

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Departamento de Parasitologia

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
Sonia Maria Cursino dos  
Santos  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

*1 de 1/11*

Estudo da Cinética Amebocitária em  
*Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria*  
*tenagophila* (D'Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea*  
(Dunker, 1848), infectadas pelas linhagens LE e SJ de  
*Schistosoma mansoni* Sambon, 1907.

Sonia Maria Cursino dos Santos 59

Tese apresentada ao Instituto  
de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas para  
obtenção do título de mestre  
em ciências, na área de  
parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães

Dezembro - 1993

Sa59e

21192/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Departamento de Parasitologia

Este trabalho foi realizado no Laboratório de  
Parasitologia do Departamento de Ciências Biológicas  
da Universidade de Taubaté.

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

Aos meus pais, Vicente e Sebastiana  
pelo apoio e confiança, muito  
obrigada.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães, pela orientação;

As Profas. Ana Maria Aparecida Guaraldo, Eliana Maria Zanoti-Magalhães e Marlene Tiduko Veta, pela leitura atenta e comentários;

Aos Profs. Luiz Eduardo Correa Lima e Sergio de Moura Araújo, pelo apoio e incentivos;

Ao Prof. Aquiles Eugenio Piedrabuena, pela análise estatística;

A Eduardo Santos Guimarães, Paulo Eduardo Guzzo Coutinho, Harnoli Kátia M. Correa, Ana Julia Urias Santos Araújo e todos meus amigos pela amizade e incentivos.

Aos Professores, Funcionários e Colegas do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, em especial a Celia Cristina Borelli, pelo apoio e solidariedade.

## ÍNDICE

1-INTRODUÇÃO.....	Pag. 1
2-OBJETIVO.....	Pag. 9
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	Pag. 10
4-RESULTADOS.....	Pag. 14
TABELAS.....	Pag. 20
FIGURAS.....	Pag. 30
5-DISCUSSÃO.....	Pag. 42
6-RESUMO.....	Pag. 49
7-CONCLUSÕES.....	Pag. 51
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	Pag. 53

## LISTA DAS TABELAS

I-Taxa de infecção e mortalidade dos moluscos *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* quando infectados com 10 miracídios *S. mansoni* das linhagens LE e SJ.

II-Número de amebócitos circulantes em *B. glabrata* do grupo controle.

III-Número de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* do grupo controle.

IV-Número de amebócitos circulantes em *B. straminea* do grupo controle.

V-Número de amebócitos circulantes em *B. glabrata* infectada com a linhagem LE de *S. mansoni*.

VI-Número de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* infectada com linhagem LE de *S. mansoni*.

VII-Número de amebócitos circulantes em *B. straminea* infectada com a linhagem LE de *S. mansoni*.

VIII-Número de amebócitos circulantes em *B. glabrata* infectada com a linhagem SJ de *S. mansoni*.

IX-Número de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* infectada com a linhagem SJ de *S. mansoni*.

X-Número de amebócitos circulantes em *B. straminea* infectada com a linhagem SJ de *S. mansoni*.

## LISTA DAS FIGURAS

- 1-Variacão do número de amebócitos circulantes em *B. glabrata* do grupo controle.
- 2-Variacão do número de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* do grupo controle.
- 3-Variacão no número de amebócitos circulantes em *B. straminea* do grupo controle.
- 4-Variacão no número de amebócitos circulantes em *B. glabrata* infectadas com a linhagem LE de *S. mansoni*.
- 5-Variacão no número de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* infectadas com a linhagem LE de *S. mansoni*.
- 6-Variacão no número de amebócitos circulantes em *B. straminea* infectadas com a linhagem LE de *S. mansoni*.
- 7-Variacão no número de amebócitos circulantes em *B. glabrata* infectadas com a linhagem SJ de *S. mansoni*.
- 8-Variacão no número de amebócitos circulantes em *B. tenagophila* infectadas com a linhagem SJ de *S. mansoni*.
- 9-Variacão no número de amebócitos circulantes em *B. straminea* infectadas com a linhagem SJ de *S. mansoni*.
- 10-*B. glabrata* (96 horas, H.E., 500 X), infectada com a linhagem LE de *S. mansoni*. Esporocisto primário íntegro.
- 11-*B. straminea* (24 horas, H.E., 500X), infectada com a linhagem LE de *S. mansoni*. Esporocisto em fase de degeneraco.

12-B. *tenagophila* (24 horas, H.E., 500 X), infectada com a linhagem LE de *S. mansoni*. Esporocisto em fase de degeneração.



## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS

Os hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 no Brasil são moluscos da classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora e família Planorbidae. Os planorbídeos brasileiros estão distribuídos em cinco gêneros. No gênero *Biomphalaria* Preston, 1910 existem três espécies transmissoras naturais do *S. mansoni*: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848), são as transmissoras naturais do *S. mansoni* (Paraense, 1976).

Em 1912, PIRAJÁ DA SILVA constatou pela primeira vez a infecção de planorbídeos pelo *S. mansoni*. ARANTES (1922, 1924) registrou os primeiros casos autóctones desta parasitose no Estado de São Paulo, cidade de Santos.

Até 1950 eram reconhecidos como hospedeiros intermediários da esquistossomose mansônica, *B. glabrata* e *B. straminea* (PARAENSE & CORRÊA, 1963).

*B. tenagophila* foi denominado de *Planorbis immunis* por LUTZ (1928), em virtude desta espécie não se infectar em laboratório. Inúmeros pesquisadores seguiram a mesma linha de LUTZ (LUTZ & LUTZ, 1929; RIFY, 1954; RUTZ, 1957; COELHO, 1957) até que COUTINHO, (1956) e COELHO (1962) obtiveram as primeiras infecções.

*B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* possuem uma ampla distribuição geográfica no território nacional. *B. glabrata* encontra-se distribuída pelos paralelos 13o e 21o S e pelos meridianos 39o e 45o W, correspondendo à área do sudeste da Bahia, metade oriental de Minas Gerais, estendendo-se para a faixa costeira e áreas interiores de Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Pode ser encontrado ainda no Pará, Maranhão, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Distrito Federal e Paraná. Neste último a espécie atinge o extremo sul de sua distribuição na latitude de 25o S em Curitiba (PARAENSE, 1966). Pela sua alta positividade no campo *B.*

*glabrata* é considerado o principal hospedeiro intermediário do *S. mansoni* no Brasil (BARBOSA, 1970).

*B. straminea* encontra-se delimitada pelo meridiano 41o W e pelo paralelo 11o S e pela linha costeira. É encontrada ainda um pouco mais ao sul, entre 15o e 18o S e 40o e 44o W. Existem ainda áreas de menor amplitude espalhadas por todo o território nacional, sendo portanto a espécie mais adaptada às variedades de clima e condições ecológicas do País (PARAENSE, 1986). Esta espécie está intimamente relacionada com altas taxas de esquistossomose humana; é restrita à zonas do litoral, mata e agreste do Nordeste brasileiro (ALENCAR, 1940; BARBOSA & COELHO, 1954, 1956; LUCENA, 1964; BARBOSA & FIGUEIREDO, 1969, 1970). O conhecimento da existência de focos de *S. mansoni* por *B. straminea* na região do Nordeste data de 1918 (LUTZ & PENNA, 1918). Os índices de infecção natural são geralmente reduzidos (inferior a 2%) (BARBOSA & COELHO, 1954; BARBOSA, 1970), o que não impede a elevada endemicidade na região, devido a alta densidade planorbídica observadas nos criadouros, associadas às péssimas condições sanitárias da população (GERKEN et alii, SOUZA et alii, 1981a, 1981b, 1983b). No Estado de São Paulo presume-se que a entrada desse molusco foi acidental, associada a prática da piscicultura (CORREA, et alii, 1970). Em levantamentos malacológicos realizados no Estado, foram encontrados criadouros de *B. straminea* em 27 municípios (TELES & VAZ, 1988).

*B. tenagophila* distribuiu-se pela faixa costeira entre Caravelas (17o 45' S e 39o 15' W) na Bahia, e Chuí (33o 41' S e 53o 27' W) no Rio Grande do Sul. Encontramos ainda populações isoladas no Distrito Federal e arredores e em Minas Gerais (PARAENSE, 1986). O molusco é pouco susceptível, mas bem adaptado às cepas regionais do *S. mansoni*. Em certas regiões do Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná é o principal transmissor.

No final da década de 50 e na década de 60, em determinadas regiões do Estado de São Paulo foram encontrados focos com altos índices de infecção natural de *B. tenagophila* (SUCEN, 1986) e a ocorrência de focos de *S. mansoni* é significativa nas seguintes regiões do Estado: Vale do Paraíba,

Grande São Paulo, Baixada Santista, Vale do Ribeira e Vale do Paranaíba (CODA et alii., 1959; PIZA & RAMOS, 1960; RAMOS et alii., 1969; ALMEIDA MACHADO, 1982).

## 1.2 SUSCETIBILIDADE DOS HOSPEDEIROS INTERMEDIÁRIOS

Desde 1916 até o presente momento, diversas pesquisas abordaram a suscetibilidade dos moluscos planorbídeos no Brasil, fornecendo indicações valiosas a respeito da relação parasito-hospedeiro. A eliminação de cercarias, do ponto de vista epidemiológico, é a característica mais relevante em infecções experimentais de planorbídeos (CUBA CUBA & CORREA, 1977).

Experimentos laboratoriais com linhagens simpátricas e alopátricas de *S. mansoni* demonstraram taxa de infecção variável entre 30 e 100% de positividade para *B. glabrata* reforçando a idéia de que este é o molusco mais susceptível (CHIEFFI, 1975; BORDA & PELLEGRINO, 1976; SANTANA et alii., 1978; SOUZA et alii., 1981b, 1983a, 1983b). Em *B. straminea* a taxa variou de 0 a 24%, o que evidencia suscetibilidade baixa à infecção (GERKEN et alii., SOUZA et alii., 1981a, 1981b, 1983b; MALEK & ROUQUAYROL, 1986; DIAS et alii., 1987). Em se tratando de *B. tenagophila*, a taxa de infecção com as linhagens simpátricas atinge a 100% (PARAENSE & CORREA, 1963, 1978), com linhagens alopátricas varia de 0 a 35% (CHIEFFI, 1975; CORREA et alii., 1979; DIAS et alii., 1987), confirmando a suscetibilidade às linhagens regionais de *S. mansoni*.

Para diversos autores, a suscetibilidade ou a resistência ao *S. mansoni* estaria na dependência da interação de diversos fatores fisiológicos e genéticos, tanto do molusco como do parasito (NEWTON, 1953, 1954; FILES & CRAM, 1949; BARBOSA & COELHO, 1956; COELHO, 1957, 1962; PARAENSE & CORREA, 1963; MAGALHÃES, 1966, 1970; TRIPP, 1970; RICHARDS & MERRIT, 1972; BASCH, 1975; CARVALHO et alii., 1980; BASTOS, et alii., 1984)

FILES & CRAM (1949), foram os primeiros a ressaltar a complexidade da relação intra e interespecífica parasito-hospedeiro e sugeriram a existência de diferenças

regionais. PARAENSE & CORREA (1963), demonstraram a necessidade de um ajuste fisiológico entre o molusco e o parasito, na constatação de que *S. mansoni*, adaptado a *B. glabrata* de Minas Gerais apresentou resistência à infecção quando colocados frente a *B. tenagophila* de São Paulo e vice-versa.

NEWTON (1953, 1954), testando moluscos *B. glabrata* de Salvador (BA) com linhagens portorriquenhas de *S. mansoni*, realizou seleção genética auto-fecundação, para o caráter suscetibilidade, adotando um mutante albino como marcador, concluiu que a suscetibilidade dos moluscos ao *S. mansoni* está condicionada por fatores genéticos, além de se referir à influência da idade do hospedeiro.

RICHARDS & MERRIT (1972), utilizando a mesma linhagem parental de NEWTON, sugeriram que a suscetibilidade de moluscos jovens é controlada por um complexo de 4 ou mais fatores, assinalando a presença de genes que condicionam a resistência também nos exemplares susceptíveis.

RICHARDS (1973), através de seleção de populações de moluscos *B. glabrata* de Santa Lúcia e de Porto Rico, utilizando linhagens de *S. mansoni* das mesmas regiões preconizou que moluscos jovens susceptíveis tornam-se resistentes quando adultos e vice-versa. Demonstrou ainda que o caráter de resistência adquirido na maturidade é determinado por um único gene dominante com herança mendeliana. Outros autores concordam que o padrão genético do molusco é o fator de maior influência na suscetibilidade às infecções pelo *S. mansoni* (BASCH, 1975; BASTOS et alii., 1984; DIAS et alii., 1987).

Outra abordagem constituição gênica do miracídio de *S. mansoni* (BROOKS, 1953), onde o ocasional sucesso do desenvolvimento do esporocisto estaria mais relacionado com a variação intrínseca no miracídio do que com sua chance de localização do molusco susceptível. KAGAN & GEIGER (1965), enfatizaram a importância da constituição gênica do miracídio, atuando sobre a variação nos índices de infecção de *B. glabrata* variante albina. BORDA & PELLEGRINO (1976), estudando a suscetibilidade de *B. tenagophila* e *B. glabrata* às linhagens de

*S. mansoni* LE (Belo Horizonte, MG) e PT (Pedro de Toledo, SP), concluíram que os moluscos são potencialmente susceptíveis à infecção e que a constituição gênica dos miracídios seria principal determinante da suscetibilidade do molusco.

Uma interpretação alternativa foi dada por MAGALHÃES (1966, 1970), quanto a especificidade do complexo molusco-trematódeo. O autor sugere que a suscetibilidade ao esquistossomo representa a aptidão de um molusco com genótipo pré-adaptado às suas condições. Desse modo, o mesmo exemplar de molusco pode ser susceptível a outro miracídio pertencente a mesma população.

Outros autores como WRIGHT (1974) e KASSIM & RICHARDS (1970), propuseram através de experimentos que o miracídio penetra no hospedeiro, absorve substâncias de superfície do hospedeiro, obtendo assim, sucesso na infecção.

### **1.3-DESENVOLVIMENTO DOS ESPOROCISTOS E REAÇÃO TECIDUAL**

Logo após a penetração no molusco hospedeiro o miracídio perde o seu revestimento epitelial ciliado e, imobiliza-se nas proximidades do ponto de penetração. A transformação do miracídio em esporocistos primários ocorre nas 48 horas após a penetração, e esta transformação é caracterizada por modificações anatômicas e funcionais, evoluindo até a forma de cercária (BARBOSA, 1970; REY, 1991).

Apesar da pouca atenção dada às reações histopatológicas, estudos referentes a interação do *S. mansoni* com *B. tenagophila*, *B. glabrata* e *B. straminea* foram realizados, iniciando-se assim um outro capítulo a respeito do estudo dos efeitos do parasitismo causado pelo *S. mansoni* nos hospedeiros invertebrados.

Em exemplares resistentes a destruição dos parasitas está frequentemente associada a encapsulação do invasor por amebócitos. A incompatibilidade entre o molusco e o trematódeo, traduz-se pela reação celular aos esporocistos reconhecidos como corpos estranhos (MALDONADO & ACOSTA-MATIENZO,

1947; FILES & CRAM, 1949; NEWTON, 1952, 1954; BROOKS, 1953; COELHO, 1954, 1957, 1962; BARBOSA & COELHO, 1956; CHENG & SNYDER, 1962; PAN, 1963, 1965; TRIPP, 1961, 1970, 1974; CUBA CUBBA & CORREA, 1977; Lie et alii., 1980).

TRIPP (1958, 1960), demonstrou que hemácias, bactérias e leveduras introduzidas experimentalmente no pelicípode *Crassostrea virginica* (ostra americana) e *B. glabrata* são fagocitados e degradados intracelularmente, tornando evidente que a ação fagocítica das células da hemolinfa dos moluscos é a maior linha de defesa dessas espécies contra a invasão de microorganismos. CHENG & AULD (1977), observaram que as células de hemolinfa reconhecem e reagem englobando o material estranho por fagocitose ou encapsulação.

