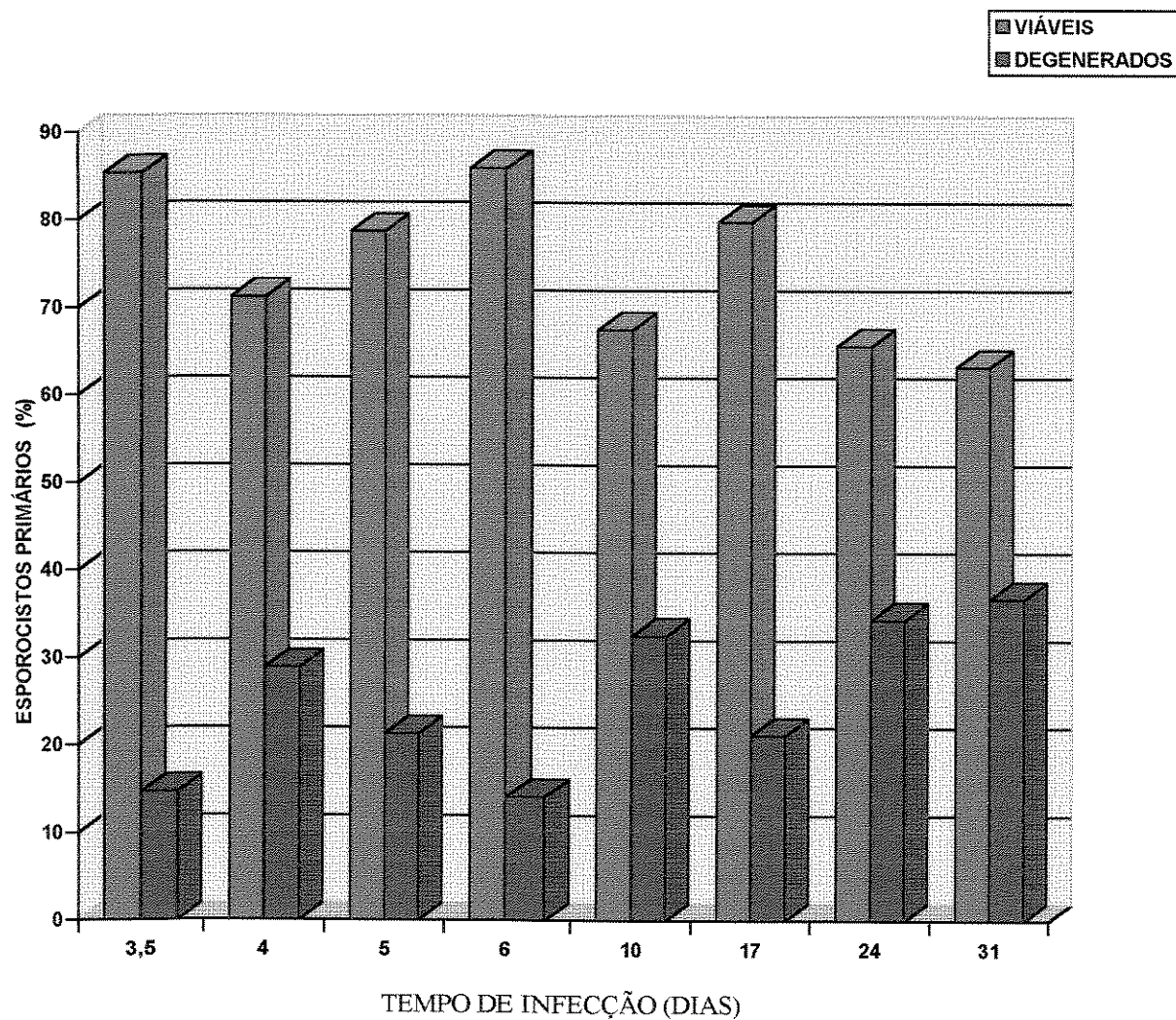


FIGURA 9 - NÚMERO MÉDIO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS OBSERVADOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO IV)

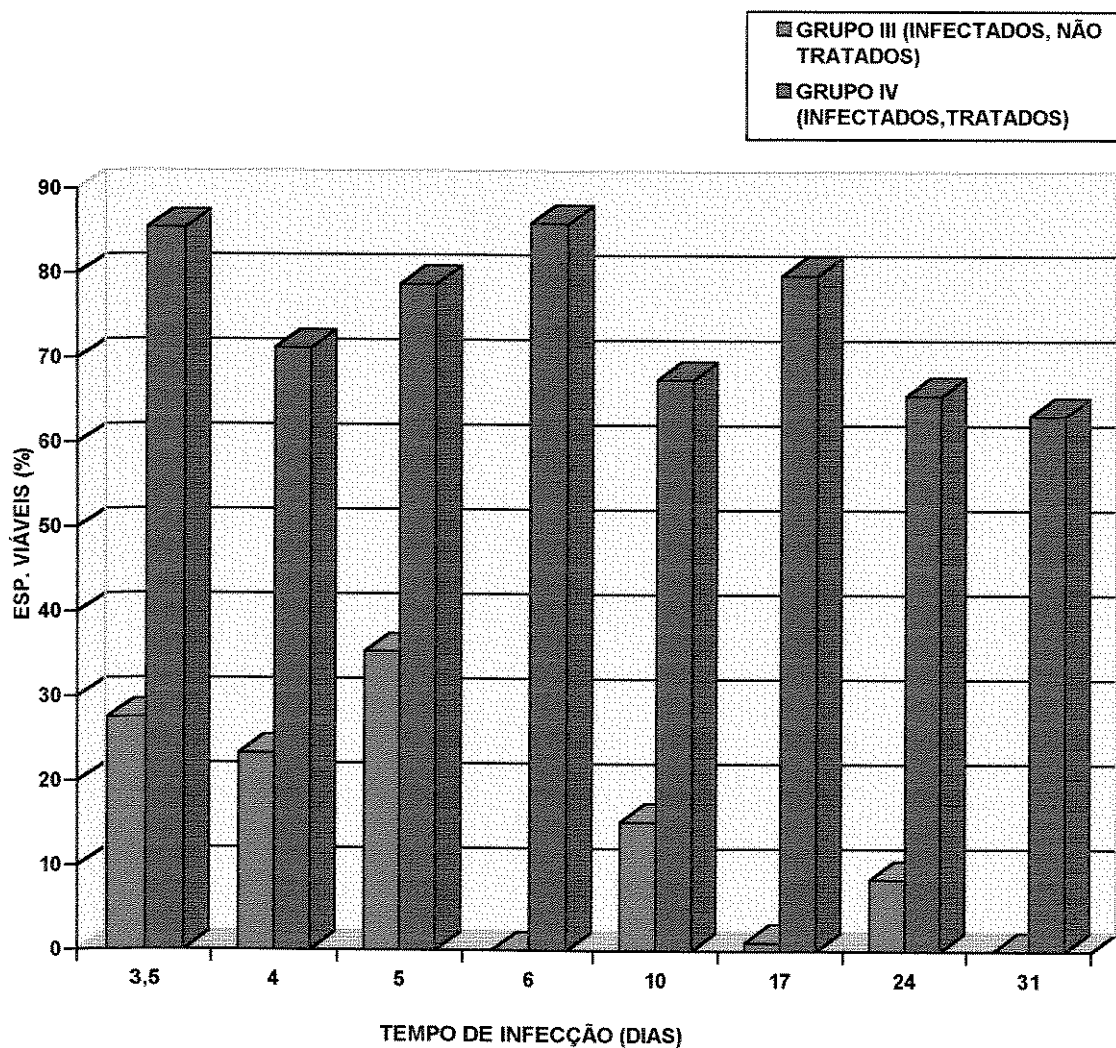


FIGURA 10 - NÚMERO MÉDIO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS VIÁVEIS OBSERVADOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni*, TRATADA OU NÃO COM HIDROCORTISONA (GRUPOS IV E III, RESPECTIVAMENTE)

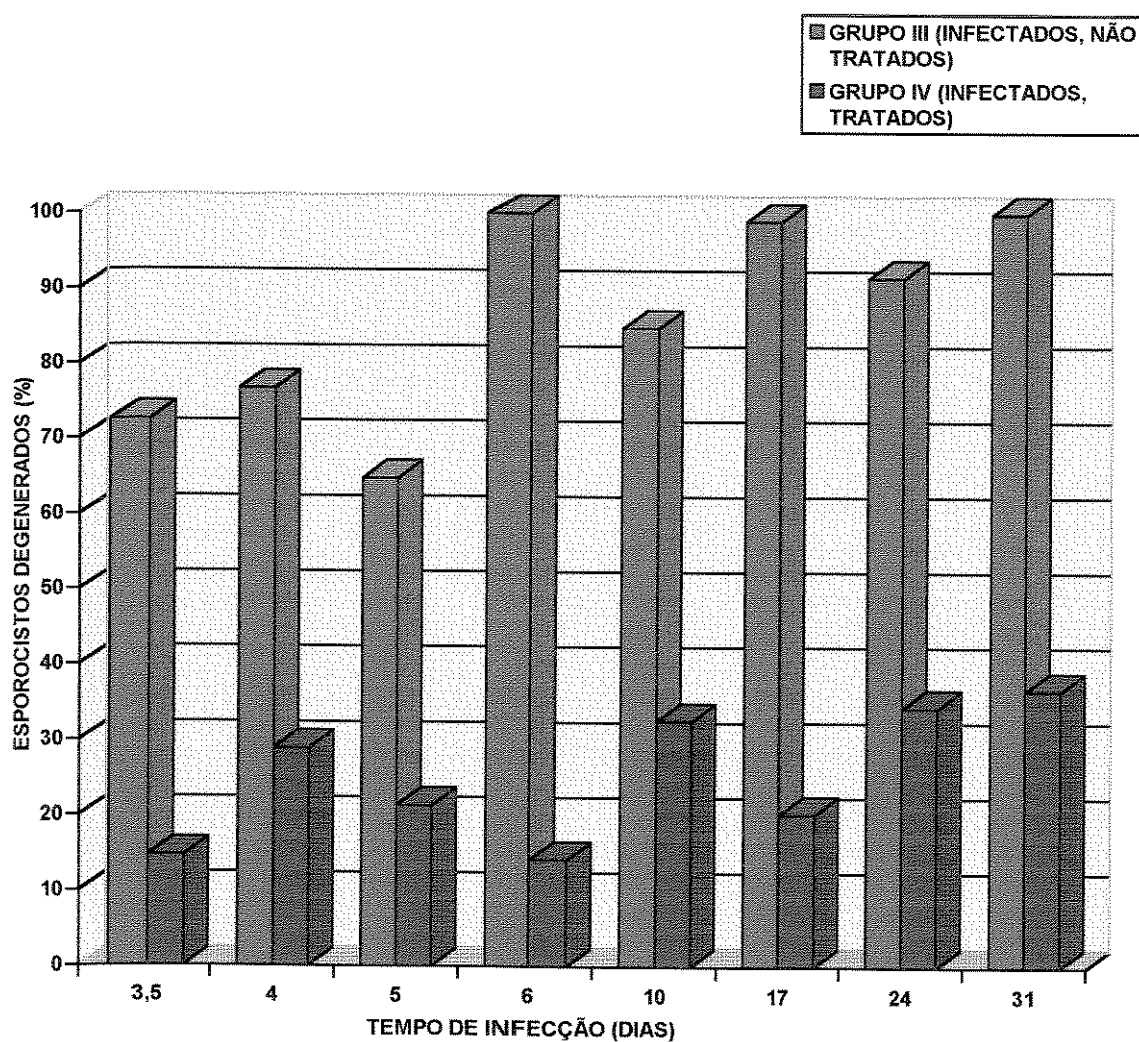


FIGURA 11 - NÚMERO MÉDIO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS DEGENERADOS OBSERVADOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* E TRATADA OU NÃO COM HIDROCORTISONA (GRUPOS IV E III, RESPECTIVAMENTE)

