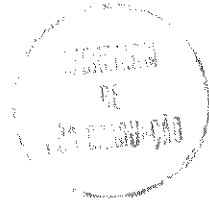


ESTA exemplar corresponde a redação final de tese defendida  
pela candidata Doralice de Souza Luro Balan e  
aprovada pela comissão julgadora

18/6/90

L. A. Magalhães



Doralice de Souza Luro Balan

"VERIFICAÇÃO DE ALGUNS ASPECTOS  
IMUNOLÓGICOS E PARASITOLÓGICOS  
EM *Biomphalaria tenagophila*  
(D'ORBIGNY, 1835) INFECTADA  
POR TREMATÓDEOS DIGENÉTICOS"

orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães

Tese apresentada para  
obtenção do grau de  
MESTRE, em Ciências  
Biológicas.  
Instituto de Biologia  
da Universidade  
Estadual de Campinas  
- UNICAMP - São Paulo  
- Brasil - 1990

A meus pais Antonio e Alice;  
a minha irmã Denize; a  
meus irmãos Antonio e Alexandre.

A meu marido José Mario,  
a nossos filhos Mário e  
Guilherme.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz A. Magalhães, pela orientação segura, participação constante e pela amizade que sempre me dedicou.

Ao Curso de Pós-graduação do Departamento de Microbiologia e Imunologia, na pessoa do Dr. Marcos Garcia Costa, pela colaboração na possibilidade de ter trilhado esta caminhada.

Ao Prof. Dr. Aquiles Eugenio Piedrabuena pela contribuição prestada na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Corsini (in memoriam), pelas mãos de quem iniciei nos estudos da Imunologia.

Aos docentes do Departamento de Parasitologia, Prof. Dr. Luiz Cândido S. Dias, Dra. Eliana Z. Magalhães, Dra. Ana Maria A. Guaraldo e Dra. Marlene Veta, pela disponibilidade constante.

Aos funcionários do Laboratório III - Helminologia - que me auxiliaram sempre com cortesia.

Aos colegas José Valfrido Santana e Soely M. P. Machado, companheiros de estudos e trabalho, por sua marcante colaboração.

A todos os colegas do Curso de Pós-graduação em Imunologia, especialmente a Maria Rita L. Zucato e a turma de 1986,

pela possibilidade de convivência e momentos de inesquecíveis recordações.

Às pessoas, que por esquecimento, possa tê-las omitido aqui.

Agradecimentos à "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP -", instituição a qual, como bolsista, permitiu-me o desenvolvimento desse trabalho.

## SUMÁRIO

	pág.
I- INTRODUÇÃO	1
II- MATERIAL E MÉTODOS	7
1- Procedência dos moluscos	7
2- Verificação da taxa de infecção natural	7
3- Manutenção dos moluscos	8
4- Infecção de <u>B. tenacophila</u> livres de infecção por trematódeos	9
5- Exame histopatológico dos moluscos	9
6- Obtenção e armazenamento da hemolinfa	10
7- Teor proteico da hemolinfa	11
8- Obtenção do soro imune de coelho anti <u>B. tenacophila</u> livres de infecção por trematódeos	12
9- Imunodifusão radial dupla	13
10- Eletroforese e imunoeletroforese	13
11- Contagem de amebócitos da hemolinfa	14
12- Avaliação quantitativa da fagocitose	15
12.1- Preparo de eritrócitos de	15

	pág.
carneiro formolizados	
12.2- Preparo de monocamadas de amebócitos	16
12.3- Fagocitose dos eritrócitos de carneiro formolizados	16
13- Análise Estatística	17
III- RESULTADOS	19
1- Taxa de infecção natural por trematódeos	19
2- Determinação das reações teciduais e da presença de larvas nos moluscos observados em cortes histológicos.	20
3- Estudos da hemolinfa	21
4- Desempenho do soro imune de coelho	23
5- Descrição da imunodifusão radial dupla e da imunoeletroforese	23
6- Contagem de amebócitos e avaliação quantitativa da fagocitose	26
IV- DISCUSSÃO	50
V- RESUMO E CONCLUSÕES	55
VI- APÊNDICE	57
VII- BIBLIOGRAFIA	60

## I- INTRODUÇÃO

A esquistossomose está entre as mais importantes endemias parasitárias mundiais. Estimava-se em 1981 que a prevalência desta parasitose atingia 500 milhões de pessoas, em 73 países, a despeito de grande número de programas nacionais de controle (BAILEY e cols., 1986). Esses programas davam maior ênfase ao controle da doença no homem, em detrimento da erradicação da doença ou da interrupção da transmissão (LIESE, 1986).

Muitos trabalhos da literatura mundial nas últimas décadas, tem contribuído para o conhecimento dessa verminose do ponto de vista dos hospedeiros intermediários (moluscos do gênero Biomphalaria), dos hospedeiros definitivos (homem, alguns roedores e marsupiais), da distribuição geográfica e do agente parasitário (Schistosoma), (SMITHER e cols., 1982).

No Brasil milhões de indivíduos são acometidos pela esquistossomose mansônica, originando graves problemas médicos, sociais e econômicos.

O ciclo dessa parasitose no homem, consiste em uma sucessão de estágios do Schistosoma mansoni, com a eliminação de ovos pelas fezes; estes ovos rompem-se no meio líquido liberando miracídios, larvas infectantes do caramujo, hospedeiro intermediário. No molusco por um processo de poliembrionia, numerosas cercárias são produzidas e eliminadas na água, onde permanecem por tempo limitado em estado livre até que, entrando em

contato com o homem ou outro hospedeiro definitivo, penetra através da pele. Após a penetração as cercárias transformam-se em esquistossômulos. A evolução para a forma adulta, com diferenciação sexual, ocorre nos vasos da circulação portal intra e extrahepática. Com o acasalamento, o par de vermes migra para as velas mesentéricas inferiores, onde ocorre a postura de ovos. Parte desses ovos retorna pela circulação depositando-se no fígado e em outros locais do organismo. Outros ovos, rompem as pequenas vênulas da parede intestinal, ganhando a luz do intestino, sendo eliminados pelas fezes (ARAÚJO, 1984).

Trabalhos clássicos de PELLON & TEIXEIRA (1950 e 1953), registraram a distribuição da esquistossomose mansônica e sua elevada incidência Nordeste e Oeste, Centro-Oeste e Sul, do nosso país.

RUIZ (1957), PIZA (1959, 1960 e 1967) e RAMOS e cols. (1961), demonstraram que o principal vetor da endemia nas regiões Sudeste e Sul do país era o planorbídeo *Biomphalaria tenagophila*, exceto em Minas Gerais, Paraná e regiões do Sul de São Paulo onde tem esse papel a *Biomphalaria glabrata*.

A espécie *B. tenagophila* distribui-se da Bahia ao Chuí, extremo sul do Brasil; populações isoladas foram encontradas no Distrito Federal e Minas Gerais (PARAENSE, 1984).

Em 1963, PARAENSE e cols., postularam a existência de duas "raças" de *S. mansoni*, uma de Belo Horizonte (MG) e outra do Vale do Paraíba do Sul (SP), parasitas respectivamente de *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Demonstraram haver um ajuste fisiológico entre o molusco e o parasita. Assim é que *B.*



tenagophila, do Vale do Paraíba, mostrava-se susceptível à linhagem local de S. mansoni e praticamente refratária à linhagem mineira. Fenômeno semelhante ocorria em B. glabrata de Belo Horizonte, que apresentava-se susceptível à linhagem mineira e resistente à linhagem paulista do trematódeo.

DIAS e cols. (1987) verificaram que populações de B. glabrata, B. straminea e B. tenagophila, estavam ajustadas a diferentes cepas de S. mansoni, demonstrando experimentalmente a susceptibilidade dos moluscos, que podem ou não apresentar susceptibilidade à outra cepa, que não a simpátrica.

NEWTON (1952, 1953); RICHARDS (1970, 1973 e 1975) e RICHARDS E MERRITT (1972) confirmaram que a susceptibilidade era carácter hereditário e envolvia fatores genéticos do hospedeiro intermediário.

A grande maioria das investigações sobre a esquistossomose mansônica utiliza B. glabrata como modelo do agente transmissor, pois esse molusco ajustou-se muito bem às condições de laboratório. Poucas investigações tem sido feitas utilizando-se B. straminea ou B. tenagophila.

Em laboratório B. tenagophila, mostrou-se pouco susceptível à infecção esquistossomótica (RUIZ, 1957; COELHO, 1962; MAGALHÃES, 1969; DIAS 1986), produzindo número menor de cercárias, provavelmente devido a mecanismos de imunidade naturais (COELHO 1957, 1962).

Além de ter de vencer a resistência natural à infecção oferecida pelo molusco, as larvas de S. mansoni podem enfrentar outros fatores que se interpõem ao seu desenvolvimento. LIM &

HEYNEMAN, 1972, publicaram um artigo de revisão dos conhecimentos sobre o processo de competição entre larvas de diferentes espécies de trematódeos, observados no interior de moluscos planorbídeos. Os autores ressaltam que estes fenômenos competitivos poderiam auxiliar no controle de certos parasitos como por exemplo *S. mansoni*. Para isto seriam utilizadas larvas de trematódeos rivais, que predariam ou destruiriam os esporocistos ou cercárias de *S. mansoni*. A competição entre larvas de diferentes trematódeos, seria resultante de um antagonismo direto (poder predatório das rédias) ou indireto (substâncias tóxicas, luta por espaço vital, competição alimentar, mecanismos imunológicos e perturbações do equilíbrio hospedeiro-parasita).

Os trabalhos de LIE (1975, 1976a, 1976b, 1980 e 1982), evidenciaram que mecanismos imunológicos como: encapsulação, fagocitose e morte dos esporocistos, estão envolvidos nos processos competitivos entre larvas de trematódeos no interior de moluscos.

RATCLIFF e cols. (1985), em publicação de trabalho de revisão da imunologia de invertebrados, mostraram que os insetos e moluscos desenvolveram mecanismos de defesa bastante eficiente. A "primeira linha de defesa", contra a invasão de parasitas é representada pela espessa cutícula externa dos insetos e pela concha nos moluscos. Caso o invasor penetre, será combatido por mecanismos de defesa celulares e humorais. As defesas celulares são mediadas por células da hemolinfa e incluem processos de fagocitose, formação de nódulos ou cápsulas, coagulação da hemolinfa e cicatrização de feridas. As defesas humorais incluem

lisinas, aglutininas, fatores antimicrobiais e substâncias semelhantes a linfoquinas.

Em gastrópodes as respostas celulares tem sido demonstradas por STAUBER (1961), CHENG e cols. (1970), TRIPP (1970), MICHELSON (1975), JEONG e cols. (1976) e ABDUL SALAM e cols. (1980).

TRIPP (1961, 1970) mostrou em *B. glabrata*, a capacidade dos amebócitos de distinguirem entre material "próprio" e "não-próprio". Esses moluscos aceitaram implante de tecido homólogo, porém destruíram tecido heterólogo.

Os mecanismos humorais estudados por MACKIN (1961), TRIPP (1961), FENG (1962) e MICHELSON (1963), revelaram fatores biologicamente ativos da hemolinfa, que funcionalmente simulavam anticorpos. Vários fatores ativos da hemolinfa foram identificados como opsoninas, que iniciariam ou facilitariam o processo de fagocitose (TRIPP, 1966).

A resistência adquirida em caramujos foi estudada por LIE e cols. (1983), em trabalho sobre a resistência à infecção pelo *S. mansoni* em *B. glabrata*.

BAYNE e cols. (1984), publicaram dados sobre a existência de receptores específicos, para esporocistos primários de *S. mansoni* em hemócitos de *B. glabrata*.

Muitas questões na imunologia de invertebrados estão ainda sem resposta. Como se dá o reconhecimento de corpos estranhos? Quais são os mecanismos de destruição e digestão de invasores? Há algum paralelismo com os mecanismos que ocorrem nos vertebrados?

Dentro do estudo da imunologia nos moluscos, nosso questionamento comporta indagações como:

a) os moluscos infectados por trematódeos, apresentariam resistência cruzada à infecções por outras espécies do grupo, em especial ao *S. mansoni*?

b) a atividade fagocitária estaria aumentada nos moluscos parasitados?

c) o perfil eletroforético da hemolinfa seria alterado durante a infecção? Se alterado, essas alterações teriam características específicas?

d) as reações amebocitárias em torno das larvas, seriam influenciadas por infecções prévias ou concomitantes?

## II- MATERIAL E MÉTODOS

### 1- PROCEDÊNCIA DOS MOLUSCOS

Os exemplares de B. tenagophila utilizados nos experimentos, foram capturados na cidade de Louveira, no Estado de São Paulo, em criadouro localizado em tanques de piscicultura.

Este local de conformidade com as investigações da "Superintendência do Controle de Endemias" (SUCEN), nunca foi foco de esquistossomose.

As capturas realizaram-se no período de março de 1986 à novembro de 1988, sempre pela manhã, em dias de sol, com temperatura média diária de 20 à 30° C.

Também foram utilizadas B. tenagophila, nascidas e criadas em laboratório, procedentes do Vale do Rio Paraíba do Sul, Estado de São Paulo.

