ANA MARIA APARECIDA GUARALDO

DESENVOLVIMENTO DOS ESPOROCISTOS DE *SCHISTOSOMA MANSONI* (SAMBON,1907) EM *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY,1818) E *BIOMPHALARIA TENAGOPHILA* (D'ORBIGNY,1835).

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Mestre.

ORIENTADOR:

PROF. DR. LUIZ AUGUSTO MAGALHÃES

Departamento de Parasitologia da Universidade Estadual de Campinas

Depto. de Microbiologia e Imunologia da Universidade Est. Campinas

- CAMPINAS -

São Paulo - Brasil

1979

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meus pais, Aldo e Olívia, que nunca deixaram me faltar alento na conquista de meus objetivos;

Às manas Lireny e Lenira e avó Maria, minha gratidão pelo apoio, compreensão e carinho.

A G R A D E C I M E N T O S

A execução deste trabalho foi possível mediante os recursos fornecidos pela Coordenação do Curso de Pós-graduação em Imunologia da UNICAMP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

Em nome da Coordenação do Curso de Pós-graduação em Imunologia, faço menção especial ao espírito de colaboração dos professores doutores Zeferino Vaz e Walter August Hadler, que sempre souberam atender prontamente as reivindicações propostas pela comissão coordenadora.

Minha gratidão ao Prof. Dr. Luiz Augusto Magalhães pela incansável dedicação e orientação segura, aliadas à amizade leal demonstrada em todos momentos de minha carreira.

Ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel minha admiração por alguns caracteres marcantes de sua personalidade que admito fundamentais para a prática da ciência : observação, perseverança, bom senso e humildade. Agradeço a oportunidade de conviver e aprender com eles.

Ao Prof. Dr. Paulo de Toledo Artigas manifesto meu profundo reconhecimento pela dedicação e espírito crítico com que analisou atenta e minuciosamente o manuscrito deste texto; suas proveitosas sugestões, indiscutivelmente, contribuíram para valorizar a apresentação deste documento.

À equipe do Depto. de Parasitologia da Unicamp sou grata pela afetuosa acolhida, e aproveito expressar meu orgulho em poder participar e conviver com as pessoas integrantes deste grupo.

À Profa. Dra. Marlene T. Ueta que me acompanhou atentamente em todos momentos desta pesquisa, agradeço o amparo de sua franca amizade, incentivos e críticas.

À Profa. Dra. Dária Repka meu reconhecimento pelo apoio e esclarecimentos prestados no decorrer deste trabalho.

À Profa. Gilda Pareja expresso meu agradecimento pela cuidadosa elaboração e execução do tratamento estatístico dos dados aqui apresentados.

À Sra. Cleuza dos Santos meu sincero reconhecimento pela inestimável cooperação e exaustivo auxílio prestado na montagem histológica das preparações utilizadas nesta pesquisa.

À Profa. Júlia Seiko Sakurada, pela enorme colaboração recebida na preparação das frações de Imunoglobulinas.

Agradeço a convivência com aqueles companheiros de trabalho que já se encontram distantes, de volta à terra natal, após adquirirem algum conhecimento de Imunologia nesta Universidade. Muito pude aprender com Othon, Raimundo, Valfrido e Carlos Henrique.

Aos colegas de pós-graduação, em particular à Eliana Maria Zanotti e Ajax Mercês Atta, expresso meu agradecimento pela compreensão, amizade, colaboração e incentivos.

A todos que puderam me acompanhar nesta jornada ou que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

pág.

I - INTRODUÇÃO 1

II- MATERIAL E MÉTODOS

II.1. Procedência dos animais 6

II.2. Exposição de *Biomphalaria glabrata* e de *Biomphalaria tenagophila* a miracídios das respectivas linhagens de *S. mansoni* 6

II.3. Infecção de moluscos com linhagens alopátricas de *S. mansoni* 7

II.4. Exame histológico dos moluscos 7

II.5. Determinação quantitativa de esporocistos primários em *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* 9

II.6. Infecção de *Mus musculus* albinos com cercárias procedentes de *B. glabrata* e *B. tenagophila* 9

II.7. Preparo de vermes para reações de imunofluorescência 9

II.8. Preparo de antígenos de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ 10

II.9. Obtenção de soros de coelhos anti- *S. mansoni* 11

II.10. Obtenção de imunoglobulina G de soro normal de coelho 11

II.11. Imunização de carneiro com imunoglobulina G de coelho 12

II.12. Titulação dos imune-soros de coelhos 12

II.13. Isolamento da fração globulínica do soro imune de carneiro 13

II.14. Preparação do conjugado de isotiocianato de fluoresceína-IgG de carneiro anti-IgG de coelho 14

II.15. Reações de imunofluorescência indireta 15

II.16. Análise estatística dos esporocistos primários BH e SJ de *S. mansoni* 17

III- RESULTADOS

III.1. Descrição dos esporocistos primários 20

III.2. Desempenho do hospedeiro intermediário frente aos esporocistos primários das linhagens BH e SJ de *S. mansoni* 22

III.3. Aspectos gerais da evolução dos esporocistos 39

III.4. Reações de imunofluorescência 48

IV- DISCUSSÃO 54

V- RESUMO E CONCLUSÕES 59

VI- APÊNDICE 62

VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64

I - INTRODUÇÃO.

Apesar da extensa investigação dos efeitos do parasitismo causado por *Schistosoma mansoni* SAMBON,1907 nos hospedeiros vertebrado e no invertebrado, pouca atenção tem sido dada pelos pesquisadores ao estudo das reações histopatológicas nestes últimos. Contudo, informes obtidos até o presente momento revelam importantes eventos decorrentes da interação de *S. mansoni* com *Biomphalaria glabrata* (SAY,1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'ORBIGNY,1835). Mediante estudos efetuados com estas espécies, alguns autores têm demonstrado que, nos exemplares suscetíveis à infecção, os esporocistos desenvolvem-se quase sem reação tecidual do molusco. Em caramujos resistentes, a destruição dos parasitas está frequentemente associada à encapsulação do organismo invasor por amebócitos. A incompatibilidade entre molusco e trematódeo traduz-se pela reação celular aos esporocistos reconhecidos como corpos estranhos (MALDONADO & ACOSTA-MATIENZO -1947[38]; FILES & CRAM - 1949[20]; NEWTON-1952[41], 1954[43]; BROOKS - 1953[4]; COELHO - 1954[12], 1957[13], 1962[14]; CHENG & SNYDER - 1962[10]; PAN - 1963[46], 1965[48]; TRIPP-1961[60], 1970[61], 1974[62]).

Experimentos, com a finalidade de estudar a infecção dos moluscos com linhagens alopátricas de *S. mansoni*, mostram que o sucesso do parasitismo parece depender basicamente da interação de fatores genéticos presentes nas populações do planorbídeo e do parasita.

A primeira evidência de que a suscetibilidade dos moluscos ao *S. mansoni* é condicionada por fatores genéticos foi fornecida por NEWTON (1953, 1954), testando uma colônia de *B. glabrata* de Salvador (BA) com linhagem portorriquenha do verme. Esta observação

foi possível mediante seleção de caramujos por autofecundação, empregando-se um mutante albino como marcador. Nessa ocasião, o autor também referiu-se à influência da idade do hospedeiro sobre a suscetibilidade. Tal hipótese foi confirmada, vinte anos depois, pelos trabalhos elaborados por RICHARDS (1973)[55], que provou a possibilidade de caramujos jovens suscetíveis tornarem-se resistentes quando adultos. Demonstrou ainda que o caráter resistência, adquirido na maturidade, é determinado por um único gene dominante, com herança mendeliana . RICHARDS & MERRITT[(54)], em 1972, utilizando a mesma colônia parental adotada por NEWTON, concluíram que a suscetibilidade de moluscos jovens é controlada por um complexo de quatro ou mais fatores, assinalando a presença de genes que condicionam a resistência também nos exemplares suscetíveis.

Por outro lado, os resultados de KAGAN & GEIGER(1965)[24] enfatizaram a importância da constituição genética do miracídio, atuando sobre a variação nos índices de infecção de *B. glabrata* albina.