PAN (1965), em estudos histopatológicos de *B. glabrata*, infectada com *S. mansoni*, observou dois tipos de reação celular. O primeiro tipo é mínima, focal e mediata por fibroblastos não hipertróficos. O segundo tipo, que aparece mais tarde, é generalizado e proliferativo, caracterizado pela participação de amebócitos hipertróficos.

CHENG & GARRABRANT (1977), trabalhando com *B. glabrata* 10R2 (linhagem refratária), em contato com miracídios de *S. mansoni*, observaram fagocitose ou encapsulação de esporocistos primários. Este processo envolvia duas fases: alargamento do granuloma ao redor do esporocisto intacto e desintegração do parasita com aumento do tamanho do granuloma seguindo-se a destruição de esporocistos.

#### **1.4-AMEBÓCITOS**

As células envolvidas no mecanismo de defesa dos moluscos são denominadas de amebócitos e tem como função: fagocitose e/ou encapsulação, liberação de substâncias citotóxicas, transporte de cálcio nas situações de reparo tecidual e da concha e ainda a coagulação da hemolinfa (WAGGE, 1951; CHENG et alii., 1979; BAYNE, 1979; BAYNE et alii., 1980; ABDUL-SALAM & MICHELSON, 1980a,b; SMINIA & Van der KNAAP, 1987).

Segundo WADGE (1955), os amebócitos tem origem no tecido conjuntivo e camadas epiteliais dos moluscos. LIE et alii. (1975a), descreveram uma região, na parede renopericárdica dos moluscos pulmonados chamado Órgão Produtor de Amebócitos (APO - Amebocytes Producing Organ), o que foi confirmado por JEONG et alii., 1983.

PAN (1958), descreveu um tipo celular a amebócito, mas reconheceu que este tipo de célula poderia ser encontrado em diversos padrões diferenciados.

HARRIS (1975) e CHENG & AULD (1977), demonstraram que ocorrem dois tipos de células na hemolinfa de *B. glabrata*, sem no entanto definir o papel na reação amebocitária.

CHENG (1975), descreveu a morfologia dos amebócitos e os classificou em granulócitos e hialinócitos. Os primeiros são caracterizados pela presença de grande número de glânulos citoplasmáticos, que são restritos ao endoplasma. Os glânulócitos quando expandem, produzem pseudópodes que podem ser lobópode ou filópodes. Os hialinócitos são geralmente esféricos ou ovais e não formam pseudópodes marginais quando se distendem contra o substrato, embora se achatem. O citoplasma é esparsamente granular, e fica uniformemente basófilo.

Os glânulócitos encapsulam e fagocitam material em *B. glabrata* e são os únicos tipos de células que expressam função de defesa do tipo leucocitário. Os hialinócitos não participam da mesma função mas se tem em porcentagem estável nos moluscos não infectados (JEONG & HEYNEMEN, 1976; STUMPF & GILBERTSON, 1980).

Fatores externos como estímulos mecânicos, temperatura, tensão de oxigênio na água, podem alterar o número de amebócitos circulantes, fazendo com que dupliquem o número, duas horas (SMINIA, 1972; STUMPF & GILBERTSON, 1978; WOLMARANS & YSSEL, 1988; FRYER et alii., 1989).

Os mecanismos pelos quais ocorrem a fagocitose ou a encapsulação do corpo estranho (parasita ou qualquer material reconhecido como "non self"), ainda não estão bem esclarecidos, apesar dos vários trabalhos realizados sobre o assunto (CHENG, 1975; CHENG & MOHANDAS, 1985; SMINIA & van der KNAAP, 1987).

Em moluscos suscetíveis, os amebócitos circulantes reconhecem o parasita, mas não conseguem eliminá-lo (BENEX & JACOBELLI, 1980).

Testes "in vitro" mostram que frações isoladas de esporocistos primários de *S. mansoni* secretam produtos que estimulam a motricidade de amebócitos provenientes de linhagens resistentes de *B. glabrata*, mas inibe a motilidade de amebócitos provenientes de moluscos suscetíveis (van der KNAAP & LOKER, 1990).

Além das células amebocitárias, os componentes do plasma tem função importante na defesa imunitária dos moluscos, atuando diretamente sobre o material estranho, destruindo-o ou aumentando a fagocitose (TRIPP, 1970).

O sistema imune, caracterizado nos vertebrados pela presença de globulinas, resposta específica a antígenos e memória imunológica, não está reconhecida em moluscos e outros invertebrados (MALEK & CHENG, 1974). Entretanto, o estudo de componentes plasmáticos, encontraram substâncias que funcionam como aglutininas, lisinas e opsoninas (TRIPP, 1966; GILBERTSON & ETGES, 1967; PEMBERTON, 1974; ANDERSON & GOOD, 1976; MICHELSON & DUBOIS, 1977; LOKER & HERTEL, 1987).



## 2-OBJETIVO

Os trabalhos realizados até o presente momento sobre o comportamento dos amebócitos, adotaram como modelos experimentais principalmente *B. glabrata* e em menor escala *B. tenagophila*.

O nosso objetivo é realizar estudo da cinética das células amebocitárias das três espécies de moluscos responsáveis pela transmissão da esquistossomose no Brasil; *B. glabrata* de Belo Horizonte (MG), *B. tenagophila* de Aparecida (SP) e *B. straminea* de Picos (PI), onde as duas primeiras espécies serão submetidas às infecções simpátricas e alopátricas, enquanto que *B. straminea* será submetida à infecções alopátricas de duas linhagens de *S. mansoni* de regiões distintas do Brasil. Espera-se compreender melhor o processo de defesa dos moluscos e correlacioná-los com o grau de suscetibilidade.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. POPULAÇÕES DE PLANORBÍDEOS**

Os moluscos utilizados foram das espécies *Riomphalaria glabrata* variante melânica, procedente de Belo Horizonte (MG), *B. tenagophila* variante albina, procedente de Aparecida (SP) e *B. straminea* variante albina, procedente de Picos (PI), esta última cedida pelo Departamento de Parasitologia da Unicamp. Os moluscos nasceram e foram criados no laboratório de parasitologia da Universidade de Taubaté, Taubaté, SP.

#### **3.2. MANUTENÇÃO DE PLANORBÍDEOS**

As três espécies de moluscos foram mantidas em aquários segundo-se a metodologia de criação proposta por Pellegrino & Katz, 1970.

Os aquários de criação adotados mediam 35 x 24 x 20 cm, com capacidade de 10 litros, fundos e laterais de vidro, com uma camada de 1 cm de areia no fundo, com carbonato de cálcio, recoberta por outra camada de terra.

A oxigenação da água não clorada, foi feita por processo natural, através de planta aquáticas e por processo artificial, mediante borbulhamento de ar comprimido. Os moluscos foram alimentados com alface fresca "ad libitum".

Os descendentes destes foram obtidos através de posturas coletadas em pequenas placas de isopor e transferidas a outros aquários para desenvolvimento.

#### **3.3. LINHAGENS DE S. MANSONI**

As linhagens de *S. mansoni* utilizadas para infecção dos moluscos foram a LE (Belo Horizonte - MG), isolada de paciente que se infectou na zona metropolitana de Belo Horizonte, MG, quando de uma só exposição às cercárias e SJ, linhagem isolada a partir de moluscos infectados naturalmente de foco do

Vale do Paraíba, SP. As linhagens foram mantidas em laboratórios com sucessivas passagens em Hamsters.

### **3.4. OBTENÇÃO DE OVOS DE *S. mansoni***

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados por via subcutânea, com 120 cercárias foram sacrificados 50 a 60 dias após a infecção. O fígado e o intestino foram homogeneizados em liquidificador e a suspensão submetida a uma série de peneiras "Granulitest" com malhas de 0,315 mm, 0,160 mm e 0,50 mm, obtendo-se assim a concentração rápida dos ovos.

Após a concentração dos ovos, induziu-se a eclosão dos miracídios, com exposição à luz artificial por 2 horas (Standen, 1951), mantendo-se a temperatura entre 26 a 28°C.

### **3.5. CONTAGEM DE MIRACÍDIOS**

Para realizarmos a infecção individualizada dos moluscos dos experimento, foi realizada a contagem de miracídios.

Do concentrado, após homogeneização, com auxílio de agitador manual de movimentos verticais, foram tomadas dez alíquotas de 0,1 ml com pipeta de 1 ml, as quais foram colocadas separadamente sobre placa de vidro e examinadas ao microscópio estereoscópico para a contagem de miracídios; o mesmo procedimento foi feito em triplicata para a obtenção da média aritmética de miracídios existentes em 0,1 ml.

### **3.6. INFECÇÃO DE MOLUSCOS**

Foram utilizados descendentes jovens de *B. glabrata* com 7 a 10 mm de diâmetro, *B. tenagophila* com 4 a 7 mm de diâmetro e *B. straminea* com 2 a 4 mm.

Para determinar a suscetibilidade 100 moluscos foram expostos individualmente a 10 miracídios das diferentes linhagens de *S. Mansoni* (Le e SJ); para a contagem de amebócitos

130 moluscos foram infectados com 10 miracídios e para estudo histopatológico 12 moluscos foram infectados com 100 miracídios.

Os moluscos foram distribuídos individualmente em frasco de vidro, contendo 3 ml de água. Em seguida foi acrescentada a quantidade de miracídios desejada.

Durante a exposição, regulou-se a distância do foco luminoso (lâmpada de 60 watts) de tal forma a manter a temperatura da água em torno de 28.C nas 2 a 4 horas seguintes (STANDEN, 1952).

Após infecção, os moluscos utilizados para avaliação de suscetibilidade foram transferidos para os aquários, mantendo-se no decorrer de todo o experimento (90 dias) a temperatura da água em torno de 26.C ( $\pm 2$ .C).

A temperatura foi controlada, em sala com 50 m<sup>3</sup> de volume, mediante ar climatizado por aparelho de ar condicionado.

### **3.7. EXAME DOS MOLUSCOS**

Após 30 dias de exposição aos miracídios de *S.mansoni*, os moluscos foram distribuídos individualmente em frascos contendo cerca de 3 ml de água e expostos à luz, durante 2 horas.

Foi feita pesquisa de cercárias de *S.mansoni* em microscópio estereoscópico. Esta operação foi repetida duas vezes por semana.

Os planorbídeos que permaneceram negativos até 90 dias após a infecção, foram esmagados entre lamínulas de plástico (CHIARI et alii. , 1977) e examinados para detecção de esporocito.

### **3.8. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA**

Para cada linhagem de *S.mansoni*, foram infectados 12 moluscos de cada espécie com 100 miracídios e sacrificados lotes de 3 animais em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas após a

infecção, visando a obtenção de diferentes estágios evolutivos das larvas de esquistossomos.

Antes da fixação, os moluscos foram anestesiados com cristais de mentol em água, durante 4 horas e colocados em fixador de Bouin. O tempo mínimo de fixação foi de 2 horas. Cada exemplar foi retirado da concha e submetido a ressecção de região cefalopodal e lavado em água várias vezes até a completa remoção do fixador. Em seguida o material foi processado e incluído em parafina. Após a inclusão, as peças foram cortadas em série de 7 micrômetros de espessura. O método de coloração usado foi o de hematoxilina-Eosina.

Foram realizados cortes histológicos em moluscos não infectados (3 moluscos para cada espécie) como controle.

### **3.9. OBTENÇÃO DE HEMOLINFA E CONTAGEM DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES DOS MOLUSCOS**

Para cada grupo experimental foram infectados 10 moluscos individualmente com 10 miracídios. As contagens foram realizadas em intervalos de 2 horas até completar 24 horas após a exposição. O grupo controle era constituído por 10 caramujos de cada espécie.

A cada intervalo, dos moluscos eram retirados o excesso de água, sendo removida com papel higiênico. Com seringa de plástico de 1 ml, agulha microfina II marca "Plastiplak" foi retirada a hemolinfa da região cefalopodal através da concha. A hemolinfa foi depositada em câmara de Neubauer para contagem. Para *B. straminea*, devido o seu pequeno tamanho, utilizou-se pipeta Pasteur com ponta super fina para a coleta de hemolinfa.

A hemolinfa era adicionada aos orifícios da câmara de Neubauer imediatamente após a coleta e os amebócitos circulantes contados a fresco, sem coloração vital, em microscópio óptico comum com aumento de 400 vezes.

O número foi expresso pela média de células por mm<sup>3</sup> de 10 moluscos em cada intervalo.

### 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi aleatorizado, para avaliação estatística dos valores obtidos nos números de exemplares infectados, quando da exposição à meracídios de *S. mansoni* e nas contagens de amebócitos circulantes na hemolinfa.

A análise desses fatores foi efetuada através da Análise de Variância, tratando-se de normalizar os dados pela fórmula raiz quadrada de  $X + 0,5$  e, testando-se os contrastes pelo teste de Tukey. Foram adotados também os testes de Friedman, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. (HOLLANDER & WOLFE, 1973).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. TAXA DE INFECÇÃO

#### 4.1.1. EXPOSIÇÃO DE *B.glabrata*, *B.tenagophila* e *B.straminea* A MIRACÍDIOS DA LINHAGEM LE DE *S. mansoni*

Os resultados obtidos mostrou que a taxa de infecção para *B.glabrata* foi de 70%. Tanto *B. tenagophila* como *B. straminea* não se infectaram. No exame de esmagamento dos moluscos entre lamínulas não foram encontrados esporocistos (TABELA 1).

#### 4.1.2. EXPOSIÇÃO DE *B.glabrata*, *B.tenagophila* e *B.straminea* A MIRACÍDIOS DA LINHAGEM SJ DE *S.mansoni*.

Os resultados obtidos mostrou que a taxa de infecção para *B.glabrata* e *B.straminea* não se infectaram. Somente *B.tenagophila* eliminou cercarias quando infectadas com a linhagem SJ de *S.mansoni* (67,18%). No esmagamento dos moluscos entre lamínulas não foram esporócitos .(TABELA 1).

### 4.2. ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS

#### 4.2.1. LINHAGEM LE

Na avaliação histopatológica de *B.glabrata* infectados com *S.mansoni* da linhagem LE nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas após infecção, encontramos esporocistos íntegros, com aspecto normal, com núcleos esféricos e citoplasma basófilo.(FIGURA 10)

Em *B.tenagophila* sacrificada com 24 horas após infecção, mostrava em torno de alguns esporócistos, reação celular semelhante a fibroblastos, apesar dos esporocistos apresentarem-se íntegros. Moluscos sacrificados com 48, 72 e 96 horas após infecção, já mostravam esporocistos degenerados. (FIGURA 12).

Em *B. straminea*, sacrificada com 24, 48 horas após infecção, já apresentavam esporocitos em fase de degeneração e alguns degenerados. Moluscos sacrificados com 72 e 96 horas após infecção não se encontravam mais sinais de esporocitos apresentando tecido íntegro.

#### 4.2.2. LINHAGEM SJ

Em *B. glabrata* infectada com *S. mansoni* da linhagem SJ, sacrificadas 24 horas após infecção mostrava reação celular, com amebócitos em torno de alguns esporocitos ainda íntegros. Moluscos sacrificados com 48, 72 e 96 horas após infectados já mostravam esporocitos degenerados.

Em *B. tenagophila* sacrificadas 24, 48, 72 e 96 horas após infecção, foram encontrados primários íntegros com aspecto normal, com núcleos periféricos e citoplasma basófilo, além de poucos esporocitos em fase de degeneração.

Em *B. straminea* sacrificada 24, 48 e 72 horas, após infecção foram encontradas esporocitos degenerados, com células fusiformes irregulares. Nas 96 horas após infecção não se encontravam mais sinais de esporocitos, apresentando tecido íntegro. (FIGURA 11)

#### 4.3. CONTAGEM DE AMEBÓCITOS

##### 4.3.1. NÚMERO DE CÉLULAS AMEBOCITÁRIAS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* DO GRUPO CONTROLE.

Nas tabelas II, III e VI e figuras 1, 2 e 3 encontram-se os resultados da contagem de amebócitos na hemolinfa circulante de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* do grupo controle.

Em *B. tenagophila* e *B. straminea* (FIGURA 2 e 3), no decorrer do experimento, não apresentaram diferenças



significativas no número médio de células amebocitárias (Granulócitos e hialinócitos).