### 2- VERIFICAÇÃO DA TAXA DE INFECCÃO NATURAL

Adotou-se a técnica de PELLEGRINO (1955), onde após a captura, todos os caramujos eram expostos a um foco de luz, por 2 à 3 horas, para promover a eliminação de cercárias e verificar a infecção por trematódeos digenéticos em condição natural. Tal

exposição foi repetida a cada 4 dias, num período de 60 dias. Os exemplares que nesse intervalo não eliminaram nenhum tipo de cercária, foram considerados livres de infecção.

As cercárias foram identificadas, (MACHADO e cols., 1987), sendo os moluscos separados em grupos, conforme o tipo de cercária eliminada.

### 3- MANUTENÇÃO DOS MOLUSCOS

Os caramujos parasitados, separados de acordo com os tipos de cercárias oriundas da infecção natural, e os não parasitados, foram mantidos em aquários no Departamento de Parasitologia da UNICAMP.

Diariamente eram alimentados com alface.

Foram constituídos durante o trabalho os seguintes grupos de moluscos:

**Grupo A-** moluscos capturados em Louveira:

- 1A- B. tenagophila de campo livre de infecção por trematódeos. (contrôle).
- 2A- B. tenagophila infectadas por furcocercárias longifurcadas sem ocelos.
- 3A- B. tenagophila infectadas por furcocercárias longifurcadas com ocelos.
- 4A- B. tenagophila infectadas por equinostomocercárias.
- 5A- B. tenagophila infectadas por xifidiocercárias.

6A- B. tenagophila de campo infectadas experimentalmente com S. mansoni.

Grupo B- moluscos nascidos e criados em laboratório, procedentes do Vale do Rio Paraíba do Sul

1B- B. tenagophila de laboratório livres de infecção por trematódeos. (contrôle).

2B- B. tenagophila de laboratório infectadas experimentalmente com S. mansoni.

4- INFECÇÃO DE B. tenagophila com S. mansoni DA LINHAGEM SJ

A infecção de planorbídeos realizou-se pela técnica de STANDEN (1952), sendo a linhagem SJ de S. mansoni empregada, mantida no laboratório. Esta linhagem foi isolada de moluscos naturalmente infectados em São José dos Campos, Estado de São Paulo.

Os miracídios foram obtidos de ovos colhidos nas fezes de camundongos Mus musculus albinos (Swiss), nascidos e criados no biotério do Departamento de Parasitologia.

Os caramujos destinados à observação histológica foram expostos isoladamente, a 100 miracídios, recém eclodidos.

Para obtermos a eliminação de cercárias, os caramujos foram expostos isoladamente, a 10 miracídios.

5- EXAME HISTOPATOLÓGICO DOS MOLUSCOS

Exemplares de *B. tenagophila* infectadas por furcocercárias longifurcadas sem ocelos, por equinostomocercárias e por xifidlocercárias, foram submetidas a superinfecção com 100 miracídios SJ de *S. mansoni* e sacrificados por imersão em fixador BOUIN alcoólico, 24, 48 e 72 horas após a superinfecção.

Utilizamos 4 exemplares de cada tipo de infecção. As peças foram submetidas a cortes seriados com  $7\mu\text{m}$  de espessura e a coloração fêz-se pelo Tricrômico de GOMORI.

Os cortes foram observados ao microscópio óptico e analisadas as reações teciduais encontradas, anotando-se a presença de larvas (esporocistos, rédias e cercárias).

#### 6- OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DA HEMOLINFA

A hemolinfa foi colhida da região céfalo-podal do molusco, por rompimento do tegumento com estilete, recolhendo-se com pipeta PASTEUR o material extravasado (comunicação pessoal de SANTANA, 1986).

Foram utilizados moluscos de 8 a 18 mm de diâmetro e o volume médio obtido foi de 20 a 30  $\mu\text{l}$  de hemolinfa por indivíduo, verificando-se nas contagens à fresco a média aproximada de 200 céls/mm<sup>3</sup>.

A hemolinfa livre de células foi obtida por



centrifugação a 800 g, por 10 minutos.

Colhemos hemolinfa de B. tenagophila de campo (Grupos A) e de B. tenagophila de laboratório (Grupos B).

A hemolinfa colhida foi utilizada para dosagem de proteínas, contagem de amebócitos e ensaios de fagocitose.

#### 7- TEOR PROTEICO DA HEMOLINFA

As concentrações proteicas da hemolinfa foram estudadas por:

1) Dosagem de proteína pelo método do BIURETO segundo WEICHSELBAUM (1946).

A hemolinfa fresca de um "pool" de 30 moluscos com 9 a 12 mm de diâmetro e pertencia aos seguintes grupos:

B. tenagophila de laboratório livres de infecção (contrôle), B. tenagophila de campo livres de infecção (contrôle), e B. tenagophila de laboratório infectadas por S. mansoni.

2) Dosagem de proteína pelo método de LOWRY (1951), modificado.

Essa dosagem realizou-se com hemolinfa fresca individualmente, em exemplares de 9 a 12 mm de diâmetro, já que

este método exige quantidade mínima de material.

Os grupos analisados foram:

B. tenagophila de campo livres de infecção, B. tenagophila infectadas por furcocercárias, B. tenagophila infectadas por xifidiocercárias e B. tenagophila de campo infectadas experimentalmente com S. mansoni.

B- OBTENÇÃO DE SORO IMUNE DE COELHO, anti-B. tenagophila de campo livres de infecção por trematódeos.

O esquema de imunização adotado foi o de OLIVEIRA (1975), modificado.

Foi injetada, em um coelho cedido pelo Biotério da UNICAMP, hemolinfa de moluscos do campo livres de infecção por trematódeos, centrifugada a 17.000 g, por 2 minutos.

As duas primeiras inoculações foram feitas nos gânglios poplíteos do coelho, com intervalo de 30 dias. A hemolinfa em concentração proteica de 10 mg/ml, foi emulsionada com adjuvante completo de FREUND, utilizando-se um volume total de 1 ml dessa concentração, em cada inoculação. Após 15 dias da segunda inoculação, fêz-se uma série de quatro injeções subcutâneas, no dorso do animal, em intervalos semanais. Nessas inoculações a hemolinfa não foi emulsionada com adjuvante completo de FREUND e a concentração proteica foi de 5 mg/ml.

Foram realizadas sangrias no coelho, nos intervalos das

Injeções, para verificação por imunodifusão radial, do título de anticorpos produzidos.

#### 9- IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA

Os experimentos de imunodifusão foram realizados em gel de ágar a 1%, em solução salina 0,15M, segundo indicações de OUCHTERLONY (1958).

A difusão ocorreu em temperatura ambiente, por 30 a 40 horas. Por meio da precipitação de agregados Antígeno-Anticorpo, analisamos o perfil da hemolinfa (Ag) frente ao soro imune de coelho (Ac) anti-hemolinfa.

A coloração das lâminas fêz-se pelo COOMASIE-BLUE.

Foram utilizadas nas preparações, somente hemolinfa dos grupos de B. tenagophila capturadas no campo, em Louveira, SP.

#### 10- ELETROFORESE E IMUNOELETROFORESE

Foi empregada a técnica de eletroforese e imunoeletroforese unidimensionais, segundo as indicações de GRABAR e cols. (1964), em lâminas de vidro 10 x 10 cm, utilizando-se como suporte gel de agarose a 1% em tampão Barbital (0,05M; pH 8,6) e um gradiente de potencial de 6V/cm, em geladeira por 2 horas.

Logo após a corrida eletroforética, efetuou-se a imunodifusão dos componentes separados, frente a um soro imune de coelho, em câmara úmida, a temperatura ambiente, por 30 a 40 horas. A coloração fêz-se por COOMASIE-BLUE.

Foi estudada a hemolinfa de moluscos capturados no campo, parasitados e não parasitados por trematódeos.

#### 11- CONTAGEM DE AMEBÓCITOS DA HEMOLINFA

A determinação foi realizada pela técnica empregada para contagem de leucócitos:

$$\text{cel/mm}^3 = \frac{\text{célis contadas}}{4} \times 10$$

4

Algumas contagens foram feitas em hemolinfa colhida de um "pool" de cinco moluscos, e em outras ocasiões as determinações foram individuais. Foi utilizada hemolinfa coletada na região céfalo-podal de moluscos, com 10 a 12 mm de diâmetro, sendo colocada imediatamente em câmara de Neubauer, sem diluição.

Os exemplares destinados a esse estudo foram:

- B. tenagophila de campo livres de infecção;
- B. tenagophila infectadas por furcocercárias sem ocelo;
- B. tenagophila infectadas por xifidocercárias e

B. tenacophila de campo infectadas experimentalmente com S. mansoni.

## 12- AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA FAGOCITOSE

A capacidade de fagocitose dos amebócitos da hemolinfa fresca dos moluscos, foi avaliada frente a eritrócitos de carneiro formolizados.

Para a realização dos ensaios de fagocitose "in vitro", tomou-se como base a técnica de ABDUL-SALAM e cols. (1980), com algumas adaptações.

### 12.1- Preparo de Eritrócitos de Carneiro Formolizados

A formolização de eritrócitos de carneiro, suspensos em ALSEVER, fêz-se após lavagens com PBS pH7,0, adicionando-se a seguir 10 volumes de formol 3% à "papa" de eritrócitos.

Deixou-se a mistura por 24 horas em agitação vagarosa na geladeira. Novas lavagens em PBS e M.E.M. (meio de Eagle), foram executadas.

A suspensão foi ajustada para  $7 \times 10^6$  céls/mm<sup>3</sup>.

## 12.2- Preparo de Monocamadas de Amebócitos

A hemolinfa de um "pool" de 10 moluscos, com 9 a 12 mm de diâmetro foi acondicionada em tubo de plástico e mantida em banho-de-gelo até sua utilização.

Colocou-se 25  $\mu$ l de hemolinfa sobre lamínulas de vidro e incubou-se as preparações em câmara úmida, por 20 minutos à 22 °C. Com uma simples inclinação nas lamínulas, a hemolinfa foi removida, obtendo-se uma camada de amebócitos firmemente aderida à lamínula.

## 12.3- Fagocitose de Eritrócitos de Carneiro Formolizados

As monocamadas foram cobertas com 25  $\mu$ l de suspensão de Eritrócitos de carneiro formolizados. Fêz-se incubação em câmara úmida, por 1 hora, a 22 °C. Ao final os eritrócitos em excesso, foram removidos por lavagem com M.E.M. pH7,5.

As lamínulas foram fixadas com álcool metílico por 5 minutos, coradas com GIEMSA 1:5 e montadas em lâminas de microscopia, com bálsamo do Canadá.

O grau de fagocitose foi determinado pela contagem ao acaso de um mínimo de 200 amebócitos em cada monocamada, utilizando-se para tanto microscópio óptico com lente de imersão.

Para a determinação da porcentagem de fagocitose (F),

utilizou-se a seguinte fórmula:

$$F = \frac{\text{n}^\circ \text{ de amebócitos fagocitando} \times 100}{\text{n}^\circ \text{ total de amebócitos contados}}$$

A capacidade de fagocitose dos amebócitos da hemolinfa, foi avaliada nos grupos de B. tenagophila de campo livres de infecção, B. tenagophila infectadas por furcocercárias sem ocelo, B. tenagophila infectadas por xifidiocercárias, B. tenagophila de campo infectadas experimentalmente com S. mansoni.

### 13- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos estudos estatísticos para os valores obtidos nas dosagens proteicas da hemolinfa, nas contagens de "células spreading" na hemolinfa fresca e na avaliação quantitativa da fagocitose.

A análise desses valores foi efetuada através do Teste de Student e da análise de variância (Teste de Bartlett, Teste de Cochran e Teste de Tukey).

Para algumas situações optou-se por testes não-paramétricos, como o Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Maun-Withney (U Test), (ROSCOE, 1975).

Muitos valores exigiram transformações matemáticas, ou

seja foram normalizados, para serem usados no Teste de Tukey (CAMPOS, 1979).

Nos cálculos estatísticos, consideramos os seguintes valores representativos:

- n.s. = não significativo
- \* = valor significativo ao nível de 5%
- \*\* = valor significativo ao nível de 1%
- \*\*\* = valor significativo ao nível de 0,1%,  
altamente significativo



### III- RESULTADOS

#### 1- TAXA DE INFECÇÃO NATURAL POR TREMATÓDEOS

Para formarmos os grupos de experimento, fizemos várias capturas em criadouro natural situado no município de Louveira, SP.

No total foram coletados 2.243 exemplares de B. tenagophila, sendo que 2.041 indivíduos não apresentaram eliminação de qualquer tipo de cercária, sendo considerados livres de infecção por trematódeos.

A TABELA 1, mostra as taxas de infecção natural, segundo o tipo de cercária eliminada.

Verificamos que o maior percentual de infecção nas B. tenagophila, foi para furcocercárias longifurcadas sem ocelos (5,5%), seguindo-se a infecção por xifidiocercárias (3,0%).

Os moluscos infectados por furcocercárias longifurcadas com ocelos e os infectados por equinostomocercárias foram em número muito reduzido, não sendo estudados na maioria dos ensaios.

Não constatamos infecções naturais concomitantes por mais de um tipo de cercária. Moluscos que não apresentaram infecção por trematódeos, foram usados como grupo controle dos experimentos deste trabalho.