Outro relevante ponto de vista foi assinalado por FILES & CRAM (1949)[20], que ressaltaram a complexidade das interrelações estabelecidas entre hospedeiro e parasita, no teste de suscetibilidade frente a diversas linhagens de *S. mansoni* , com caramujos provenientes da Libéria, Egito, Porto Rico, Venezuela e Brasil. Admitiram a existência de diferenças fisiológicas, intra e interespecíficas, entre os vermes de áreas endêmicas diferentes.

A necessidade de um ajuste fisiológico entre molusco e verme ficou bem demonstrada por PARAENSE & CORRÊA (1963b)[50], na constatação de que *S. mansoni* , adaptado à *B. glabrata* de Minas Gerais, apresentou resistência à infecção quando colocado frente a *B. tenagophila*

de São Paulo e vice-versa. Com base neste fato, demonstraram a existência de duas linhagens de *S. mansoni* : uma de Belo Horizonte(BH) que requer *B. glabrata* e outra de São José dos Campos (SJ), que requer *B. tenagophila*. Para cada espécie de hospedeiro, o índice de infecção seria condicionado pela variação na frequência de genes responsáveis pela suscetibilidade e resistência, presentes numa determinada população de molusco (PARAENSE & CORRÊA- 1963a)[49].

Outra abordagem deste problema foi aventada por MAGALHÃES (1966)[33] , ajustando uma interpretação alternativa, quanto à especificidade envolvida no complexo molusco-trematódeo; o autor acredita que a suscetibilidade ao esquistossomo representa a aptidão de um molusco com genótipo favorável, frente a um miracídio portador de genótipo pré-adaptado às suas condições. Nesta situação, o mesmo exemplar de caramujo pode não ser suscetível a outro miracídio pertencente à mesma população.

As implicações do raciocínio acima referido estendem-se ao campo da epidemiologia, pois fornecem subsídios que justificam a implantação da doença no Vale do Rio Paraíba do Sul (SP), região onde não se tinha registro de casos autóctones até 1956. Nesta época, *B. tenagophila* era reconhecida como responsável pela manutenção de focos ativos no Rio de Janeiro (DEANE & cols.-1953)[18], Niterói (MARTINS-1957),[39] Santos (MOURA-1945)[40] e outros pontos do litoral paulista.

Conforme o relato de PIZA & cols.(1959)[53], apesar das autoritárias sanitárias teram alertado sobre a presença de casos autóctones na região do Vale do Rio Paraíba do Sul (CORRÊA & cols. -1956)[15], não foi avaliada de imediato a grande importância epidemiológica deste achado, uma vez que o transmissor exclusivo da região, *B. tenagophila* , apresentava alto grau de resistência à infecção em laboratório (COELHO-1957)[13]. Prevaleceu então o conceito de que esta espécie não teria con-

dições para contribuir de maneira efetiva na disseminação da parasitose.

Infelizmente não foi o que ocorreu e a esquistossomose assumiu o caráter de doença profissional, imposta pelas circunstâncias propícias do ambiente, destacando-se, em particular, o tipo de irrigação adotada no cultivo de arroz. O constante contato dos lavradores com água contaminada e a presença de grande número de moluscos foram os fatores determinantes na indução de melhor ajuste entre hospedeiro e parasita. Só após muitos esforços, ficaram comprovadas a gravidade e a extensão do problema, numa área de grande expressão econômica.

Admitindo-se que o *S. mansoni* esteja em fase inicial de adaptação no Vale do Rio Paraíba do Sul, torna-se oportuno o estudo comparativo das linhagens BH e SJ, na tentativa de elucidar alguns fenômenos relacionados com a evolução do parasitismo.

Várias etapas deste estudo foram realizadas no laboratório do Depto. de Parasitologia da Universidade Estadual de Campinas. Destacamos alguns resultados obtidos em camundongos infectados experimentalmente com linhagens BH e SJ. Cercárias da linhagem mineira de *S. mansoni* apresentaram maior capacidade de penetração no tegumento de roedores, provocando uma patologia hepática mais severa do que aquela induzida pelo verme de São José dos Campos (MAGALHÃES & CARVALHO- 1969[34]; MAGALHÃES & CARVALHO- 1973a[35]; MAGALHÃES & cols. - 1975[37]; LEMOS NETO & cols.--1978[27]). Estudando a morfologia dos vermes adultos das linhagens BH e SJ, MAGALHÃES & CARVALHO (1973b)[36] verificaram diferenças significativas nas determinações de comprimento, na distância entre as ventosas oral e acetabular, assim como na distância entre a extremidade distal das gônadas e a parte anterior dos vermes. Ficou demonstrado ainda que o número de testículos de *S. mansoni* da linhagem mineira é superior ao apresenta

do pela linhagem paulista. Se realmente existe maior contribuição de uma das linhagens na evolução da patologia no hospedeiro definitivo, parece válida a suposição de que o comportamento no hospedeiro intermediário também possa apresentar características próprias.

Com base nestes fatos, pareceu-nos oportuno acompanhar o desenvolvimento dos esporocistos de ambas as linhagens nos respectivos hospedeiros simpátricos. A característica dominante nesta abordagem é a avaliação qualitativa e quantitativa dos esporocistos primários no decorrer da infecção.

Outro aspecto que constitue objeto de nosso estudo diz respeito à investigação de determinantes antigênicos comuns aos esporocistos e vermes adultos das duas linhagens, revelados pela técnica de imunofluorescência indireta. Mediante a aplicação desta metodologia, tentamos ainda estabelecer a época de aparecimento destes antígenos comuns no corpo do molusco.

II - MATERIAL E MÉTODOS.

II.1 - PROCEDÊNCIA DOS ANIMAIS.

Em todas as etapas do experimento foram utilizados moluscos, nascidos e criados no laboratório, pertencentes a duas espécies:

Biomphalaria glabrata albina, procedente de Belo Horizonte (MG).

Biomphalaria tenagophila melânica, procedente do Vale do Rio Paraíba do Sul, no estado de São Paulo.

Os exemplares destinados ao estudo histológico foram selecionados pelo diâmetro da concha (de 4 a 6 mm).

As linhagens de *S. mansoni* mantidas no laboratório para a realização deste trabalho são denominadas BH e SJ e se referem a populações de esquistossomos que se desenvolvem, respectivamente, em *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte e de *Biomphalaria tenagophila* de São José dos Campos.

Foi utilizado como hospedeiro definitivo *Mus musculus* albino, "Swiss", nascido e criado no biotério do Depto. de Parasitologia da UNICAMP.

Para testes sorológicos, foram utilizados coelhos e um carneiro. Este oferecido pela Estação Experimental do Instituto Biológico de Campinas; os coelhos foram fornecidos pelo biotério do Depto. de Parasitologia da Universidade.

II.2 - EXPOSIÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* E DE *Biomphalaria tenagophila* A MIRACÍDIOS DAS RESPECTIVAS LINHAGENS DE *S. mansoni*.

Os miracídios provieram de ovos colhidos no fígado de camundongos experimentalmente infectados. Foi feita a trituração do órgão em li-

quidificador e a suspensão passada em uma série de peneiras "granutest", com malhas de 0,149 mm, 0,074mm e 0,037 mm. Os planorbídeos destinados à observação histológica foram expostos, isoladamente, a 100 miracídios recém eclodidos, de acordo com o método proposto por STANDEN (1952)[59].

Para a manutenção do ciclo do verme e obtenção de esporocistos para reações de imunofluorescência, os moluscos de ambas as espécies foram expostos individualmente a 15 miracídios da linhagem simpátrica do trematódeo.

II.3 - INFECÇÃO DE MOLUSCOS COM LINHAGENS ALOPÁTRICAS DE S. mansoni.

Mantivemos em laboratório populações de *S. mansoni* das linhagens BH e SJ, utilizando moluscos autóctones selecionados geneticamente para o caráter suscetibilidade. A obtenção destas populações de moluscos suscetíveis a linhagens simpátricas foi possível mediante autofecundação em várias gerações sucessivas, conforme o método de SANTANA & cols. (1978)[56].