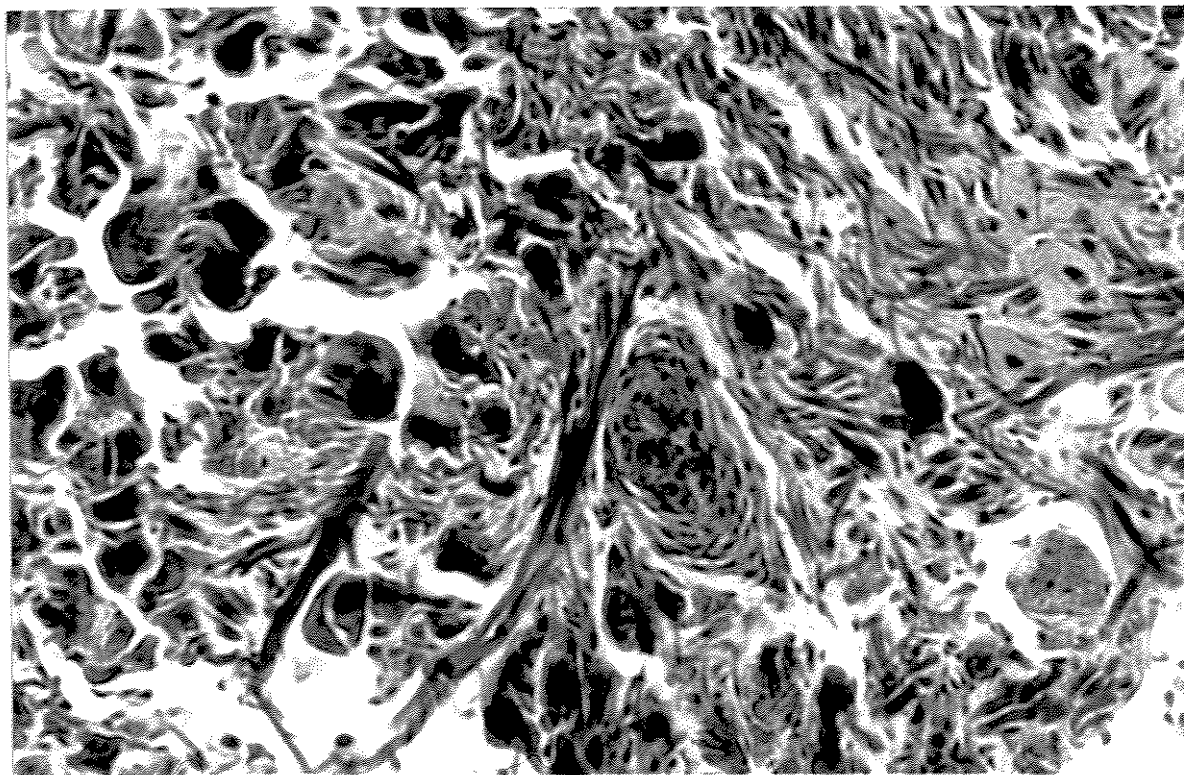


FIGURA 12 - Corte histológico da região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* não tratada com hidrocortisona (Grupo III) 3,5 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*. Observa-se esporocisto primário degenerado com reação amebocitária intensa ao seu redor. Coloração por Tricrômico de Gomori. 430X.

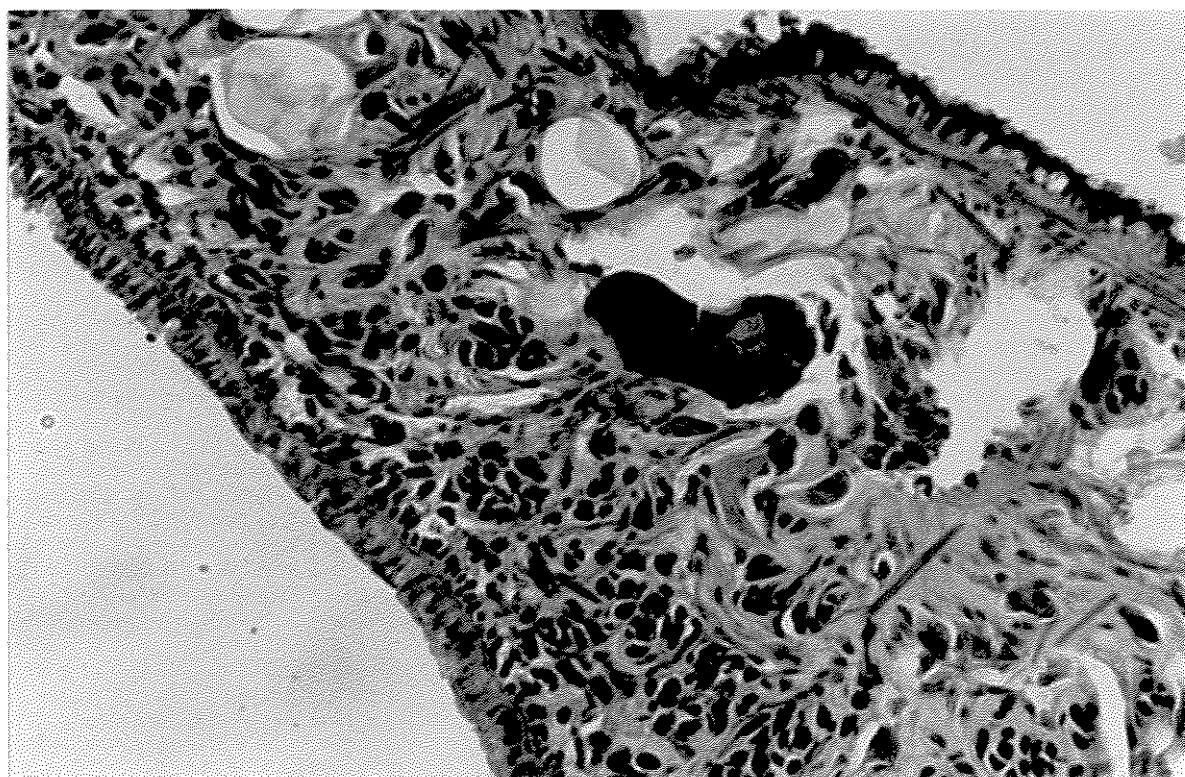


FIGURA 13 – Corte histológico da região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* tratada com hidrocortisona (Grupo IV) 3,5 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*. Observa-se esporocisto primário viável sem reação amebocitária ao seu redor. Coloração por Tricrômico de Gomori. 430X.

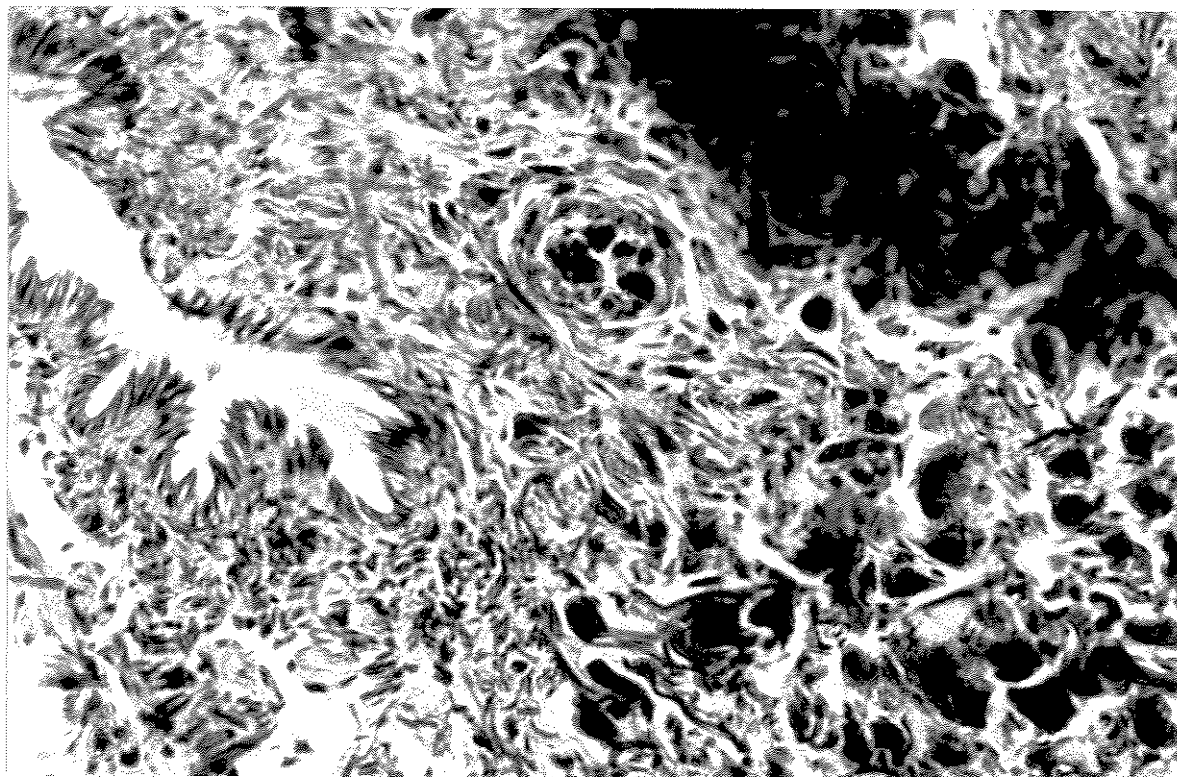


FIGURA 14 – Corte histológico da região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* não tratada com hidroclotisona (Grupo III) 4 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*. Observa-se esporocisto primário em degeneração com reação amebocitária ao seu redor. Coloração Tricrômico de Gomori. 430X. Uso de filtro azul.

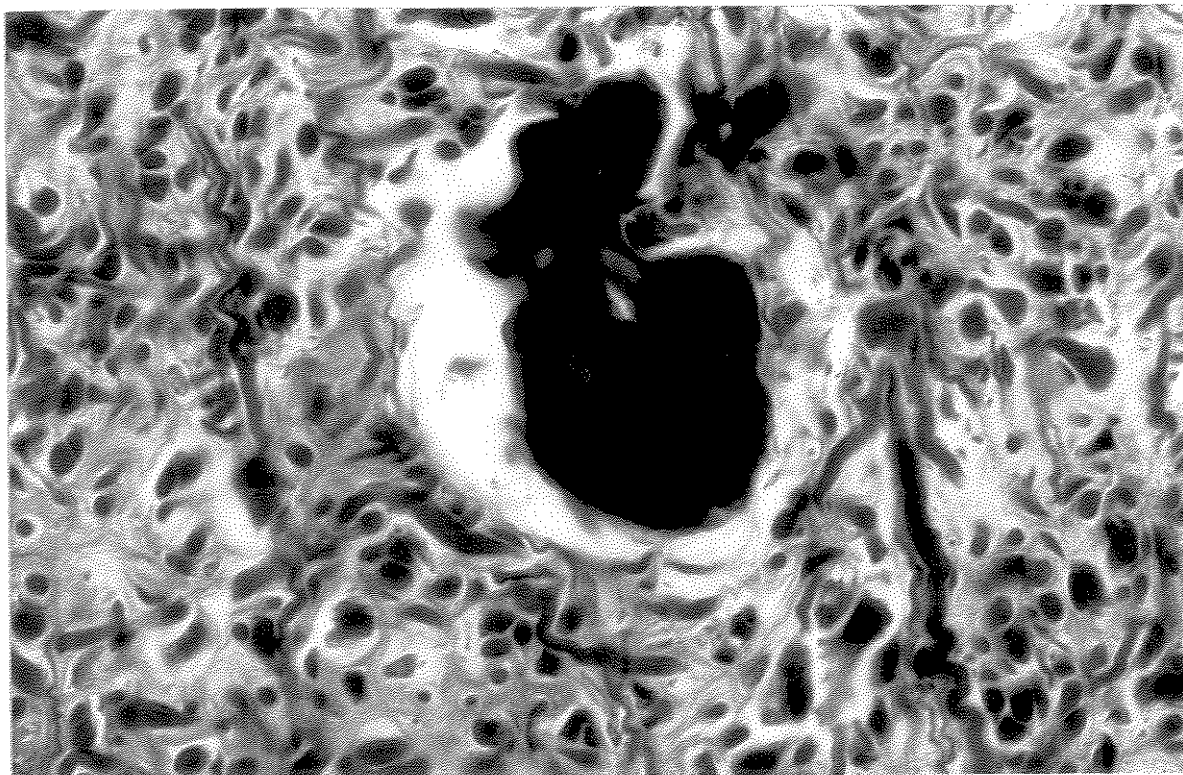


FIGURA 15 – Corte histológico da região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* tratada com hidrocortisona (Grupo IV) 5 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*. Observa-se esporocisto primário viável sem reação amebocitária ao seu redor. Coloração por Tricrômico de Gomori. 1090X

TABELA 14 - REAÇÃO AMEBOCITÁRIA EM TORNO DOS ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E NÃO TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO III)

Nº DO MOLUSCO	TEMPO DE INFECÇÃO (DIAS) *	ESPOROCISTOS		
		COM REAÇÃO	SEM REAÇÃO	TOTAL
01	3,5	0	0	0
02	3,5	24	01	25
03	3,5	06	09	15
04	04	06	01	07
05	04	01	05	06
06	04	15	02	17
07	05	07	01	08
08	05	13	04	17
09	05	02	07	09
10	06	0	0	0
11	06	13	0	13
12	06	03	0	03
13	10	06	07	13
14	10	0	0	0
15	10	0	0	0
16	17	46	0	46
17	17	18	0	18
18	17	24	11	35
19	24	01	02	03
20	24	10	06	16
21	24	17	11	28
22	31	12	01	13
23	31	04	0	4
24	31	07	0	07

C/ REAÇÃO= Existência de reação amebocitária ao redor do esporocisto primário

S/ REAÇÃO= Não existência de reação amebocitária ao redor do esporocisto primário

* Correspondem, respectivamente, a 12, 24, 48, 72 horas e 7, 14, 21 e 28 dias após tratamento dos moluscos do Grupo IV

TABELA 15 - AVALIAÇÃO DA REAÇÃO AMEBOCITÁRIA EM TORNO DOS ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH PRESENTES EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS E NÃO TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO III)

TEMPO DE INFEÇÃO	ESPOROCISTOS				
	COM REAÇÃO		SEM REAÇÃO		TOTAL
	MÉDIA	%	MÉDIA	%	
* (DIAS)					
3,5	10,0	75,02	3,33	24,98	13,33
4	7,33	73,3	2,67	26,7	10
5	7,33	64,7	4,0	35,3	11,33
6	5,33	100	0	0	5,33
10	2,0	46,19	2,33	53,81	4,33
17	29,33	88,88	3,67	11,12	33
24	9,33	59,58	6,33	40,42	15,67
31	7,67	95,875	0,33	4,125	8

* Correspondem, respectivamente, a 12, 24, 48, 72 horas e 7, 14, 21 e 28 dias após tratamento dos moluscos do Grupo IV.