Em *B. glabrata* (FIGURA 1), observamos nas primeiras 4 horas e de 16 horas a 24 horas após o início da contagem que os amebócitos encontram-se em número mais elevado do que nos intervalos entre 6 a 14 horas sendo esta variação estatisticamente significativa ( $p < 0,05 \%$ ).

#### **4.3.2. NÚMERO DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, QUANDO EXPOSTOS A LINHAGEM LE DE *S. mansoni*.**

Nas tabelas V, VI e VII e figuras 4, 5 e 6 encontram-se os resultados da contagem de amebócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* quando infectadas com a linhagem LE de *S. mansoni*.

Nas três espécies de planorbídeos, observamos que apesar do número de granulócitos ter oscilado nos diferentes intervalos, estas não foram significativas ( $p > 0,05 \%$ ). Em relação aos hialinócitos, em *B. glabrata* (FIGURA 4), observamos um aumento de células circulantes nos intervalos de 2 a 20 horas em relação aos intervalos de 8 a 12 horas após infecção com a linhagem simpátrica de *S. mansoni* ( $p < 0,05 \%$ ), em *B. tenagophila* (FIGURA 5) apresentou um número elevado de hialinócitos no intervalo de 12 horas em relação aos intervalos de 2, 4 e 10 horas após infecção, sendo significativas essas oscilações ( $P < 0,05 \%$ ), em *B. straminea* (FIGURA 6), observamos diferenças significativas entre os intervalos de 30', 2, 16 e 20 horas em relação aos intervalos de 8 a 14 horas após infecção pela linhagem alopátrica de *S. mansoni*.

Quando foi aplicado o teste específico, para observar diferenças entre o grupo controle e o grupo infectado com a linhagem LE. Foi observado diferença significativa entre as células amebocitárias do tipo hialinócito entre os grupos das espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*. Na espécie *B. straminea*,

foram observadas diferenças significativas tanto para os granulócitos como para os hialinócitos.

#### **4.3.3. NÚMEROS DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES NA HEMOLINFA DE *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* QUANDO EXPOSTOS A LINHAGEM LE DE *S. mansoni*.**

Nas tabelas IX e X e figuras 7, 8 e 9 encontram-se os resultados da contagem de amebócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, quando expostos a linhagem SJ de *S. mansoni*.

*B. glabrata* (FIGURA 7) quando expostas a miracídios da linhagem SJ de *S. mansoni* apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05 \%$ ) para as células amebocitárias (granulócitos, hialinócitos e células totais). Observamos que nos intervalos 2 e 4 horas após a exposição ocorreu um aumento de células granulocíticas e que esse período foi significativo frente aos intervalos de 8, 12, 20 e 24 horas após exposição a linhagem alopátrica de *S. mansoni*. Nos hialinócitos circulantes nos períodos de 8, 12, 14 e 18 horas após exposição, encontramos um aumento significativo de hialinócitos frente aos intervalos de 30', 2, 4, 10 e 22 horas após exposição quando encontravam-se em menor número na hemolinfa circulante. Foram observadas diferenças significativas nas células totais nos intervalos 4, 10 e 2 horas após exposição.

*B. tenagophila* (FIGURA 8) exposta à miracídios de *S. mansoni* da linhagem SJ, apresentou oscilações no número médio de amebócitos circulantes, porém, essas oscilações não foram significativas nos diferentes intervalos ( $p > 0,05 \%$ ).

Em *B. straminea* (FIGURA 9), observamos diferenças significativas ( $p < 0,05 \%$ ) para células hemolinfáticas (granulócitos, hialinócitos e células totais) quando exposta à linhagem alopátrica de *S. mansoni*.

Para os granulócitos, os intervalos de 2 e 8 horas após exposição apresentaram diferenças para os intervalos de 10 e 24 horas após exposição. Em relação aos hialinócitos os

intervalos de 8 e 10 horas apresentaram diferenças significativas em relação aos intervalos de 4, 12 e 20 horas após exposição. Para as células totais não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05\%$ ).

Quando comparados os dados dos grupos infectados e controle das três espécies de bionfalária foi observado que em *B. glabrata* quando exposta à linhagem alopátrica foram encontradas diferenças significativas entre o número de granulócitos, o mesmo não sendo observado nos hialinócitos. Em *B. lenaxophila* foram observadas diferenças significativas nas variações do número de células amebocitárias e para *B. straminea* não foram observadas diferenças significativas entre grupos.

TABELA I - Taxa de infecção e mortalidade dos moluscos *R. glabrata*, *R. tenagophila* e *R. straminea* quando infectados com 10 miracídios *S. mansoni* das linhagens LE e SJ.

Espécies de	Linhagem LE			Linhagem SJ		
	No. de mol inf.	% mort 90 dias	% Pos.	No. de mol inf.	% mort. 90 dias	% Pos.
Moluscos						
<i>R. glabrata</i>	100	60,0	70,0	100	60,0	0,0
<i>R. tenagophila</i>	100	56,0	0,0	100	84,0	67,18
<i>R. straminea</i>	100	48,0	0,0	100	45,0	0,0

TABELA II - Número de Amebócitos circulantes em *B. glabrata* do grupo controle.

HS	MÉDIA			DESVIO PADRÃO			VARIÂNCIA		
	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT
1/2	18,4	5,2	23,61	8,96	3,19	9,88	80,23	10,19	97,61
2	13,2	5,1	18,3	7,90	2,89	10,51	62,44	8,36	110,48
4	17,1	5,1	22,2	12,32	2,67	14,20	151,86	7,11	201,69
6	5,1	1,4	6,5	4,31	1,11	5,17	18,61	1,23	26,75
8	6,9	1,7	8,6	2,85	1,20	3,00	8,11	1,44	8,98
10	8,2	4,7	12,9	6,59	2,11	8,06	43,44	4,44	65,00
12	10,4	2,7	13,1	4,85	1,64	5,67	23,48	2,69	32,11
14	6,0	4,0	10,0	2,00	2,83	3,10	4,00	8,00	10,00
16	14,6	5,5	20,1	6,50	3,57	9,12	42,23	12,75	83,11
18	13,4	5,1	18,5	10,44	3,26	12,87	108,98	10,61	165,75
20	14,2	4,7	18,9	16,89	2,17	18,71	285,44	4,69	350,00
22	13,2	4,7	17,9	12,70	3,38	15,48	161,19	11,44	239,75
24	12,6	3,4	16,0	10,42	2,45	10,89	108,48	5,98	118,50

GRAN= Granulócitos

HIAL= Hialinócitos

CT= Células Totais

TABELA III - Número de Amebócitos circulantes em R. leucogobilia do grupo controle.

HS	MÉDIA			DESVIO PADRÃO			VARIÂNCIA		
	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT
1/2	11,0	4,8	15,8	6,02	2,09	7,29	36,20	4,36	53,16
2	6,9	3,4	10,3	4,59	2,15	6,22	21,09	4,64	38,64
4	10,3	4,7	15,0	10,54	3,03	12,92	111,01	9,21	166,80
6	12,7	5,4	18,1	9,09	2,50	8,06	82,61	6,24	64,89
8	11,8	5,2	17,0	6,54	2,56	8,45	42,76	6,56	71,40
10	9,7	3,9	13,6	4,98	2,39	7,00	24,81	5,69	49,04
12	10,8	4,6	15,4	7,17	2,37	8,80	51,36	5,64	77,44
14	15,4	5,7	21,1	6,07	2,53	7,87	36,84	6,41	61,89
16	9,4	4,5	13,9	8,85	3,14	11,41	78,24	9,58	130,09
18	9,3	8,9	18,2	7,62	6,91	14,24	58,01	47,69	202,76
20	8,7	3,1	11,8	5,93	1,81	7,45	35,21	3,29	55,56
22	10,7	3,2	13,9	7,90	2,93	10,46	62,41	8,56	109,49
24	11,7	4,2	15,9	5,87	2,32	5,87	34,41	5,56	29,29

GRAN= Granulócitos

HIAL= Hialinócitos

CT= Células Totais

TABELA IV - Número de Amebócitos circulantes em *B. straminea* do grupo controle.

HS	MÉDIA			DESVIO PADRÃO			VARIÂNCIA		
	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT
1/2	10,5	4,7	15,2	7,05	3,55	7,81	49,65	12,65	60,96
2	20,1	6,0	26,1	16,18	3,55	19,45	261,89	12,60	378,49
4	20,4	6,1	26,5	31,77	5,20	36,78	1009,64	27,90	1352,45
6	11,8	6,1	17,9	9,17	3,45	10,71	84,16	11,89	114,69
8	12,9	7,4	20,3	15,83	4,57	19,47	250,49	20,84	379,21
10	8,2	5,5	13,7	6,01	2,29	6,87	36,16	5,25	47,21
12	11,2	5,5	16,7	17,80	5,18	22,79	316,96	26,85	519,21
14	10,3	6,6	16,9	12,63	4,00	15,88	159,61	16,04	212,09
16	5,8	4,6	10,4	4,58	4,34	8,06	20,96	18,84	65,04
18	5,6	2,3	7,9	5,28	1,62	5,49	27,84	2,61	30,09
20	11,3	4,5	15,8	8,34	3,04	9,66	69,61	9,25	93,36
22	9,2	4,8	14,0	3,09	2,82	5,22	9,56	7,96	27,20
24	10,9	5,8	16,7	16,60	2,27	16,98	275,69	5,16	288,21

GRAN= Granulócitos

HIAL= Hialinócitos

CT= Células Totais

TABELA V- Número de Amebócitos circulantes em *B. glabrata* infectada com a linhagem LE de *S. mansoni*.

HS	MÉDIA			DESVIO PADRÃO			VARIÂNCIA		
	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT
1/2	8,3	3,5	11,8	2,87	2,38	3,92	8,21	5,65	15,36
2	9,9	4,0	13,9	4,18	1,00	4,70	17,49	1,00	22,09
4	8,8	2,3	11,1	2,79	1,42	3,14	7,76	2,01	9,89
6	7,6	1,7	9,3	2,46	0,90	2,97	6,04	0,81	8,81
8	5,4	1,5	6,9	2,15	0,67	2,62	4,64	0,45	6,89
10	14,6	1,1	15,7	7,74	0,94	7,48	59,84	0,89	56,01
12	16,2	1,5	17,7	10,27	1,02	9,86	105,56	1,05	97,21
14	11,3	2,4	13,7	6,48	1,62	6,66	42,01	2,64	44,41
16	8,3	1,9	10,2	5,66	0,83	5,86	32,01	0,69	34,36
18	9,3	2,6	11,9	3,10	1,96	3,56	9,61	3,84	12,69
20	12,9	4,6	17,5	9,74	3,01	11,16	94,89	9,04	124,45
22	12,6	1,9	14,5	10,39	1,04	10,18	108,04	1,09	103,65
24	8,0	3,4	11,4	4,94	1,28	5,16	24,40	1,64	26,44

GRAN= Granulócitos

HIAL= Hialinócitos

CT= Células Totais



TABELA VI- Número de Amebócitos circulantes em *E. tenasophylla* infectada com linhagem LE de *S. mansoni*.

HS	MÉDIA			DESVIO PADRÃO			VARIÂNCIA		
	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT
1/2	9,0	3,0	12,0	6,62	1,26	7,09	43,80	1,60	50,20
2	10,1	1,8	11,9	5,26	0,75	5,73	27,69	0,56	32,89
4	6,0	1,7	7,7	1,26	1,00	1,42	1,60	1,01	2,01
6	8,9	2,9	11,8	5,22	1,58	6,49	27,29	2,49	42,16
8	7,5	2,9	10,4	3,64	0,70	3,98	13,25	0,49	15,84
10	8,5	1,8	10,3	2,20	0,98	2,87	4,85	0,96	8,21
12	8,9	5,0	13,9	5,13	2,10	6,09	26,29	4,40	37,09
14	11,2	2,9	14,1	8,69	1,87	9,59	75,56	3,49	91,89
16	15,9	2,4	18,3	10,01	1,11	10,31	100,29	1,24	106,21
18	9,0	2,2	11,2	3,74	1,60	4,71	14,00	2,56	22,16
20	17,2	2,8	18,0	22,32	2,48	25,05	498,16	6,16	627,49
22	10,0	2,3	12,3	7,29	0,64	6,89	53,20	0,41	447,41
24	11,4	3,1	14,5	11,55	1,22	12,58	133,44	1,49	158,25

GRAN= Granulócitos

HIAL= Hialinócitos

CT= Células Totais

TABELA VII - Número de Amebócitos circulantes em *B. straminea* infectada com a linhagem LE de *S. mansoni*.

MS	MÉDIA			DESVIO PADRÃO			VARIÂNCIA		
	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT
1/2	20,9	4,7	25,6	18,05	2,33	19,23	325,89	5,41	369,84
2	15,7	3,2	18,9	4,24	1,60	5,03	18,01	2,56	25,29
4	25,3	2,7	28,0	12,66	2,00	12,94	160,21	4,01	167,40
6	26,9	1,9	28,8	12,05	1,30	12,49	145,09	1,69	155,96
8	16,4	1,6	18,0	5,80	0,66	5,92	33,64	0,44	35,00
10	33,0	0,8	33,8	23,50	0,75	23,03	552,20	0,56	530,36
12	22,0	1,4	23,4	15,64	1,20	15,99	244,60	1,44	255,64
14	26,5	1,8	28,3	18,49	2,18	18,96	342,05	4,76	359,61
16	21,0	2,9	23,9	16,29	1,45	15,64	265,40	2,09	244,69
18	19,0	2,6	21,6	15,90	1,69	16,59	252,80	2,84	275,24
20	27,2	4,3	31,5	15,86	2,05	16,27	251,56	4,21	264,64
22	29,8	3,9	31,7	31,48	0,83	30,91	90,96	0,69	955,64
24	31,8	3,8	35,6	21,83	1,40	21,31	476,76	1,96	454,24

GRAN= Granulócitos

HIAL= Hialinócitos

CT= Células Totais

TABELA VIII - Número de Amebócitos circulantes em *B. glabrata* infectado com a linhagem SJ de *S. mansoni*.

HS	MÉDIA			DESVIO PADRÃO			VARIÂNCIA		
	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT
1/2	7,4	3,0	10,4	1,28	1,55	2,15	1,64	2,40	4,64
2	9,2	2,7	11,9	1,54	1,19	2,26	2,36	1,41	5,09
4	10,3	3,5	13,8	1,55	1,75	2,71	2,41	3,05	7,36
6	7,4	2,8	10,2	1,43	1,54	2,48	2,04	2,36	6,16
8	5,2	5,6	11,8	2,60	1,85	3,97	6,76	3,44	15,76
10	6,9	3,1	10,0	2,30	2,12	3,22	5,29	4,49	10,40
12	5,0	7,0	12,0	1,10	1,55	1,67	1,20	2,40	2,80
14	7,2	7,3	14,5	4,58	2,41	5,52	20,96	5,81	30,45
16	8,0	5,8	13,8	3,35	3,06	5,58	11,20	9,36	31,16
18	3,6	6,7	10,3	1,56	2,19	1,90	2,44	4,81	3,61
20	6,2	5,0	11,2	2,44	1,61	1,99	5,96	2,60	3,96
22	6,5	2,7	9,2	2,66	1,49	3,68	7,05	2,21	13,56
24	5,5	4,2	9,7	1,96	2,56	3,23	3,85	6,56	10,41

GRAN= Granulócitos

HIAL= Hialinócitos

CT= Células Totais

TABELA IX- Número de Amebócitos circulantes em *B. tenacophylla* infectada com a linhagem SJ de *S. mansoni*.

HS	MÉDIA			DESVIO PADRÃO			VARIÂNCIA		
	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT
1/2	6,3	1,6	7,9	4,61	1,11	5,39	21,21	1,24	29,09
2	4,9	1,3	6,2	2,88	0,90	3,68	8,29	0,81	13,56
4	6,3	3,4	9,7	5,53	3,10	8,44	30,61	9,64	71,21
6	6,2	3,3	9,5	6,75	3,58	10,11	45,56	12,81	102,25
8	12,0	3,7	15,7	9,56	2,76	11,80	91,40	7,61	139,24
10	8,6	3,0	11,6	8,73	2,14	9,52	76,24	4,60	90,64
12	4,5	1,8	6,3	2,25	1,17	2,76	5,05	1,36	7,61
14	3,9	1,4	5,3	3,51	1,11	4,47	12,29	1,24	20,01
16	10,1	3,5	12,6	6,02	3,04	9,16	36,29	9,25	83,84
18	3,8	0,9	4,7	3,28	0,70	3,67	10,76	0,49	13,45
20	5,9	3,5	9,4	5,59	2,80	7,81	31,29	7,85	61,04
22	5,4	1,9	7,3	5,77	2,07	7,76	33,21	4,29	60,21
24	4,4	2,8	6,8	2,93	1,99	4,64	8,60	3,96	21,56

GRAN= Granulócitos

HIAL= Hialinócitos

CT= Células Totais

TABELA X- Número de Amebócitos circulantes em *B. siamense* infectada a linhagem de SJ de *S. mansoni*.