Exemplares da geração F_4 de *B. tenagophila* e da geração F_3 de *B. glabrata* foram utilizados para infecção alopátrica com 15 miracídios. Decorrido um tempo determinado (1 e 20 semanas) após o contato com as larvas, esses moluscos foram sacrificados, dissecados e seus órgãos incluídos em parafina para apreciação dos efeitos do parasitismo.

II.4 - EXAME HISTOLÓGICO DOS MOLUSCOS.

Caramujos destinados à observação em microscopia óptica comum foram sacrificados, visando a obtenção de diferentes estágios da evolução das larvas do esquistossomo. Para tanto, foram sacrificados caramujos

expostos à linhagem simpátrica ; grupos de moluscos eram sacrificados a intervalos semanais, desde a primeira até a oitava semana após a infecção.

Antes da fixação dos tecidos em Bouin alcoólico, cada planorbídeo era anestesiado com cristais de mentol em água, durante quatro horas e a concha cuidadosamente removida com pinça. O tempo máximo de fixação era de aproximadamente 2 horas. Antes da cada exemplar ser submetido à dissecção e posterior inclusão em parafina, o excesso de ácido pícrico era eliminado mediante lavagens sucessivas da peça em hidróxido de amônia 4/1000. Frequentemente procedeu-se dissecção na região cefalopodal , para a retirada do saco bucal com a rádula, visando-se evitar dano na navalha do micrótomo. Após inclusão em parafina, as peças foram cortadas em série,com 7 µm de espessura. Os métodos de coloração utilizados foram hematoxilina-eosina, tricrômico de Gomori e a reação de PAS.

Os moluscos parasitados, destinados a reações de imunofluorescência, foram sacrificados por imersão em fixador de Rossman (90 ml de álcool etílico 100%,saturado com ácido pícrico e 10 ml de formaldeído 37%). O tempo de fixação foi de aproximadamente 15 horas e o ácido pícrico também foi removido conforme descrito anteriormente. As peças foram incluídas em parafina. As preparações resultaram de cortes no micrótomo ajustado para 5 µm de espessura, sendo a montagem realizada em lâminas próprias para a observação no microscópio com lâmpada de mercúrio (UV).

Houve sempre o cuidado de se reservar lâminas para observação em microscopia óptica comum, após coloração pelo tricrômico de Gomori , técnica que nos ofereceu maior possibilidade de análise citológica.

Como controle dos experimentos,foram utilizados moluscos também nascidos em laboratório, porém não submetidos à infecção.

II.5 - DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM *Biomphalaria glabrata* E *Biomphalaria tenagohila*.

A avaliação quantitativa de esporocistos primários nos tecidos foi possível mediante o registro da incidência de cada uma das larvas na sequência dos cortes seriados. A continuidade da sequência de cortes foi observada prèviamente, pelo exame das preparações em microscópio estereoscópico (40X).

II.6 - INFECÇÃO DE *Mus musculus* ALBINOS COM CERCÁRIAS PROCEDENTES DE *B. glabrata* E *B. tenagophila*.

A técnica adotada para infecção de camundongos foi a estabelecida por PELLEGRINO & MACEDO (1955)[52], que recomendam a imersão parcial do roedor numa suspensão contendo aproximadamente 150 cercárias. Os animais foram deixados sob efeito de luz e calor conforme proposição de BRENER (1959)[3].

Decorridos aproximadamente 60 dias da data de infecção , os camundongos foram sacrificados para retirada de esquistossomos, através de perfusão da veia porta e vasos mesentéricos (YOLLES & cols.-1947)[63]. Foram perfundidos 360 camundongos, tendo sido colhidos, aproximadamente, 20.000 vermes.

II.7 - PREPARO DE VERMES PARA REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.

Os esquistossomos, recém colhidos, eram lavados em solução de cloreto de sódio 0,15 M, durante aproximadamente 1 hora e imediatamente mergulhados no fixador de Rossman, onde permaneciam, pelo menos,

15 horas. A seguir, era aplicado o mesmo tratamento descrito para obtenção de cortes histológicos de moluscos.

Adotou-se, também, outro tipo de preparação antigênica com esquistossomos liofilizados. Neste caso, após lavagem em solução fisiológica, os helmintos eram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e liofilizados.

II. 8- PREPARO DE ANTÍGENOS DE S. mansoni DAS LINHAGENS BH e SJ .

Os vermes adultos eram separados, levando em conta sexo e linhagem. Desta forma foram obtidos 4 variedades de antígenos: BHM, BHF, SJM e SJF, preparados com esquistossomos armazenados em congelador e liofilizados.

Foram produzidos dois tipos de antígenos : extratos salinos, para testes de imunodifusão em gel de ágar, segundo OUCHTERLONY (1958)[45] e antígeno bruto, para inoculação em coelhos.

A preparação de extratos salinos obedeceu a técnica preconizada por DAMIAN(1966)[17]; os vermes secos eram triturados em gral e suspensos em solução salina tamponada com fosfatos 0,02M pH 7,2. As suspensões eram mantidas durante 24 horas a 4°C, em agitação contínua. Posteriormente centrifugadas a 18000 G durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado em refrigerador. De cada extrato salino, era determinado o teor proteico pelo método de LOWRY & cols. (1951)[30].

Os antígenos brutos, utilizados para imunização de coelhos, foram preparados mediante a suspensão de esquistossomos em solução salina tamponada 0,02 M pH 7,0, misturados com adjuvante incompleto de Freund, na proporção de 1:1 (v/v).

II.9 - OBTENÇÃO DE SOROS DE COELHO ANTI - S. mansoni.

O esquema de imunização adotado foi o estabelecido por BASTOS & cols. (1978)[2], que recomendam inoculações do extrato bruto de *S. mansoni* em adjuvante incompleto de Freund. As duas primeiras injeções de 10 mg de verme seco foram feitas na vizinhança dos gânglios poplíteos de coelho, com intervalo de um mês ; após 15 dias, uma série de 3 injeções subcutâneas, de 5 mg, no dorso do animal, a intervalos semanais. Decorridos dez dias da última inoculação, os coelhos foram sangrados para obtenção de soro específico de cada uma das linhagens de esquistossomo.

Obedecendo este esquema, foram obtidas reações de Arthus positivas com 500 μg de proteína, dez semanas após a primeira inoculação. Nesta ocasião os antissoros revelaram "ring test" positivo tanto com o antígeno homólogo, como com antígenos heterólogos, nas concentrações de 1,0 , 0,5 e 0,25 mg de proteína/ml.

II.10 - OBTENÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G DE SORO NORMAL DE COELHO.

A fração globulínica do soro normal de coelho foi obtida pela precipitação com sulfato de amônia a 50% de saturação, conforme indicação de KABAT & MAYER (1971)[23]. A fração obtida foi cromatografada em DEAE celulose, equilibrada com tampão fosfato 0,02 M pH 8,0. Das frações eluídas, foi determinada a absorbância a 280 nm no espectrofotômetro. As amostras referentes ao pico principal eluído foram agrupadas e dialisadas contra água destilada antes da liofilização.

A avaliação da pureza do material obtido foi determinada por imunoeletroforese em gel de ágar, fazendo-se reagir a fração globulínica com soro de carneiro anti-soro total de coelho.

II.11 - IMUNIZAÇÃO DE CARNEIRO COM IMUNOGLOBULINA G DE COELHO.

No esquema de imunização escolhido, todas as inoculações da IgG foram feitas em adjuvante de Freund completo (V/V). Na primeira inoculação, foi administrado 1 ml por via subcutânea, contendo 10 mg de antígeno. Decorridas 5 semanas após a primeira dose, foram administradas 4 injeções intramusculares com intervalos de 3 semanas, contendo respectivamente, 15, 10 e 5 mg de proteína. Decorridos doze dias após a última inoculação, o carneiro foi sangrado para obtenção de soro imune.