## 2- DETERMINAÇÃO DAS REAÇÕES TECIDUAIS E DA PRESENÇA DE LARVAS NOS MOLUSCOS OBSERVADOS EM CORTES HISTOLÓGICOS

Nos cortes histológicos observamos a presença de esporocistos, rédias ou cercárias que parasitavam os exemplares examinados.

Nos casos de superinfecção com miracídios da linhagem SJ de *S. mansoni*, observamos a ocorrência de esporocistos primários de *S. mansoni*, miracídios já desprovidos de cílios, presentes no tegumento do molusco há pelo menos 24 horas.

As microfotos de cortes de moluscos mostram que a superinfecção com *S. mansoni*, não determinou perda da integralidade nos esporocistos das infecções precedentes (FIGURAS 1, 2, 3, 4). Encontramos os esporocistos íntegros de furcocercárias, de equinostomocercárias e de xifidiocercárias.

A FIGURA 1, mostra esporocistos íntegros de furcocercárias. No tegumento desses moluscos infectados por furcocercárias e superinfectados com *S. mansoni*, encontramos esporocistos de *S. mansoni* degenerados, assemelhando-se a uma massa amorfa onde as células praticamente desapareceram. Não foram notadas reações amebocitárias em torno dessas larvas.

Na FIGURA 2, aparecem esporocistos íntegros de xifidiocercárias.

É notável na FIGURA 3, a presença de uma xifidiocercária no tecido do hepatopâncreas. Nos exemplares infectados por xifidiocercárias e superinfectados com *S. mansoni*, foram

encontrados esporocistos degenerados de *S. mansoni*. As células apresentaram-se sem suas características normais, não se observando contudo, reação amebocitária em torno dessas larvas.

Temos na FIGURA 4, a presença de equinostomocercárias no tecido pulmonar.

Nos exemplares infectados por equinostomocercárias, foram observadas rédias, que apresentavam-se como organismos alongados com esboço de aparelho digestivo e numerosas células germinativas.

Os exemplares infectados por equinostomocercárias, quando submetidos à superinfecção por miracídios de *S. mansoni*, apresentaram em seu tegumento esporocistos degenerados de *S. mansoni* sem reação amebocitária aparente.

Os esporocistos de furcocercárias, xifidiocercárias e equinostomocercárias, eram constituídos de células somáticas e células germinativas (geralmente uma única fileira junto a membrana externa da larva).

### 3- ESTUDOS DA HEMOLINFA

A hemolinfa dos planorbídeos foi coletada e utilizada imediatamente para os ensaios de fagocitose e contagem de amebócitos.

Para a dosagem de proteínas, obtenção do soro imune de coelho e para imunodifusão e eletroforese a hemolinfa foi

centrifugada removendo-se as células.

Frequentemente, após determinado o teor de proteína total a hemolinfa foi estocada a 4°C, por 2 a 3 dias ou mesmo congelada a -17°C.

Obsevou-se então uma mudança de coloração. Essa mudança foi de um vermelho vivo e transparente, para um marrom escuro quase negro.

Os experimentos de imunodifusão mostraram que não houve perda de antigenicidade após essa mudança de cor, sendo que os títulos de reação conseguidos foram os mesmos da hemolinfa fresca.

Quando a quantidade de hemolinfa colhida foi maior que 4 ml procedeu-se à sua liofilização e estocagem à -17°C, mantendo-se sua reatividade, incluindo a capacidade de induzir uma resposta imune.

Na dosagem proteica, nossos resultados apresentados na TABELA 2, mostraram diferença altamente significativa entre o grupo de moluscos livres de infecção capturados no campo e o grupo mantido e criado pelo laboratório do Departamento de Parasitologia, da UNICAMP.

Os valores maiores para proteína total foram encontrados nos moluscos do laboratório.

Na TABELA 3, onde ambos os grupos livres de infecção e infectados por *S. mansoni*, foram formados por moluscos de laboratório, não observou-se diferença significativa nos valores das amostras.

Mediante os resultados da TABELA 4, onde a dosagem foi realizada pelo método de LOWRY, ficou demonstrado que não há

diferença significativa entre os valores obtidos para a proteína total, quando comparados os vários grupos do campo.

#### 4- DESEMPENHO DO SORO IMUNE DE COELHO

A hemolinfa de *B. tenagophila* mostrou-se um bom antígeno, para a preparação de soro imune em coelhos.

Logo após terem sido iniciadas as inoculações no dorso do animal, (40 dias após a 1ª inoculação nos gânglios poplíteos), um título de reação 1:4 já aparecia na imunodifusão.

No final do esquema de imunização, onde seguiram-se:

2 inoculações de 10 mg/ml de proteínas da hemolinfa nos gânglios poplíteos e 4 inoculações de 5 mg/ml no dorso do animal, o resultado da imunodifusão do soro imune de coelho em diluições seriadas, frente a hemolinfa fresca de *B. tenagophila* de campo livre de infecção (6 mg/ml), forneceu um título de reação 1:32 (FIGURA 5). Este título foi considerado excelente.

#### 5- DESCRIÇÃO DA IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA E DA ELETROFORESE

Testes de precipitação em gel de ágar foram realizados com a finalidade de conhecer-mos as características antigênicas da

hemolinfa. Analisamos a hemolinfa dos vários grupos do campo em estudo e sua interação com o soro imune de coelho anti-Bt de campo livre de infecção por trematódeos.

Em todos os testes tivemos um padrão de identidade total, ou seja, os antígenos de todas as amostras são relacionados.

A solução de antígeno (hemolinfa) foi colocada em poços do gel opostos a um único poço contendo o antisoro (FIGURA 6 e 7).

Notamos de forma muito interessante, que ao reagirem Ag-Ac formam ao menos 3 bandas muito nítidas de precipitação (FIGURA 6).

Não houve diferenças antigênicas detectáveis entre os grupos do campo infectados por diferentes trematódeos, ou livres de infecção (FIGURA 7). As linhas de precipitação ou bandas formadas, fundiram-se em total identidade.

Aparecem 4 bandas nítidas na FIGURA 7.

Estes sistemas representam diferentes agregados e aparecem mesmo nas amostras mais diluídas.

Tal padrão, bastante complexo, mostrou-nos que estes agregados Ag-Ac, difundiram-se diferentemente no ágar até atingirem condições de equilíbrio.

a FIGURA 8, apresenta-nos claramente 4 linhas de precipitação em I.A. Não tão nítidas existem 5 linhas em I.B.

Na mesma FIGURA 8, as bandas no Teste II (Bt *S. mansoni*) são nítidas e largas, podendo-se notar 4 - 5 linhas em II.A e 4 delas em II.B.

Esta FIGURA representa ainda, no Teste III, 3 linhas

nítidas em III.A. e 5 linhas em III.B.

Os Testes I, II, III da FIGURA 8, foram deixados difundir por 60 horas.

Esse tempo permitiu melhor separação e visualização, dos agregados Ag-Ac formados.

A natureza bioquímica das bandas encontradas no gel, com coloração pelo Coomassie Blue exibem natureza proteica, indicada por esse tipo de corante.

As características da hemolinfa, foram testadas por eletroforese, seguida de imunodifusão.

Amostras de hemolinfa (25 mg/ml) foram aplicadas em poços centrais na agarose e submetidas a eletroforese por 2 horas.

A imunodifusão durou 48 horas, sendo feita frente ao soro imune de coelho anti-Bt livre de infecção por trematódeos, colocado em canaletas no gel.

O perfil imunoeletroforético da hemolinfa dos vários grupos em experimento, esta ilustrado na FIGURA 9.

A migração das proteínas, mostrou ser em direção ao pólo positivo (catódico).

Nas preparações à fresco, nas amostras de Bt livres de infecção foi encontrada uma banda tênue, próxima ao poço central que migra em direção ao pólo negativo (anódico).

Esta banda, contudo, é removida facilmente pela lavagem do gel em salina, antes da secagem e coloração.

A FIGURA 9 é uma foto da preparação, após a lavagem, secagem e coloração.

Encontramos para a hemolinfa de Bt livre de infecção, 5.

linhas de precipitação, sendo uma deslocada para o pólo anódico, uma junto ao próprio poço de depósito da amostra de hemolinfa, 2 próximas ao poço em direção ao pólo catódico e uma última muito densa e deslocando-se rapidamente, sendo a que migrou maior distancia em direção ao pólo positivo (FIGURA 9.2)

Quando submetemos à eletroforese a hemolinfa de Bt infectada por furcocercárias, obtivemos 4 linhas deslocando-se em direção ao pólo positivo. Entre elas uma linha forte e densa foi a que se deslocou mais rapidamente (FIGURA 9.1).

Também visualizamos 4 linhas de precipitação, na hemolinfa de Bt infectada por S. mansoni (FIGURA 9.3). Uma delas apresentou-se muito densa e migrou rapidamente.

Na FIGURA 9.4, na imunoeletroforese de Bt infectadas por xifidiocercárias, notamos 3 linhas em direção ao pólo positivo e a mais densa delas caminhou mais velozmente que as outras.

Em todos os Testes esta banda mais densa deve abrigar vários agregados Ag-Ac sobrepostos.

#### 6- CONTAGEM DE AMEBÓCITOS E AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA FAGOCITOSE

As contagens celulares foram feitas individualmente molusco por molusco (TABELA 5) e também em "pool" de 5 moluscos (TABELA 6). Os exemplares examinados são moluscos capturados no campo.

Os dados da TABELA 5, não revelaram diferença.



significativa no número de células da hemolinfa por caramujos infectados por *S. mansoni* e caramujos livres de infecção por trematódeos (em tempo, lembramos que uma amostragem maior poderia inferir outro resultado). Já nos experimentos referidos na TABELA 6, na contagem realizada em "pool" de hemolinfa dos moluscos, foram constatados comportamentos diferenciados. Os resultados demonstraram aumento no número de células (amebócitos circulantes), em todos os grupos infectados por trematódeos, em comparação com o controle livre de infecção.

Similarmente, foi significativa a diferença do número de amebócitos quando comparamos os grupos infectados por furcocercárias e xifidiocercárias entre si, sendo o último grupo o que demonstrou maior número de amebócitos em sua hemolinfa.

A TABELA 7, mostra o teste estatístico das contagens que realizamos nos vários grupos.

Os resultados obtidos nos ensaios de fagocitose estão apresentados nas TABELAS 8 e 9.

A análise das TABELAS, indicam que a capacidade de fagocitose dos amebócitos é maior nos grupos infectados por trematódeos digenéticos em relação ao grupo controle livre de infecção. Na comparação entre o grupo infectado por *S. mansoni* e o grupo controle livre de infecção, não foram encontradas diferenças significativas.

Os amebócitos nos grupos de moluscos infectados por furcocercárias longifurcadas sem ocelos ou por xifidiocercárias, apresentaram maior capacidade de fagocitose quando comparados com o grupo infectado por *S. mansoni*. Por outro lado foi significativa

a diferença entre os moluscos infectados por furcocercárias e os infectados por xifidiocercárias.

O valor encontrado para taxa de fagocitose foi maior neste último grupo.

A FIGURA 10 mostra uma visão geral da monocamada de amebócitos, preparada para a fagocitose de eritrócitos formolizados de carneiro.

As FIGURAS 11 e 12 fornecem a imagem de amebócitos fagocitando eritrócitos.

TABELA 1 - Taxa de infecção natural por trematódeos digenéticos, por tipo de cercárias, em moluscos *Biomphalaria tenagophila* capturadas no criadouro de Louveira, SP.

tipo de cercária	nº de exemplares infectados	percentual de infecção
furcocercárias longi-furcadas sem ocelos	122	5,5
furcocercárias longi-furcadas com ocelos	11	0,5
equinostomocercárias	7	0,5
xifidlocercárias	62	3,0

Obs: o número total de moluscos examinados foi igual a 2.243.

TABELA 2 - Dosagem de proteína total da hemolinfa de Biomphalaria tenagophila, pelo método do Biureto.

hemolinfa	dosagem (mg/ml)	variação
Bt de campo livres de infecção	36,32 ± 2,72 <sup>(a)</sup>	
Bt de laboratório livres de infecção	48,56 ± 7,36 <sup>(b)</sup>	0,001 < p < 0,01 <sup>(c)</sup> ***

- (a) o resultado expressa a média aritmética ± 1 D.P (desvio padrão) para n = 7 (n = nº de dosagens)
- (b) o resultado expressa a média aritmética ± 1 D.P (desvio padrão) para n = 6
- (c) analisado pelo "teste de student", teve valor t = 3,85 para 11 graus de liberdade, considerado altamente significativo

TABELA 3 - Dosagem de proteína total, da hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila*, nascidas e criadas no laboratório do Dep. de Parasitologia da UNICAMP, pelo método do biureto.

hemolinfa	dosagem (mg/ml)	variação
Bt de laboratório livres de infecção	$48,56 \pm 7,36^{(a)}$	
Bt de laboratório infectadas por <i>S. mansoni</i>	$44,97 \pm 5,77^{(b)}$	p > 0,05 <sup>c</sup> n.s.

(a) o resultado expressa a média aritmética  $\pm 1$  D.P (desvio padrão), para n = 6 (n = nº de dosagens)

(b) o resultado expressa a média aritmética  $\pm 1$  D.P (desvio padrão), para n = 4

(c) analisado pelo "teste de student", teve valor t = 0,86, para 8 graus de liberdade, não mostrando diferença significativa.