HS	MÉDIA			DESVIO PADRÃO			VARIÂNCIA		
	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT	GRAN	HIAL	CT
1/2	11,3	3,8	15,1	4,94	1,33	5,30	24,41	1,76	28,09
2	23,1	4,5	27,6	14,94	1,69	15,69	223,29	2,85	246,04
4	19,7	2,3	22,0	12,00	1,42	11,62	144,01	2,01	135,00
6	18,1	3,5	21,6	16,08	0,92	16,34	258,69	0,85	266,84
8	22,5	5,1	27,6	11,23	1,51	12,08	126,05	2,29	146,04
10	11,1	5,9	16,0	7,60	1,58	7,58	57,69	2,49	57,49
12	15,5	3,0	18,5	8,16	1,41	8,03	66,65	2,00	64,45
14	12,0	4,4	16,4	3,46	2,01	4,90	12,00	4,04	24,04
16	14,1	4,5	18,6	7,44	1,36	7,02	55,29	1,85	49,24
18	25,0	4,2	29,2	25,55	1,60	25,39	652,80	2,56	644,76
20	13,0	3,2	16,2	8,96	1,33	9,05	80,20	1,76	81,96
22	17,3	4,0	21,3	17,19	1,26	17,53	295,61	1,60	307,44
24	10,0	3,8	13,8	4,15	0,98	3,97	17,20	0,96	15,76

GRAN= Granulócitos

HIAL= Hialinócitos

CT= Células Totais

FIGURA 1 - Variação no número de amebócitos circulantes em *E. alabama* do grupo controle.

**MEDIA No. AMEBOCITOS/0,1 mm<sup>3</sup> HEMOLINFA**

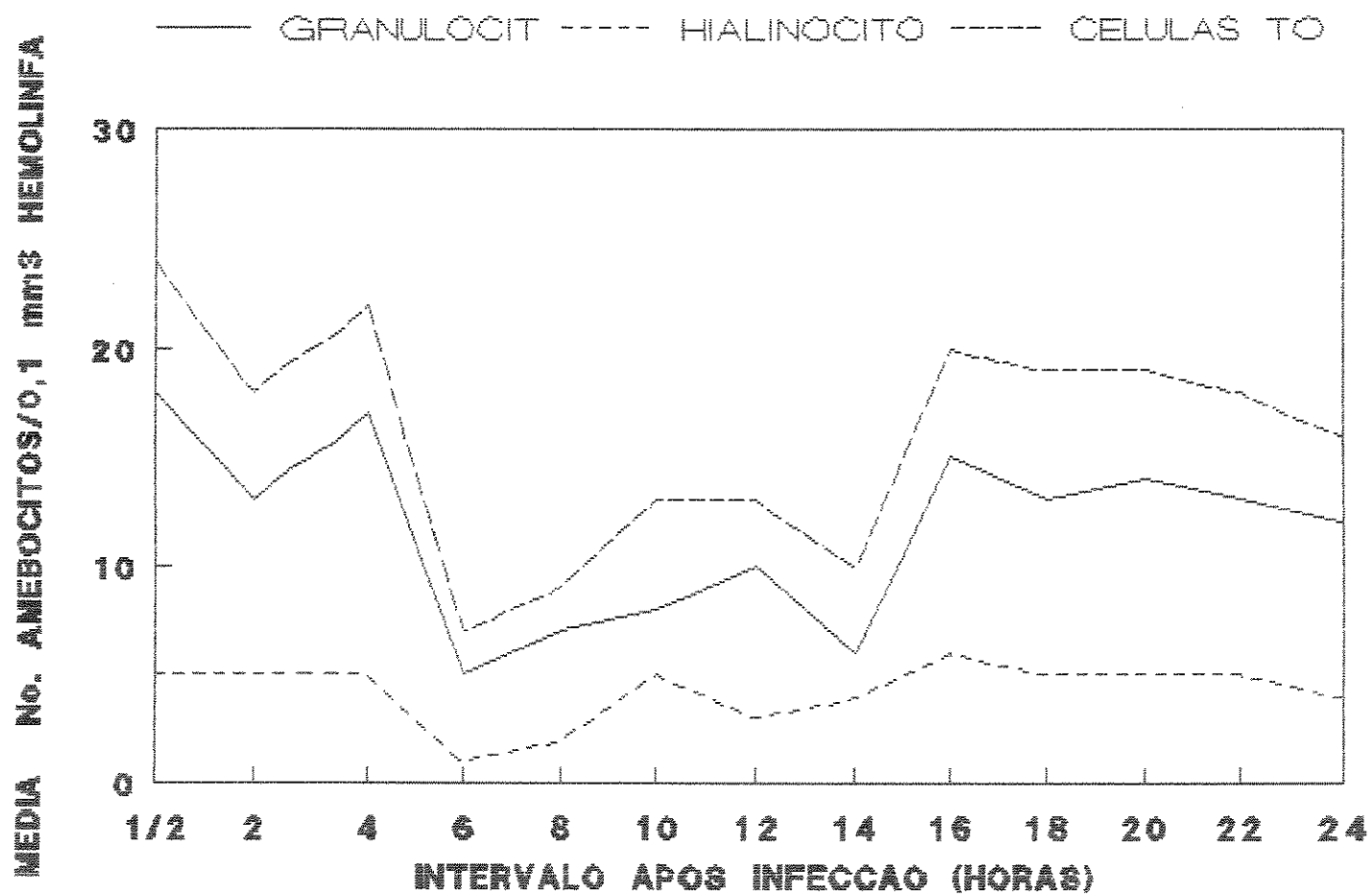


FIGURA 2 - Variação no número de amebócitos circulantes em *L. braziliensis* do grupo controle.

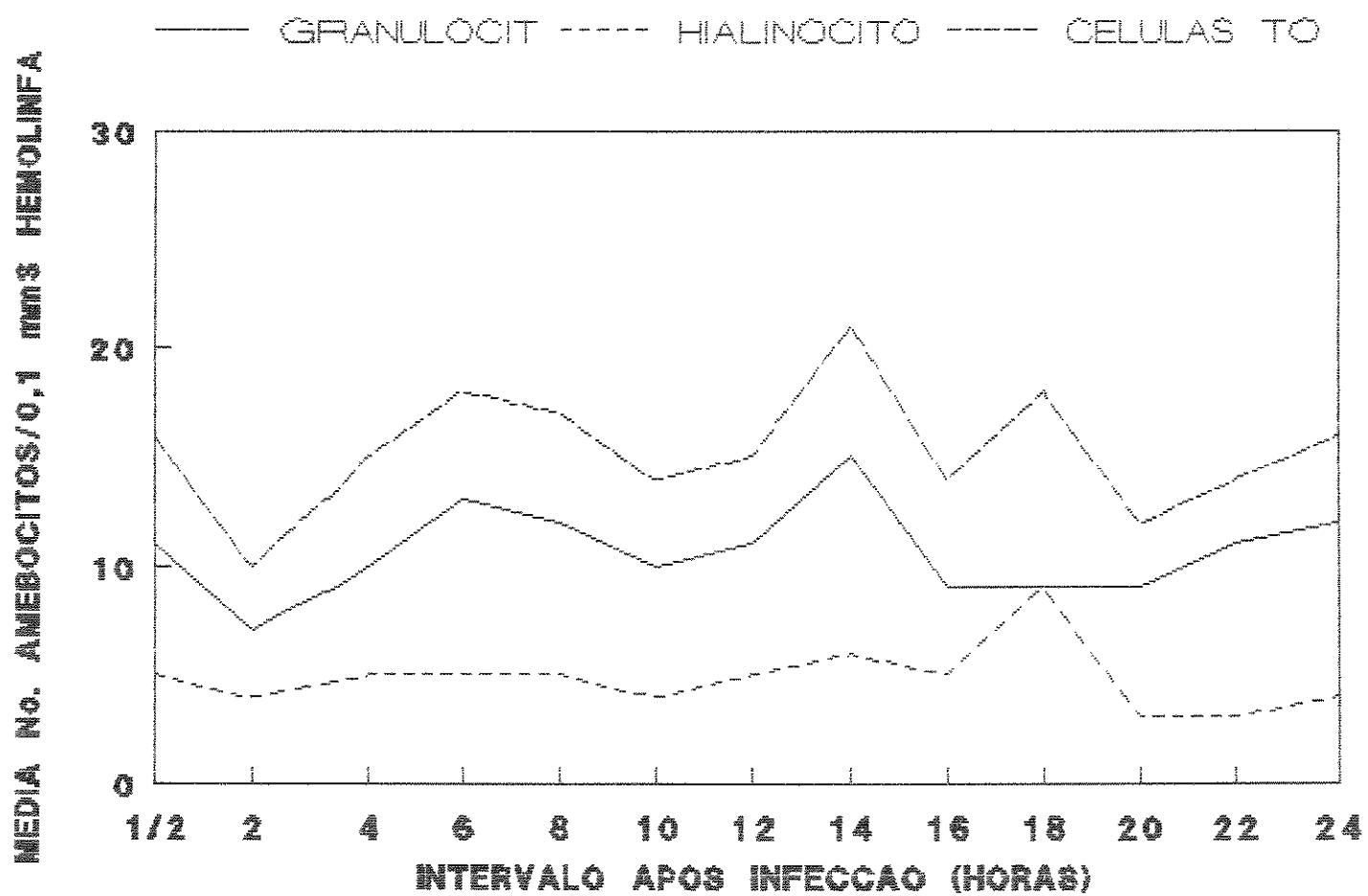


FIGURA 3 - Variação no número de amebócitos circulantes em *B. siamensis* do grupo controle.

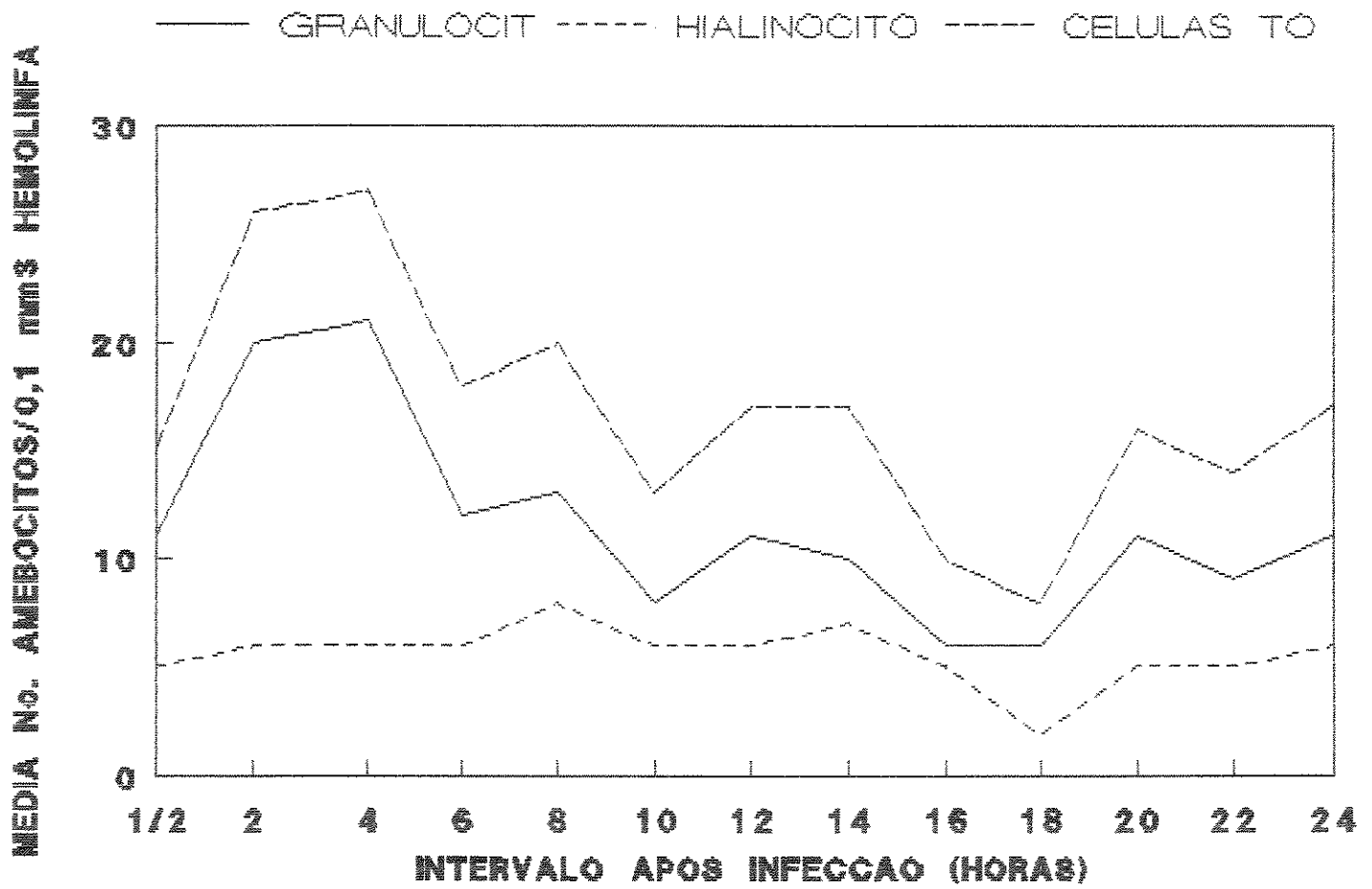




FIGURA 4 - Variação no número de amebócitos circulantes em *R. glabrata* infectadas com a linhagem LE de *S. mansoni*.