A determinação do título de anticorpos no soro imune foi realizada pela imunodifusão dupla em agarose. A concentração de antígeno empregada foi de 100 μg de proteína/ml frente a diluições seriadas do antissoro, na razão 2. Nestas condições, observou-se reação de precipitação até a diluição 1:512. O soro devidamente liofilizado foi destinado ao isolamento da fração globulínica, para ser conjugada com isotiocianato de fluoresceína.

II.12 - TITULAÇÃO DOS IMUNE- SOROS DE COELHOS.

Para demonstração de anticorpos séricos induzidos pelo trematódeo, os antissoros de coelhos foram titulados por hemaglutinação indireta com o reagente da "BEHRING" para esquistossomose. Este tratamento também foi dado aos respectivos soros normais. A reação foi realizada em placas de micro-hemaglutinação, adotando-se diluições seriadas na ra-

zão 2, com valores que variaram desde 1:2 até 1:32.768. A leitura foi executada após 2 e 3 horas.

Os soros normais não apresentaram reação de aglutinação.

Os títulos obtidos, expressos pelo inverso da última diluição que apresentou reação de aglutinação, estão abaixo discriminados:

SORO	BHM	BHF	SJM	SJF
TÍTULO	2048	16.384	16.384	16.384

Foi também adotada a titulação pela imunodifusão dupla em gel de ágar, segundo OUCHTERLONY[45]. Os quatro tipos de soros foram testados com antígenos homólogos e heterólogos de vermes machos. O soro SJM foi o único a apresentar título de 1:4 com formação de 4 sistemas precipitantes. Os outros soros apresentaram título de 1:2, sendo que o número de sistemas precipitantes revelado foi 2 para BHF e 1 para os soros BHM e SJF.

II.13 - ISOLAMENTO DA FRAÇÃO GLOBULÍNICA DO SORO IMUNE DE CARNEIRO.

A purificação do antissoro de carneiro foi obtida mediante cromatografia em coluna de DE-52 celulose (3,0 x 40,0 cm), a partir de 50 ml de soro contendo 4,2 g de proteína. A eluição das frações foi efetuada em gradiente de pH e força iônica de acordo com técnica proposta por ESTEVES & cols. (1974)[19].

As frações eluídas com tampão fosfato 0,04 M pH 6,0, referentes ao terceiro pico, foram reunidas e dialisadas contra água destilada antes da liofilização. A absorbância deste "pool" foi registrada a 280 nm em espectrofotômetro Zeiss PMQ III, em cubas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico.

A avaliação da pureza das amostras foi efetuada por eletroforese em acetato de celulose. Tampão veronal sódico 0,05M pH8,6 e volta-

gem constante de 250 v(4mA/fita) durante 45 minutos, foram as condições de forese. Também foi adotada a imunoeletroforese em gel de ágar, aplicando-se uma d.d.p. de 5,0 v/cm durante 90 minutos e devidamente revelada com soro de coelho imunizado com soro total de carneiro.

II.14 - PREPARAÇÃO DO CONJUGADO DE ISOTIOCIANATO DE FLUORESCEÍNA IgG DE CARNEIRO ANTI- IgG DE COELHO.

A concentração proteica da fração globulínica do soro de carneiro foi ajustada para 14,0 mg/ml, com tampão carbonato 10% pH9,5. Sob agitação contínua, foi adicionado isotiocianato de fluoresceína numa proporção de 20 ug/mg de IgG, partindo-se de uma solução de fluorocromo, contendo 1,0 mg/ml dissolvida no mesmo tampão.Após a adição da fluoresceína, o pH foi ajustado para 9,3 com tampão carbonato e a reação se processou sob o abrigo da luz, durante 90 minutos, com agitação branda em banho de gelo. Decorrido este tempo, a mistura foi centrifugada durante 30 minutos a 18000G em centrífuga refrigerada.

A retirada do fluorocromo livre foi obtida mediante a cromatografia em coluna de Sephadex G-25 (33,0 x 1,2 cm), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,2 . Foi utilizada amostra de 9,0 ml contendo 14 mg de proteína/ml. Foram recolhidas frações de 1 ml, em frascos escuros.

Das frações eluídas, foram determinadas as densidades ópticas para proteína a 280 nm e para fluoresceína a 490 e 320 nm. A concentração proteica do conjugado foi determinada com o uso do reativo de biureto, empregando-se comprimento de onda de 560 nm.

Para a estimativa da relação fluoresceína/proteína(F/P), o conteúdo da fluoresceína foi medido em microgramos/ml, utilizando -se o diacetato de fluoresceína (FDA), como padrão e hidróxido de sódio 0,1M como diluente . Esta solução padrão continha 1 μg de FDA/ml (McKINNEY & cols. -1964)[32]. Os valores de densidade óptica a 490 e 320 encontrados para a solução padrão de FDA foram os seguintes:

Solução padrão de FDA contendo 1 μg/ml - DO_{490} = 0,245 ; DO_{320}= 0,21.

Conjugado diluído 30 vêzes (DO_{280}= 0,52) - DO_{490} = 0,260 ; DO_{320}= 0,076.

O cálculo da concentração em μg de fluoresceína contida no conjugado foi feito com a aplicação da seguinte operação:

$$\text{Fluoresceína } (\mu g) = \frac{\text{DO corrigida do conjugado}}{\text{DO corrigida da FDA}} \times \text{diluição do conj.} \times 0{,}937$$

A densidade óptica corrigida resulta do desconto da absorção irrelevante, cujo valor equivale à subtração da metade do valor da DO_{320} do valor obtido a 490 nm.

Considerando-se então a relação F/P, tomando-se o peso molecular da fluoresceína como 389 e da imunoglobulina como 150 000, tem-se:

$$F/P = \frac{\mu g \text{ de fluoresceína}}{\mu g \text{ de proteína}} \times \frac{150\ 000}{389} = 1{,}8$$

II.15 - REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.

Para o emprego dos antissoros de coelho na imunofluorescência, foi feita prèviamente uma titulação em bloco, a fim de selecionar condições adequadas para a marcação dos esporocistos. As diluições 1/30 e 1/8, respectivamente do conjugado e soros imunes, foram consideradas excelentes e esta condição também foi mantida para outros preparados antigênicos. Não foi do nosso interesse, nesta técnica, quantificar os anticorpos.

Foram adotadas cinco categorias de preparações antigênicas:

1- cercárias livres, fixadas em formol 0,5%.

2- esquistossomos de ambos os sexos, liofilizados.

3- esquistossomos de ambos os sexos, incluídos em parafina.

4- esporocistos primários e secundários, em cortes histológicos.

5- esporocistos primários e secundários, dissecados vivos e aderidos em lâmina por fixação em acetona.

Apenas as preparações 1 e 2 tiveram as reações executadas em tubo de ensaio.

As preparações antigênicas, em cortes histológicos, sofreram desparafinização para receber o soro imune descomplementado, na diluição 1/8.

Esta etapa foi cumprida à temperatura ambiente, em câmara úmida, durante 45 minutos. Após três lavagens sucessivas com PBS (solução salina tamponada com fosfatos 0,01 M pH 7,2), empregando-se dois minutos em cada lavagem, os cortes foram tratados durante 45 minutos com conjugado fluorescente. Este conjugado foi diluído ao trigésimo, com PBS contendo azul de Evans na concentração final de 1:10 000 (FRY & WILKINSON- 1963)[21]. A reação foi executada no escuro, a 37°C. Após a devida remoção do excesso de conjugado, todas as lâminas foram montadas em glicerina alcalina tamponada.

Os controles utilizados foram os seguintes:

1 - apenas tampão;

2 - apenas conjugado;

3- soro normal de coelho + conjugado;

4- inibição da fluorescência : soro imune de coelho + anti-imunoglobulina não fluorescente + conjugado;

5- tratamento de tecido de molusco não infectado.

A avaliação da especificidade da reação antígeno-anticorpo foi possível mediante a absorção dos imune-soros com vermes liofilizados por incubação da mistura antígeno-anticorpo durante 18 horas em refrigerador (4°C).