TABELA 16 - REAÇÃO AMEBOCITÁRIA EM TORNO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO IV)

Nº DO MOLUSCO	TEMPO DE INFECÇÃO * (DIAS)	ESPOROCISTOS		
		COM REAÇÃO	SEM REAÇÃO	TOTAL
01	3,5	0	24	24
02	3,5	5	21	26
03	3,5	8	17	25
04	4	1	4	5
05	4	6	22	28
06	4	4	15	19
07	5	23	38	61
08	5	8	26	34
09	5	7	20	27
10	6	11	38	49
11	6	13	6	19
12	6	2	19	21
13	10	1	11	12
14	10	16	25	41
15	10	25	2	27
16	17	6	49	55
17	17	8	34	42
18	17	1	16	17
19	24	9	19	28
20	24	5	19	24
21	24	3	9	12
22	31	2	17	19
23	31	6	14	20
24	31	0	10	10

COM REAÇÃO= Existência de reação amebocitária ao redor do esporocisto primário

SEM REAÇÃO= Não existência de reação amebocitária ao redor do esporocisto primário

* Correspondem, respectivamente, a 12, 24, 48, 72 horas e 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento

TABELA 17 - AVALIAÇÃO DE REAÇÃO AMEBOCITÁRIA EM TORNO DOS ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH PRESENTES EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO IV)

TEMPO DE INFECÇÃO	ESPOROCISTOS				
	COM REAÇÃO		SEM REAÇÃO		TOTAL
	MÉDIA	%	MÉDIA	%	
* (DIAS)					
3,5	4,33	17,32	20,67	82,68	25
4	3,67	21,12	13,67	78,88	17,33
5	12,67	31,15	28,0	68,85	40,67
6	8,67	29,22	21,0	70,78	29,67
10	14,0	52,49	12,67	47,51	26,67
17	5,0	13,16	33,0	86,84	38
24	5,67	26,54	15,67	73,46	21,33
31	2,67	16,29	13,67	83,71	16,33

* Correspondem, respectivamente, a 12, 24, 48, 72 horas e 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento.

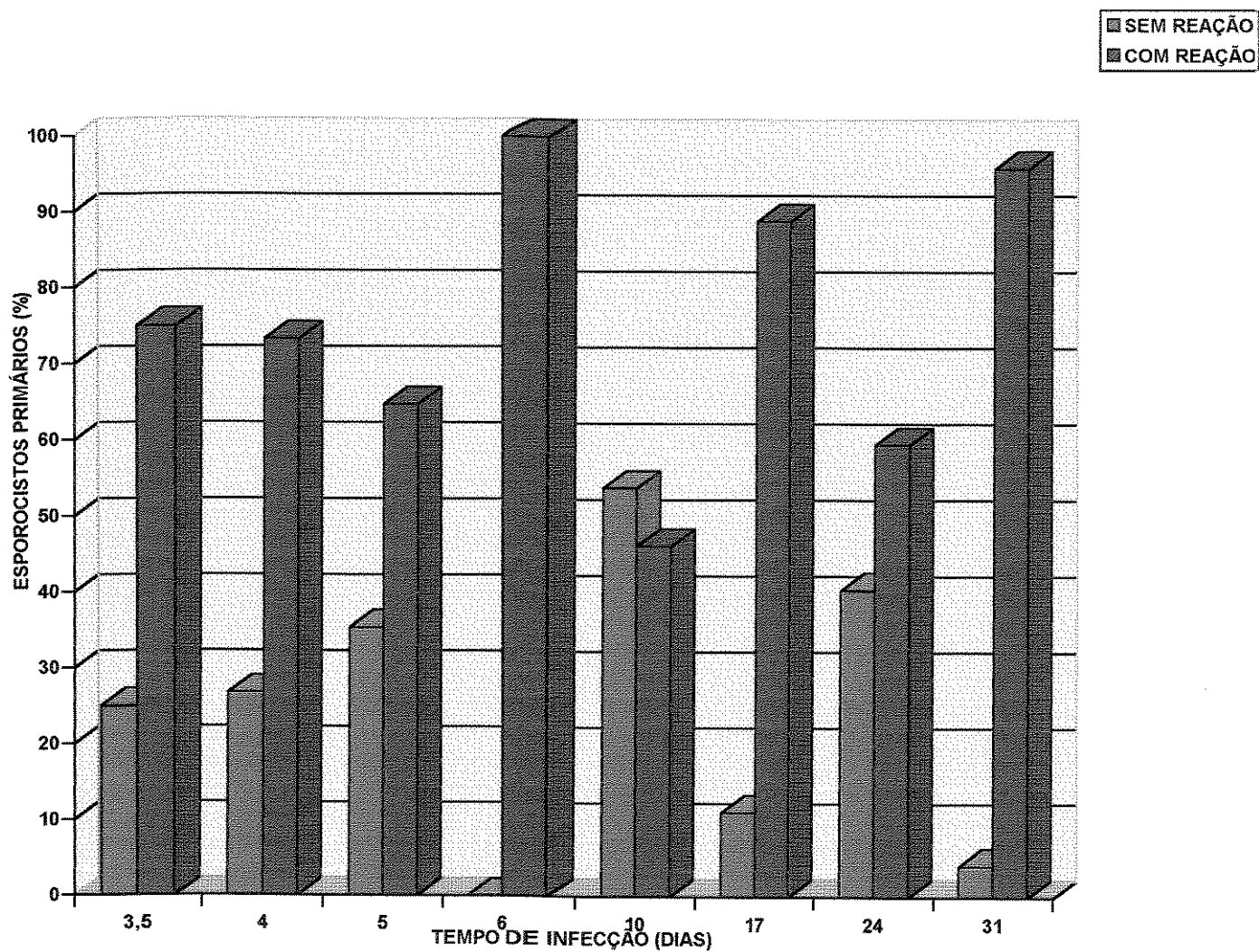


FIGURA 16 - REAÇÃO AMEBOCITÁRIA EM TORNO DOS ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E NÃO TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO III)

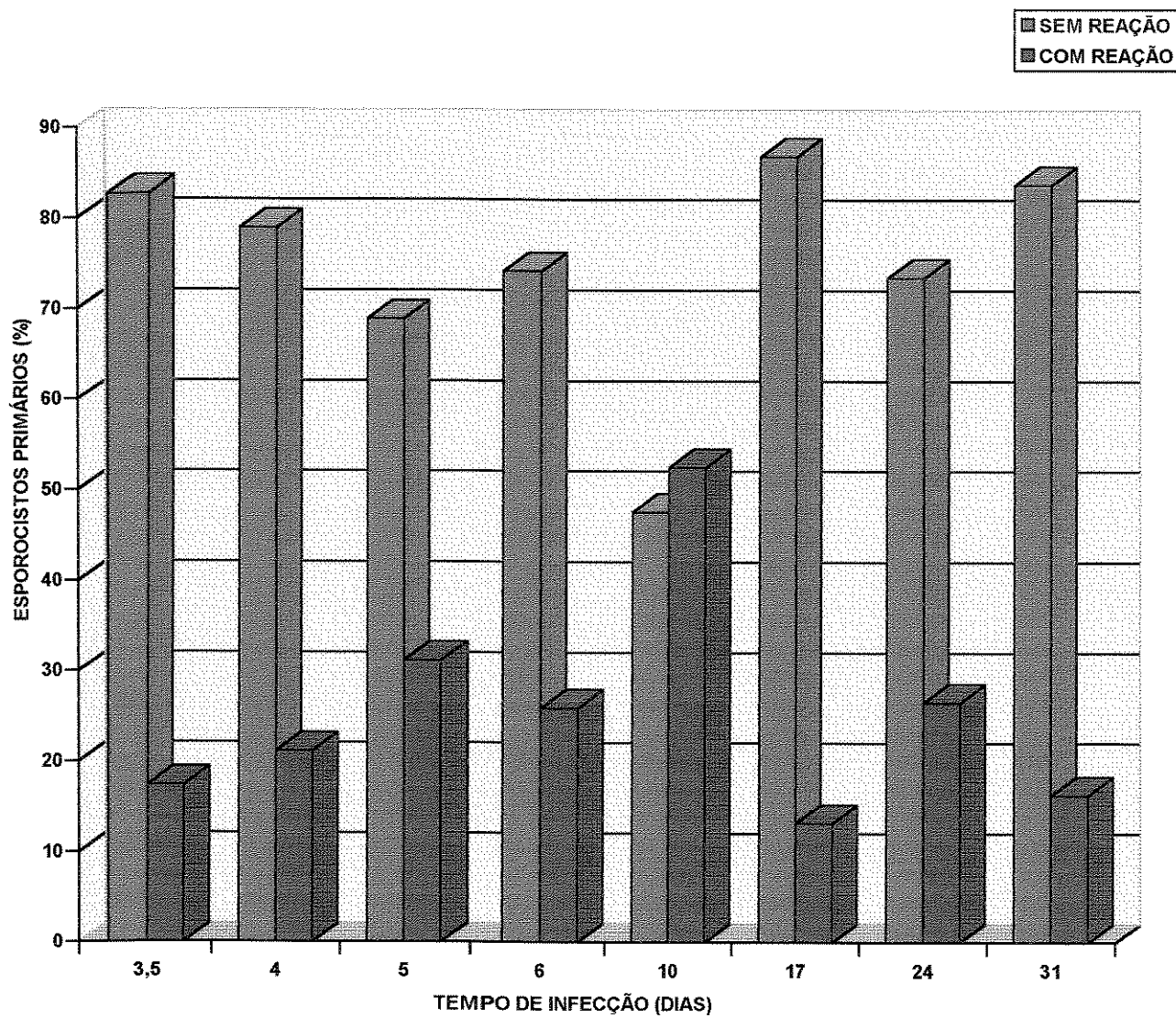


FIGURA 17 - REAÇÃO AMEBOCITÁRIA EM TORNO DOS ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* da LINHAGEM BH E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO IV)