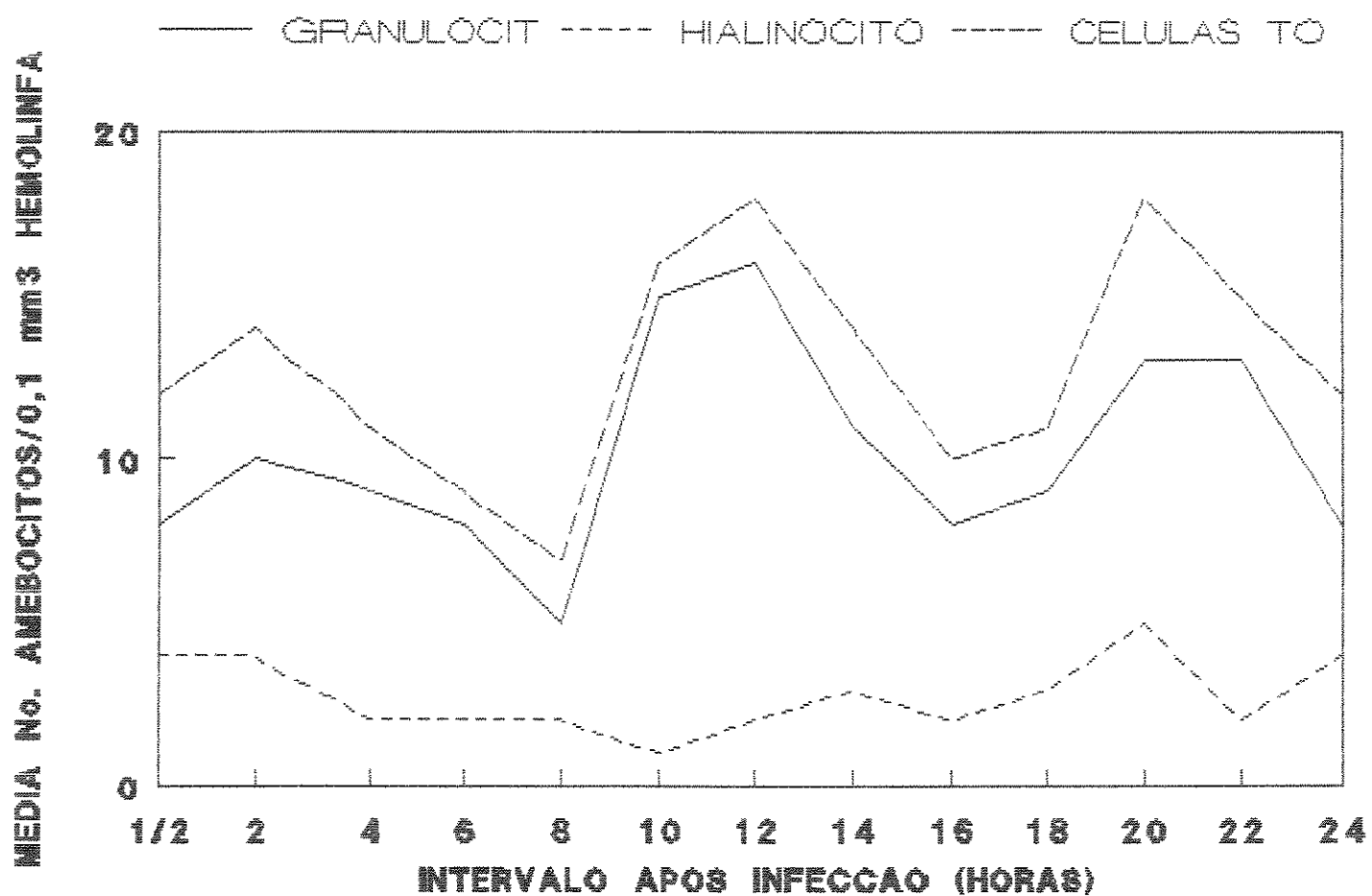


FIGURA 5 - Variação no número de amebócitos circulantes em *R. tamaritensis* infectadas com a linhagem LE de *S. mansoni*.

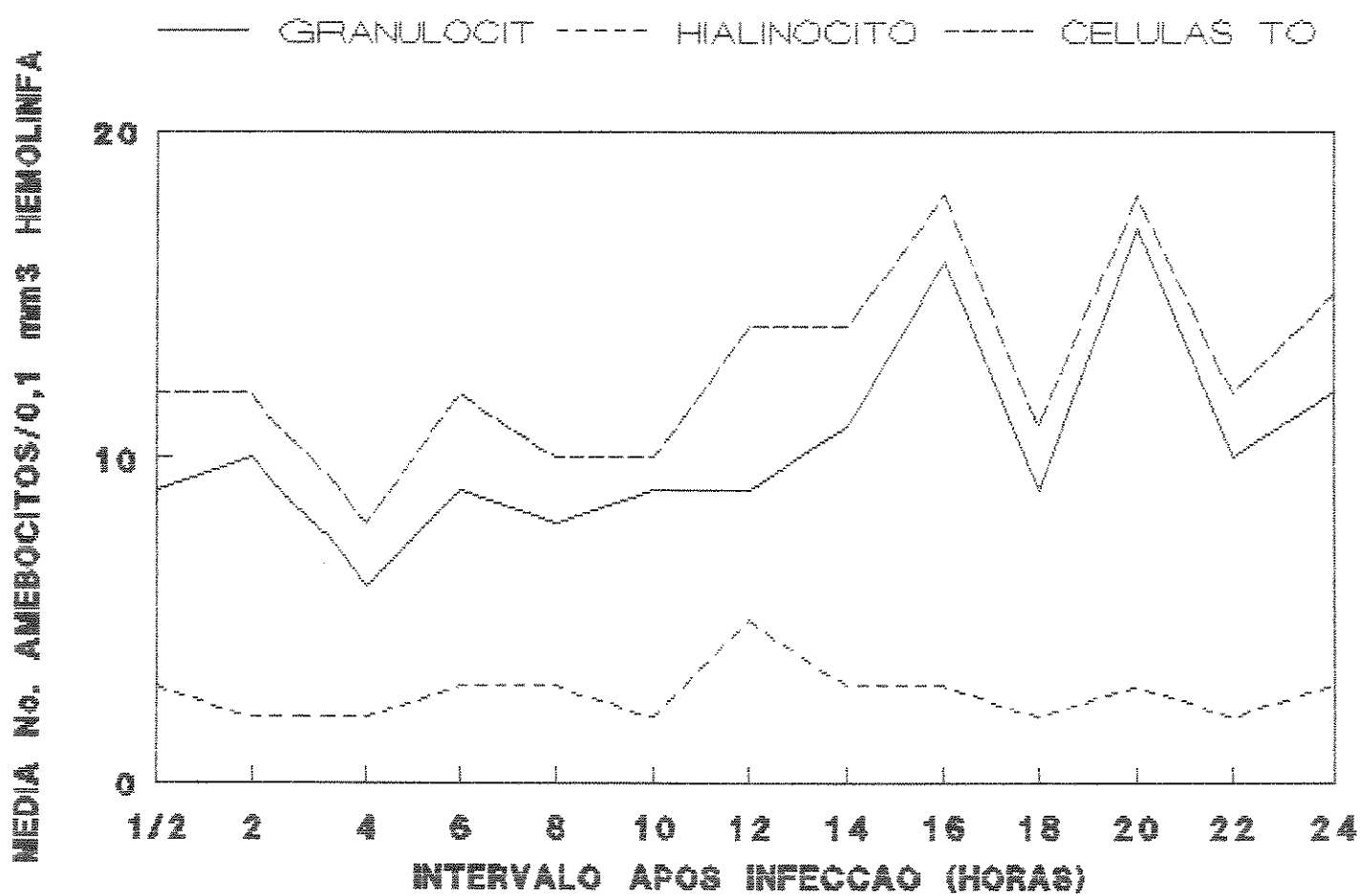


FIGURA 4 - Variação no número de amebócitos circulantes em *B. siamensis* infectada com a linhagem LE de *S. mansoni*.

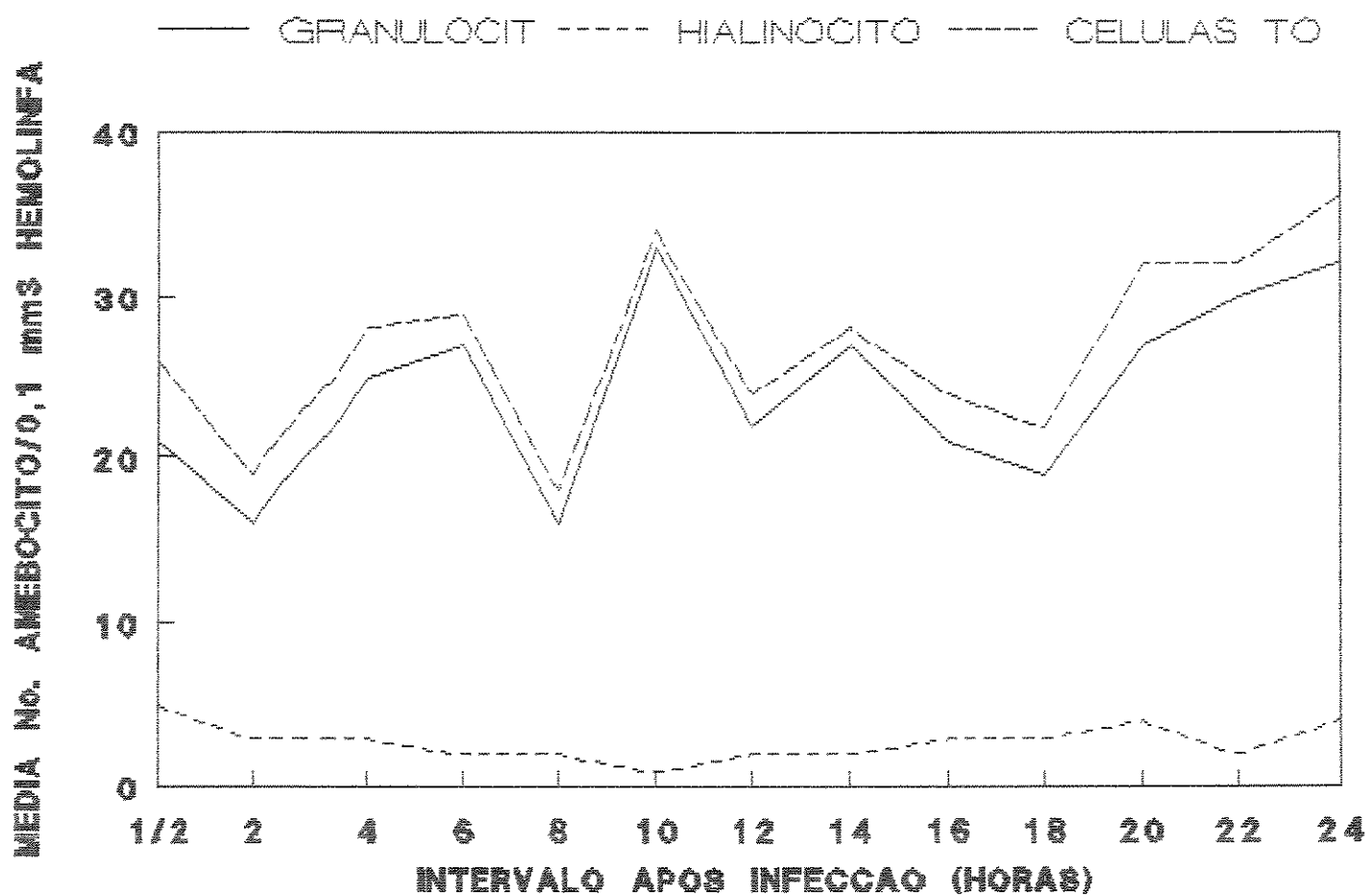


FIGURA 7 - Variação no número de amebócitos circulantes em *E. alabamica* infectada com a linhagem SJ de *S. mansoni*.

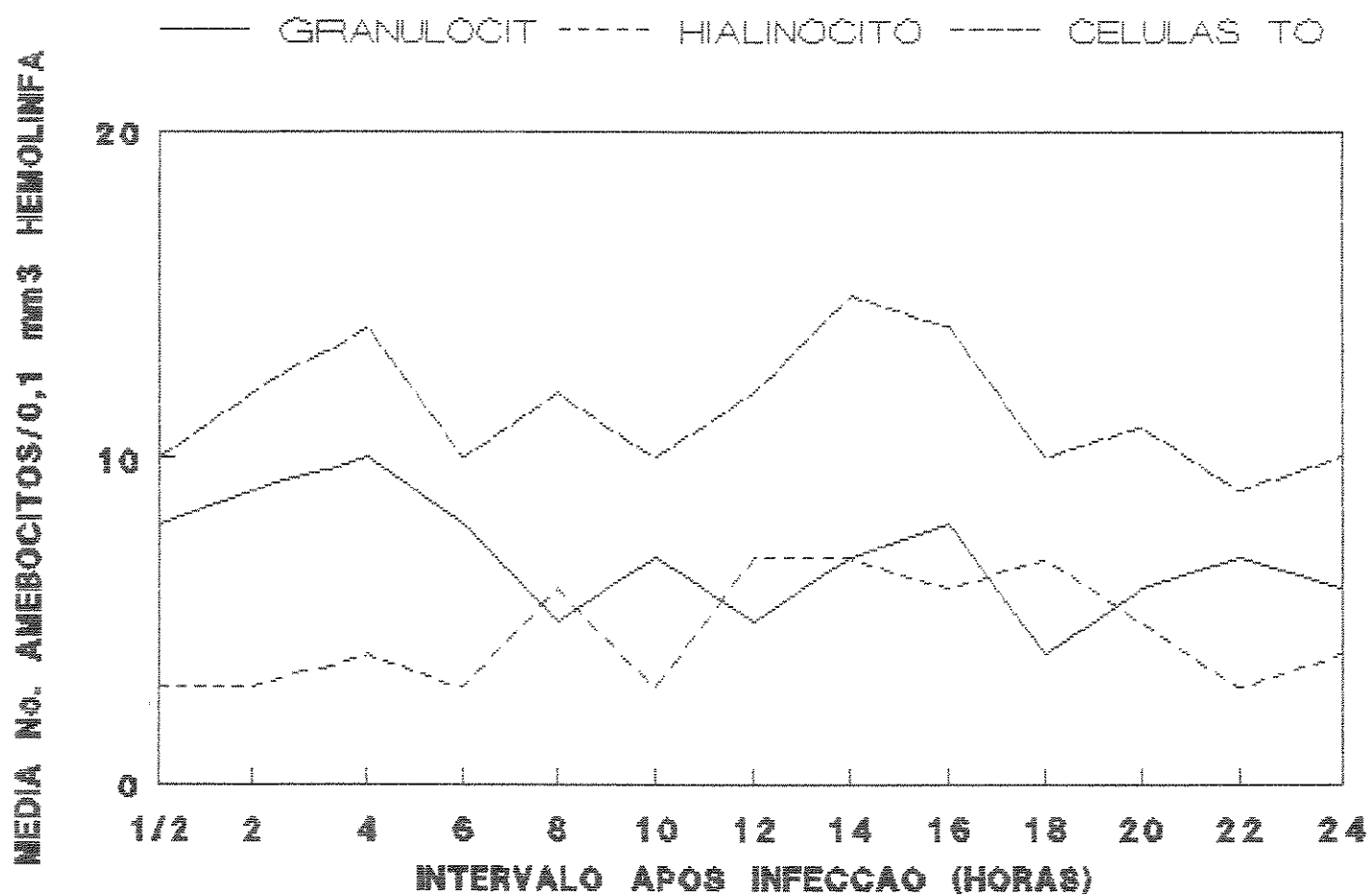


FIGURA 8 - Variação no número de amebócitos circulantes em *E. lamprocephala* infectada com a linhagem de BJ de *E. marginis*.

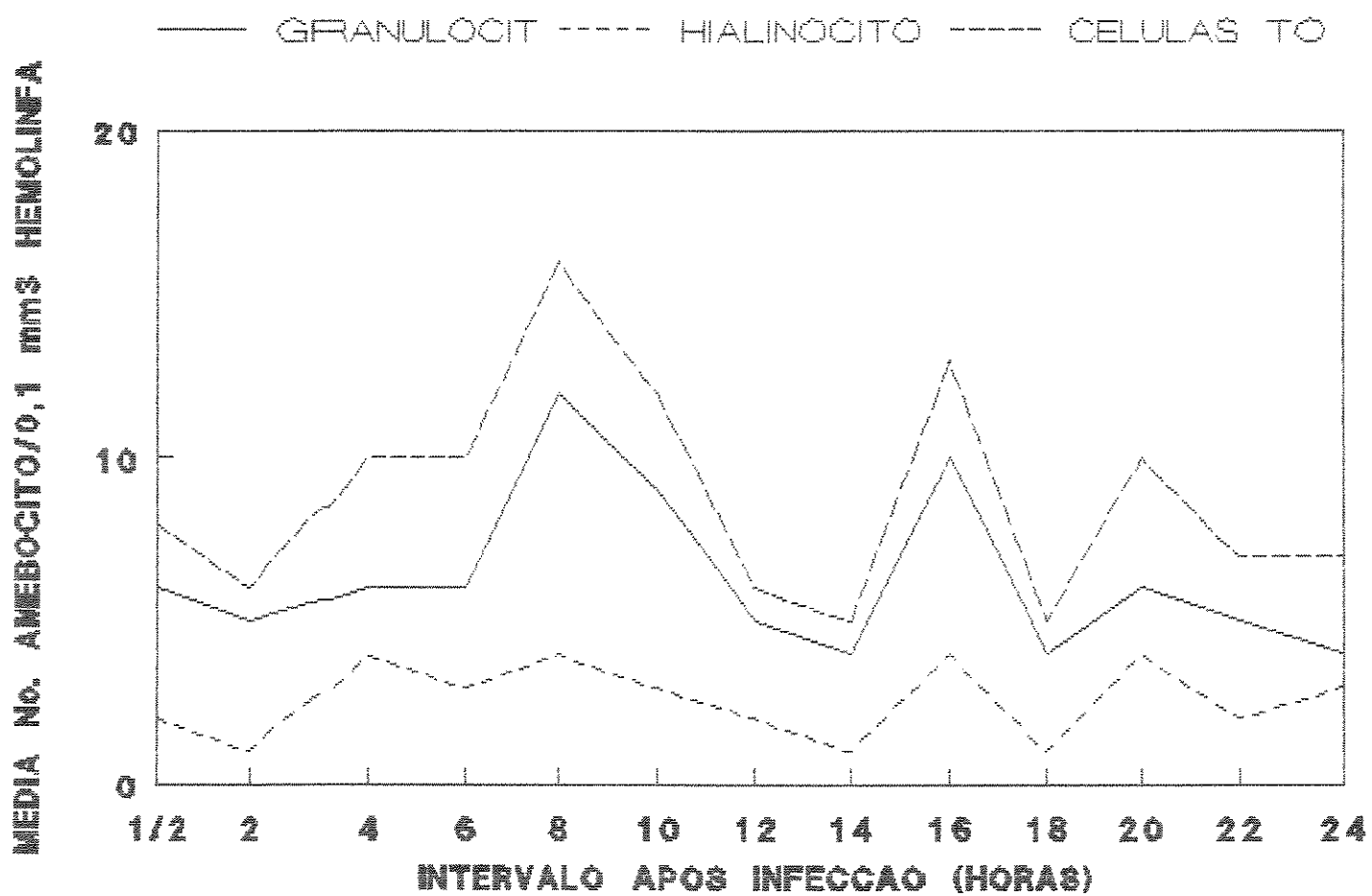


FIGURA 9 - Variação no número de amebócitos circulantes em *B. malayi* infectada com a linhagem SJ de *S. mansoni*.