Também foi necessária a absorção dos soros de coelhos com tecidos de moluscos não parasitados. Esta absorção foi feita com hepatopâncreas e ovotestis liofilizados e a proporção adotada de soro para antígeno, foi de aproximadamente 2:1. Após 18 horas de reação a 4°C, a preparação era centrifugada a 755 G durante 20 minutos.

O resultado da fluorescência foi obtido mediante a leitura das reações no microscópio com lâmpada de mercúrio (UV).

II.16 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS BH e SJ DE S. mansoni.

Este estudo teve como objetivo primordial a determinação de possíveis diferenças qualitativas e quantitativas dos esporocistos primários, presentes nos diferentes períodos da infecção nas duas espécies de molusco.

Os dados da observação de cortes histológicos encontram-se dispostos nas Tabelas I e II, referentes à distribuição das três categorias de esporocistos (íntegros, degenerados e acelulares) nos diferentes órgãos dos caramujos. Na Tab. II anotamos os valores médios dos esporocistos íntegros (EI), degenerados (ED) e totais (ET), das duas espécies, nos vários períodos do desenvolvimento larvário.

Para comparar numericamente a condição dos esporocistos BH e SJ adotamos o teste não paramétrico para duas amostras (rank-test

de WILCOXON ou de MANN-WHITNEY). A distribuição das larvas nos órgãos do hospedeiro foi avaliada mediante a aplicação do teste de FRIEDMAN (SNEDECOR & COCHRAN - 1967)[58].

A primeira semana de infecção foi alvo de estudo mais detalhado, em virtude deste período ser considerado por nós como decisivo para a determinação do destino do parasito. A Tab. IV foi organizada com os dados da primeira semana da infecção. Nela, comparamos as médias de cada categoria de esporocistos, incluindo aqueles acelulares na modalidade dos degenerados. No anexo I consta a análise de tais parasitas neste período, pelo teste de WILCOXON.

Agrupamos as observações referentes aos seguintes períodos de pós-infecção: dias 2 e 3, dias 5, 6 e 7 , com a finalidade de avaliar o comportamento das larvas, aplicando-se o teste de WILCOXON (anexos II e III). Quanto à observação do primeiro dia, a análise não foi efetuada, devido ao insuficiente número de caramujos examinados. Os testes correspondentes aos dias 14, 21 e 35 a 70 de evolução do parasitismo encontram-se respectivamente, nos anexos IV, V e VI. Não efetuamos o teste da quarta semana de infecção por ser pequeno o número de exemplares examinados.

Outro tipo de análise se refere à comparação de larvas, considerando-se a localização dos esporocistos primários no decorrer da primeira semana de desenvolvimento. Os dados encontram-se dispostos na Tab. IV.A análise foi feita separadamente para cada categoria de esporocisto(Tabs. V, VI e VII). Os órgãos parasitados, considerados nesta análise, foram codificados segundo a anotação especificada:

(1)- cabeça;

(2)- tentáculos e base do tentáculo ;

(3)- pé ;

(4)- colar do manto;

(5)- manto ;

(6)- outros órgãos.

O ítem "outros órgãos" foi criado para facilitar o manuseio de dados, levando em conta ser insignificante a incidência de esporocistos em órgãos que não os enumerados anteriormente.

A Tab. V refere-se ao teste de FRIEDMAN para esporocistos primários totais das duas espécies, levando-se em consideração a localização das larvas na primeira semana de evolução. A mesma análise para as larvas íntegras está registrada na Tab. VI ; os valores expressos na Tab. VII correspondem a larvas degeneradas.

III - RESULTADOS.

III.1 - DESCRIÇÃO DOS ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS.

Esporocisto primário é a designação que vários autores adotam para miracídios já desprovidos de cílios e que tenham ingressado no tecido do molusco há pelo menos 24 horas.

No decorrer de nossas observações, constatamos particularidades morfológicas nos esporocistos primários, aproveitadas na classificação destas larvas, de acordo com o critério abaixo mencionado:

ESPOROCISTO PRIMÁRIO ÍNTEGRO.

Característica notável do esporocisto primário íntegro é a ausência de infiltração de amebócitos em torno da larva.

A conformação do esporocisto primário, com um dia de vida ajusta-se a do esporocisto secundário descrito na Fig.13. As células presentes no esporocisto primário são de duas categorias: células somáticas e células germinativas (CHENG & BIER- 1972)[11]. Nesta modalidade de larva, as células somáticas apresentam-se arredondadas, com tamanhos diversos, citoplasma discretamente basófilo, contendo finas granulações também basófilas dispostas predominantemente junto da membrana externa. O núcleo das células é único e geralmente central, arredondado, com volume ocupando aproximadamente 1/4 do volume celular e nucléolo às vêzes proeminente (Fig. 1). O núcleo das células germinativas apresenta-se vesicular e o citoplasma muito rico em granulações. Células somáticas e germinativas apresentam-se, desde o primeiro dia, envoltas por uma membrana polissacarídica, demonstrável em reação citoquímica pe

lo PAS (Fig. 8).Em um esporocisto primário, observou-se a presença de uma única fileira de células germinativas junto à membrana externa da larva, simulando um epitélio germinativo (Fig.1). Esta membrana parece ser remanescência da parede do miracídio. Na microscopia óptica comum não visualizamos musculatura na parede do esporocisto; este fato explicaria a ausência de locomoção da larva. Convém ressaltar que a musculatura no esporocisto secundário é razoavelmente desenvolvida e o tegumento dotado de pequenos espículos (Fig.9).

ESPOROCISTO PRIMÁRIO DEGENERADO (celular e acelular).

As células esporocísticas em degeneração, em sua maioria, apresentam núcleo picnótico. O citoplasma destas células passa a ser eosinofílico e os grânulos citoplasmáticos tendem a se agruparem(Figs. 2 e 16).

Os amebócitos concentram-se em grande número em torno da larva em degeneração, com o fim aparente de isolar o tecido adjacente. O núcleo dos amebócitos, assim como seu citoplasma, alonga-se, simulando o aspecto de uma fibra semelhante ao fibroblasto (Figs. 2 , 15 e 16). Esta modificações amebocitárias ocorrem quando as células de defesa estão em íntimo contato com a larva. No citoplasma destas células fagocitárias surgem granulações eosinofílicas, talvez produto de secreção.

Quando se trata de infecções antigas, torna-se difícil afirmar se a disposição assumida pelos amebócitos seja decorrência de reação em torno de larva em processo de desintegração ou de outro corpo estranho, pois as células esporocísticas alteram-se e na maior parte dos casos, desaparecem. Por isso, propomos uma terceira categoria

de esporocistos que denominamos ACELULARES. Esta condição larvar apresenta-se sob duas formas, dependentes do grau de degeneração. Quando as larvas encontram-se ainda em processo ativo de degeneração, as células esporocísticas perdem suas características normais para tornarem-se granulosas e eosinofílicas, ficando reduzidas a simples massa amorfa envolta por uma coroa de amebócitos. Quando as larvas estão em adiantado estágio degenerativo, restam apenas amebócitos envolvendo uma região, que aos poucos fica preenchida por tecido do tipo conjuntivo, notando-se , porém, alguns vacúolos no local que, supostamente, era ocupado pela larva (Fig. 2).

III. 2 - DESEMPENHO DO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO FRENTE AOS ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS DAS LINHAGENS BH e SJ DE S. mansoni.

Verificamos que, em 15,15% dos casos, *B. tenagophila* mostrou-se capaz de destruir a totalidade dos esporocistos primários durante a primeira semana de infecção. Nos exemplares nos quais não foi sustada a infecção, 81,8% dos esporocistos tornaram-se degenerados; neste caso, 27% dos esporocistos eram acelulares. O comportamento de *B. glabrata* apresentou-se completamente diferente, pois, ao final da primeira semana, a totalidade dos moluscos era portadora de larvas viáveis, ao lado de 32,6% de esporocistos em vias de degeneração.