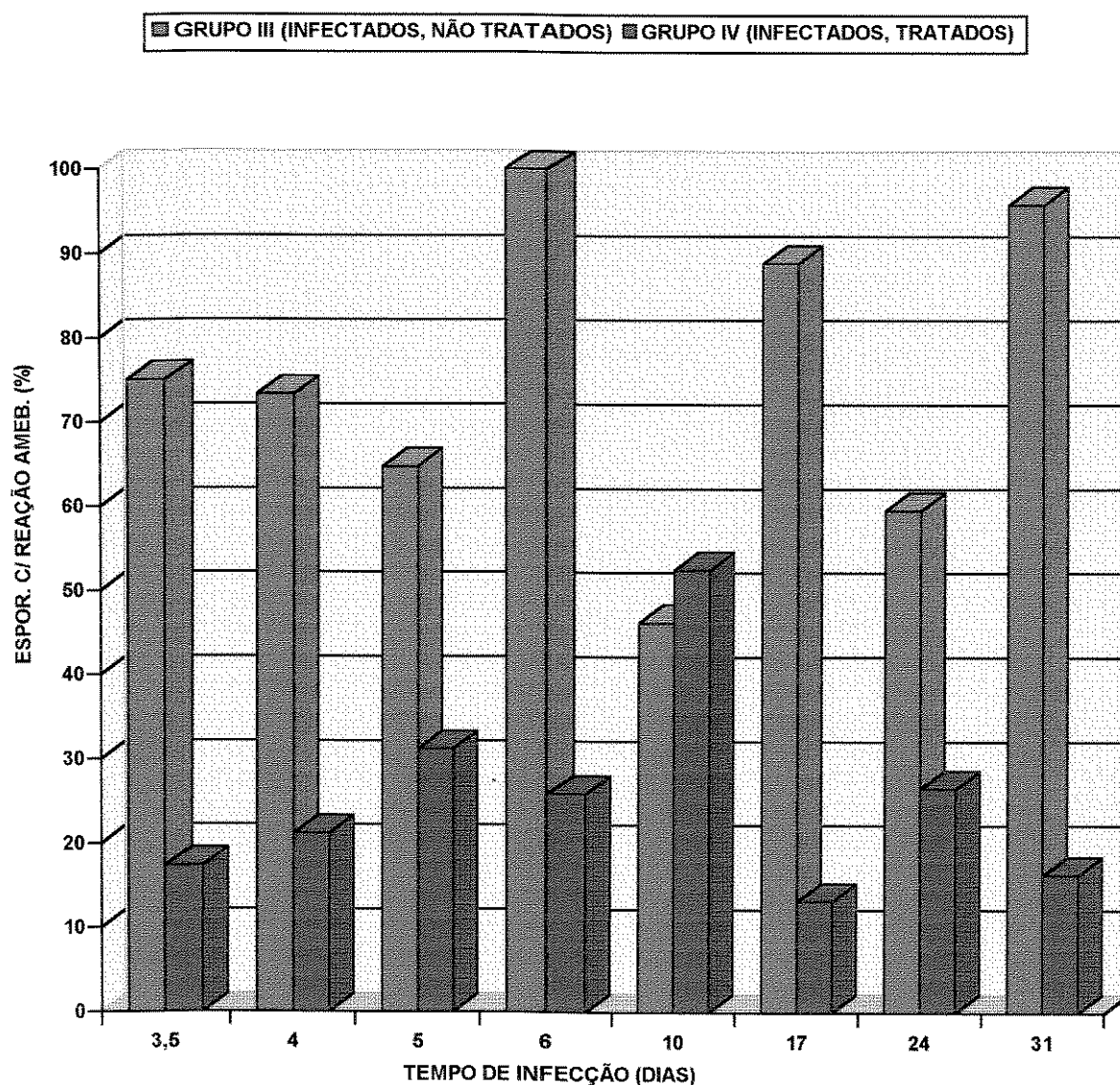


FIGURA 18 - NÚMERO MÉDIO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS COM REAÇÃO AMEBOCITÁRIA AO SEU REDOR, ENCONTRADOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E TRATADA OU NÃO COM HIDROCORTISONA (GRUPOS IV E III, RESPECTIVAMENTE)

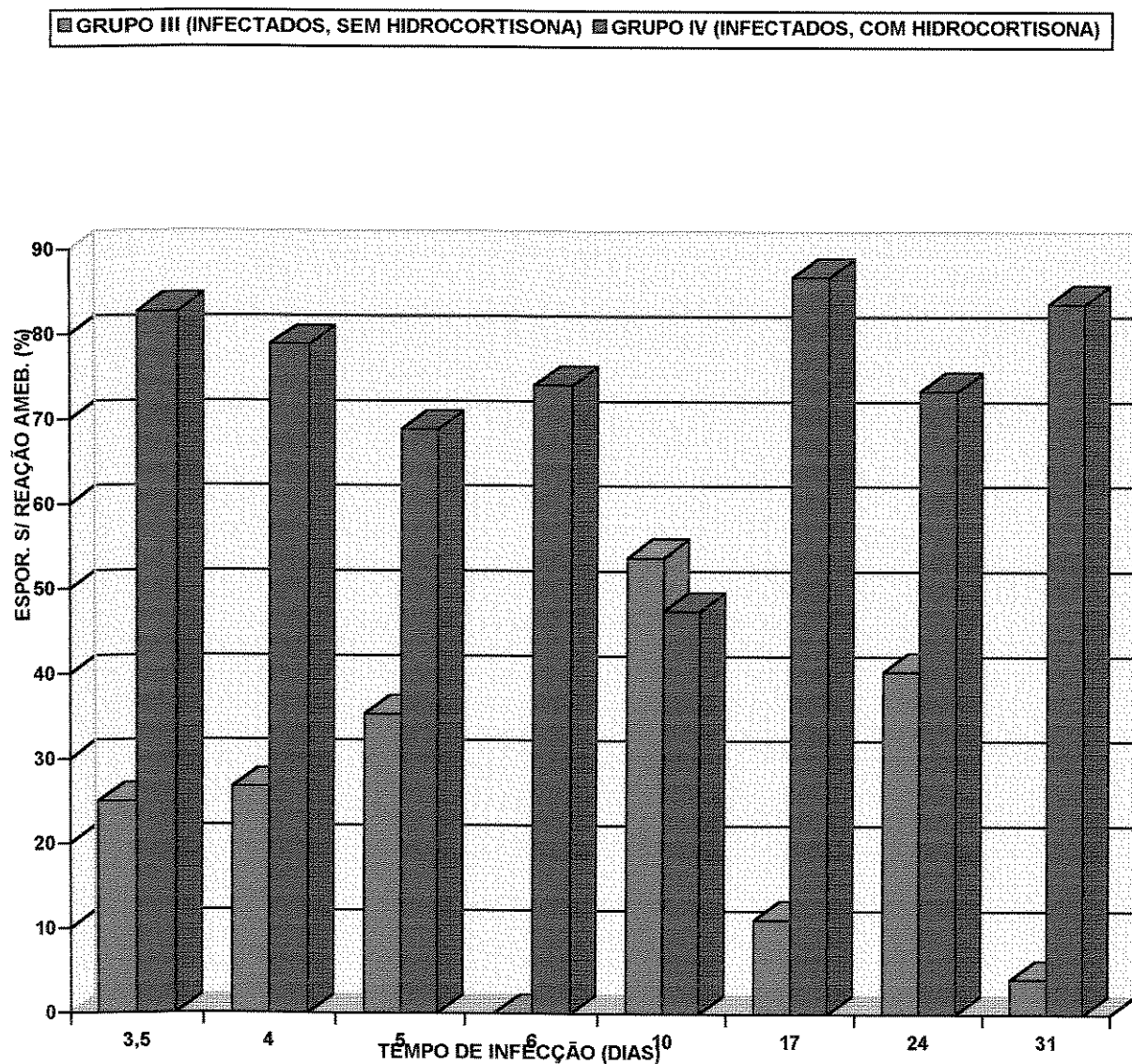


FIGURA 19 - NÚMERO MÉDIO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS SEM REAÇÃO AMEBOCITÁRIA AO SEU REDOR, ENCONTRADOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E TRATADA OU NÃO COM HIDROCORTISONA (GRUPOS IV E III, RESPECTIVAMENTE)

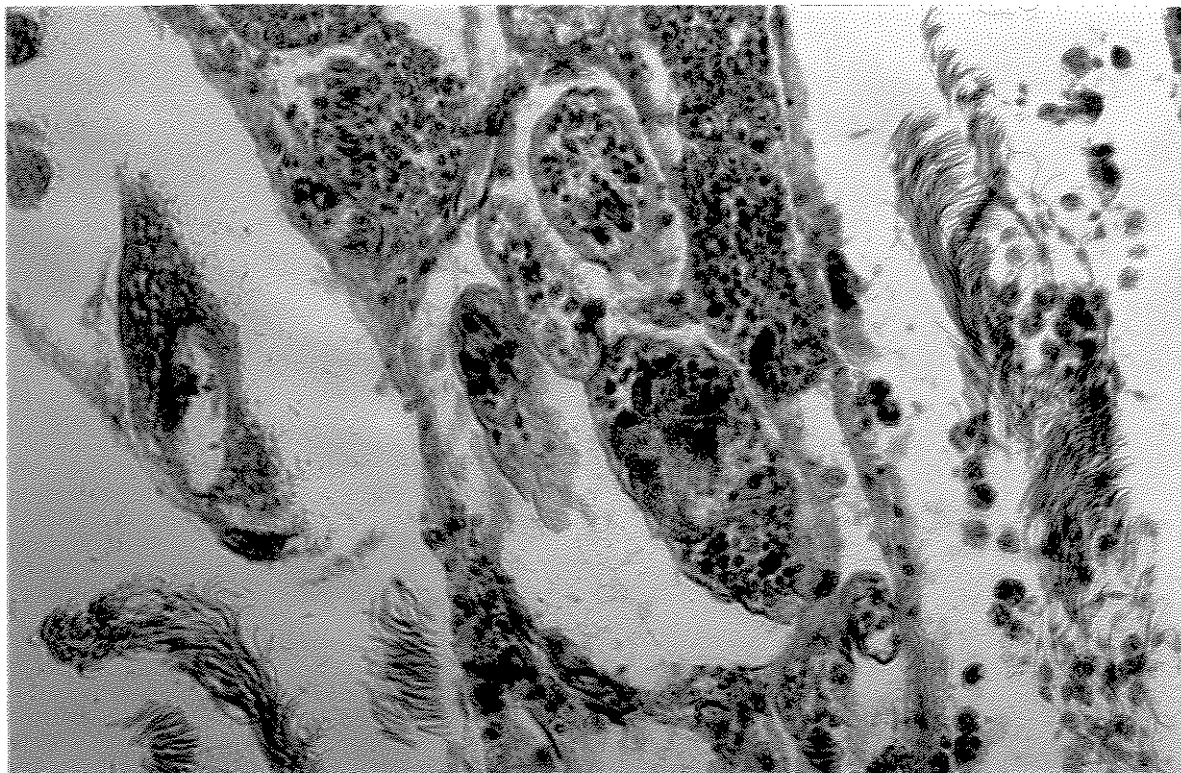


FIGURA 20 – Corte histológico do ovotestis de *Biomphalaria glabrata* tratada com hidrocortisona (Grupo IV) 10 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*. Observa-se a formação de cercária em esporocisto secundário maduro. Coloração por Tricrômico de Gomori. 430X.

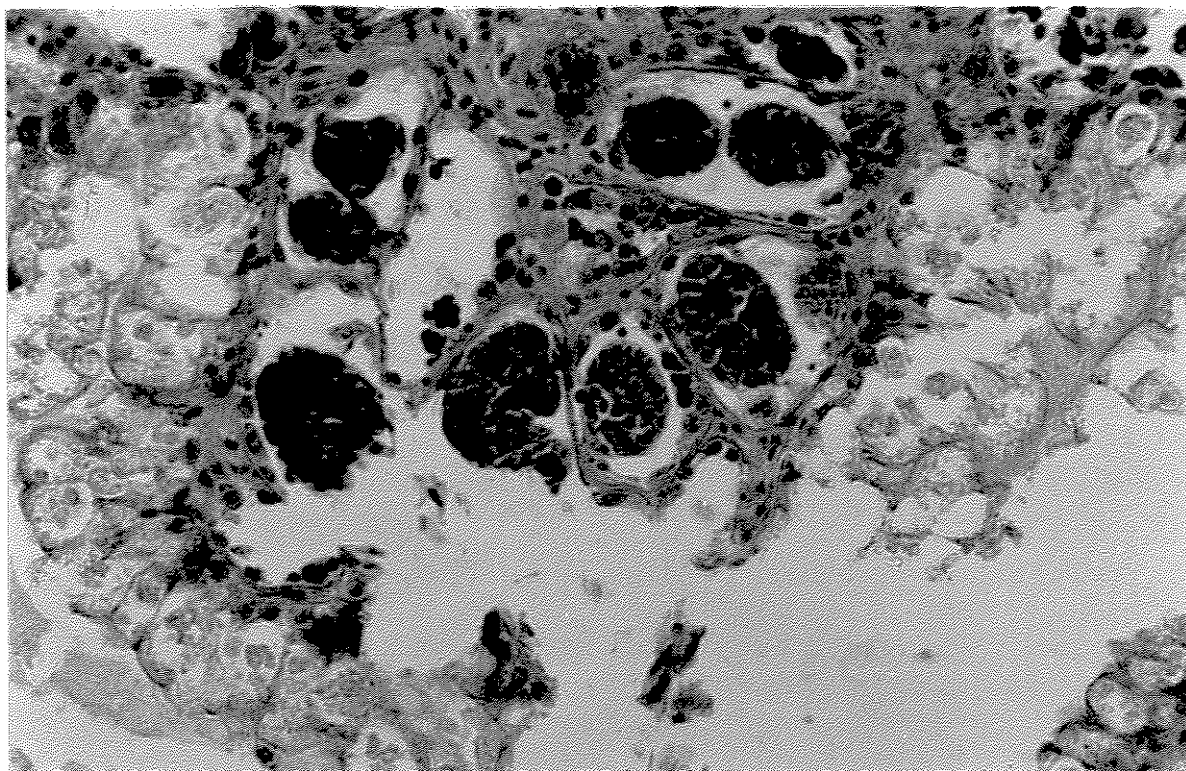


FIGURA 21 – Corte histológico do ureter de *Biomphalaria glabrata* não tratada com hidrocortisona (Grupo III) 31 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*. Observa-se esporocistos secundários imaturos em degeneração. Coloração por Tricrômico de Gomori. 430X.