TABELA 4 - Dosagem de proteína total da hemolinfa de Biomphalaria tenagophila, capturadas no criadouro de Louveira, SP., pelo método de LOWRY.

hemolinfa	dosagem (b)
Bt do campo livre de infecção	27,86 ± 6,41
Bt do campo <u>S. mansoni</u> <sup>(a)</sup>	33,90 ± 2,40
Bt furcocercárias	25,09 ± 4,63
Bt xifidiocercárias	27,88 ± 1,21

(a) Estes exemplares foram infectados em laboratório, com cepa SJ de S. mansoni.

(b) O resultado expressa a média aritmética ± 1 D.P (desvio padrão) para n = 6.

NOTA: A análise estatística (contida no ANEXO I), por testes paramétricos e não-paramétricos, considera as variações de valores entre os tratamentos n.s. = não significativas.

TABELA 5 - Contagem de amebócitos na hemolinfa fresca sem diluição, feita individualmente nos exemplares de Biomphalaria tenagophila.

hemolinfa	nº de céls. "spreading"	variação <sup>(c)</sup>
Bt do campo livres de infecção	17 ± 8,60 <sup>(a)</sup>	p > 0,05 n.s.
Bt do campo <u>S. mansoni</u>	22 ± 12,10 <sup>(b)</sup>	

(a) o resultado expressa a média aritmética ± 1 D.P (desvio padrão) para n = 6.

(b) o resultado expressa a média aritmética ± 1 D.P (desvio padrão) para n = 5.

(c) analisado pelo "teste de student", teve valor t = 0,372 para 9 graus de liberdade, considerado não significativo (valores normalizados pela fórmula  $x + 5$ ).

Obs: Bt do campo S. mansoni, são moluscos infectados experimentalmente.

TABELA 6 - Contagem de amebócitos na hemolinfa fresca, em "pool" de moluscos, Biomphalaria tenagophila.

hemolinfa	nº de céls. "spreading" (a)
Bt do campo livres de infecção	17 ± 1,29
Bt do campo <u>S. mansoni</u>	21 ± 2,08
Bt furcocercárias	21 ± 0,95
Bt xifidlocercárias	22 ± 0,95

(a) o resultado expressa a média aritmética ± 1 D.P (desvio padrão) para n = 4.

Obs: Bt de campo S. mansoni, são moluscos infectados experimentalmente.



TABELA 7 - Teste de TUKEY para a contagem de amebócitos na hemolinfa fresca de *B. tenagophila*, em "pool" de moluscos.

hemolinfa	$\bar{X}^{(a)}$	variação <sup>(b)</sup>		
Bt do campo livres de infecção	16,96	***	***	***
Bt do campo <i>S. mansoni</i>	18,75			
Bt furcocercárias	18,44			**
Bt xifidlocercárias	18,87			

(a) média dos valores transformados pela fórmula  $\sqrt{x + 0,5}$  (vide ANEXO II).

(b) os tratamentos unidos por barras são significativos, a saber:

\*\* - significativo a nível de 1%  
 \*\*\* - significativo a nível de 0,1%

Obs - A ausência de barras ligantes, mostra que os tratamentos comportam-se como iguais.

TABELA 8 - Taxa de fagocitose dos amebócitos da hemolinfa de Biomphalaria tenagophila do campo, frente a eritrócitos de carneiro formolizados.

amebócitos de	percentual de (a) fagocitose %
Bt livre de infecção	59,4 ± 5,98
Bt <u>S. mansoni</u>	60 ± 1,58
Bt furcocercárias	76,4 ± 4,77
Bt xifidiocercárias	83,2 ± 3,11

(a) o resultado expressa a média aritmética  $\pm$  1 D.P (desvio padrão), para n = 5.

Obs: Bt S. mansoni, são moluscos do campo infectados experimentalmente.

TABELA 9 - Teste de TUKEY para a taxa de fagocitose dos amebócitos da hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila*, frente a eritrócitos de carneiro formolizados.

amebócitos de	X (a)	variação (b)
Bt livre de infecção	50,452	***
Bt <i>S. mansoni</i>	50,768	***
Bt furcocercárias	65,874	***
Bt xifidiocercárias	61,026	***

(a) a média representa os valores transformados pela fórmula:  
 $\alpha' = \arcsen \sqrt{\hat{p}}$  (ANEXO III)

(b) os tratamentos ligados por barras são significativos, a saber:

\*\* - significativo a nível de 1%  
 \*\*\* - significativo a nível de 0,1%

Obs - A ausência de barras ligantes, mostra que os tratamentos comportam-se como iguais.

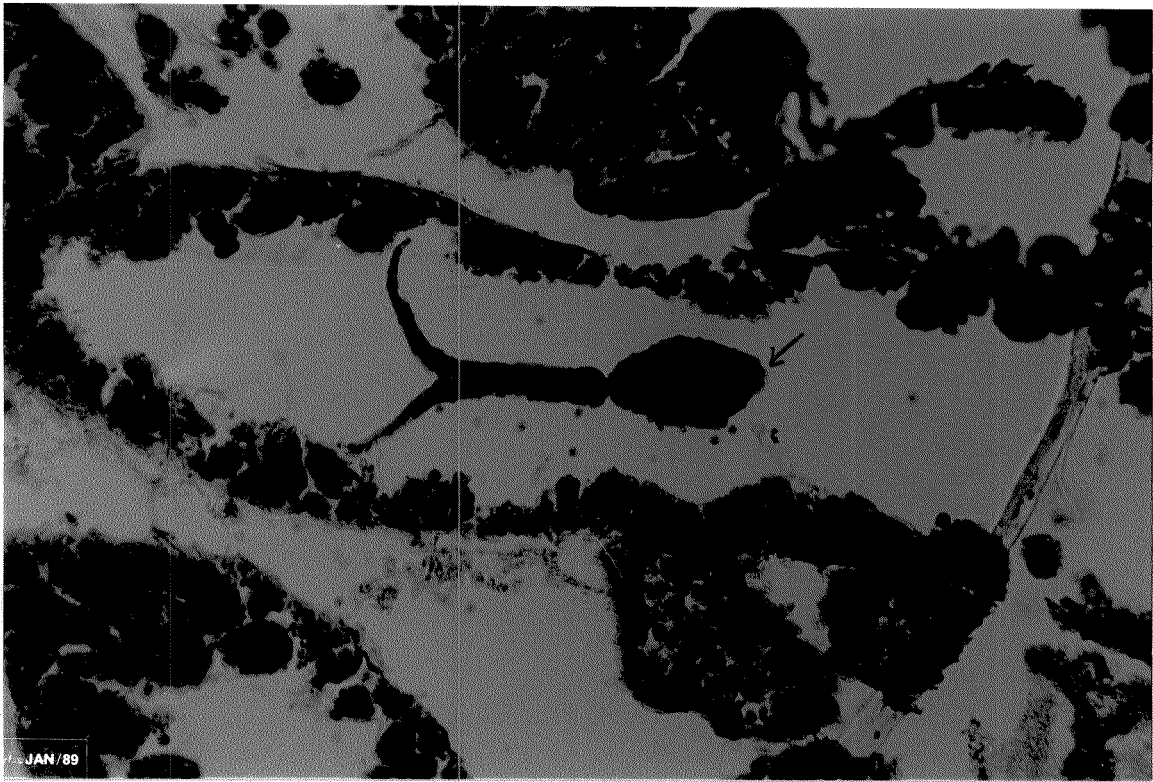


FIGURA 1— *B. tenagophila* (coloração Tricrômico de Gomori, 200 X), material trabalhado 48 horas após superinfecção por miracídios de *S. mansoni*. Mostra esporocistos íntegros e uma cercária longifurcada sem ocelos, no hepatopâncreas.

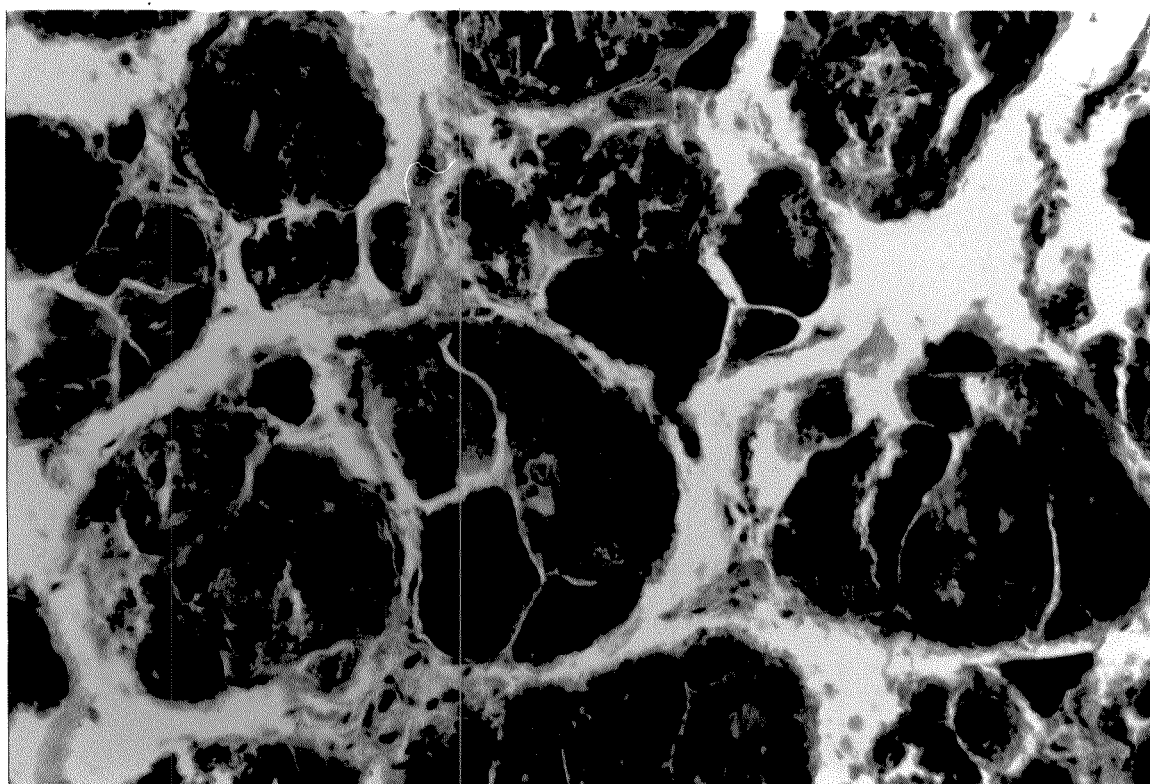


FIGURA 2- *B. tenagophila* (Tricrômico de Gomori, 375 X), material trabalhado 48 horas após superinfecção por miracídios de *S. mansoni*. Mostra vários esporocistos secundários que darão origem a xifidiocercárias, no hepatopâncreas.

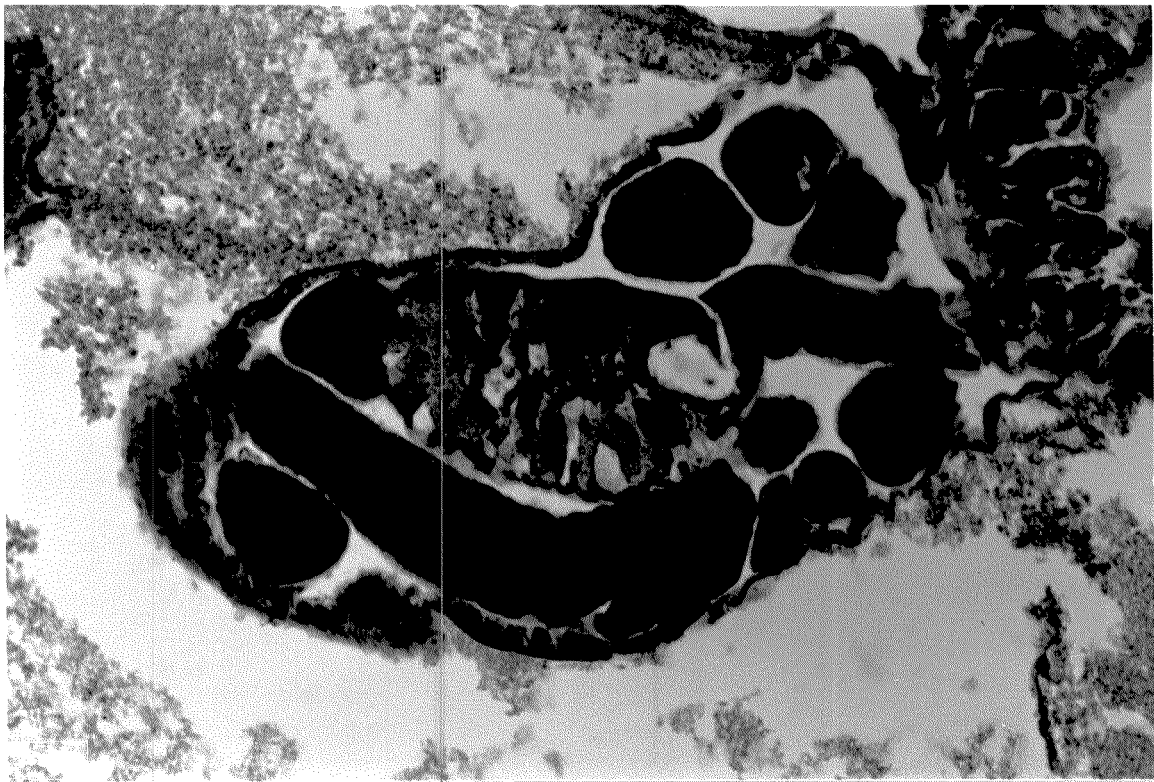


FIGURA 3-- *B. tenagophila* (Tricrômico de Gomori, 375 X), material trabalhado 72 horas após superinfecção por miracídios de *S. mansoni*. Mostra xifidiocercária, localizada no hepatopâncreas.