Parece lícito supor que o molusco paulista, resistente à infecção, seja capaz de dar origem a maior número de amebócitos, ou que estas células possuam maior capacidade de agressão. Não se pode, também, excluir a possibilidade da larva da linhagem SJ atrair maior número de células de defesa do hospedeiro. Deve-se levar em consideração, ainda ,

que o sucesso do desenvolvimento dos miracídios no hospedeiro intermediário depende, além de fatores ambientes, daqueles relacionados com padrões genéticos que possibilitem um ajustamento fisiológico entre molusco e trematódeo.

Nos experimentos efetuados com infecções alopátricas, utilizando-se moluscos geneticamente selecionados para o caráter suscetibilidade, não detetamos reações amebocitárias em torno de esporocistos primários e secundários. Mesmo em infecções antigas, examinadas após 155 dias da exposição aos miracídios, não registramos presença de esporocistos degenerados. O sucesso da infecção alopátrica, em planorbídeos geneticamente selecionados, reforça a hipótese de que os moluscos deixam de reconhecer a larva alopátrica como estranha. Este fato ocorre tanto em *B. glabrata* como em *B. tenagophila* . Por outro lado , a resistência adquirida por seleção também se mantém para a linhagem alopátrica de *S. mansoni*.

Não dispomos de dados quantitativos sobre a evolução cronológica na infecção alopátrica; entretanto observamos que as larvas do trematódeo apresentam, anatomicamente, o mesmo desenvolvimento observado nas infecções simpátricas. Além disso, a infecção tende a ser mais duradoura em virtude da maior sobrevivência do molusco suscetível parasitado.

Não consideramos em nosso estudo o índice de penetração dos miracídios; não obstante, é possível reconhecer que a destruição das larvas ocorre principalmente nos três primeiros dias de pós-infecção (Tabs. I e II). Neste estágio podemos determinar a condição dos esporocistos primários e ainda detetamos a totalidade de larvas que atingiram

os tecidos, incluindo aquelas que estão sendo absorvidas. Neste período, em 8 planorbídeos infectados com a linhagem BH, observou-se que, dos 800 miracídios sujeitos aos moluscos, foram encontrados apenas 298 nos tecidos, o que acarretou uma taxa de penetração equivalente a 37,25% para a linhagem mineira. Observamos que 29,5% dos miracídios da linhagem BH apresentaram-se degenerados. Portanto, o número de larvas BH que parece garantir o sucesso da infecção em *B. glabrata* corresponde a 70,5% do total encontrado nos tecidos.

Aplicando-se o mesmo raciocínio para *B. tenagophila*, parasitada por *S. mansoni* da linhagem SJ, em 7 exemplares examinados neste período(Tab. II), o índice de penetração de miracídios foi de apenas 17,4%, sendo que 98,4% dos esporocistos primários apresentaram-se degenerados,ou seja, a infecção é garantida por 1,6% das larvas presentes em *B. tenagophila*.

Na análise estatística efetuada com esporocistos primários e relacionada com o comportamento destes, no decorrer da primeira semana, verificamos que os valores médios para esporocistos íntegros e totais foram significativamente maiores em *B. glabrata* do que em *B. tenagophila* , ao nível de 1%. Na linhagem SJ, o número de esporocistos degenerados e acelulares, durante o mesmo período, mostrou-se significativamente maior em relação à linhagem BH(Anexo I).

Para melhor enfoque da verificação, apresentamos o diagrama das médias de esporocistos primários das 3 categorias, de ambas linhagens (Fig.3). Os resultados a que chegamos, pela análise de dados nos demais períodos especificados no gráfico, não revelaram modificação substancial com relação aos encontrados na análise conjunta dos dados dos primeiros sete dias de evolução do parasito (Anexos II e III).

Observando-se o Anexo IV, verifica-se que, duas semanas após a infecção, não há diferença significativa entre as modalidades de esporocistos primários nas duas espécies . Na terceira semana, a diferença entre esporocistos íntegros e totais, de ambas as linhagens, foi significativa ao nível de 1%, apresentando-se maior na linhagem BH (Anexo V).

No último período analisado, isto é, o compreendido entre o 35º ao 70º dia após a infecção, encontramos maior média numérica de esporocistos primários em *B. glabrata;* esta diferença é consequência da presença de maior número de esporocistos degenerados, conforme os valores dispostos no Anexo VI. Tal acontecimento explica-se pelo fato de que, neste período, os esporocistos precocemente degenerados em *B. tenagophila* já tinham sido absorvidos.

Quanto à distribuição dos esporocistos primários nos diferentes órgãos, no decurso da primeira semana de infecção, verificou-se que eles se localizam em número decrescente nos órgãos que relacionamos a seguir, na ordem de frequência de parasitos:

pé;

cabeça;

tentáculos;

colar do manto;

manto;

outras regiões.

O órgão mais atingido pelo parasito é o pé, fato que parece confirmar que a tendência da larva é a de penetrar na área de maior superfície e mais exposta do molusco, permanecendo aí definitivamente. A permanência dos esporocistos primários na região de penetração pode perdu

rar várias semanas, possivelmente até que se esgote a sua capacidade reprodutiva. Mesmo em moluscos suscetíveis, observa-se de modo geral, processo degenerativo parcial ou total nos esporocistos primários mais antigos, ainda contendo esporocistos secundários em seu interior, particularmente após a 7º semana de infecção.

Quando comparamos a distribuição de esporocistos íntegros e degenerados por órgão, os resultados superpõem-se aos obtidos quando se considera a totalidade de esporocistos. Tal verificação permite concluir que não há, de modo específico, um órgão que ofereça melhor condição para o desenvolvimento do esporocisto primário e, por conseguinte, os diferentes órgãos comportam-se de igual maneira com relação aos esporocistos primários, durante a primeira semana de evolução (Fig. 4).

Foi feita tentativa para determinação de uma função matemática capaz de expressar a correlação fornecida pelo número de esporocistos primários (íntegros e degenerados) e tempo de infecção, para cada linhagem de esquistossomo. Do ponto de vista estatístico, pareceria que a hipérbole seria a representação mais compatível com o fenômeno biológico. Entretanto, o ajuste hiperbólico mostrou-se insatisfatório, comprovando apenas que existe regressão com o decorrer do tempo, nas duas espécies de molusco. Tentamos ajustar uma curva exponencial e o resultado foi desfavorável, devido à grande dispersão dos dados e do pequeno número de observações disponíveis em cada período de infecção.

Ressaltamos , entretanto, que ao final de uma semana após a exposição aos miracídios, *B. tenagophila* apresentou 59% dos esporocistos degenerados, enquanto que *B. glabrata* mostrou apenas 11,8% de formas degeneradas.

TAB. I - DISTRIBUIÇÃO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM 36 EXEMPLARES DE *Biomphalaria glabrata* EXPOSTOS INDIVIDUALMENTE A 100 MIRACÍDIOS DA LINHAGEM BH DE *Schistosoma mansoni* (I = esporocistos íntegros ; D = esporocistos degenerados ; T = esporocistos totais ; A = esporocistos acelulares)

Nº do molusco	tempo de infecção (dias)	CABEÇA				TENTÁCULO				PÉ				COLAR MANTO				MANTO				OUTROS				TOTAL ESPOROCISTO			
		I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T
1	1	1	11	-	12	6	3	-	9	1	11	-	12	-	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	8	28	-	36
2	1	4	5	-	9	1	8	-	9	14	9	-	23	-	-	-	-	-	4	-	4	1	-	-	1	20	26	-	46
3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	28	1	-	29	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	29	1	-	30
4	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	21
6	2	5	-	-	5	1	-	-	1	29	5	-	34	8	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	43	5	-	48
7	2	6	-	-	6	-	-	-	-	42	1	-	43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	48	1	-	49
8	2	15	-	-	15	-	-	-	-	17	-	-	17	6	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	38	-	-	38
9	3	-	7	-	7	3	7	-	10	-	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	27	-	30
10	6	2	-	-	2	4	2	-	6	7	1	-	8	5	3	-	8	-	-	-	-	2	-	-	2	20	6	-	26
11	6	-	1	-	1	1	2	-	3	-	5	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	8	-	9
12	7	5	1	-	6	8	-	-	8	35	31	-	66	-	-	-	-	5	-	-	5	-	4	-	4	53	36	-	89
13	14	-	-	-	-	2	-	-	2	1	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	1	4
14	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TAB. I - continuação