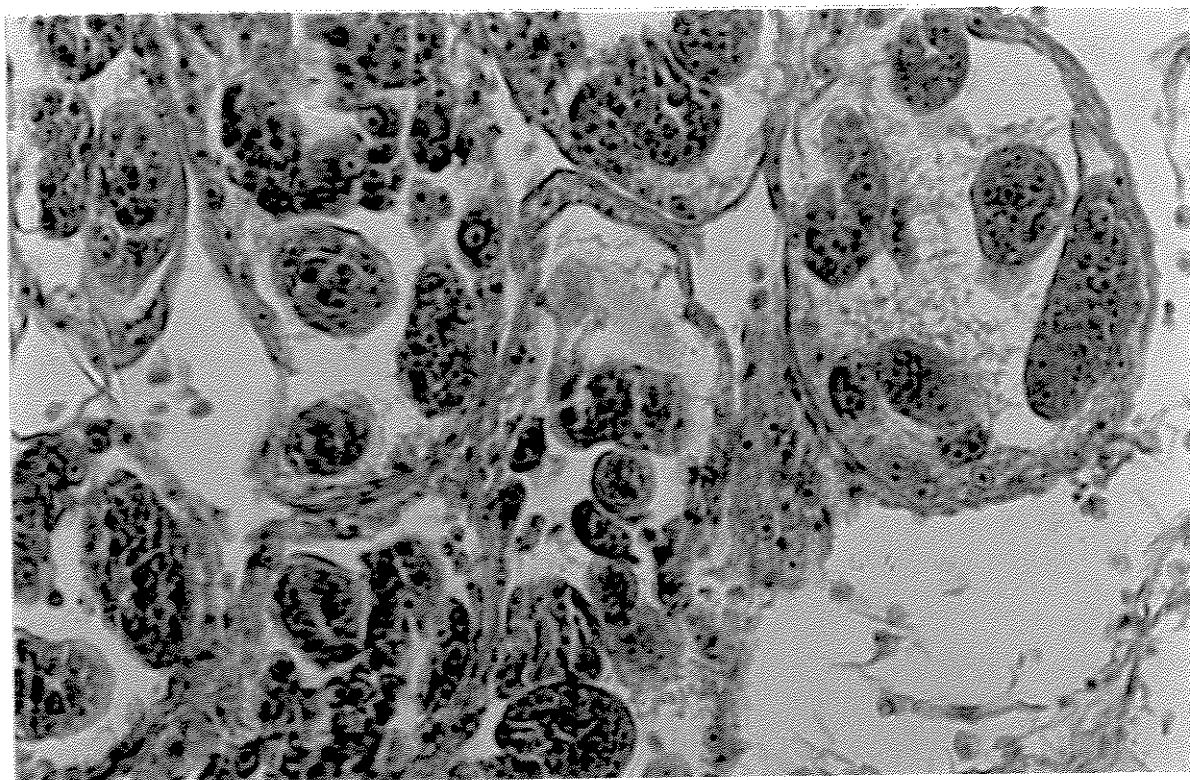


FIGURA 22 – Corte histológico do tentáculo de *Biomphalaria glabrata* tratada com hidro cortisona (Grupo IV) 31 dias após a infecção por *Schistosoma mansoni*. Observa-se esporocistos secundários imaturos viáveis. Coloração por Tricrômico de Gomori. 430X.

TABELA 18: PRESENÇA DE ESPOROCISTOS SECUNDÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E NÃO TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO III)

MOLUSCO	TEMPO INFECCÃO (DIAS)	REGIÃO CEFA-LOPODAL	TENTÁCULO	COLAR DO MANTO	MANTO	URETER	OUTROS *
Nº		V **	D ***	V **	D ***	V **	D ***
01	3,5	-	-	-	-	-	-
02	3,5	-	-	-	-	-	-
03	3,5	-	-	-	-	-	-
04	04	-	-	-	-	-	-
05	04	-	-	-	-	-	-
06	04	-	-	-	-	-	-
07	05	-	-	-	-	-	-
08	05	-	-	-	-	-	-
09	05	-	-	-	-	-	-
10	06	-	-	-	-	-	-
11	06	-	-	-	-	-	-
12	06	-	-	-	-	-	-
13	10	-	-	-	-	-	-
14	10	-	-	-	-	-	+
15	10	+	+	-	+	+	-
16	17	-	+	-	+	-	-
17	17	-	+	-	+	-	-
18	17	-	+	-	-	-	-
19	24	+	-	-	-	-	-
20	24	+	+	-	+	+	+
21	24	-	-	-	-	-	+
22	31	-	+	-	+	-	+
23	31	-	+	-	+	+	+
24	31	-	+	-	+	-	+

* OUTROS= outros locais do corpo do molusco onde foram encontrados esporocistos secundários (hepatopâncreas, ovotestis, intestino, etc)

** V= esporocistos secundários viáveis

***D= esporocistos secundários degenerados

TABELA 19 - PRESENÇA DE ESPOROCISTOS SECUNDÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO IV)

MOLUSCO (N ^o)	TEMPO INFECC- ÇÃO (DIAS)	REGIÃO CEFALOPODAL		TENTÁCULO		COLAR DO MANTO		MANTO		URETER		OUTROS	
		V**	D***	V**	D***	V**	D***	V**	D***	V**	D***	V**	D***
01	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
07	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	10	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
15	10	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
16	17	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
17	17	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
18	17	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
19	24	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
20	24	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
21	24	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
22	31	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
23	31	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
24	31	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+

• OUTROS= outros locais do corpo do molusco onde foram encontrados esporocistos secundários (hepatopâncreas, ovotestis, Intestino, etc)

** V=esporocistos secundários viáveis

*** D= esporocistos secundários degenerados

TABELA 20 - AVALIAÇÃO DOS ESPOROCISTOS SECUNDÁRIOS, QUANTO À MATURIDADE, PRESENTES EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E NÃO TRATADA COM COM HIDROCORTISONA (GRUPO III)

MOLUSCO	TEMPO INFECCÃO (DIAS)	REGIÃO CEFALOPODAL	TENTÁCULO	COLARDO	MANTO	URETER	OUTROS
Nº		M**	I***	M**	I***	M**	I***
01	3,5	-	-	-	-	-	-
02	3,5	-	-	-	-	-	-
03	3,5	-	-	-	-	-	-
04	04	-	-	-	-	-	-
05	04	-	-	-	-	-	-
06	04	-	-	-	-	-	-
07	05	-	-	-	-	-	-
08	05	-	-	-	-	-	-
09	05	-	-	-	-	-	-
10	06	-	-	-	-	-	-
11	06	-	-	-	-	-	-
12	06	-	-	-	-	-	-
13	10	-	-	-	-	-	+
14	10	-	-	-	-	-	-
15	10	-	+	-	+	-	-
16	17	-	+	-	+	+	-
17	17	-	-	-	-	-	-
18	17	-	+	-	-	-	-
19	24	-	+	-	-	-	-
20	24	+	-	-	+	+	+
21	24	-	-	-	-	-	+
22	31	+	-	+	+	-	+
23	31	+	-	-	+	+	+
24	31	-	+	-	+	-	+

• OUTROS= outros locais do corpo do molusco onde foram encontrados esporocistos secundários (hepatopâncreas, Ovotestis, intestino, etc.)

** M= Esporocistos secundários maduros

*** I= esporocistos secundários imaturos

TABELA 21 - AVALIAÇÃO DOS ESPOROCISTOS SECUNDÁRIOS, QUANTO À MATURIDADE, EM *Biomphalaria glabrata* EXPOSTA A 100 MIRACÍDIOS DE *Schistosoma mansoni* DA LINHAGEM BH E TRATADA COM HIDROCORTISONA (GRUPO IV)

MOLUSCO (N ^o)	TEMPO INFE- ÇÃO (DIAS)	REGIÃO CEFALOPODAL		TENTÁCULO		COLAR DO MANTO		MANTO		URETER		OUTROS *	
		M**	I***	M**	I***	M**	I***	M**	I***	M**	I***	M**	I***
01	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
02	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	3,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
07	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	10	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
15	10	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
16	17	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
17	17	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
18	17	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	24	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	24	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
21	24	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
22	31	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
23	31	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
24	31	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+

*OUTROS= outros locais do corpo do molusco onde foram encontrados esporocistos secundários (hepatopâncreas, ovotestis, intestino, etc)

** M= esporocistos secundários maduros

*** I= esporocistos secundários imaturos

DISCUSSÃO:

Este trabalho visou observar a atuação de glicocorticóides (hidrocortisona) sobre as células que constituem o principal mecanismo de defesa dos moluscos *Biomphalaria glabrata* expostos a infecção por *Schistosoma mansoni* e a influência que tal atuação poderia ter no desenvolvimento do trematódeo em seu hospedeiro intermediário. Com os resultados obtidos pretende-se contribuir para o conhecimento dos mecanismos de defesa dos moluscos.

Nosso primeiro passo foi a avaliação da taxa de infecção e sobrevivência dos moluscos durante as semanas posteriores à infecção por *Schistosoma mansoni* e ao tratamento com hidrocortisona. Foi avaliado também, de modo quantitativo, a liberação de cercárias, comparando tal ocorrência entre os moluscos que haviam recebido o tratamento por hidrocortisona e os que não receberam tal tratamento. A seguir, observamos de modo quantitativo as células circulantes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectadas ou não por *Schistosoma mansoni*, tratadas ou não com hidrocortisona.

A sobrevivência dos moluscos infectados foi significativamente menor do que a dos moluscos não expostos à infecção, observando-se entretanto que os moluscos infectados e tratados com hidrocortisona sobreviveram mais, verificando-se ao final da 23ª semana a presença de moluscos vivos no Grupo IV (moluscos infectados e tratados com hidrocortisona). Tais moluscos, provavelmente, tiveram condições de sobreviver por mais semanas devido ao fato da menor ocorrência de processos inflamatórios pelo corpo, graças ao tratamento com hidrocortisona.

A taxa de infecção por *Schistosoma mansoni* apresentada por moluscos tratados com hidrocortisona (Grupo IV) foi superior àquela apresentada por *Biomphalaria glabrata* não tratada (Grupo III). Os moluscos do Grupo IV iniciaram o período de liberação de cercária primeiro que os moluscos do Grupo III e continuaram a liberá-la até a 19ª semana, enquanto que após a 8ª semana não observamos mais liberação de cercárias no grupo de moluscos não tratados (Grupo III). Ficou assim evidente a maior suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* apresentada pelos moluscos do Grupo IV (tratado com hidrocortisona). Esse resultado mostra que, como ocorre tanto no homem como em outros animais, a hidrocortisona nos moluscos *Biomphalaria glabrata* também tem a ação de favorecer a infecção. Foi altamente significativo o aumento do número de cercárias liberadas pelos moluscos que receberam o tratamento. Como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5, a quantidade máxima de cercárias liberadas por semana por *Biomphalaria glabrata* não tratada não chegou a 1/5 do número máximo semanal apresentado pelo grupo dos moluscos tratados (Grupo IV). Nas mesmas tabelas, podemos observar ainda que tais resultados não se devem unicamente ao aumento do número de moluscos suscetíveis (mais moluscos infectados, maior quantidade de cercárias), mas sim à ação da hidrocortisona sobre a produção individual de cercárias de cada molusco, já que a maior produção individual de cercárias a cada semana por moluscos do Grupo III (Tabela 4 – molusco 2BgIII, 7ª semana) corresponde a apenas 1/5 da máxima produção individual a cada semana por moluscos do Grupo IV (Tabela 5 – molusco 3BgIV, 15ª semana). Interessante ressaltar que o molusco 3BgIV, aquele que na maioria das vezes apresentou o maior número de cercárias liberadas semana a semana no Grupo IV, foi também o que conseguiu manter-se vivo liberando cercárias por maior tempo (12 semanas), como pode

ser observado na Tabela 5. Tal dado confirma o favorecimento à sobrevivência dos moluscos infectados e tratados com hidrocortisona; tal corticóide diminuiria a ocorrência de processos inflamatórios, oferecendo melhores condições de vida ao molusco e permitindo o desenvolvimento normal do *Schistosoma mansoni* em seu hospedeiro.