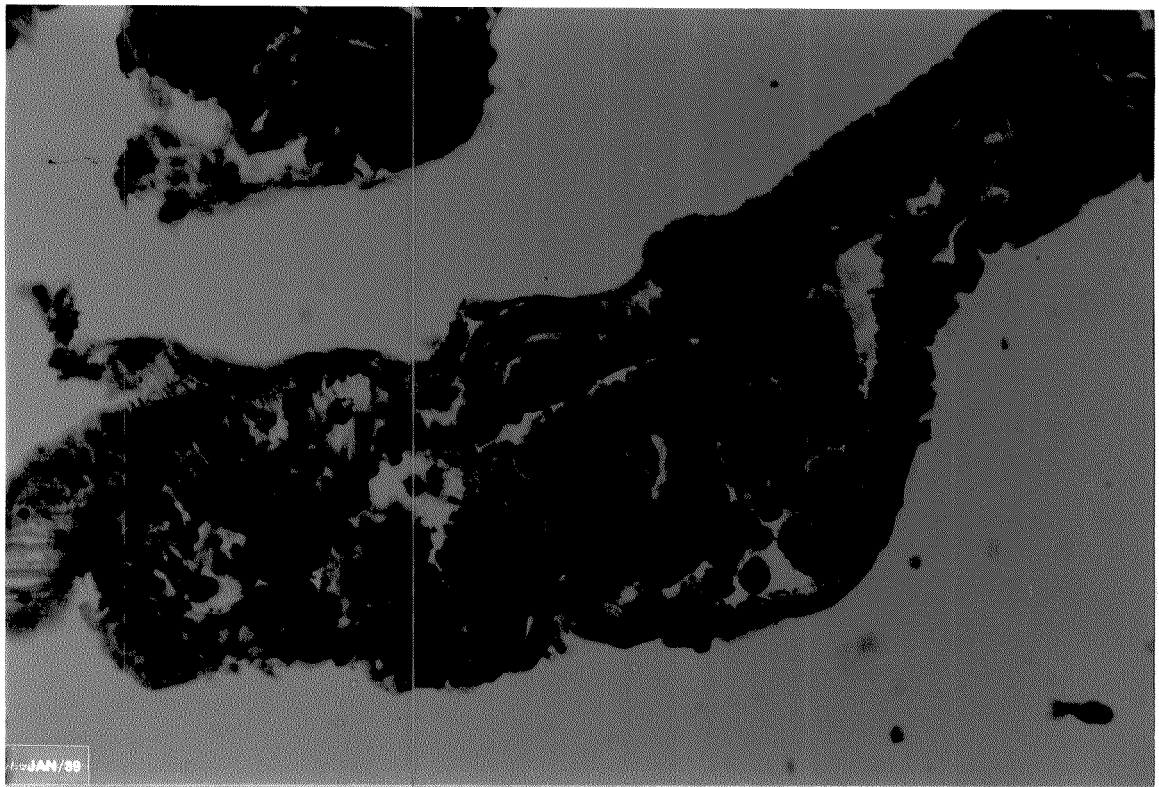


FIGURA 4-B. *tenagophila* (Tricrômico de Gomori, 375 X), material trabalhado 48 horas após superinfecção por miracídios de *S. mansoni*. Mostra uma equinostomocercária, no tecido pulmonar; nota-se a presença de uma coroa de ganchos na extremidade sinestra da cercária.

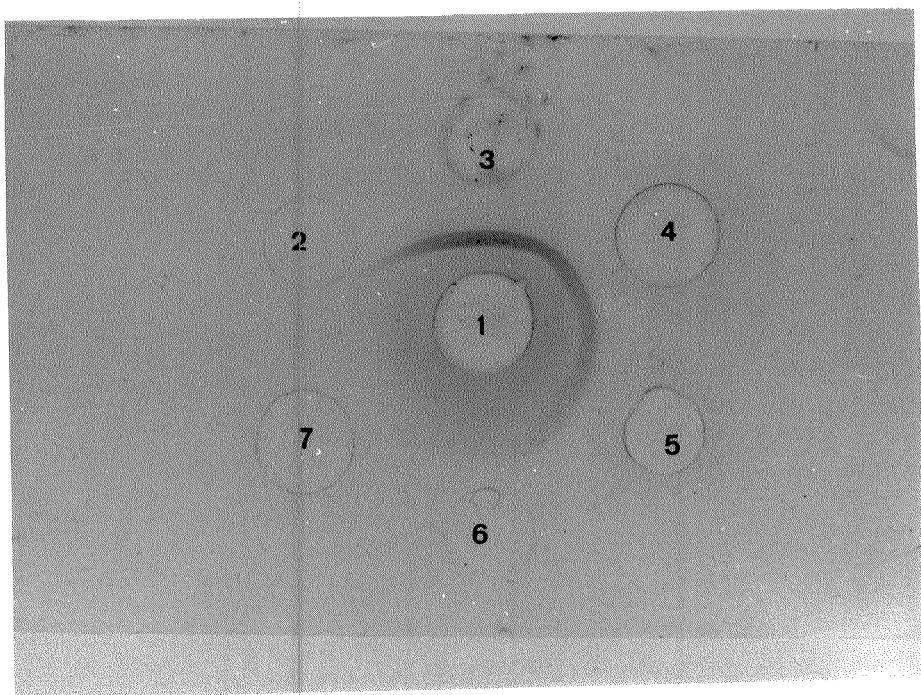


FIGURA 5- Imunodifusão radial dupla, do soro imune de coelho anti-Bt, frente a hemolinfa de Bt do campo livre de infecção (24 horas de difusão).

- 1- hemolinfa (6 mg/ml)
- 2- 3- 4- 5- 6- soro imune de coelho (anti-Bt) nas diluições 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, respectivamente
- 7- soro normal de coelho (total)



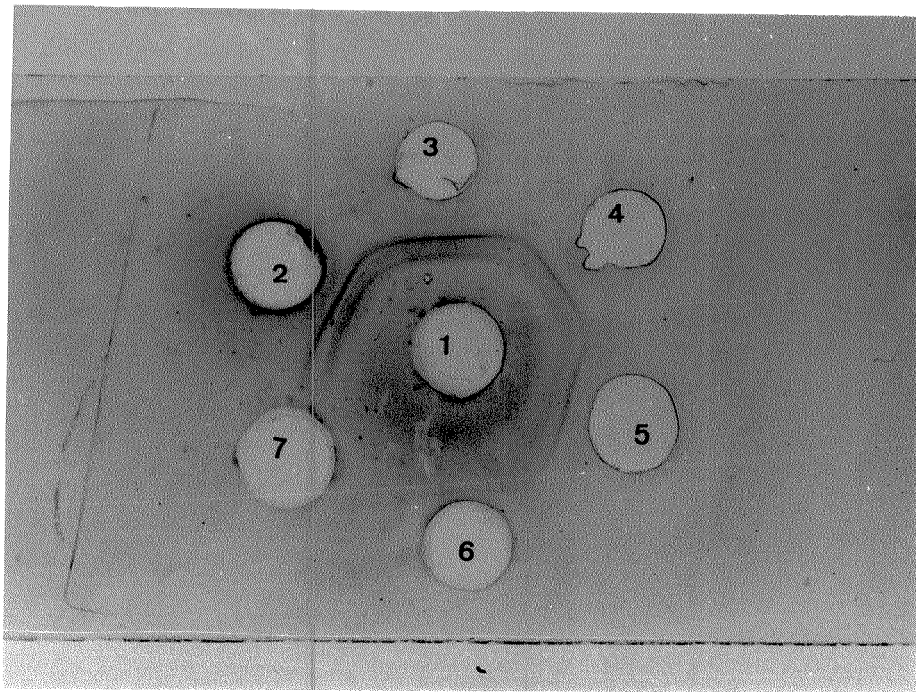


FIGURA 6- Imunodifusão radial da hemolinfa de *B. tenacophila* do campo, frente a soro imune de coelho (24 horas de difusão).

- 1- soro imune de coelho anti-Bt (total)
- 2- 3- hemolinfa de Bt livre de infecção (6 mg/ml)
- 4- 5- hemolinfa de Bt livre de infecção (3 mg/ml)
- 6- hemolinfa de Bt livre de infecção (1 mg/ml)
- 7- soro normal de coelho (total)

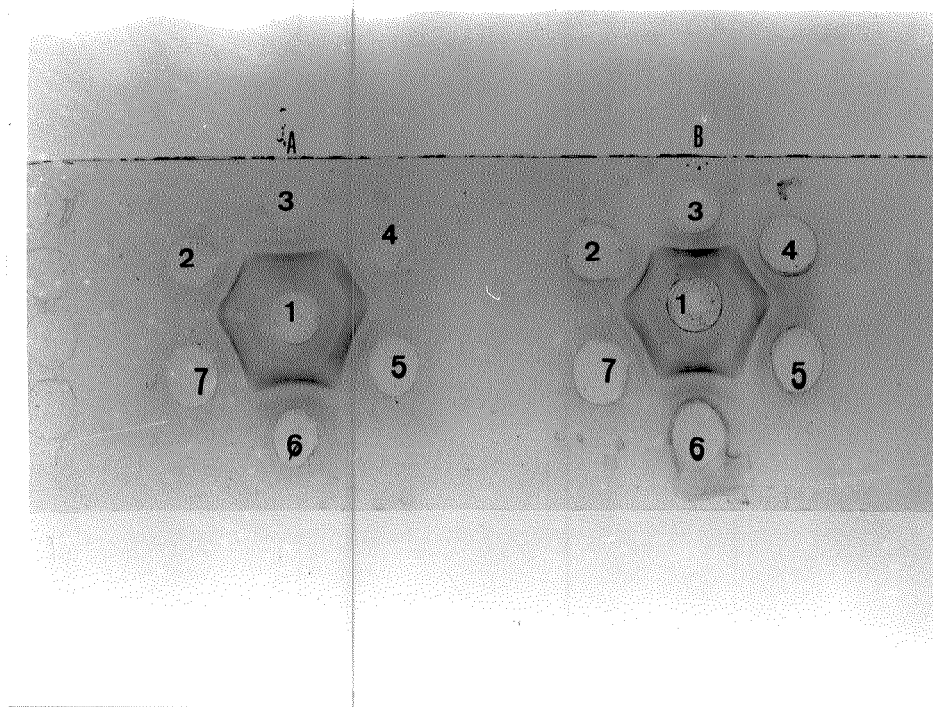


FIGURA 7- Imunodifusão radial da hemolinfa de B. tenagophila do campo, frente ao soro imune de coelho (48 horas de difusão).

A- 1- soro imune de coelho anti-Bt  
 2- hemolinfa de Bt xifidiocercárias  
 3- hemolinfa de Bt livre de infecção  
 4- 5- 6- hemolinfa de Bt S. mansoni  
 7- hemolinfa de Bt furcocercárias

B- 1- soro imune de coelho anti-Bt  
 2- 5- hemolinfa de Bt furcocercárias  
 3- hemolinfa de Bt livre de infecção  
 4- 7- hemolinfa de Bt S. mansoni  
 6- hemolinfa de Bt xifidiocercárias

Obs:- o soro foi utilizado total, e a hemolinfa 6 mg/ml.

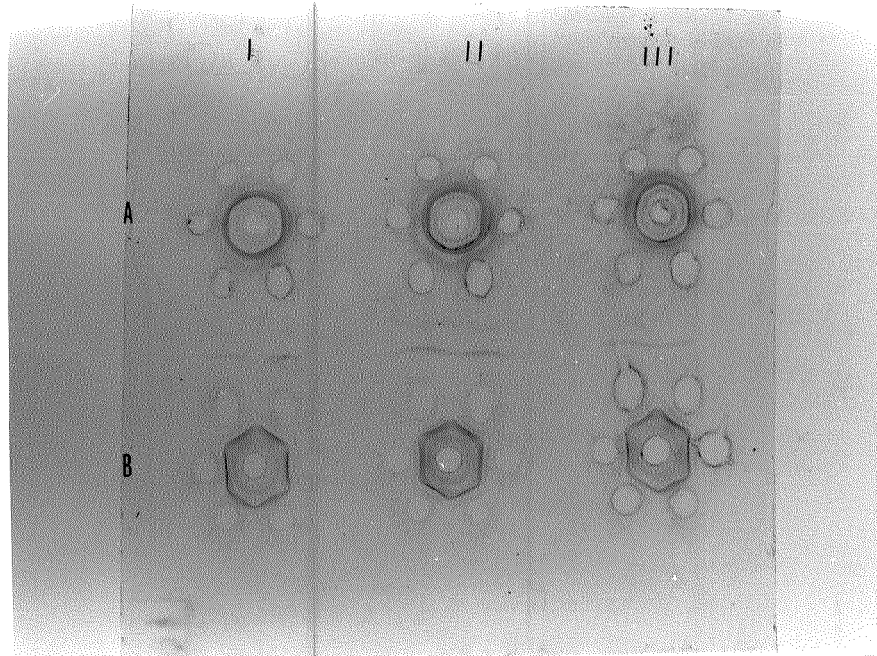


FIGURA 8- Padrão de imunodifusão para hemolinfa de exemplares do campo (6 mg/ml) e soro imune de coelho (total, 60 horas de difusão).