Nº do molusco	tempo de infecção (dias)	CABEÇA				TENTÁCULO				PÉ				COLAR MANTO				MANTO				OUTROS				TOTAL ESPORO CISTOS			
		I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T
17	21	-	-	-	-	2	-	-	2	1	2	-	3	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	-	1	5	2	-	7
18	21	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2
19	21	-	1	-	1	3	1	-	4	1	-	-	1	-	-	-	-	2	1	-	3	1	-	-	1	6	3	-	9
20	21	-	-	-	-	4	-	-	4	3	-	-	3	-	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	7	2	-	9
21	21	1	-	-	1	4	-	-	4	2	1	-	3	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	1	8	-	9
22	21	2	-	-	2	2	-	-	2	3	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	7
23	21	3	-	-	3	2	-	-	2	4	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	9
24	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	27	1	-	-	1	1	-	-	1	1	1	-	2	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	5
26	27	1	-	-	1	3	-	-	3	1	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	6	-	-	6
27	27	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	12	1	-	13
28	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	27	-	-	3	3	-	-	-	-	-	3	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	4	7
30	40	-	1	-	1	-	-	-	-	1	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2	2	-	4
31	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	49	3	1	-	4	1	2	-	3	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	4	-	8
33	49	-	1	-	1	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	-	5	-	5
34	49	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-	3
35	49	1	7	-	8	4	4	-	8	2	11	1	14	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	8	22	1	31
36	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	1	-	-	1	1	2	-	3

TAB. II - DISTRIBUIÇÃO DE ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS EM 63 EXEMPLARES DE *Biomphalaria tenagophila* EXPOSTOS INDIVIDUALMENTE A 100 MIRACÍDIOS DA LINHAGEM SJ DE *Schistosoma mansoni* (I = esporocistos íntegros ; D = esporocistos degenerados; (T = esporocistos totais ; A = esporocistos acelulares).

Nº do molusco	tempo de infecção (dias)	CABEÇA				TENTÁCULO				PÉ				COLAR MANTO				MANTO				OUTROS				TOTAL ESPOROCISTOS			
		I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T
1	1	-	6	-	6	-	3	-	3	-	39	-	39	-	26	-	26	-	-	-	-	-	2	-	2	-	76	-	76
2	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
4	1	-	2	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
5	3	-	1	-	1	1	5	-	6	1	31	-	32	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	2	39	-	41
6	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
8	5	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
9	5	-	-	-	-	-	1	-	1	-	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4
10	5	2	-	-	2	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	-	3
11	5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5	0	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5	-	6
12	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	5	-	-	-	-	-	2	-	2	-	9	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	11
14	5	-	-	-	-	-	-	1	1	-	3	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	5
15	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	6	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
17	6	1	-	-	1	-	-	-	-	10	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	11
18	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	7	-	1	-	1	-	-	-	-	-	7	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	8

TAB. II (continuação)

Nº do molusco	tempo de infecção (dias)	CABEÇA				TENTÁCULO				PÉ				COLAR		MANTO		MANTO				OUTROS				TOTAL ESPOROCISTOS			
		I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T
20	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12
21	7	2	11	-	13	2	5	-	7	1	11	4	16	2	4	-	6	1	9	3	13	1	12	-	13	9	52	7	68
22	7	-	4	-	4	-	-	-	-	-	13	-	13	-	-	-	-	-	10	1	11	-	3	-	3	-	30	1	31
23	7	-	1	1	2	-	-	-	-	-	1	1	2	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	5
24	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	7	1	-	-	1	10	3	-	13	25	10	-	35	2	2	-	4	-	-	-	-	-	1	-	1	38	16	-	54
26	7	4	-	-	4	3	3	-	6	5	6	-	11	4	-	-	4	6	9	1	16	2	-	1	3	24	18	2	44
27	7	-	8	-	8	-	6	-	6	-	2	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	2	18
28	7	1	-	2	3	-	-	4	4	1	-	9	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	0	16	18
29	7	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	6	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	7
30	7	-	-	-	-	6	-	1	7	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	2	8
31	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	3
32	7	-	4	-	4	-	3	-	3	-	6	64	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	64	77
33	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	1	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	1	9
34	14	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	10	10	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	12
35	14	4	-	-	4	4	-	-	4	7	-	-	7	1	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	1	18	-	-	18
36	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	9	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	2	9	11
37	14	-	-	-	-	-	1	1	2	-	2	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	5
38	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
39	14	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1

TAB. II (continuação)

Nº do molusco	tempo de infecção (dias)	CABEÇA				TENTÁCULO				PÉ				COLAR MANTO				MANTO				OUTROS				TOTAL ESP.			
		I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T	I	D	A	T
40	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	14	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	7
42	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	21	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
47	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2
48	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	27	3	-	-	3	2	-	-	2	16	-	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	-	-	21
52	27	-	-	-	-	5	-	-	5	1	3	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	3	-	9
53	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	35	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	3
56	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	35	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2	-	-	2	-	1	-	1	-	-	-	-	3	1	-	4
58	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
59	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	-	3	3
60	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
61	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	5	9	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	5	5	10
62	42	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	2
63	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1

TAB. III - Média de esporocistos primários íntegros (EI), degenerados (ED) e totais (ET) encontrados nos diferentes períodos da infecção em *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*.

Dias após exposição	espécie	Número de moluscos examinados	EI	ED	ET
1	*B. glabrata*	2	14,0	27,0	41,0
	B. tenagophila	4	0,0	20,0	20,0
2 e 3	*B. glabrata*	7	26,1	4,9	31,0
	B. tenagophila	3	0,7	13,3	14,0
5,6 e 7	*B. glabrata*	3	24,7	16,7	41,4
	B. tenagophila	26	3,6	11,9	15,5
14	*B. glabrata*	4	0,8	0,3	1,1
	B. tenagophila	12	2,2	2,4	4,6
21	*B. glabrata*	7	5,1	2,3	7,4
	B. tenagophila	5	0,2	0,4	0,6
27	*B. glabrata*	6	3,7	1,5	5,2
	B. tenagophila	2*	13,5	1,5	15,0
35 a 70	*B. glabrata*	7	4,0	5,6	9,6
	B. tenagophila	11	0,7	1,4	2,1

*possivelmente, dois moluscos deste grupo eram suscetíveis, o que tornou a média relativamente maior nesta espécie, 27 dias após infecção.

TAB. IV - Média dos esporocistos primários íntegros e degenerados em *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* em diversas localizações no decorrer da primeira semana de evolução do *S. mansoni*.

categoria do esporocisto	espécie do molusco	LOCALIZAÇÕES cabeça	tentáculos	pé	colar do manto	manto	outras	Nº TOTAL
ÍNTEGRO	*B. glabrata*	*3,17*	*2,00*	*16,25*	*1,67*	*0,42*	*0,25*	*285*
	B. tenagophila	*0,33*	*0,70*	*1,33*	*0,24*	*0,21*	*0,09*	*96*
DEGENERADO	*B. glabrata*	*2,08*	*1,83*	*6,17*	*0,75*	*0,33*	*0,33*	*138*
	B. tenagophila	*1,27*	*1,21*	*7,80*	*1,03*	*1,03*	*0,63*	*431*

TAB. V - TESTE DE FRIEDMAN PARA ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS TOTAIS NAS DUAS ESPÉCIES DE MOLUSCOS EM RELAÇÃO À LOCALIZAÇÃO DAS LARVAS NA PRIMEIRA SEMANA DE DESENVOLVIMENTO.

ESPÉCIE	SOMA DOS RANKS						X^2
	cabeça	*tentáculo*	*pé*	*colar*	*manto*	*outros*	
B. glabrata	47	45	70,5	38	24,5	27	33,18**
B. tenagophila	100	107	151	74,5	81,5	74	43,82**

* significativo ao nível de 5% ; ** significativo ao nível de 1%

$X^2_{5;\ 0,01} = 15,09$; $X^2_{5\ ;\ 0,05} = 11,07$

TAB. VI - TESTE DE FRIEDMAN PARA ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS ÍNTEGROS NAS DUAS ESPÉCIES DE MOLUSCOS EM RELAÇÃO À LOCALIZAÇÃO DAS LARVAS NA PRIMEIRA SEMANA DE DESENVOLVIMENTO.