Segundo NEWTON (1953), RICHARDS (1973), RICHARDS & MERRITT (1975) e SANTANA *et al.* (1978) a suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* é geneticamente determinada e se constitui num caráter herdável. Outros fatores, como a idade do molusco, número de larvas a que o molusco é exposto e a linhagem do trematódeo, influenciam a suscetibilidade. RICHARDS (1973) e RICHARDS & MERRITT (1975) observaram que moluscos jovens suscetíveis tornaram-se resistentes quando adultos.

O corticóide deve ter atuado logo após sua aplicação, causando modificações no sistema de defesa celular do molusco favorecendo o desenvolvimento dos esporocistos primários. Segundo GUARALDO *et al.* (1981) as primeiras 72 horas de infecção são fundamentais para a determinação da viabilidade das larvas do *Schistosoma mansoni* intramolusco.

Analisando os mecanismos de defesa de *Biomphalaria glabrata*, confirmamos os dados apresentados por CHENG (1975), CHENG & AULD (1977) e JEONG & HEYNEMAN (1976): a existência de 2 tipos de células na hemolinfa dos moluscos, representando os granulócitos a maior sub-população de células circulantes. O outro tipo, os hialinócitos, encontrados em menor proporção, possuem papel de defesa ainda desconhecido. Há evidências preliminares que estas células representam um tipo primário de células que reagem contra antígenos solúveis (CHENG & GARRABRANT, 1977).

Os amebócitos comportaram-se de maneira diferente frente ao tratamento por hidrocortisona. Apesar de granulócitos e hialinócitos terem sofrido o efeito imunossupressivo da droga, quer em moluscos infectados (Grupo III e Grupo IV), quer em moluscos não infectados por *Schistosoma mansoni* (Grupo I e Grupo II), os granulócitos foram as células que se apresentaram mais afetadas pelo tratamento, tendo sido sua quantidade menor nos moluscos tratados. Quanto ao número de células circulantes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* infectados por *Schistosoma mansoni* da linhagem BH não tratadas com hidrocortisona, nossos achados são compatíveis com aqueles encontrados por SANTANA (1990). Nesses experimentos tanto os moluscos como os parasitas haviam sido mantidos em laboratório de maneira semelhante à utilizada por nós, e o método de contagem de células foi o mesmo.

Apesar de não terem sido afetados tão profundamente, também os hialinócitos foram sempre encontrados em menor quantidade nos moluscos tratados.

Confirmando as observações de JOKY *et al.* (1985), SANTANA (1990) demonstrou aumento do número de amebócitos durante as primeiras 72 horas após a infecção (intensa atividade mitótica). SETA *et al.* (1996) mostraram que quando submetidos à infecção por *Schistosoma mansoni*, moluscos *Biomphalaria glabrata* apresentaram aumento imediato de amebócitos circulantes. A intensa proliferação celular ocorre após estímulo, provavelmente para neutralizar o miracídio no hospedeiro intermediário. Por que, então, num grupo de moluscos dessa espécie, infectados por esse mesmo trematódeo, quando submetidos ao tratamento com hidrocortisona, o número das células de defesa circulantes na hemolinfa diminuiu? No ser humano e em outros animais, a hidrocortisona muitas vezes é usada para reprimir a formação de anticorpos (HARPER,

1971; FERRI *et al.* 1977). Visto que houve variação quantitativa entre os amebócitos dos moluscos tratados pelo corticóide e os dos moluscos não tratados, podemos sugerir que a hidrocortisona atua sobre o APO (Órgão Produtor de Amebócitos) dos caramujos (LIE *et al.*, 1975), diminuindo, de modo semelhante ao que ocorre em outros animais, a produção de suas células de defesa e/ou talvez dificultando a maturação das mesmas.

Pudemos notar a existência significativa da interação infecção-tratamento na alteração do número de granulócitos, diminuindo a quantidade dos mesmos, já que os moluscos que apresentaram uma diminuição mais intensa dessas células de defesa foram os pertencentes ao Grupo IV, ou seja, os infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com hidrocortisona. Já no caso dos hialinócitos comprovou-se estatisticamente a atuação somente do tratamento, ou seja, a não existência de interação infecção-tratamento. Também neste experimento ficou clara a não atuação de nenhum fator ligado ao tempo.

FERRI *et al.* (1977) relataram o poder de inibição que esteróides cristalinos, como a hidrocortisona, causam sobre a mobilização dos macrófagos nos homens. Os granulócitos são, assim como os macrófagos, as células de defesa que apresentam pseudópodos e que tem como função a atividade fagocitária. Assim, também nos moluscos, além de afetar quantitativamente as células de defesa na hemolinfa circulante, como já foi citado acima, a hidrocortisona atuou diminuindo o número de esporocistos com reações amebocitárias. A hidrocortisona não só atuaria sobre o APO, mas também diretamente sobre as células de defesa, afetando fisiologicamente as células produzidas, uma vez que, quando presentes nas reações em torno dos esporocistos, não foram eficientes o suficiente para impedir o desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*.

Os grânulos citoplasmáticos presentes nos granulócitos são tidos como verdadeiros lisossomos (CHENG & BUTLER, 1979) e as enzimas lisossomais presentes nesses grânulos (CHENG & MOHANDAS, 1985) teriam como função a morte e a lise do material estranho (SMINIA & VAN DER KNAAP, 1987). As enzimas lisossomais, formadas por fosfatases ácidas e alcalinas, lisosimas e esterases não específicas tem seu início de síntese após o reconhecimento do material estranho e sua liberação quando da migração dos grânulos à superfície celular e sua extrusão.

As evidências sugerem que reação mediada por amebócitos é a principal responsável pela resistência à infecção em *Biomphalaria glabrata*, embora os fatores humorais possam modular funções amebocitárias (BAYNE *et al.*, 1980)

A verificação da reação amebocitária em torno dos esporocistos mostrou-nos que a taxa infecção, a quantidade de cercárias liberadas, a quantidade de amebócitos circulantes na hemolinfa do molusco, o número de esporocistos degenerados e/ou viáveis e a presença de reação amebocitária ao redor do esporocistos estão intimamente correlacionados.

O Grupo IV (*Biomphalaria glabrata* infectada por *Schistosoma mansoni* e tratada com hidrocortisona) foi o grupo que apresentou maior número de esporocistos viáveis, sem reação amebocitária; estas, quando existentes, eram do tipo discretas. Esse grupo, composto de moluscos que se encontravam em estado de imunossupressão celular, havia apresentado menor quantidade de granulócitos circulantes na hemolinfa. Da mesma maneira que ocorre nos vertebrados, a hidrocortisona mostrou nos moluscos ação direta sobre as células fagocitárias, afetando tanto a mobilização dos amebócitos como a produção de substâncias que acentuam a fagocitose de microorganismos, evitando reações

amebocitárias em torno das larvas do trematódeo e promovendo o desenvolvimento do parasita intramolusco.

Podemos sugerir, a partir de nossos resultados, que, não havendo a hidrocortisona anulado totalmente a produção amebocitária do APO, nem mesmo a atividade fagocitária, os amebócitos que conseguiram se aproximar dos esporocistos causaram uma reação celular ao redor dos mesmos de forma muito mais discreta que a encontrada nos moluscos não tratados, pois os amebócitos (assim como ocorre com os macrófagos no ser humano) quando afetados pela hidrocortisona, sofreriam inibição de sua habilidade de penetrar nas áreas traumatizadas.

Os granulócitos, como foi citado anteriormente, foram mais afetados que os hialinócitos; a diminuição no número de amebócitos com capacidade em imobilizar helmintos pela encapsulação (LIE *et al.*, 1987) foi mais um fator que favoreceu a não ocorrência e/ou ocorrência mais discreta de reações amebocitárias em moluscos tratados com hidrocortisona.

Segundo RENWRANTZ & CHENG (1977), SCHOENBERG & CHENG (1980), VAN DER KNAAP & LOKER (1990), existem fatores do soro que provavelmente influenciam o mecanismo de defesa dos moluscos, como as lectinas e os polipeptídeos livres. As lectinas, presentes no soro da hemolinfa e na superfície dos amebócitos, segundo MULLAINADHAN & RENWRANTZ (1986), são as responsáveis pela formação de pontes entre carboidratos das células e as partículas estranhas. Atuam ainda como opsoninas citofílicas, que aumentam a adesão de partículas estranhas (RENWRANTZ & STAHRMER, 1983; VAN DER KNAAP & LOKER, 1990). Outros pesquisadores, como LIE *et al.* (1980), LOKER *et al.* (1982), MICHELSON (1964), também acreditam que

componentes plasmáticos não celulares devem estar envolvidos na resposta dos moluscos frente aos miracídios. Porém, segundo SMINIA & VAN DER KNAAP (1987) são os próprios amebócitos os produtores de substâncias encontradas na hemolinfa do molusco atuando em seus mecanismos de defesa. SCHOZAWA & KUMADA (1986) demonstraram a produção de radicais de oxigênio pelos amebócitos de *Biomphalaria glabrata* após o estímulo com material estranho; produção essa que, para DIKKEBOON *et al.* (1988), é tida como um mecanismo pelo qual as células da hemolinfa desses moluscos matam parasitas. Uma falha dos amebócitos em produzir radicais de oxigênio poderia ser um dos fatores que determinariam a suscetibilidade a um parasito como *Schistosoma mansoni*. Teria a hidrocortisona uma ação sobre os componentes não celulares do molusco?

LOKER & BAYNE (1982) afirmaram que a habilidade dos moluscos em destruir os esporocistos pode ser atribuída mais ao processo de defesa celular do que aos componentes plasmáticos não celulares, colocando a reação amebocitária como o fator de maior importância no sucesso do combate à infecção. No entanto, ALLEGRETTI (1994) referiu que os mecanismos celular e humoral são dependentes, isto é, só a presença de células não é o suficiente para eliminar o parasito, assim como somente o plasma (soro) também não o elimina.

Em nossos experimentos histológicos do desenvolvimento do esporocisto e das reações amebocitárias), observamos que a maior parte dos esporocistos era do tipo viável no Grupo IV, grupo dos moluscos infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com hidrocortisona (Tabelas 12 e 13; Figuras 15 e 22); essa observação explica a maior liberação de cercárias pelos moluscos desse grupo em um número muito maior que o liberado pelos moluscos não tratados. A suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* foi tão

elevada neste grupo que todos os moluscos se infectaram e em todos os períodos de observação encontramos esporocistos viáveis, o que não ocorreu com *Biomphalaria glabrata* do grupo não tratado com hidrocortisona.

Confirmando o que já fôra observado nos experimentos para determinação do número de cercárias produzidas, verificamos através da observação dos cortes histológicos a precocidade do desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* em moluscos tratados com hidrocortisona, onde verificamos a presença de esporocistos secundários maduros 10 dias após a exposição aos miracídios, enquanto em moluscos não tratados, esporocistos secundários maduros só foram notados com 24 dias de infecção.

Os esporocistos primários de *Schistosoma mansoni* costumam se localizar no pé, cabeça, tentáculos, colar do manto e outras regiões, restringindo-se às áreas mais expostas a infecção. Acredita-se que não exista, de modo específico, um órgão oferecendo melhores condições para o desenvolvimento do esporocisto primário e, portanto, os diferentes órgãos comportam-se de maneira igual com relação a tais esporocistos na primeira semana. Eles permanecem na região de entrada por várias semanas, possivelmente até esgotar sua capacidade reprodutiva (GUARALDO, 1981).

Compativelmente com as informações acima citadas, em nossos experimentos tanto nos moluscos tratados com hidrocortisona (Grupo IV) como naqueles não tratados (Grupo III), a localização dos esporocistos primários se deu na região cefalopodal.