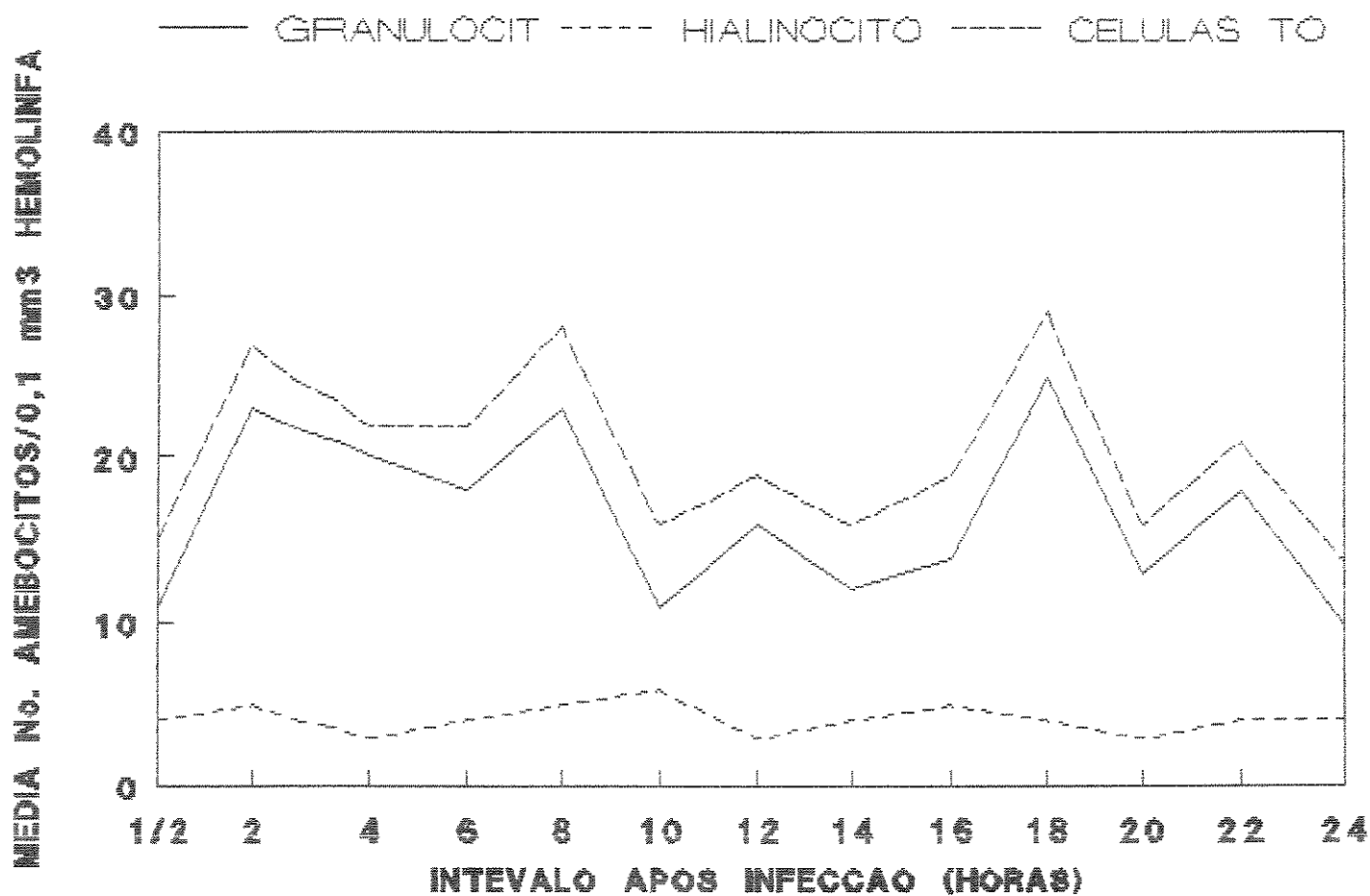


FIGURA 10 - *E. glabrata* ( 96 horas, H.E., 500 x ), infectada com linhagem LE de *S. mansoni*. Esporocisto primário íntegro.

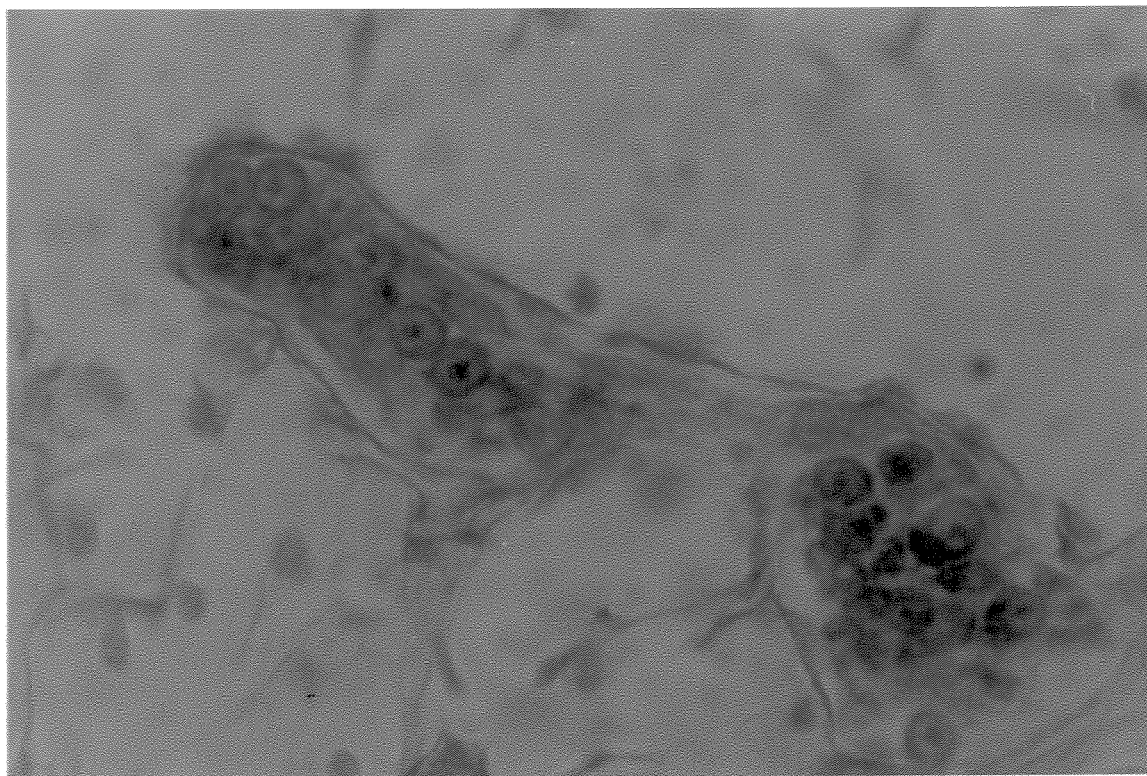


FIGURA 11 - *B. siamanea* ( 24 horas, H.E., 500 x ), infectada com linhagem SJ de *S. mansoni*. Esporocisto em fase de degeneração.

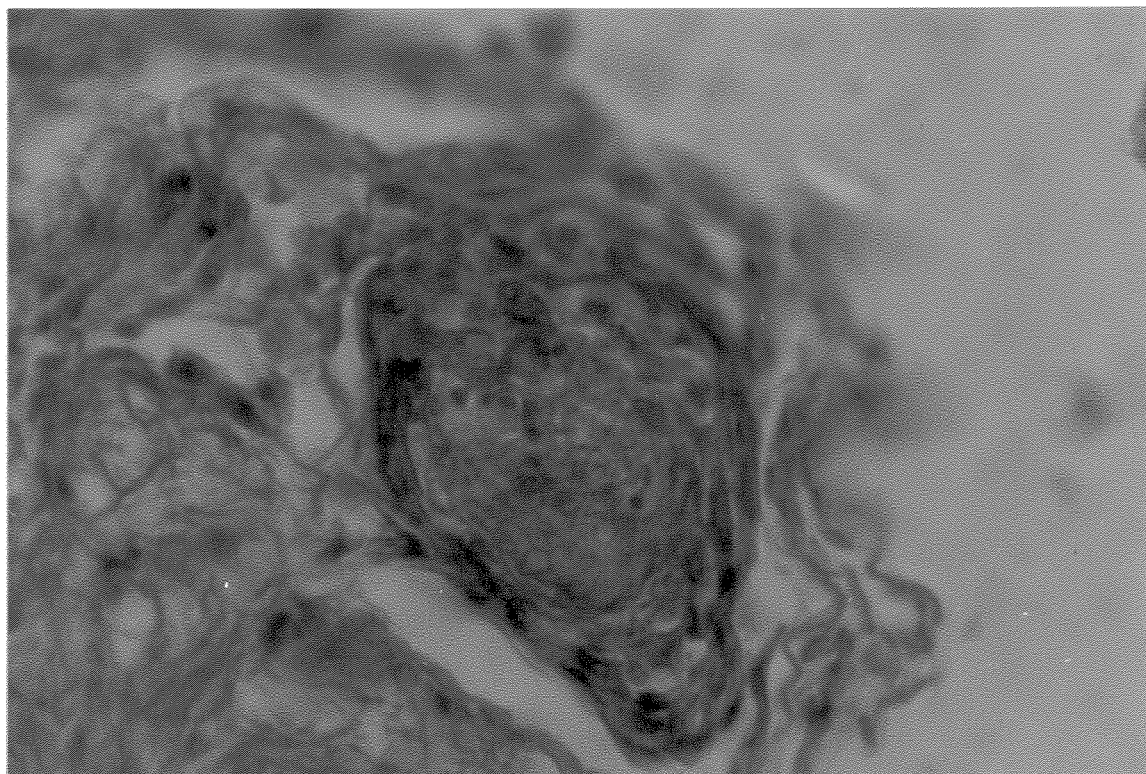
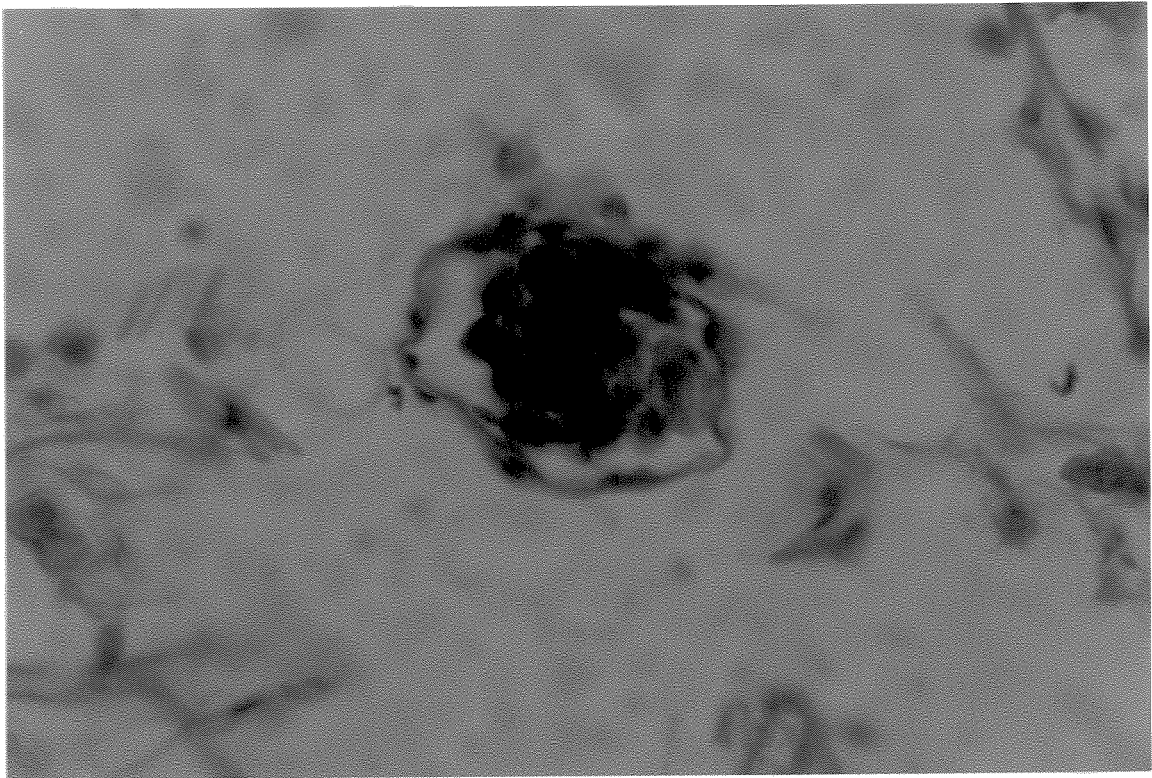




FIGURA 12 - *R. tenagophila* (24 horas, H.E., 500 x ), infectada com linhagem LE de *S. mansoni*. Esporocisto em fase de degeneração.



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. ÍNDICE DE INFECÇÃO

Em nossos experimentos, *B. glabrata* e *B. tenagophila* apresentaram comportamento semelhante quando infectada com as linhagens simpátricas e alopátricas de *S. mansoni* (Tab. 1).

Quando infectadas com a linhagem simpátrica, 70,0% dos moluscos *B. glabrata* eliminaram aecárias, enquanto que *B. tenagophila* apresentou índice de positividade de 67,18%. *B. glabrata* é considerada a principal transmissora da esquistossomose no Brasil, e no entanto, quando infectada com linhagem alopátrica se mostrou refratária o mesmo ocorrendo com *B. tenagophila*, que é considerada por diversos autores como um molusco que geralmente é bem adaptada a linhagem local de *S. mansoni*, apresentando-se refratária com linhagens alopátricas. (PARAENSE & CORREA, 1963, 1978; SANTANA et alii, 1978; CHIEFFI, 1975; CORREA et alii, 1979; DIAS et alii, 1987; MACHADO et alii, 1988).

Com relação a *B. glabrata* PARAENSE & CORREA (1963), utilizando linhagem simpátrica (BH) e alopátrica (SJ) de *S. mansoni*, evidenciou resistência a linhagem alopátrica, o que está de acordo com o nosso experimento. Outros autores (CHIEFFI, 1975; CORREA et alii, 1979) utilizando a mesma linhagem alopátrica (SJ) de *S. mansoni* e moluscos *B. glabrata* de origens geográficas diferentes, obtiveram resultados positivos.