I. A- poço central: hemolinfa de Bt furcocercárias  
poços laterais: soro imune de coelho anti-Bt

B- poço central: soro imune de coelho anti-Bt  
poços laterais: hemolinfa de Bt furcucercárias

II. A- poço central: hemolinfa de Bt *S. mansoni*  
poços laterais: soro imune de coelho anti-Bt

B- poço central: soro imune de coelho anti-Bt  
poços laterais: hemolinfa de Bt *S. mansoni*

III. A- poço central: hemolinfa de Bt xifidiocercárias  
poços laterais: soro imune de coelho anti-Bt

B- poço central: soro imune de coelho anti-Bt  
poços laterais: hemolinfa de Bt xifidiocercárias

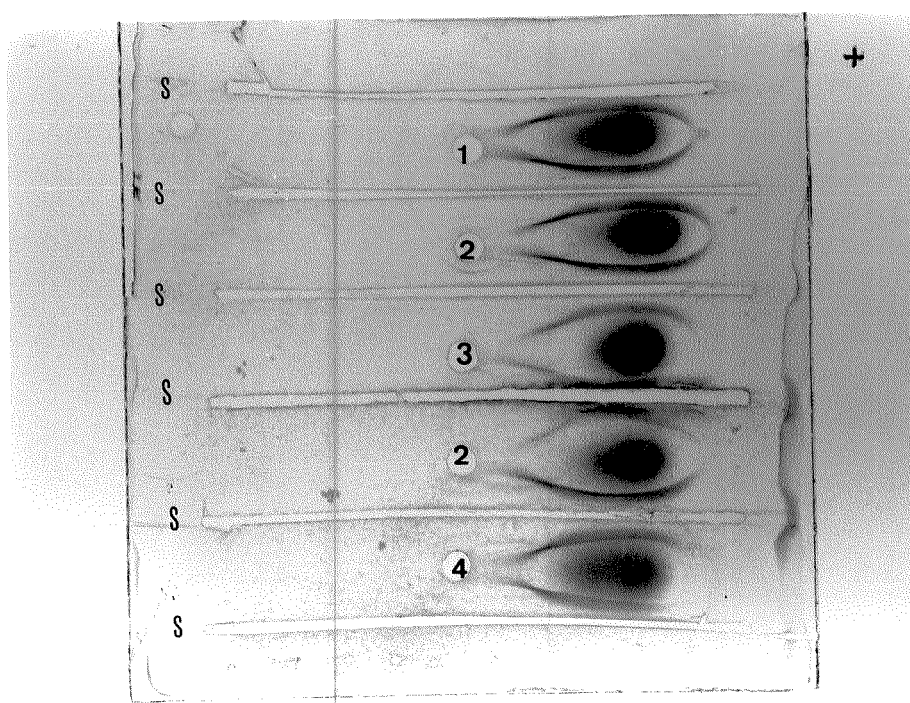


FIGURA 9- Padrão de imunoeletroforese da hemolinfa de *B. tenagophila* do campo.

- S- soro imune de coelho anti-Bt  
 1- hemolinfa de Bt furcocercárias  
 2- hemolinfa de Bt livre de infecção  
 3- hemolinfa de Bt *S. mansoni*  
 4- hemolinfa de Bt xifidlocercárias

Obs:- o soro foi utilizado total e a hemolinfa 6 mg/ml.

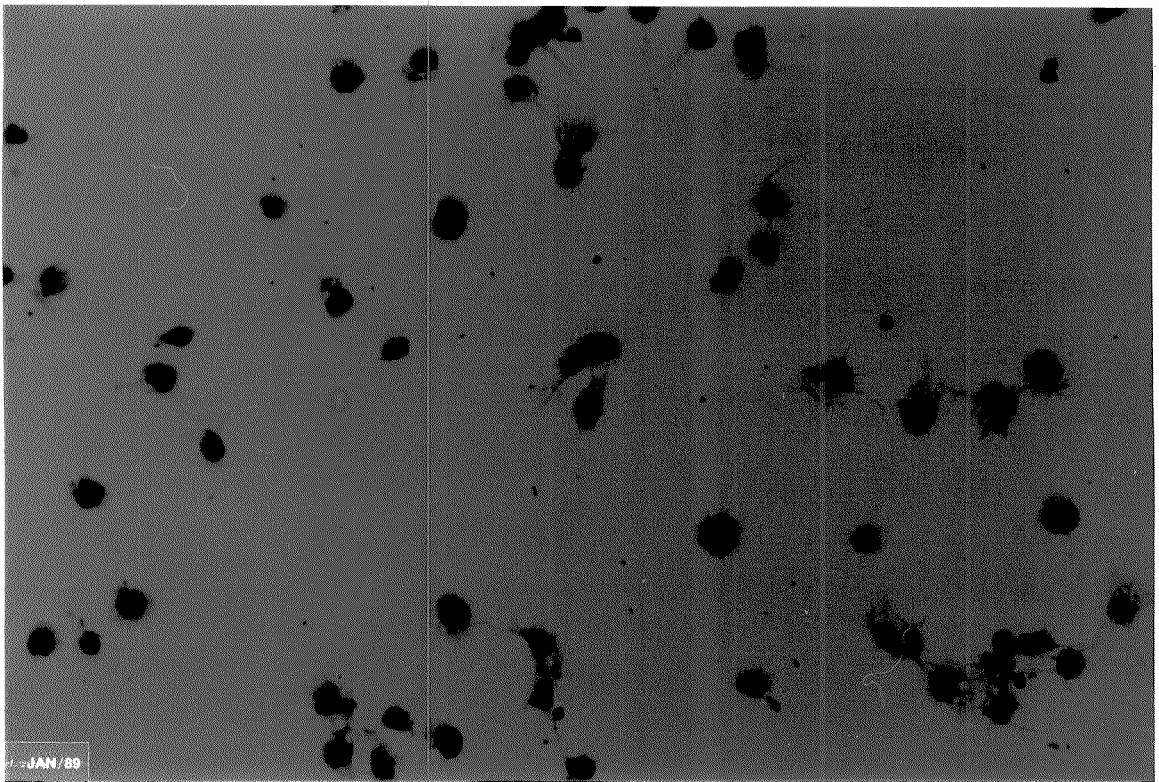


FIGURA 10- Monocamada de amebócitos da hemolinfa de *B. tenagophila* livres de infecção. (Giemsa, 375 X)

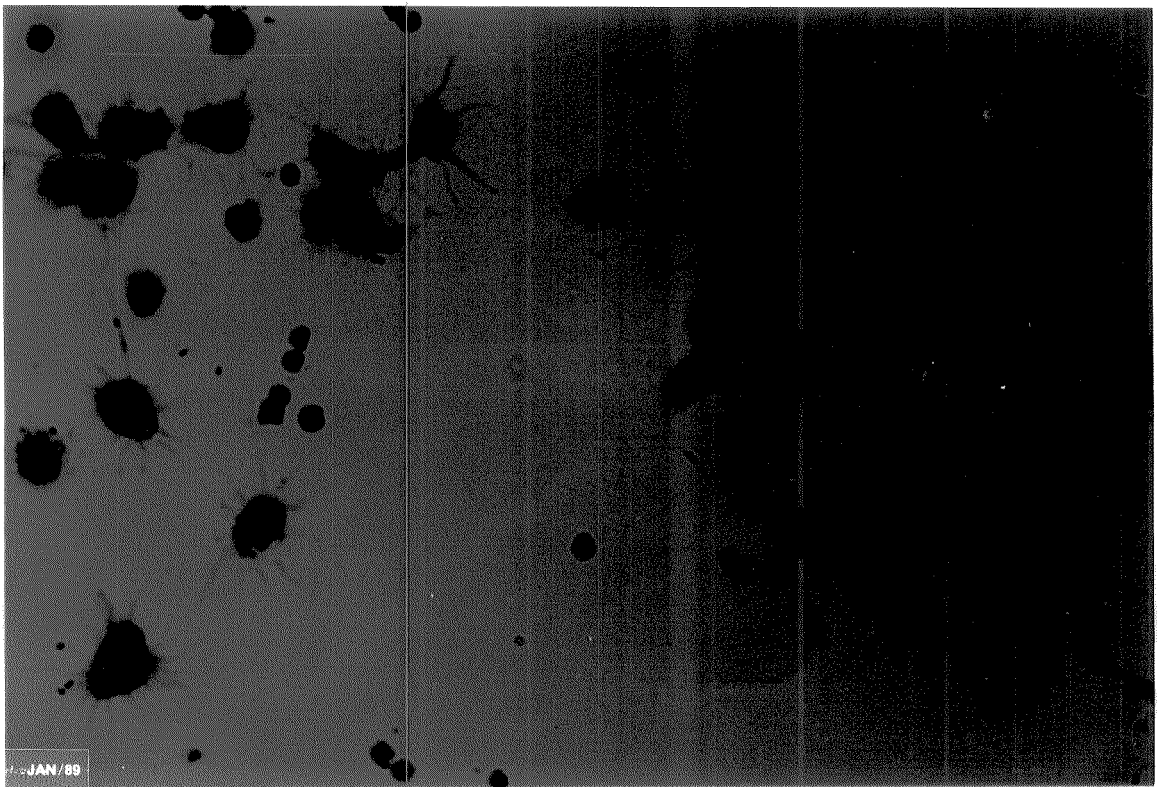


FIGURA 11- Fagocitose "in vitro" de eritrócitos de carneiro formolizados, por amebócitos da hemolinfa de *R. tenagophila*, infectadas por xifidiocercárias. (Giemsa, 600 X)

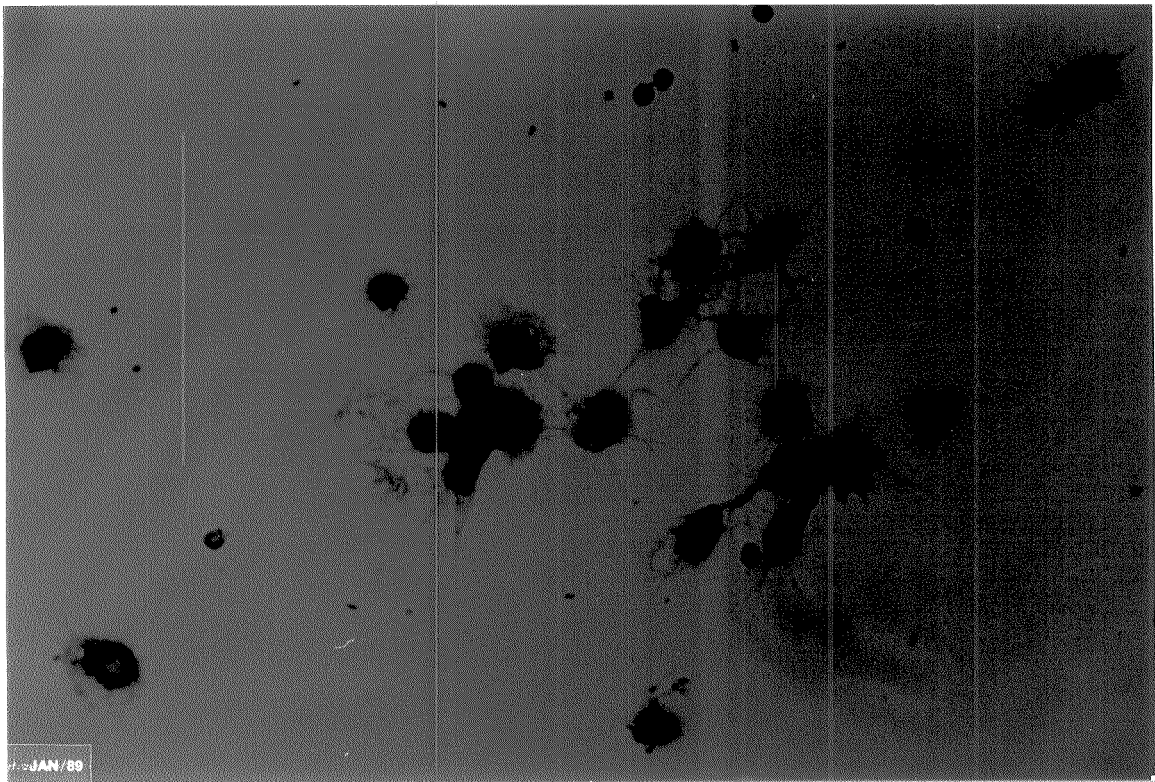


FIGURA 12- Detalhe do processamento dos eritrócitos de carneiro formolizados, no interior dos amebócitos da hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por furcocercárias. (Giemsa, 600 X)

#### IV- DISCUSSÃO

Nossos resultados referentes aos moluscos *B. tenagophila* capturados no campo, quanto à taxa de infecção natural por trematódeos digenéticos, bem como a identificação das cercárias eliminadas estão em concordância com os dados assinalados por MACHADO e cols. (1985, 1987, 1988). Esses trabalhos reassignaram a capacidade desse molusco albergar, como hospedeiro intermediário, diversas espécies de trematódeos digenéticos.