Foi ainda interessante notar que, considerando-se quantidade de esporocistos primários viáveis, a análise estatística revelou interação entre tempo e tratamento, enquanto que para os esporocistos primários degenerados não houve evidência de interação nem de efeito de tratamento. Notou-se ainda que, além de reduzir drasticamente a proporção de reações amebocitárias em torno dos esporocistos, o tratamento com hidrocortisona promoveu pequeno aumento na redução de tais reações com o passar do tempo.

Quanto aos esporocistos secundários, PAN (1965) afirma que, para a maioria dos sistemas caramujo-schistosoma, geralmente são distribuídos ao acaso no tecido conjuntivo interlobular da glândula digestiva. Alguns casos observados por SCHUTTE (1975) mostraram que a densidade de esporocistos secundários de *Schistosoma mansoni* seria maior na porção distal da glândula digestiva do molusco do que na porção proximal. Foi mostrado que apenas uma parte dos numerosos esporocistos secundários produzidos pelos esporocistos primários migra diretamente em direção à glândula digestiva do caramujo onde vai dar origem a cercárias. A outra fração dos esporocistos secundários mantem-se localizada na região cefalopodal do caramujo, onde a maioria dará origem a novos esporocistos filhos.

Em nossos experimentos, os esporocistos secundários em moluscos de ambos os grupos foram principalmente encontrados na região cefalopodal, tentáculo, colar do manto, ureter, hepatopâncreas, ovotestis e intestino.

Ficou evidente que a distribuição dos esporocistos no corpo do molusco não mostrou diferença significativa entre os grupos.

Podemos sugerir, baseados em todos os experimentos realizados, que a hidrocortisona, assim como ocorre no ser humano e em outros animais, apresentaria no molusco *Biomphalaria glabrata* efeito imunossupressivo e anti-inflamatório. Com a diminuição dos processos inflamatórios o molusco teria melhores condições de vida, sobrevivendo mais. Devido à diminuição da quantidade e da atividade das células de defesa do molusco, *Biomphalaria glabrata* apresentaria maior facilidade para se infectar por *Schistosoma mansoni*, havendo uma maior produção de esporocistos, a maioria deles permanecendo-se viáveis, sem reação amebocitária ao seu redor, permitindo eliminação de maior número de cercária

CONCLUSÕES

- A infecção por *Schistosoma mansoni* determinou menor sobrevivência dos moluscos, porém moluscos tratados com hidrocortisona e submetidos à infecção sobreviveram mais que moluscos não tratados e infectados
- Moluscos *Biomphalaria glabrata* que receberam tratamento com hidrocortisona (Grupo IV) apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni*, quando comparados com moluscos não tratados (Grupo III).
- Moluscos *Biomphalaria glabrata* tratados com hidrocortisona e infectados por *Schistosoma mansoni* (Grupo IV) iniciaram período de liberação de cercárias primeiro que o grupo não tratado (Grupo III), e continuaram a liberá-las por um período maior que os moluscos do Grupo III.
- O número de cercárias liberadas pelo grupo de moluscos *Biomphalaria glabrata* tratados com hidrocortisona (Grupo IV) foi bem maior que o liberado pelo grupo de moluscos não tratados (Grupo III).
- A liberação individual de cercárias por moluscos do Grupo IV foi 5 vezes maior que a liberação pelos moluscos do Grupo III.
- Notou-se interação infecção-tratamento na alteração do número de amebócitos, já que a diminuição mais intensa de tais células ocorreu nos moluscos do Grupo IV (infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com hidrocortisona). Os granulócitos foram os amebócitos mais afetados pelo tratamento.

- Moluscos *Biomphalaria glabrata* infectados por *Schistosoma mansoni* e que receberam tratamento com hidrocortisona (Grupo IV) apresentaram maior número de esporocistos viáveis que os do Grupo III (infectados, não tratados).
- Nos moluscos *Biomphalaria glabrata* infectados por *Schistosoma mansoni* e não tratados com hidrocortisona (Grupo III) foi encontrado maior número de esporocistos degenerados, apresentando reações amebocitárias mais intensas ao redor dos esporocistos, enquanto que nos moluscos tratados com hidrocortisona (Grupo IV) tais reações, além de menos frequentes tinham, quando existentes, aparência discreta.
- Tratamento e tempo foram significantes, havendo interação entre ambos, com relação ao número de esporocistos primários viáveis.
- Não houve evidência de interação nem de efeito de tratamento, considerando-se a quantidade de esporocistos primários degenerados.
- Houve ocorrência de drástica redução quanto à proporção de reações amebocitárias em torno dos esporocistos, redução essa que se mostrou levemente maior com o tempo.
- O tratamento com hidrocortisona não influenciou na distribuição dos esporocistos pelo corpo dos moluscos.
- Em síntese, podemos sugerir que a hidrocortisona atua sobre as células de defesa dos moluscos, diminuindo sua atividade sobre o trematódeo, levando à produção de maior número de larvas infectantes.

SUMMARY

Hydrocortisone (cortisol) is the main example of a drug which presents anti-inflammatory and immunosuppressive effects in mammals like other compounds as corticosteroids, suprarenal hormones with steroid formation or any others with similar activities. Its main activity is on the cell defence and is used in the infection and allergy cases best inhibiting primary than secondary response.

The internal defence system of molluscs are constituted by humoral and cell mechanisms. Two types of amoebocytes, the cell defence in molluscs are found: hialinocyte and granulocyte. The second type is similar to the macrophage of mammals and is responsible for the phagocytic activity.

Experiments were conducted to verify the mode of action of hydrocortisone over the haemolymph cells of *Biomphalaria glabrata* infected with BH strain of *Schistosoma mansoni* miracidia and its developmental influence in the intermediate host. Survival of molluscs, rate of infection, number of released cercaria, haemolymph circulating amoebocytes, amoebocyte reaction around the sporocysts were verified. Molluscs treated with hydrocortisone exhibited less circulating amoebocytes in the haemolymph, more susceptibility to the infection, more production and precocious release of cercaria and predominance of viable sporocysts without secondary sporocysts. These results which are compatible among them, suggest similar mode of action of hydrocortisone in the defence system of *Biomphalaria glabrata* and human been causing immunosuppression. This action would facilitate the *Schistosoma mansoni* development in its intermediary host.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. - *B. glabrata* amoebocytes: effect of *S. mansoni* infection on *in vitro* phagocytosis. **J. Invert. Pathol.** **35**(3): 241-248, 1980a.
- 2) ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. - *Biomphalaria glabrata*-amoebocytes assay of factors influencing *in vitro* phagocytosis. **J. Invert. Pathol.** **36**: 52-59, 1980b.
- 3) ALLEGRETTI, S.M. - Estudo da ação dos componentes celulares e não celulares da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* melânica na infecção por *Schistosoma mansoni*. Campinas. **Tese (Doutoramento) UNICAMP. INSTITUTO DE BIOLOGIA**, 1994.
- 4) BALAN, D.S.L.; MAGALHÃES, L.A.; PIEDRABUENA, A.E. - Aspectos Imunológicos e parasitológicos em *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) infectadas por *Schistosoma mansoni*. **Rev. Saúde Públ.** **27**(6): 421-429, 1993..
- 5) BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M.; DE WAN, P.C. - *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail host for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.** **50**: 409-416, 1980 a.
- 6) BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M.; DE WAN, P.C. - Macrophage-like hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. **J. Parasitol.**, **66**(3): 413- 419, 1980 b.
- 7) BAYNE, C.J. - Phagocytosis and non self recognition in invertebrates. **Bio Science** **40**(10): 723-731, 1990.
- 8) BRIDE, M.; BARRE, P.; GRIFFOND, B. - Fibronectin and ovotests development in the snail *Helix aspersa*: comparative immunology. **Dev. Comp. Immun.** **10**: 177, 1986.

- 9) CARTER, O.S. & BOGITSH, B.J. - Histologic and cytochemical observations of the effects of *Schistosoma mansoni* on *Biomphalaria glabrata*. **Ann. Ny. Acad. Sci.** **266**:380-393, 1975.
- 10) CHENG, T.C. & RIFKI, E. - Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. **Amer. Fish. Soc.** **5**: 443-496, 1970.
- 11) CHENG, T.C. - Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. **Ann. Ny. Acad. Sci.** **266**: 343-379, 1975.
- 12) CHENG, T.C. & YOSHINO, T.P. - Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (mollusca) challenged with bacterial lipids. **J. Invert. Pathol.** **28**: 143-146, 1976.
- 13) CHENG, T.C. & AULD, K.R. - Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. **J. Invert. Pathol.** **30**: 119-122, 1977.
- 14) CHENG, T.C. & GARRABANT, T.A. - Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasit.** **77**: 467-472, 1977.
- 15) CHENG, T.C. & BUTLER, M.S. - Experimentally induced elevations in acid phosphatase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (mollusca). **J. Invert. Pathol.** **34**: 119-129, 1979.
- 16) CHENG, T.C. - Internal defence mechanisms of mollusca against invading microorganisms. **Trans. Amer. Microsc. Soc.** **102**:185-193, 1983 a.
- 17) CHENG, T.C. - The role of lysosomes in molluscan inflammation. **Amer. Zool.** **23**:129-144, 1983 b.

- 18) CHENG, T.C. & MOHANDAS, A. - Effect of high dosages of bacterial challenge on acid phosphatase release from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **J. Invert. Pathol.** **45**:236-241, 1985.
- 19) CHENG, T.C. - Some cellular mechanism governing self and nonself recognition and pathogenicity in vertebrates and invertebrates relative to protistan parasites. **Aquaculture** **67**:1-14, 1987.
- 20) COELHO, M.V. - Suscetibilidade de *Australorbis tenagophilus* à infecção por *Schistosoma mansoni*. **Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **4**: 289-295, 1962.
- 21) CONCEIÇÃO, M.J. & COURA, J.R. - Comportamento experimental em *Biomphalaria glabrata* de amostras de *Schistosoma mansoni* isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas de esquistossomose. **19^o Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro**, p.88, 1983.
- 22) DIKKEBBOOM, R.; BAYNE, C.J.; VAN DER KNAAP, W.P.W.; TIJNAGEL, J.M.G.H. - Possible role of reactive forms of oxygen *in vitro* killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocyte of *Lymnaea stagnalis*. **Parasitol. Res.** **75**: 148-154, 1988.
- 23) EISEN, M.D.H.N. - **Microbiologia-Imunologia**. vol 2, 2^a edição. Editora Harper Row do Brasil. São Paulo – SP, 1979.
- 24) FERNANDES, M.A. - *Schistosoma mansoni* infections in the first three months of life of sympatric intermediate host from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **92(1)**: 27-29, 1997.
- 25) FERREI, R.G.; CALICH, V.L.G; VAZ, C.A.C. - **Imunologia**. 1^a edição, Ed. Edgard Blucher ltda- São Paulo - SP, 1977.

- 26) FILES, V.S. & CRAM, E.B. – A study on the comparative susceptibility os snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, **35**: 555-560, 1949.
- 27) FOLEY, D.A. & CHENG, T.C. - A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. **J. Invert. Pathol.** **25**: 189-197, 1975.
- 28) FOLEY, D.A. & CHENG, T.C. - Degranulation and other ghanges of molluscan granulocytes associated with phagocytosis. **J. Invert. Pathol.** **29**: 321-325, 1977.
- 29) FRYER, S.E.; HULL, C.J.; BAYNE, C.J. - Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata*: Carbohydrate specicity of hemocyte receptors and a plasma opsonin. **Dev. Comp. Imunol.** **13**: 9-16, 1989.
- 30) FRYER, S.E. & BAYNE, C.J. - *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasit.** **76**: 45-42, 1990.
- 31) GUARALDO, A.M.A.; MAGALHÃES, L.A.; RANGEL, H.A.; PAREJA, G. - Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). **Rev. Saúde Públ.** **15**: 436-448, 1981.
- 32) HARPER, A. H. – **Review of Phisiological Chemistry Lange Med.** 13^a edition public. São Francisco. Califôrnica. USA, 1971.
- 33) HARPER, A.H. – **Manual de Química Fisiológica.** 4^a edição. Atheneu Editora São Paulo. S.A., 1977.
- 34) HARRIS, K.R. - The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. **Ann. Acad. Ny. Scien.** **266**: 437-463, 1975.