*B. straminea* apresentou total resistência as linhagens alopátricas de *S. mansoni* (Tab 1). CARVALHO et alii (1980), utilizando as mesmas linhagens de *S. mansoni* do nosso experimento e *B. straminea* de Piripiri (PI), também encontrou resultados idênticos ao nosso, *B. straminea* sendo refratária as linhagens LE e SJ de *S. mansoni*. ZANOTTI & MAGALHÃES (1982) e DORVAL (1985), utilizando moluscos de outras áreas geográficas também não obtiveram sucesso nas infecções experimentais, entretanto, GERKEN et alii (1975) e SOUZA et alii (1981 a, b),

utilizando moluscos *B. straminea* de várias localidades do Estado de Minas Gerais, conseguiram obter sucesso nos experimentos utilizando as linhagens LE e SJ.

Os nossos resultados frente aos de outros pesquisadores nos indicam que a resistência à infecção pode estar ligada a um maior ajuste fisiológico entre o molusco e trematódeo, condicionada a constituição gênica do molusco (PARAENSE & CORREA, 1963; MAGALHÃES, 1970).

## 5.2. REAÇÃO AOS ESPOROCISTOS

Poucos estudos comparativos entre as três espécies de *Biomphalaria* foram realizados. COELHO (1957); GUARALDO et alii (1981) e SETA (1990), compararam as reações teciduais em *B. glabrata* e *B. tenagophila* e BARBOSA & COELHO (1956), entre *B. glabrata* e *B. straminea*, adotando linhagens simpátricas e alopátricas.

Segundo diversos autores (NEWTON, 1952; TRIPP, 1961, 1974; PAN, 1963, 1965; BARBOSA, 1965; CHENG & GARRABRANT, 1977; BAYNE et alii, 1980), miracídios de *S. mansoni* normalmente desenvolvem-se sem qualquer resposta celular dos hospedeiro intermediário quando a infecção ocorre em moluscos suscetíveis. No entanto, em moluscos pouco suscetíveis, os miracídios são rapidamente atacados por amebócitos, circundados por uma cápsula fibrótica e destruído.

Nas preparações histológicas, observamos comportamentos distintos. *B. glabrata* e *B. tenagophila* infectadas com as respectivas linhagens simpátricas apresentaram reações amebocitária em volta de esporocistos encontrados no tecido adjacente. Na maioria dos esporocistos, observou-se ausência de reação amebocitária. Utilizando linhagens alopátricas observamos que 48 horas após exposição, os esporocistos encontravam-se degenerados, achados estes que estão de acordo com os resultados obtidos por diversos autores (COELHO, 1957; BARBOSA & COELHO, 1956; SETA, 1990).

*B. straminea* infectadas com a linhagem alopátricas, apresentou forte reação amebocitárias, com esporocistos destruídos 24 horas após exposição e reparação celular precoce observada a partir do segundo dia até o quarto dia após exposição. DORVAL (1985), trabalhando com *B. straminea* de Três Lagoas (MT) e com linhagens de *B. mansonii* de localidades geográficas diferentes observou o mesmo tipo de reação, com destruição de 100% dos esporocistos. Segundo COELHO & BARBOSA (1956), esse tipo de reação tecidual seria um dos fatores determinantes dos baixos índices de infecção desse planorbídeo.

### 5.3. NÚMERO DE AMEBÓCITOS CIRCULANTES

Moluscos infectados e grupo controles, ficaram expostos à luz por duas horas o que, segundo diversos autores, poderia alterar o número de amebócitos circulantes (SMINIA, 1972; STUMPF & GILBERTSON, 1978; WOLMARANS & YSSEL, 1988).

No grupo controle de *B. glabraia*, a média das médias de células amebocitárias da hemolinfa circulante foi de 15,89 células por 0,1 mm<sup>3</sup>, sendo 11,79 (74,20%) de granulócitos e 4,1 (25,80%) de hialinócitos (Tab. 2), resultados que discordam de outros autores (CHENG, 1975; CHENG & AULD, 1977; STUMPF & GILBERTSON, 1980; SANTANA, 1990), que encontram em média 92,11% de granulócitos e 7,8% de hialinócitos. Em nosso experimento o diâmetro da concha variou de 7 a 10 mm, enquanto que dos autores citados o diâmetro foi de 15 mm e moluscos de localidades geográficas diferentes podem ser os responsáveis pelos resultados discordantes, entre o números de células amebocitárias (STUMPF & GILBERTSON, 1978).

Em *B. lemnacchilla* a média de amebócitos circulantes foi de 15,38 células / 0,1 mm<sup>3</sup>, sendo 11,18 (72,69%) de granulócitos e 4,74 (31,08%) de hialinócitos (Tab. 3). SETA (1990) encontrou na mesma espécie média de 16,4 células / 0,1mm<sup>3</sup> sendo 7 (42,68%) de granulócitos e 9,4 (57,32%) de hialinócitos, enquanto que, REIS (1990) encontrou 13,64 células / 0,1 mm<sup>3</sup>, sendo 4,85 (35,48%) de granulócitos e 8,8 (64,52%) de hialinócitos. Os

autores citados, utilizaram os moluscos da mesma espécie com diâmetros de conchas semelhantes, mas com origens geográficas diferentes, o que poderia explicar a diferença nos resultados (STUMPF & GILBERTSON, 1978).

Em *B. straminea* a média de amebócitos circulantes foi de 16,77 células / $0,1 \text{ mm}^3$ , sendo 11,4 (67,98%) de granulócitos e 5,37 (32,02%) de hialinócitos (Tab. 4), não sendo significativas as oscilações ocorridas no número médio de células amebocitárias ( $p > 0,05\%$ ).

Considerando o número de amebócitos, não foram observadas diferenças significativas entre as três espécies de *Biomphalaria* do grupo controle ( $p=0,4962$ ).

Houve em ambos os grupos (controle e infectados) nas três espécies de *Biomphalaria*, um maior número de células granulocíticas, com reação aos hialinócitos, na hemolinfa circulante. Esta observação vem de encontro com os achados de JEONG & HEYNEMAN (1976); CHENG & AULD (1977); TRIPP (1961), que observaram que os granulócitos são os tipos mais comuns de células amebocitárias em *B. glabrata* e que elas estariam presentes em maior número em volta de materiais reconhecidos como "corpos estranhos" do molusco.

*B. glabrata* quando exposta à miracídeos da linhagem LE de *S. mansoni*, apresentou variação no número médio de células amebocitárias nos diferentes intervalos, sendo estas variações não significativas para os granulócitos e células totais, apresentando diferença significativa a nível de hialinócitos. SETA (1990), trabalhando com *B. glabrata* e utilizando a linhagem BH de *S. mansoni*, também encontrou diferenças significativas no número de hialinócitos, o mesmo não ocorrendo com os granulócitos e células totais.

Quando exposta a miracídeos da linhagem SJ de *S. mansoni*, *B. glabrata* apresentou diferenças significativas para granulócitos e hialinócitos. Observamos que nas primeiras 4 horas após a exposição ocorreu um aumento de células granulocíticas na hemolinfa, que foi seguida por uma diminuição dessas células nos intervalos de 6 e 8 horas após exposição e mantendo-se a níveis

abaixo do número de granulócitos do início do experimento. Nos hialinócitos observamos que dos 30 minutos iniciais até 6 horas após exposição aos miracídios ocorreram pequenas oscilações, havendo um aumento dessas células com 8 horas após infecção (Fig. 7).

Analisando *B. glabrata* infectada com linhagem simpátrica e alopátricas, observamos que para linhagem simpátrica, houve uma queda brusca de granulócitos a partir da segunda hora após exposição e manteve-se até a oitava hora, quando teve início a elevação do número dessas células na hemolinfa, alcançando pico de granulócitos na décima segunda hora, indicando que a resposta ao miracídio foi rápida, com os granulócitos sendo imobilizados para o tecido nas primeiras horas após infecção. Há ainda de ressaltar que, apesar de não se ter conhecimento a respeito da função desempenhada pelos hialinócitos, o número dessas células na hemolinfa caiu lentamente até a décima hora após exposição, resultando que os intervalos de migração dos granulócitos deferem dos hialinócitos, o que nos leva a crer que as células envolvidas no processo de defesa dos moluscos teriam funções diferentes, onde as células granulocíticas seriam responsáveis pela fagocitose (JEONG & HEYNEMAN, 1976) e os hialinócitos atuariam clivando o material estranho, com liberação de enzimas lisossomiais e possivelmente ativariam os mecanismos de ataque dos granulócitos, que teria seu início na fase de reconhecimento "self-nonsel" mediado por receptores (JORDANE & CHENG, 1987).

*B. glabrata* infectada com linhagem alopátrica, observamos que o pico de granulócitos na hemolinfa circulante ocorre 4 horas após infecção, diminuindo o número de células até a décima hora, e levando-se em seguida, mas não alcançando o mesmo nível que o da quarta hora após infecção. O aumento brusco de células circulantes nas primeiras horas após infecção foi observado por STUMPF & GILBERSON (1978) e SETA (1990), indicando uma resposta do tipo "Leucocitária", fenômeno este resultante da infecção parasítica.

*B. tenagophila* exposta a miracídios de *S. mansoni* da linhagem SJ, apresentou oscilações no número médio de amebócitos circulantes na hemolinfa (Fig. 8), porém essas oscilações não foram significativas nos diferentes intervalos ( $p > 0,05$ ), o que discorda do experimento de REIS (1990), que observou diferenças significativas nas células granulocíticas circulantes de *B. tenagophila* quando infectada com *S. mansoni* linhagem SJ.

Analisando *B. tenagophila* exposta à miracídios de *S. mansoni* da linhagem LE (Fig. 5), observamos diferenças significativas no número de hialinócitos nos intervalos de 12 horas após exposição, onde ocorreu um aumento brusco de hialinócitos circulantes frente aos intervalos de 2, 4, 18 e 20 horas após exposição a linhagem alopatricas. Há de salientar que o número de granulócitos na hemolinfa foi se elevando gradativamente a partir da quarta hora após exposição, até alcançar pico com 16 horas após a exposição, tendo uma queda brusca com 18 horas, seguida de outra elevação com 20 horas após a exposição com diminuição dessas células na hemolinfa. Esta variação nos leva a crer que a produção de granulócitos pelo APO, foi aumentando gradativamente e lançadas na hemolinfa juntamente com as células que estariam voltando do tecido, provocando assim as elevações no número de células circulantes na hemolinfa. Segundo MATRICONGONDRAN (1985), observou uma intensa atividade mitótica do APO nas primeiras 48 horas após infecção em *Riomphalaria glabra* infectada anteriormente com *Echinostoma caproni* e SANTANA (1990), que verificou que o pico máximo de produção das células amebocitárias ocorreria por volta de 24 horas após exposição dos moluscos aos miracídios de *S. mansoni*.

Examinando *B. salicamina* exposta a miracídios da linhagem LE de *S. mansoni*, observamos que o número de hialinócitos circulantes na hemolinfa foi gradativamente diminuindo a partir dos 30 minutos até a décima hora após infecção seguindo-se uma elevação também gradual até 24 horas após infecção. Já com os granulócitos, ocorreu uma maior oscilação, com queda no número de células amebocitárias, logo na

segunda hora após a exposição, seguindo-se a uma elevação na quarta e sexta hora. Essa elevação e diminuição no número de células circulantes na hemolinfa se repetiu durante o tempo que durou o experimento.

Quando exposta a linhagem paulista de *S. mansoni*, *E. siraminea* apresentou uma maior oscilação no número de granulócitos circulantes, com o pico ocorrendo no intervalo de 18 horas após infecção. Os hialinócitos apresentaram pequenas oscilações entre os intervalos.

O número de células amebocitárias circulantes na hemolinfa em *E. siraminea*, apresentou-se em maior número quando comparadas com as de *E. glabrata* e *E. tenagophila* com diferença altamente significativa ( $p < 0,001$ ), podendo assim inferir que *E. siraminea* apresenta sua reação amebocitária exacerbada precoce, que pode ser observada quando da análise histopatológica do molusco quando exposto as linhagens alopátricas de *S. mansoni*, onde as formas larvárias encontravam-se degeneradas com 24 horas após exposição.



## 4. RESUMO

O trabalho consta do estudo da Acinética amebocitária em três espécies de moluscos vetores de *S. mansoni* infectadas por duas linhagens deste trematódeo, onde espera-se compreender melhor o processo de defesa dos moluscos e correlacioná-los com o grau de suscetibilidade.

Utilizamos *B. glabrata* (Belo Horizonte, MG), *B. tenagophila* (Vale do Paraíba, SP) e *B. straminea* (Picos, PI). As linhagens de *S. mansoni* utilizadas foram provenientes de Belo Horizonte (linhagem LE e do Vale do Paraíba (linhagem SJ).

O experimento foi dividido em três partes: índice de infecção dos moluscos, análise histopatológica e número de amebócitos na hemolinfa.

*B. glabrata* e *B. tenagophila*, quando expostas à linhagem simpátrica de *S. mansoni* demonstraram um índice de positividade de 70,0% e 67,18% respectivamente, e apresentaram-se refratárias quando expostas a linhagem alopatricas. Na análise histopatológica dos moluscos, quando em contato com a aça simpátrica, observou-se esporocistos íntegros e poucos apresentando reação amebocitárias, o que não ocorreu com a linhagem alopatrica, onde a maioria dos esporocistos apresentavam-se em processo de degeneração. - Com relação ao número de células amebocitárias, observou-se que em *B. glabrata* o pico máximo de células circulantes ocorre com 12 e 20 horas após exposição com a linhagem LE e as 4 e 14 horas com a linhagem SJ. *B. tenagophila* teve o seu pico máximo de células circulantes 20 horas após a exposição com a linhagem LE e as 8 horas com a linhagem SJ.

*B. straminea* mostrou-se refratária as linhagens alopatricas (LE e SJ), apresentando na análise histopatológica uma reação tecidual exarcebada, com esporocistos degenerados 24 horas após exposição e restituição tecidual a partir de 48 horas após infecção.

Com relação ao número de células amebocitárias *B. straminea*, apresentou pico de células às 10 horas após infecção para a linhagem LE e às 18 horas para a linhagem SJ.

## 7. CONCLUSÕES

01 - *B. glabrata* oriunda de Belo Horizonte-MG, mostrou-se suscetível a linhagem LE de *S. mansoni* (70,0%), e totalmente resistente a linhagem SJ.

02 - *B. lenaxophila* do Vale do Paraíba do Sul, infecta-se facilmente com a linhagem simpátrica (SJ), apresentando uma taxa de infecção de 67,18%. Este molusco foi totalmente resistente a linhagem LE de *S. mansoni*.

03 - Não se obteve sucesso na infecção de *B. siraminea* de Picos (PI), com as linhagens LE e SJ de *S. mansoni*.

04 - A análise dos cortes histológicos mostrou que nos moluscos suscetíveis predominaram esporocistos primários íntegros, enquanto que em moluscos resistentes aos esporocistos na sua maioria se encontravam degenerados.

05 - Em *B. siraminea*, foram observadas reações amebocitárias exacerbadas e rápidas recuperações teciduais.

06 - Em *B. glabrata* (não infectada) a média de células amebocitárias circulantes na hemolinfa foi de 15,89 células / 0,1 mm<sup>3</sup>, sendo 11,79 (74,20%) de granulócitos e 4,1 (25,80%) de hialinócitos.

07 - Em *B. lenaxophila* (não infectada), a média de amebócitos circulantes foi de 15,38 células/0,1 mm<sup>3</sup>, sendo 11,18 (72,69%) de granulócitos e 4,74 (31,08%) de hialinócitos.

08 - Em *B. siraminea* (não infectada), a média de amebócitos circulantes foi de 16,77 células/0,1 mm<sup>3</sup>, sendo 11,4 (67,98%) de granulócitos e 5,37 (32,02%) de hialinócitos.

09 - Moluscos *E. glabrata* e *B. tenagophila* quando infectadas com a linhagem LE, não apresentaram diferenças significativas no número médio de células amebocitárias do tipo granulocítica, mas apresentaram diferenças significativas no número médio de hialinócitos.

10 - Em *B. straminea* infectadas com a linhagem SJ, observaram-se diferenças significativas no número médio de granulócitos, o mesmo não ocorrendo com os hialinócitos.