Vários autores verificaram "resistência à infecção" em moluscos "sensibilizados" por infecções prévias. SULLIVAN (1982), indicou indução de resistência adquirida, em *B. glabrata* sensibilizada por miracídios irradiados de *Ribeiroia mariae*, tendo esses moluscos adquirido resistência a reinfeção, quando expostos a miracídios não irradiados. Estas larvas foram destruídas por amebócitos, tendo havido aumento do número dessas células.

Jourdane & cols. (1986) descreveram competição intraespecífica entre os esporocistos primários de *S. mansoni* e de *Echinostoma caeroni*, quando cohabitavam, em *B. pfeifferi*. Houve degeneração de uma fração significativa de esporocistos primários de *S. mansoni*, sendo que a fração restante migrou para fora de seus microbiótopos preferidos, provavelmente para locais não imunologicamente ativos.

Nas superinfecções verificamos, em nossos exames histopatológicos, total degeneração dos esporocistos primários de *S. mansoni* tendo os esporocistos de todas as outras espécies de



trematódeos permanecido íntegros. Houve evidentemente "proteção" à superinfecção pelo *S. mansoni*.

LIE & cols. (1980) descreveram as reações teciduais induzidas por *S. mansoni* em *B. glabrata* susceptíveis, expostas previamente a miracídios irradiados de *E. paraensei* e notaram esporocistos de *S. mansoni* degenerados sem reação amebocitária ou com número muito reduzido dessas células presas aos esporocistos.

Constatamos a ausência de reação amebocitária aparente em torno dos esporocistos destruídos de *S. mansoni* em todas as superinfecções realizadas, o que pode significar a ação de fatores na destruição do parasita.

BAYNE (1980a, 1980b) relatou que fatores na hemolinfa (excluindo-se as células), de *B. glabrata* estariam envolvidos na destruição dos parasitas pelo hospedeiro intermediário.

LOKER e cols. (1982), demonstraram em estudos "in vitro" com *B. glabrata*, componentes da hemolinfa (fatores humorais ou fatores do plasma) de exemplares resistentes, destruindo esporocistos de *S. mansoni* em incubações conjuntas.

BAYNE e cols. (1986), demonstraram aglutininas na resposta de defesa de moluscos, com papel opsonico na fagocitose "in vitro".

BAYNE e cols. (1985), postularam que os componentes do plasma que medeiam a defesa celular em *B. glabrata*, são aglutininas com conformação molecular específica e que reconheceram diferenças entre espécies distintas de caramujos.

LOKER e cols. (1987) evidenciaram diferenças na quantidade de proteína total na hemolinfa de *B. glabrata*.

parasitada por *E. paraensei*, sendo que esse valor aumenta muito nos caramujos susceptíveis. Nos exemplares resistentes, o valor proteico é fracamente elevado nos parasitados, sendo que no 60º dia de infecção era aproximadamente metade do valor encontrado no grupo contróle sem infecção.

Quando comparamos com moluscos capturados no campo, os moluscos nascidos e mantidos em laboratório apresentaram valores maiores de proteína na hemolinfa. Tal situação, talvez deva-se a fatores como alimentação e confinamento. Entre os grupos capturados no campo, verificamos não haver diferença significativa entre eles, no que se refere ao teor proteico da hemolinfa, quer estejam ou não parasitados por trematódeos digenéticos.

Acreditamos que em *B. tenagophila* os valores de proteína na hemolinfa, podem variar em razão da linhagem dos caramujos e da época de infecção. Estudos complementares, poderão confirmar ou não esse nosso crédito.

A origem dos amebócitos foi discutida por LIE e cols. (1975) em *B. glabrata*.

A participação dos amebócitos nas reações celulares à infecção por *S. mansoni*, tem sido largamente investigada.

Foram assinaladas as atividades "in vitro" dessas células no reconhecimento de agentes estranhos e na sua fagocitose por JEONG & HEYNEMAM (1976) e também por ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980), em *B. glabrata*.

Nossos resultados na contagem de amebócitos na hemolinfa (amebócitos circulantes), mostraram-se concordantes com os assinalados por STUMPE & GILBERTSON (1980). Esses autores

definiram que granulócitos (células fagociticamente ativas), expressaram aumento em número nos moluscos *B. glabrata* parasitados por *S. mansoni* em relação aos controles sem infecção.

Verificamos a atividade de fagocitose "in vitro" aumentada nos grupos infectados.

Hipoteticamente admitimos que o parasitismo ativa as células fagocíticas, já que sabemos por CHENG & SCHOEMBERG (1980), que essas células são dependentes de fatores quimiotáticos ou de fatores de reconhecimento, e que o número dessas células participantes da ingestão de partículas é de 30 até 100% (ANDERSON & GOOD, 1976).

Os trabalhos de YOSHINO (1982), ABDUL-SALAM & MICHELSON (1983), BAYNE & cols. (1984), KNAAP & SMINIA (1987), assinalaram que: esporocistos são encapsulados e mortos por células semelhantes a macrófagos; os determinantes da superfície dos amebócitos são modulados por lectinas; antígenos de *S. mansoni* reagindo com amebócitos de *B. glabrata* e receptores específicos para *S. mansoni* nos amebócitos de *B. glabrata*.

Todos esses achados, brevemente, nos permitirão esclarecer aspectos dos mecanismos de fagocitose e destruição dos parasitas, em moluscos parasitados por trematódeos.

Através da imunodifusão e da imunoeletroforese, vários trabalhos contribuíram para a diferenciação taxonomica em caramujos de importância médica (BAYLEY & cols., 1986); determinaram glicoproteínas aglutinantes em *B. glabrata* para o sistema ABO humano (STANISLAWSKY & cols., 1976) e detectaram variedades de peptídeos em exemplares susceptíveis e resistentes

de B. glabrata (BAYNE & cols., 1986).

BAYNE & cols. (1987), verificaram em B. glabrata que muitas macrocélulas componentes da hemolinfa são glicoproteínas e a ampla maioria dos determinantes antigênicos são carboidratos.

LOKER & HERTEL (1987), verificaram que componentes da hemolinfa de B. glabrata exibiam alterações moleculares quantitativas e qualitativas reveladas por SDS-PAGE.

Através do perfil eletroforético obtido na hemolinfa dos moluscos infectados pelos diferentes trematódeos, nós encontramos alterações que mostraram características específicas de cada diferente tipo de infecção. A coloração efetuada, indica natureza proteica das bandas encontradas no gel.

Nossas imunodifusões e imunoeletroforeses, permitiram-nos afirmar que há diferenças qualitativas e quantitativas na hemolinfa de B. tenacophila do campo parasitadas quando comparadas com controle livre de infecção.

Não fizemos análise bioquímica detalhada dos sistemas precipitantes e com certeza testes mais refinados, permitam-nos futuramente, discriminar sobre a natureza dessas diferenças.

Tendo o nosso grupo de trabalho o objetivo de fazer investigações imunológicas em moluscos, sabemos que muitos pontos deverão ainda ser explorados. Um importante e interessante teste seria a distinção por perfil eletroforético da hemolinfa de B. tenacophila de diferentes regiões.

## V- RESUMO E CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados que obtivemos na investigação de alguns aspectos imunológicos e parasitológicos em Biomphalaria tenagophila infectadas por trematódeos digenéticos, admitimos que:

- B. tenagophila capturados no campo, em tanques de piscicultura, foram encontradas parasitadas, sempre em infecção única, por furcocercárias longifurcadas sem ocelo, furcocercárias longifurcadas com ocelo, equinostomocercárias ou xifidiocercárias.

- Nos moluscos superinfectados com S. mansoni, não foram encontradas reações amebocitárias em torno dos esporocistos degenerados de Schistosoma mansoni. Sugerimos que isso pode indicar que não houve participação direta dos amebócitos na destruição da larva do S. mansoni e que possivelmente fatores da hemolinfa (excluindo-se as células), estariam envolvidos na destruição ao parasita.

- Os valores de proteína total da hemolinfa, mostraram-se maiores nos moluscos B. tenagophila sem infecção mantidos em laboratório, quando comparados com os capturados no campo livres de infecção por trematódeos. Esses valores não estão aumentados nos caramujos de campo naturalmente parasitados, ou mesmo aos caramujos experimentalmente infectados com S. mansoni.

- O número de amebócitos da hemolinfa, estava elevados em todos os grupos de moluscos infectados, em comparação com os moluscos do grupo controle sem infecção.
- Obtivemos maior atividade fagocitária dos amebócitos dos caramujos parasitados, principalmente naqueles parasitados por xifidlocercárias. Admitimos que o parasitismo poderia funcionar ativando as células fagocíticas.
- Na hemolinfa dos vários grupos estudados, demonstramos que houve identidade antigênica total.
- As imunodifusões mostraram sempre ao menos 3 linhas de precipitação no gel, formando 3 sistemas precipitantes diferentes.
- Os resultados obtidos na imunoeletroforese, permitiram-nos afirmar que existem diferenças qualitativas e quantitativas na hemolinfa dos moluscos parasitados e não parasitados. As diferenças parecem ter características específicas, dependente do tipo de infecção apresentada.

## VI- APÊNDICE

## Anexo I

A análise de variância para as dosagens de proteínas, dos exemplares capturados no campo, pelo método HARTREE, TABELA 4, foi realizada por testes paramétricos:

1) Teste de Bartlet, onde:  
 $X^2 = 9,5855$  para 3 graus de liberdade  $> 7,815$   
 seria significativo

2) Teste de Cochran, onde:  
 $C = 0,527$  para  $K = 4$  e  $n = 6 < 0,590$   
 não significativo  
 $K =$  tratamentos  
 $n =$  amostras

Pelo apontado anteriormente, considerou-se conveniente optar por teste não-paramétrico, escolhendo-se o Teste de KRUSKAL-WALLIS, por via de dúvidas. (CAMPOS, 1979).

Temos:

$H_{corr} = 6,411$  não significativo para  
 3 graus de liberdade  $< 7,815$

Assim H distribui-se como  $X^2$ , quando  $K = 3$  e  $n = 6$  ou ambos, com  $K - 1$  graus de liberdade.

Confirma-se os dados obtidos com a análise de variância.

## Anexo II

A análise estatística da contagem de células "spreading" na hemolinfa fresca de *Biomphalaria tenagophila*, em "pool" de 5 moluscos, fêz-se pelo Teste de Tukey (ROSCOE, 1975).

Os valores foram normalizados pela fórmula  $x + 0,5$ , onde o coeficiente de variação encontrado é C.V. = 3,34%.

$$\Delta \% = q_{\alpha} \sqrt{\frac{GMR}{r}}$$

$$\Delta 5\% = 0,32$$

$$\Delta 1\% = 0,41$$

Ordenando-se os valores temos: 4 tratamentos, 3 e 12 graus de liberdade (tratamento e resíduos).

Assim:

	Bt S. mansoni	Bt furcocercária	Bt xifidiocercária	$\bar{X}$
Bt livre de infecção	1,79***	1,48***	1,91***	16,96
	Bt S. mansoni	0,31 n.s.	0,12 n.s.	18,75
		Bt furcocercária	0,43 **	18,44
			Bt xifidiocercária	18,87

n.s. = não significativo

\* = significativo a nível de 5%

\*\* = significativo a nível de 1%

\*\*\* = altamente significativo (nível de 0,01%)



## Anexo III

Para a análise estatística dos resultados da avaliação quantitativa da fagocitose, dos amebócitos de *B. tenacophila*, utilizamos o Teste de Tukey (RASCOTE, 1975).

Os valores foram transformados, pois que percentuais não têm distribuição normal, utilizando-se a fórmula:

$$\alpha^{\circ} = \text{arc sen } \sqrt{\hat{p}}$$

Para os tratamentos, 3 e 16 graus de liberdade e 4 médias corrigidas temos:

$$\Delta_{3,4} = 4,88$$

$$\Delta_{16,4} = 6,26$$

Assim, ordenando-se os valores encontramos:

	Bt <i>S. mansoni</i>	Bt fucocercária	Bt xifidiocercária	$\bar{X}$
Bt livre de infecção	0,116 n.s.	15,420 ***	10,574 ***	50,452
Bt <i>S. mansoni</i>		15,106 ***	10,258 ***	50,768
		Bt furcocercária	4,848 **	65,874
		Bt xifidiocercária		61,026

n.s. = não significativo

\* = significativo a nível de 5%

\*\* = significativo a nível de 1%

\*\*\* = significativo a nível de 0,1%

## VII- BIBLIOGRAFIA

- ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. - Biomphalaria glabrata amoebocytes assay of factors influencing in vitro phagocytosis. J. of Invertebr. Pathol., 34, 52-59, 1980.
- ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. - Schistosoma mansoni: Immunofluorescent detection of its antigen reacting with Biomphalaria glabrata amoebocytes. Exp. Paras. 55, 132-137, 1983.
- ANDERSON, R.S. & GOOD, R.A. - Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes. J. of Invertebr. Pathol., 22, 57-64, 1976.
- ARAÚJO, J.D. - A pesquisa em esquistossomose no Brasil. Ac. M. de MED. 14, Supl. An. 1983, 1984.
- BAILEY, J.B.; MICHELSON, E.H. & PARAENSE, W.L. - Differentiation of the sibling species Biomphalaria occidentalis and Biomphalaria tenagophila by the electrophoretic patterns of their hemoglobin. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 81(3), 319-322., 1986.
- BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M. & DEWAN, P.C. - Macrophage-like hemocytes of resistant B. glabrata are cytotoxic for sporocysts of S. mansoni in vitro. J. Parasitol. 66(3), 413-19, 1980 (a).

- BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M. & DEWAN, P.C. - *S. mansoni* cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *B. glabrata*. Exper. Parasitol. 50, 409-13, 1980 (b).
- BAYNE, C.J.; LOKER, E.S.; YUI, M.A. & STEPHENS, H.A. - Immune-recognition of *S. mansoni* primary sporocysts may require specific receptors on *B. glabrata* hemocytes. Paras. Immun., 6, 519-28, 1984.
- BAYNE, C.J.; BOSWELL, C.A.; LOKER, E.S. & YUI, M.A. - Plasma components which mediate cellular defences in the gastropod mollusc *B. glabrata*. Develop. Compar. Immunol., 2(3), 523-30, 1985.
- BAYNE, C.J.; LOKER, E.S. & YUI, M.A. - Interactions between the plasma proteins of *B. glabrata* (Gastropoda) and the sporocyst tegument of *S. mansoni* (Trematoda). Parasitol., 22, 653-64, 1986.
- BAYNE, C.J.; BOSWELL, C.A. & YUI, M.A. - widespread antigenic cross-reactivity between plasma proteins of a gastropod, and its trematode parasite. Develop. and Compar. Immunol., 11, 321-29, 1987.
- CHENG, T.C. & SCHOENBERG, D.A. - Phagocytic funnel-like pseudopodia in lectin-treated gastropod hemocytes. J. Invert. Pathol., 36, 141-43, 1980.

- CHENG, T.C. & RIFKIN, E. - Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. In "A Symposium on Diseases of fishes and Shellfishes". 5, 443-96, 1970, Amer. Fish; Soc, Washington, D.C.
- CAMPOS, H. - Estatística experimental não paramétrica. 3ª edição, Departamento de Mat. e Estat. ESALC. USP. Piracicaba, 1979.
- COELHO, M.V. - Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de S. mansoni em Australorbis nigricans. Revta. Bras. Biol., 17, 325-37, 1957.
- COELHO, M.V. - Susceptibilidade de Australorbis tenagophila à infecção por S. mansoni. Revta. Inst. Med. Trop., 4 (5), 289-95, 1962.
- DIAS, L.C.S.; VETA, M.T.; GUARALDO, A.M.A. - Susceptibilidade de Biomephalaria glabrata, B. straminea e B. tenagophila a diferentes cepas de Schistosoma mansoni. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 29 (4), 205-212, Julho-Agosto, 1987.
- FENG, S.Y. - The responses of oysters to the introduction of soluble and particulate materials and factors modifying the response. Doctoral thesis. Rutgers University. New Brunswick, N.J. 1962.

GRABAR, P. & BURTIN, P. - Immuno-electrophoretic analysis. New York, Elsevier, 3-29, 94-124, 1964.

JEONG, K.H. & HEYNEMAN, D. - Leukocytes of B. glabrata: morphology and behavior of granulocytic cells in vitro. Journ. Invert. Pathol., 28, 357-62, 1976.

JOURDANE, J. & MOUNKASSA, J.B. - Topographic shifting of primary sporocysts of S. mansoni in Biomehalaria pfeifferi as a result of coinfection with Echinostoma (fa. caeroni). Journ. Invert. Pathol., 48, 269-74, 1986.

KNAAP, W.P.W.vander; MEULEMAN, E.A. & SMINIA, T. - Alterations in the internal defenses system of the pond snail Lymnaea stagnalis induced by infection with the schistosome Trichobilharzia ocellata. Parasit. Res., 23, 57-65, 1987.

LIE, K.J.; HEYNEMAN, D. & YAU, P. - The origin of amoebocytes in B. glabrata. Journ. Parasit., 63 (3), 1975.

LIE, K.J.; HEYNEMAN, D. & YAU, P. - Studies on resistance in snails. 5. Tissue reactions to Echinostoma lindoense in naturally resistant B. glabrata. Journ. Parasit., 62 292-97, 1976 a.

LIE, K.J.; HEYNEMAN, D. & YAU, P. - Studies on resistance in snails. 6. Escape of E. lindoense sporocysts from encapsulation in the snails heart and subsequent loss of the host's ability to

resist infection by the same parasite. Journ. Parasit., 62, 298-302, 1976 b.

LIE, K.J., JEONG, K.H. & HEYNEMAN, D. - Tissue reactions by *S. mansoni* in *B. glabrata*. Am. Trop. Med. and Parasit., 24 (2), 1980.

LIE, K.J. - Survival of *S. mansoni* and other trematode larvae in *B. glabrata*. Trop. and Geogr. Med., 34, 111-22, 1982.

LIE, K.J. - Acquired resistance in snails. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. Internat. Journ. for Parasit., 13 (3), 301-304, 1983.

LIESE, T.D.G. - The organization of schistosomiasis control programmes. Parasit. Today, 2 (7), 835-48, 1986.

LIM, M.K. & HEYNEMAN, D. - Intramoluscan inter trematode antagonism: a review of factors influencing the host-parasite system and its possible role in histological control. Adv. Parasit., 10, 191-268, 1972.

LOKER, E.S. & BAYNE, C. - In vitro encounters between *S. mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *B. glabrata*. Am. Jour. Trop. Med. Hyg., 31 (5), 999-1005, 1982.

LOKER, E.S. & HERTEL, L.A. - Alterations in *B. glabrata* plasma

induced by infection with the digenetic trematode Echinostoma paraensei. Journ. Parasit., 73 (3), 503-13, 1987.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. -- Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-75, 1951.

MACHADO, S.M.P.; CORDEIRO, N.S.; MAGALHÃES, L.A. & ARTIGAS, P.T. -- Nota sobre o comportamento de B. tenagophila, naturalmente infectadas com larvas de trematódeos digenéticos, na tentativa de reinfeccão com miracídeos de S. mansoni. XXI Congr. Soc. Bras. Med. Trop. 62, 1985, São Paulo, Brasil.

MACHADO, S.M.P.; CORDEIRO, N.S.; MAGALHÃES, L.A. & ARTIGAS, P.T. -- Algumas considerações sobre cercárias naturalmente encontradas em B. tenagophila capturadas em Louveira, SP. Mem. Inst. Butantan, 49 (3), 1987.

MACHADO, S.M.P.; MAGALHÃES, L.A.; ARTIGAS, P.T.; CORDEIRO, N.S.; CARVALHO, J.F. -- Verificação de antagonismo entre larvas de S. mansoni e larvas de outros digenea em B. tenagophila molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP. Brasil. Rev. Saúde Públ., São Paulo, 22 (6), 484-8, 1988.

MAGALHÃES, L.A. -- Estudo dos dados obtidos de uma população de B. glabrata de Belo Horizonte infectada por S. mansoni da mesma cidade, e de uma população de B. tenagophila infectada por S.

- mansoni de São José dos Campos. Revta. Soc. Bras. Med. Trop., 3 (4), 195-96, 1969.
- MACKIN, J.G. - Oyster leukocytes in infectious disease (abstr.) Am. Zool., 1, 371, 1961.
- MICHELSON, E.H. - "Immune" reactions of S. mansoni in the snail Australorbis glabratus. J. Insect. Pathol., 5, 1963 a.
- MICHELSON, E.H. - Plistophora busseui, a microsporidian parasite of aquatic pulmonate snails. J. Insect. Pathol., 5, 1963 b.
- MICHELSON, E.H. - Cellular defense mechanisms and tissue alterations in gastropod molluscs. In "Invertebrate Immunity", 181-95, Academic Press, N.Y., 1975.
- MICHELSON, E.H. - Specificity of hemolymph antigens in taxonomic discrimination of medically important snails. Jour. Parasitol., 52 (3), 466-72, 1966.
- NEWTON, W.L. - The comparative tissue reaction of two strains of Australorbis glabratus to infection with Schistosoma mansoni. J. Parasit., 38, 362-366, 1952.
- NEWTON, W.L. - The inheritance of susceptibility to infection with Schistosoma mansoni in Australorbis glabratus. Exp. Parasit., 2, 242-257, 1953.



- OLIVEIRA, A.R. - Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção do antígeno no linfonóculo. Summa Phytop., 1, 61, 1975.
- OUCHTERLONY, O. - Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. In. Prog. Allergy, 5, 1, 1958.
- PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R - Sobre a ocorrência de duas raças biológicas de S. mansoni no Brasil. XV Reunião SBPC, Campinas, 1963.
- PARAENSE, W.L. - Distribuição dos caramujos no Brasil. Ac. M. de Med., 14, Supl. An. 1983-1984.
- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D.G. - A simplified method for the concentration of cercariae. J. Parasit., 41 (3), 329-30, 1955.
- PELLON, A.B. & TEIXEIRA, I. - Distribuição geográfica da esquistossomose mansônica no Brasil. Publ. da "Divisão de Organização Sanitária". Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, 1950.
- PELLON, A.B. & TEIXEIRA, I. - Inquérito helmintológico escolar em cinco Estados das regiões leste, sul e centro-oeste. Publ. "Divisão de Organização sanitária". Ministério da Saúde. Rio de Janeiro, 1953.

PIZA, J.T. - Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansônica em São Paulo. XVI Congresso Bras. Hig., 1967, Curitiba.

PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H. & FIGUEIREDO, C.G. - A esquistossomose no Vale do Paraíba. Revta. Inst. Adolfo Lutz, 12, 98-143, 1959.

PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H.; CAMARGO, L.S.V. & GONÇALVES, J.R. - Descoberta de um foco autóctone de esquistossomose em Caçapava. Archos. Hig. Saúde Pública, 25, 181-84, 1960.

PIZA, J.T.; RAMOS, A.S.; BRANDÃO, C.S.H.; FIGUEIREDO, C.G. & CAMARGO, L.S.V. - Vale do Paraíba, foco endêmico da esquistossomose. Archos. Hig. Saúde Públ., 25, 35-40, 1960.

RAMOS, A.S.; PIZA, J.T. & CAMARGO, L.S.V. - Observações sobre Australorbis tenacophilus, transmissor da esquistossomose mansônica. Archos. Hig. Saúde Públ., 26, 121-24, 1961.

RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F.; FITZGERALD, S.W. & RHODES, C.P. - Invertebrate immunity: basic concepts and advances. International Review cytology, 22, 183-350, 1965.

RICHARDS, C.S. - Genetics of a molluscan vector of schistosomosis. Nature, 227, 806-10, 1970.

RICHARDS, C.S. - Susceptibility of adult B. glabrata to S. mansoni infection. Am. J. Trop. Med. Hyg., 22 (6), 748-56, 1973.

RICHARDS, C.S. - Genetic factor in a susceptibility of B. glabrata for different strains of S. mansoni. Paras., 70, 231-41, 1975.

RICHARDS, C.S. & MERRITT, JR. J.W. - Genetic factors in the susceptibility of juvenile B. glabrata to S. mansoni infection. Am. J. Trop. Med. Hyg., 21 (4), 425-434, 1972.

ROSCOE, V.T. - Fundamental research statistics the behavioral sciences. 2<sup>a</sup> Ed. Hort. Rinchard and Winstou, INC. N.Y., 1975.

RUIZ, J.M. - Contribuição ao conhecimento dos planorbídeos da cidade de São Paulo. Rev. Bras. Malar. Doen. Trop., 2 (1), 56-65, 1957.

SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. - The immunology of schistosomiasis. Adv. Parasit., 2, 41-93, 1982.

STANDEN, O.D. - Experimental infection of Australorbis glabratus with S. mansoni - I. Individual and mass infection of snails and the relationship of infection to temperature and season. Ann. Trop. Med., 44 (1), 48-53, 1952.

STANISLAWSKI, E.; RENWRANTZ, L. & BECKER, W. - Soluble blood group reative substances in the hemolymph of B. glabrata (Mollusca). J.

Invert. Pathol. 28, 301-8, 1976.

STAUBER, L.A. - Immunity in invertebrates, with special reference to the oyster. Proc. Natl. Shellfish Assoc., 50, 7-20, 1961.

STUMPE, J.L. & GILBERTSON, D.E. - Differential leukocytic responses of B. glabrata to infection with S. mansoni. J. Inv. Pathol., 35, 217-18, 1980.

SULLIVAN, J.T.; RICHARDS, C.; LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. - Ribeiroia marini: irradiated miracidia and induction of acquired resistance in B. glabrata. Exp. Parasit., 53, 17-25, 1982.

TRIPP, M.R. - The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail Australorbis glabratus. J. Paras., 47, 745-51, 1961.

TRIPP, M.R. - Hemagglutinin in the blood of the oyster Crassostrea virginica. J. Inv. Pathol., 8, 478-84, 1966.

TRIPP, M.R. - Defense mechanism of mollusks. J. Retic. Endoth. Soc., Z, 173-82, 1970.

WEICHSELBAUM, T.E. - An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. Amer. J. Clin. Pathol. Tech., 10, 40, 1946.

YOSHINO, T.P. - Lectin-induced modulation of snail hemocytes surface determinants: clearance of con a receptor complexes. Develops. Compar. Immunol., 6, 451-61, 1982.