- 35) HAYNES, R.C. - Studies of an *in vitro* effect of glucocorticoids on gluconeogenesis.
Endocrinology 71: 399, 1962.
- 36) HOFFMAN, W.Q.; PONS, J.A.; JANER, J.L. - The sedimentation concentration method in *Schistosoma mansoni*. **P.R.J. Health Trop. Med.** 9(3): 281-291, 1934.
- 37) JEONG, K.H. & HEYNEMAN, D. - Leukocytes of *Biomphalaria glabrata* - Morphology and behavior of granulocytic cells *in vitro* - **J. Invertebr. Pathol.** (28): 357-362, 1976.
- 38) JEONG, K.H.; LEI, K.J.; HEYNEMAN, D. - The ultra structure of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Dev. Comp. Immunol.** 7: 217-228, 1983.
- 39) JOKY, A.; MATRICON-GONDRAN, M.; BENEX, J. - Response to the amoebocyte-production organ of sensitized *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Echinostoma caproni* miracidia. **J. Invert. Pathol.** 45: 28-33, 1985.
- 40) KASSIM, O. O. & RICHARDS, C.S. - Host reactions in *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* miracidia involving variations in parasite strains numbers and sequence of exposure. **Int. J. Parasitol.**, 9: 565, 1979.
- 41) KOCK, C. & NIELSEN, H.E. - Activation of vertebrate complement by *Helix pomatia* hemolymph. **Dev. Comp. Immunol.** 8: 15-19, 1984.
- 42) LANDAU, B.R.; MAHLER, R.; ASHMORE, J.; ELWYN, D.; HASTING, A.B.; ZOTTUS, S. - Cortisone and the regulation of hepatic gluconeogenesis. **Endocrinology** 70: 47, 1962.
- 43) LIE, K.J.; HEYNEMAN, D.; YAN, P. - The origin of amoebocytes in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasit.** 63(3): 574-576, 1975.

- 44) LIE, K.L.; JEONG, K.H.; HEYNEMAN, D. - Tissue reactions induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Ann. Trop. Med. Parasit.** **74** (2): 157-166, 1980.
- 45) LIE, K.J.; JEONG, K.H.; HEYNEMAN, D. - Molluscan host reactions to helminthic infection. **Imunne Responses in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology and Immunoprophilaxis. Vol. IV: Protozoa, Arthropodes and Invertebrates.** Cap. 07. Ed. C.R.C. Press, INC. Florida, USA., 1987.
- 46) LOKER, E.S. & BAYNE, C.J. - *In vitro* encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **31**: 999-1005, 1982.
- 47) LOKER, E.S.; BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M.; KRUSE, K.T. - Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasit.** **68**: 84-94, 1982
- 48) LOKER, E.S. & BAYNE, C.J. - **Immune mechanisms in invertebrate vectors.**pp 199-220. Lackie A. Ed., Clarendon Press, 1986.
- 49) MAGALHÃES, L.A. – Moluscos Planorbídeos do Distrito Federal, Brasília. **Tese (Doutoramento).** UNICAMP. FACULDADE DE MEDICINA, 1966.
- 50) MAGALHÃES, L.A.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.^A; CARVALHO, J.F. - Observations on the miraxonal attraction exercised by sexually immature or adult *Biomphalaria glabrata* infected or not by *Schistosoma mansoni*. **Rev. Saúde Públ.** **31(2)**: 121-124, 1997.
- 51) MICHELSON, E.H. - Miracidia - immobilizing substances in extracts prepared from snails infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **13**: 36-42, 1964.

- 52) MICHELSON, E.H - Specificity of hemolymph antigens in taxonomic discrimination of medically snail. **J. Parasit.** **52**(3): 466-472, 1966.
- 53) MICHELSON, E.H. - Cellular defense mechanisms and tissue alternations in gastropod molluscs. In: Maramorosch, R. & Shop, R.E., Ed. **Invertebrate Immunity**. New York, Academic Press, 1975.
- 54) MILLER, A.N.; OFORI, K.; LEWIS, F.; KNIGHT, M. – *Schistosoma mansoni*: use of subtractive cloning strategy to search for RFLPs in parasite-resistant *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology** **84**: 420-428, 1996.
- 55) MOUKASSA, J.B. & JOURDANE, J. - Dynamic of the leucocytic response of *Biomphalaria glabrata* during the lerval development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma liei*. **J. Invert. Phatol.** **55**:306-311, 1990.
- 56) MULLAINADHAN, P. & RENWRANTZ, L. – Lectin-dependent recognition of foreing cells by hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Immunobiol.** **171**: 263-273, 1986.
- 57) MULLER, W.E.G.- Int. Rev. Cytol. 1956 apud Ratcliff, N.A.; Rowley, A.F.; Fitzgrald. S.W.; Rhodes, C.P.- Invertebrate Immunity: Basic concepts and recent advances. **International Review of Citology** **97**: 183-351, 1985.
- 58) NEWTON, W.L. – The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, **38**: 362-366, 1952.
- 59) NEWTON, W.L.. – The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Autralorbis glabratus*. **Exp. Parasitol.**, **2**: 242-257, 1953..
- 60) OLIVEIRA, H.P. - **Hematologia Clínica**. Livraria Atheneu. Rio de Janeiro-R.J, 1977

- 61) OTTAVIANI, E. & FRANCHINI, A. - Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L). (Gastropoda, Pulmonata). **Acta. Zoo.** **69(3):** 157-162, 1988.
- 62) PAN, C.T. - The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. **Bull. Mus. Comp. Zoo.** **199:237-299**, 1958.
- 63) PAN, C.T. - Studies on the host-parasite relation ship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **14:** 931-976, 1965.
- 64) PAN, C.T. - *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. **J. Medical Science and Biology** **49 (4):** 129-149, 1996.
- 65) PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. - Sobre a ocorrência de 2 raças biológicas de *Schistosoma mansoni* no Brasil. **Cienc. Cult.** **15:** 245-246, 1963a.
- 66) PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. - Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** **5:** 15, 1963b.
- 67) PARAENSE, W.L. & CORRÊA, L.R. - A potencial vector of *Schistosoma mansoni* in Uruguay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, vol. **84 (3):** 281-288, 1989.
- 68) PELLEGRINO, J. & MACEDO, D.G. - A simplified method for the concentration of cercarias. **J. Parasit.** **41:329**, 1955.
- 69) RATCLIFFE, N.A. - Invertebrate Immunity-A primer for the now specialist (review). **Immunology Letters** **10:** 253-270, 1985.

- 70) REIS, S.M.P.M.; MAGALHÃES, L.A.; CARVALHO, J.F. - Ação da inoculação de hemolinfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Rev. Saúde Públ.** **29(4)**: 259-264, 1995.
- 71) REIS, S.M.P.M. - Comportamento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) albina inoculada com hemolinfa total ou livre de amebócitos, frente à infecção por *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. **Tese (Doutoramento)**. UNICAMP - INSTITUTO DE BIOLOGIA, 1996.
- 72) RENWRANTZ, L. & CHENG, T.C. – Identification of agglutinin receptors on hemocytes of *Helix pomatica*. **J. Invert. Pathol.** **29**: 97-100, 1977.
- 73) RENWRANTZ, L. & STAHLER, A. – Opsonizing properties of isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. **J. Comp.** **149**: 535-546, 1983.
- 74) RICHARDS, C.S. – Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **22(6)**: 748-756, 1973.
- 75) RICHARDS, C.S. & MERRITT, J.W.JR. – Genetic in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. **American J. Tropical. Med. Hyg.** **21(4)**: 425-434, 1975.
- 76) SANTANA, J.V.; MAGALHÃES, L.A. & RANGEL, H.A. – Seleção de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. **Rev. Saúde Pública de São Paulo**, **12**: 67-77, 1978.

- 77) SANTANA, J.V.; MAGALHÃES, L.A.; RANGEL, H.A. – Quantificação da atividade fagocitária de amebócitos de moluscos *Biomphalaria glabrata* livres de infecção e infectados por *Schistosoma mansoni*. In **Congresso da Soc. Bras. de Med. Trop.**, 21º, C. Baliero Edit., Resumo nº 58. São Paulo, 1985.
- 78) SANTANA, J.V. - Mecanismo de defesa em *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* frente ao *Schistosoma mansoni*. Campinas. **Tese (Doutoramento)**. UNICAMP-INSTITUTO DE BIOLOGIA, 1990.
- 79) SAOUD, M.F.A. – The infectivity and pathogenicity of geographical strains of *Schistosoma mansoni*. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 60: 585-600, 1966.
- 80) SCHOENBERG, D.A. & CHENG, T.C. – Lectin binding specificities of hemocytes from two strains of *Biomphalaria glabrata* as determined by microhemadsorption assays. **Dev. Comp. Immunol.** 9: 497-509, 1980.
- 81) SCHOZAWA, A.C. & KUMADA, N. – Superoxide production by haemocytes of the fresh-water snail, *Biomphalaria glabrata*, stimulated by miracidia of *Schistosoma mansoni*. **Zool. Scienc.** 6: 1019-1022, 1986.
- 82) SCHUTTE, C.H.J. – Studies on the South African strain of *Schistosoma mansoni* – Part. 3: Notes on certain host-parasite relationship between intramolluscan larvae and intermediate host. **South African Journal of Science** 71: 8-20, 1975.
- 83) SETA, L.; MAGALHÃES, L.A.; CARVALHO, J.F. - Comportamento dos amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni*, inoculação de tinta nanquim e fratura da concha. **Rev. Saúde Públ.** 30(4): 332-340, 1996.

- 84) SHIFF, C.J. - Molluscan defence mechanisms: Immunity or Population Biology?
Parasitology Today 10(5): 188-190, 1994.
- 85) SIMA, P. & VETVICKA, V. – **Evolution of Immune Reactions** – 1ª edição- CRC PRESS, INC. Boca Raton, Flórida – USA, 1990.
- 86) SMINIA, T. - 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, 1972.
- 87) SMINIA, T.; WINSEMIUS, A.; VAN DER KNAAP, W.P.W. - Recognition of foreignness by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* with special reference to the role and structure of the cell coat. **Invert. Pathol.** 38: 175-183, 1981.
- 88) SMINIA, T. & VAN DER KNAAP, W.P.W. - **Immunity in Invertebrates**. Breheling M.Ed. . pp 113-124. Springer-Verlag, 1986.
- 89) SMINIA, T. & VAN DER KNAAP , W.P.W. - Cells and molecules in molluscan immunology. **Develop. Comp. Immunol.** 11: 17-28, 1987.
- 90) SOUZA, C.P.; CUNHA, R.C.P.; ANDRADE, Z.A. – Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata* .**Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** , vol.37 nº 3: 201-206, 1995.
- 91) STANDEN, O.D. - The effects of temperature, light and salinity upon the hatching ova of *Schistosoma mansoni*. **Trans.. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** 45(2): 221-241, 1951.
- 92) STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLow, T.G. – **Medical Immunology** – 9ª edition. Appleton & Lange – Stamford, Connecticut - São Francisco, Califórnia – USA, 1997.
- 93) SULLIVAN, J.T. & RICHARDS, C.S. – *Schistosoma mansoni* NIH-SM-PR-2 strain in susceptible stocks of *Biomphalaria glabrata*: comparative histology. **J. Parasitol.**, 67: 702, 1981.

- 94) THERON, A.; PAGES, J.R.; ROGNON, A. - *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory process. **Experim. Parasit.** **85**: 1-9, 1997.
- 95) TRIPP, M.R. - Defense mechanism of mollusks. **J. Retic. Enduth. Soc.** **7**:173-182, 1970
- 96) VAN DER KNAAP, W.P.W.; MEULEMAN, E.A.; SMINIA, T.- Alterations in the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. **Parasitol. Res.** **73**: 57-65, 1987.
- 97) VAN DER KNAAP, W.P.W. & LOKER, E.S. - Immune Mechanism in Trematode-Snail Interactions. **Parasitology Today** **6(6)**: 175-182, 1990.
- 98) WAGGE, L.E. - The activity of amoebocytes and of alkaline phosphatase during the regeneration of wall of the snail *Helix aspersa*. **Q. J. Microsc. Sci.** **92**: 307-321, 1951
- 99) WAGGE, L.E. & MITTLER, T. - Shell recognition in some British molluscs. **Nature** **171**: 528-529, 1953.
- 100) WAGGE, L.E. - Amoebocytes. **Cytology** **IV**: 31-78, 1955
- 101) ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A.; CARVALHO, J.F. - Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. III. Mortalidade, pesos corporal e das vísceras. **Rev. Saúde. Públ.** **29(4)**: 265-270, 1995.
- 102) ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A.; CARVALHO, J.F. - Relação entre a patogenicidade do *Schistosoma mansoni* em camundongos e susceptibilidade do molusco vetor IV - infecciosidade dos miracídeos. **Rev. Saúde Públ.** **31(5)**: 488-494, 1997.