## B. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes: effect of *Schistosoma mansoni* infections in vitro phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, 35:241-248, 1980a.
- ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes assay of factors influencing in vitro phagocytosis. *J. Invert. Pathol.*, 36: 52-59, 1980b.
- ALENCAR, J. E. A schistosomose no Ceará. *Ceará Med.*, 20: 12-20, 1940.
- ALMEIDA MACHADO, P. The brazilian program of schistosomias control, 1975 - 1979. *Am. J. Tropo. Med. Hyg.*, 31: 86, 1982.
- ANDERSON, R. S & GOOD, R.A. Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes. *J. Invert. Pathol.*, 27: 57-64, 1976.
- ARANTES, A. Sobre dois casos de schistosomose autóctone em Santos. *Arq. Paul. Med. Cir.*, 14: 95-96, 1923.
- ARANTES, A. Onze casos autóctones de schistosomose em Santos. *Bol. Soc. Med. Circ. S. Paulo*, 7: 64-65, 1924.
- BARBOSA, F. S. & COELHO, M.V. Qualidade de vector dos hospedeiros de *Schistosoma mansoni* no Nordeste do Brasil. I. Suscetibilidade de *B. glabrata* e *B. centrimentalis* à infestação por *S. mansoni*. *Publ. Av. Inst. Aggeu Magalhães*, 3: 55-62, 1954.
- BARBOSA, F. S. & COELHO, M.V. Alguns aspectos epidemiológicos relacionados com a transmissão da esquistossomose em Pernambuco, Brasil. *Publ. Av. Inst. Aggeu Magalhães*, 5: 31-47, 1956.

- BARBOSA, F. S. Ecology of the larval parasitic stages of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 7: 112-120, 1965.
- BARBOSA, F. S. & FIGUEIREDO, T. Geographical distribution of the snail host of schistosomiasis mansoni in northeastern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo, 11: 285-289, 1969.
- BARBOSA, F. S. & FIGUEIREDO, T. Susceptibility of the snail intermediate hosts of schistosomiasis from northeastern Brazil to the infection with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop.* São Paulo, 12(3): 198-204, 1970.
- BARBOSA, F. S. Epidemiologia. In: CUNHA, A. S. Esquistosomose mansoni. Ed. USP, São Paulo, p. 31-59, 1970.
- BASCH, P. F. An interpretation of snail-trematode infection rates: specificity based on concordance of compatible phenotypes. *Int. J. Parasitol.*, 5: 449-452, 1975.
- BASTOS, O. C. ; SCHIAVOTELO, R. J. C. & RIBEIRO, M. L. J. F. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* do Estado de São Paulo à infecção por linhagens de *Schistosoma mansoni* da Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). *Rev. Saúde Publ.* São Paulo, 18: 355-358, 1984.
- BAYNE, C. J. ; BUCKLEY, P. M. & De WAN, P. C. Macrophagilike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocyst of *Schistosoma* in vitro. *J. Parasitol.*, 66: 413-419, 1980.
- BENEX, J. & JACOBELLI, G. Cellular immunity in molluscan hosts of *Schistosoma mansoni*: preliminary results relating to *Biomphalaria glabrata*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 73(2): 206-213, 1980.

- BORDA, C.E. & PELLEGRINO, J. Susceptibilidade de *Biomphalaria tenagophila* y *glabrata* a dos cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 18(3): 157-164, 1976.
- BROOKS, C.P. A comparative study of *Schistosoma mansoni* in *Tropicorbis havanensis* and *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, 39(2):159-165, 1953.
- CARVALHO, O.S.; SOUZA, C.P. & FIGUEIREDO, P.Z. Suscetibilidade de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1948) de Piripiri (Piauí, Brasil) a duas cepas de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. *Rev. Saúde Publ. São Paulo*, 14: 224-229, 1980.
- CHENG, T.C. & SNYDER, R.W. Studies on host parasite relationships between larval trematodes and theirs hosts. I. A review. II. The utilization of the hosts glicogen by the intramolluscan larvae of *Glypthelminis pennsylvaniensis* Cheng, and associated phenomena. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 81: 209-228, 1962.
- CHENG, T.C. Funcional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 266: 343-379, 1975.
- CHENG, T.C. & AULD, K.R. Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. *J. Invert. Pathol.*, 30: 119-122, 1977.
- CHENG, T.C. & GARRABRANT, 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.
- 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.
- CHENG, T.C. & MOHANDAS, A. Effect of high dosages of bacterial challenge on phosphatase release from *Biomphalaria glabrata*

- hemocytes. *J. Invert. Pathol.*, **45**: 236-241, 1985.
- CHIARI, L.; ARAUJO, S.M. & GUERRERO, J. Rapid method for helminth counts in tissue of small animal hosts. *Riv. di Parasitol.*, **38**(2/3): 329-332, 1977.
- CHIEFFI, P.P. Suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni*, de cepas de *Biomphalaria tenagophila* originárias dos Estados de São Paulo e Paraná. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **17**(2): 92-96, 1975.
- COELHO, M.V. Ação das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. *Publ. Av. Inst. Aggeu Magalhães*, **3**: 39-54, 1954.
- COELHO, M.V. Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. *Rev. Bras. Biol.*, **17**(3): 325-337, 1957.
- COELHO, M.V. Suscetibilidade de *Australorbis tenagophilus* à infecção por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **4**(5): 289-295, 1962.
- CODA, D.; FALCI, N. & MENDES, F.A.T. Contribuição para o estudo e a profilaxia da esquistossomose mansônica no Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **19**: 25-68, 1959.
- CORREA, R.R.; MURGEL, J.M.T.; PIZA, J.T.; RANOS, A.S.; DIAS, L.C.S.; MORAIS, L.V.C. & ROSÁRIO, F.F. Dispersão de *Biomphalaria straminea* hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni* através da distribuição de peixes. *Rev. Saúde Publ. São Paulo*, **4**: 117-127, 1970.
- CORREA, M.C.R.; COELHO, P.M.Z. & FREITAS, J.T. Suscetibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* (LE - Belo Horizonte, MG e



- SJ - São José dos Campos - SP). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **21**(2): 72-76, 1979.
- COUTINHO, J.O. Nota sobre a infestação experimental do *Australorbis nigricans* (Spix) do município de São Paulo pelo *Schistosoma mansoni*. *Arq. Pac. Hig. Saúde Publ.*, **10**: 61-64, 1956.
- CUBA CUBA, C. A. & CORREA, L.R. *Biomphalaria straminea* do Perú e sua suscetibilidade a cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Bras. Med. Trop.*, **11**(6): 195-203, 1977.
- DIAS, L.C.S.; EUTA, M.T. & GUARALDO, A.M.A. Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophia* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **29**(4): 205-212, 1987.
- DORVAL, M.E.C. suscetibilidade de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1948) de Três Lagoas, Estado do Mato Grosso do Sul, à infecção por *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. **Tese mestrado** apresentada ao Instituto Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1985.
- FILES, V.S. & CRAM, E.B. A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, **35**: 555-560, 1949.
- FRYER, S.E.; HULL, C.A. & BAYNE, C.J. Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate specificity of hemocytes receptors and plasma opsonin. *Rev. Comp. Immunol.*, **13**: 9-16, 1989.
- GERKEN, S.E.; ARAUJO, M.P.T. & FREITAS, J.P. suscetibilidade da *Biomphalaria straminea* da região de Lagoa Santa (MG) ao *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **17**(6): 338-343, 1975.

- GILBERTSON, D.E. & EYDES, F.G. Hemagglutinin in the haemolymph of planorbid snail. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 61: 144-147, 1967.
- 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 Publ. São Paulo*, 15: 436-448, 1981.
- HARRIS, K.R. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 266: 446-464, 1975.
- HOLLANDER, M. & WOLFE, D.A. Non parametric statistical methods. N.Y. S. Wiley & Sons., 1973.
- JEONG, K.H. & HEYNEMAN, D. Leukocytes of *Biomphalaria glabrata*: morphology and behavior of granulocytic cells vitro. *J. Invert. Pathol.*, 28: 357-362, 1976.
- JEONG, K.H.; LIE, K.J. & HEYNEMAN, D. The ultrastructure of the amoebocytes producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.*, 30: 217-228, 1988.
- JOURDANE, J. & CHENG, T.C. The two phase recognition process allografts in brasilian strain of *Biomphalaria glabrata*. *J. Invert. Pathol.*, 49: 145-158, 1987.
- KAGAN, I.G. & GEIGER, S.J. the susceptibility of tree strains of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni* from Brazil and Puerto Rico. *J. Parasitol.*, 51: 622, 1965.
- KASSIM, C.O. & RICHARDS, C.S. Host reaction in *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* miracidia involving variations in parasite the strains, numbers and sequences of exposures.

- Inv. J. Parasitol., 9: 565-570, 1970.
- LIE, K.J. ; HEYNEMAN, D. & YAO, P. The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol., 63: 574-576, 1975a.
- LIE, K.J.; JEONG, K.H. & HEYNEMAN, D. Tissue reaction induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. Ann. Trop. Med. parasitol., 72(2): 157-166, 1980.
- LOKER, E.S. & HERTEL, L.A. Alterations in *B. glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *E. paraensei*. J. Parasitol., 73: 503-513, 1987.
- LUCENA, D.T. Planorbídeos transmissores da esquistossomose no Nordeste do Brasil. J. Brasil Med., 8: 269-279, 1964.
- LUTZ, A. & PENNA, O. Estudos sobre a Schistosomatose no Norte do Brasil do Brasil, por uma comissão do Instituto Oswaldo Cruz. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 10(1): 83-94, 1918.
- LUTZ, A. Estudos de zoologia y parasitologia venezolanas. Rio de Janeiro, 1928. p. 133.
- MALDONADO, J.F. & ACOSTA-MATIENZO, J. The development of *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host *Australorbis glabratus*. Puerto Rico J. Hert. trop. med., 22: 331-373, 1947.
- NACHADO, S.M.F.; MAGALHÃES, L.A.; ARTIGAS, P.T.; CORDEIRO, N.S. & CARVALHO, J.F. Verificação de antagonismo entre larvas de *Schistosoma mansoni* e larvas de outro Digenea em *Biomphalaria tenagophila* molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP. Rev. Saúde Publ. São Paulo, 22(6): 484-488, 1988.
- MALEK, E.A. & CHENG, T.C. Medical and Economic Malacology. Acad. Press., Inc. New York, N.Y., 1974.

- MAGALHÃES, L.A. Moluscos planorbídeos do distrito Federal de Brasília. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade Estadual de Campinas - São Paulo, 1966.
- MAGALHÃES, L.A. Estudo do comportamento da cepa de *Schistosoma mansoni* de Brasília. *O Hospital*, 77(3): 273-282, 1970.
- MATRICON-GONDRAN, M.; JOKY, A. & BENEX, J. Responses of the amoebocytes producing organ (APO) in *Biomphalaria glabrata* susceptible or resistant to trematode invasion: an ultrastructural study. Poster Presentation, ISDCI Invest. Immunol. Conf., Berlin, 1986. *Dev. Comp. Immunol.*, in press.
- MICHELSON, E.H. & DUBOIS, L. Agglutinins and lysins in the molluscan family planorbidae: a survey of hemolymph egg masses and albumengland extracts. *Biol. Bull.*, 153: 219-227, 1977.
- NEWTON, W.L. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 38: 326-366, 1952.
- NEWTON, W.L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Expl. Parasitol.*, 2: 242-257, 1953.
- PAN, C.T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. *Bull. Mus. Comp. Zool., Harvard Univ.*, 119: 237-299, 1958.
- PAN, C.T. Generalized and focal tissue responses in the snail *Australorbis glabratus* infected with *Schistosoma mansoni*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 113: 447-485, 1963.
- PARAENSE, W.L. & CORREA, L.R. Susceptibility of *Australorbis*

- Lenagophilus to infection with Schistosoma mansoni. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5(1): 23-29, 1963.
- PARAENSE, W.L. In: CUNHA, A.S. Esquistossomose mansoni. Planorbídeos hospedeiros intermediários do Schistosoma mansoni. São Paulo, Ed. USP, 1970. p. 25.
- PARAENSE, W.L. In: Modernos conhecimentos sobre esquistossomose mansônica. Supl. *Anais Acad. Mineira Med.*, 1983, 1984, Belo Horizonte, vol. 14, 1986. p. 117.
- PELLEGRINO, J. KATZ, N. In: CUNHA, A.S. Esquistossomose mansoni. Terapêutica experimental. São Paulo, Ed. USP, 1970.p.435.
- PEMBERTON, R.T. Anti-A e Anti-B of gastropod origin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 234: 95-121, 1974.
- PIRAJÁ DA SILVA, M.A. Estudo sobre o Schistosoma mansoni. *Coletâneas de Trabalhos (1908-1916)*. Santos 1953.
- PIZA, J.T., RAMOS, A.S. & CAMARGO, L.V. Vale do Paraíba foco endêmico de esquistossomose. *Arq. Hig. Saúde Publ.*, 25: 35-40, 1960.
- RAMOS, A.S.; PIZA, J.T.; PINTO, G.H.; TION, T.; FLEURY, G.C.; MORAIS, L.V.C. & CAMPOS, L.L. Focos ativos de esquistossomose mansoni no Vale do Ribeira, Estado de São paulo, Brasil. *Rev. Saúde Publ. São Paulo*, 3(1): 59-65, 1969.
- REY, L. Contribuição para o conhecimento da morfologia, biologia e ecologia dos planorbídeos brasileiros transmissores da esquistossomose. *Serv. Nac. Educ. Sanit. Rio de Janeiro*, 13: 217, 1956.
- REY, L. *Parasitologia Ed. Guanabara - Koogan, Rio de Janeiro, 2a. ed., 1991.*

- REIS, S.M.P.O. Estudo da ação da hemolinfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - Campinas-SP, 1990.
- RICHARDS, C.S. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.*, 22: 748-756, 1973.
- SANTANA, J.V. Mecanismos de defesa em moluscos *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* frente ao *Schistosoma mansoni*. Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1990.
- SETA, L. Comportamento de amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni* a inoculação de tinta panquim ou a fratura da concha. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1990.
- SMINIA, T. & Van der KNAAP, W.P. W. Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev. Comp. Immunol.*, 11: 17-28, 1987.
- SOUZA, C.P.; RODRIGUES, M.B. & ARAUJO, N. Suscetibilidade de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) de Belo Horizonte (MG) à infecção por cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 23(5): 188-193, 1981a.
- SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN) Resumo da carta malacológica do Estado de São Paulo (Relatório). 1986.
- STANDEN, O.D. The effect of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 45: 235-2451, 1951.

- STUMPF, J.L. & GILBERTSON, D.E. Hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: factor affecting variability. *J. Invert. Pathol.* 32: 177-181, 1978.
- TELES, H.M.S. & VAZ, J.F. Distribuição de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (Pulmonata, Planorbidae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Ciência e Cultura*, 40(2): 173-176, 1988.
- TRIPP, M.R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, 47: 747-751, 1961.
- TRIPP, M.R. Hemagglutinin in the blood of the oyster *Crassostrea virginica*. *J. Invert. Pathol.*, 8: 478-484, 1966.
- TRIPP, M.R. Molluscan immunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 234: 23-27, 1974.
- Van der KNAAP & LOKER, E.S. Immune mechanisms in trematode snail interactions. *J. Parasitol. Today*, 6(6): 175-182, 1990.
- WAGGE, L.E. The activity of amoebocytes and alkaline phosphatase during the regeneration of wall of the snail *Helix aspersa*. *Quart. J. Microscop. Sci.*, 92: 307-321, 1951.
- WAGGE, L.E. Amoebocytes. *Int. Rev. Citol.*, 4: 31-78, 1955.
- WOLMARANS, C.T. & YSSEL, E. *Biomphalaria glabrata*: influence of selected abiotic factor on leukocytosis. *J. Invert. Pathol.*, 51, 10-14, 1988.
- WRIGHT, C.A. Snail susceptibility or trematode infectivity? *J. Nat. Hist.*, 8: 545-548, 1974.
- ZANOTTI, E.M. & MAGALHÃES, L.A. Criadouro natural de *Biomphalaria straminea* no município de Louveira, SP. In: REUNIÃO ANUAL DA

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 34,  
Campinas, SP, 1982 - Resumos, p. 810.