ESPÉCIE	SOMA DOS RANKS						X^2
	cabeça	*tentáculo*	*pé*	*colar*	*manto*	*outros*	
B. glabrata	*43,5*	*48,5*	*64,5*	*38*	*28*	*29,5*	*21,88**
B. tenagophila	34,5	37,5	43	25	27	22	10,48

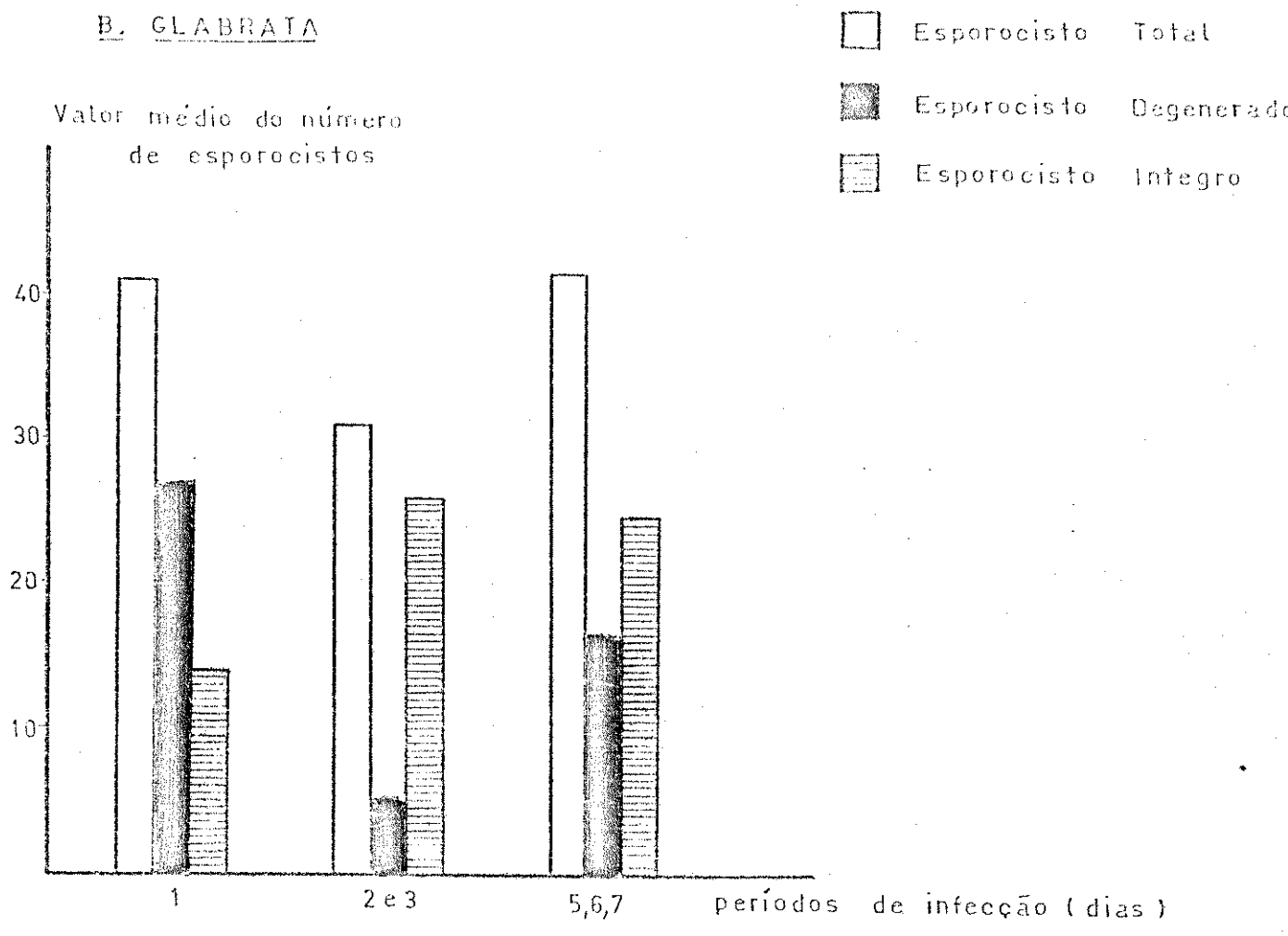
TAB. VII - TESTE DE FRIEDMAN PARA ESPOROCISTOS DEGENERADOS E ACELULARES NAS DUAS ESPÉCIES, EM RELAÇÃO À LOCALIZAÇÃO DE *S. mansoni* NA PRIMEIRA SEMANA DE DESENVOLVIMENTO.

ESPÉCIE	*cabeça*	*tentáculos*	*pé*	*colar*	*manto*	*outros*	X^2
B. glabrata	33	34	51,5	22	21	22,5	19,68**
B. tenagophila	89,5	95	143,5	68	76,5	73,5	41,98**

* significativo ao nível de p=5%

** significativo ao nível de p=1%

$X^2_{5;0,01} = 15,09$



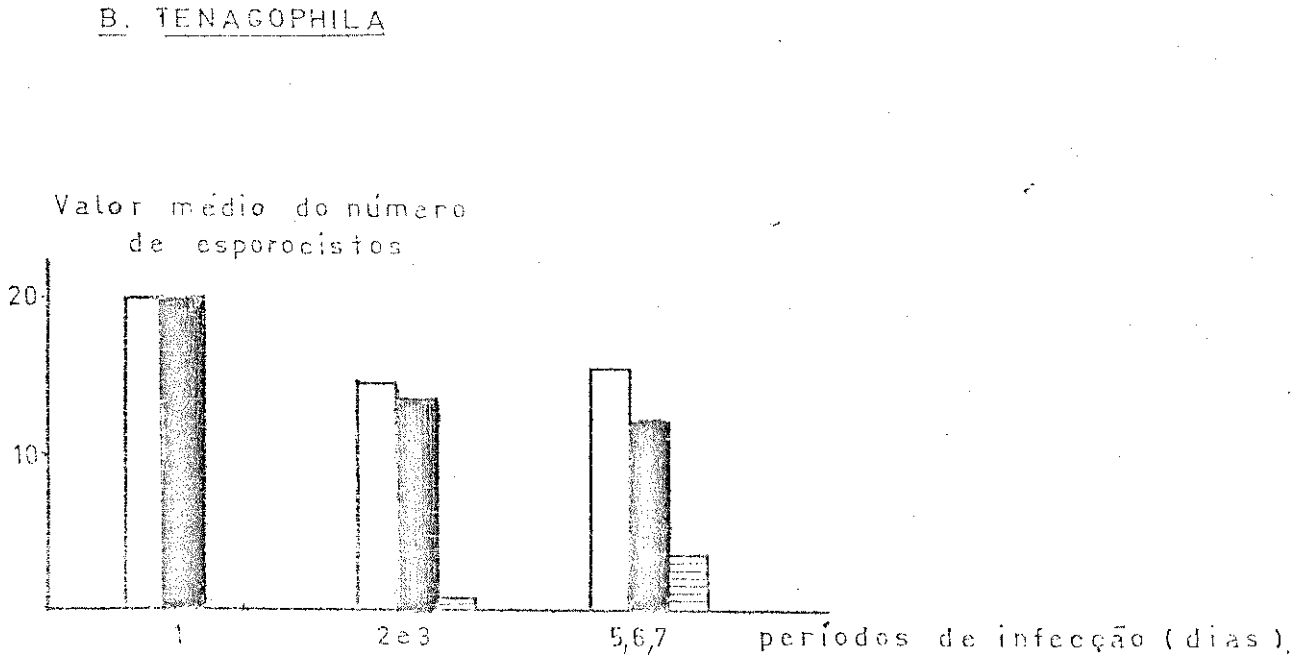
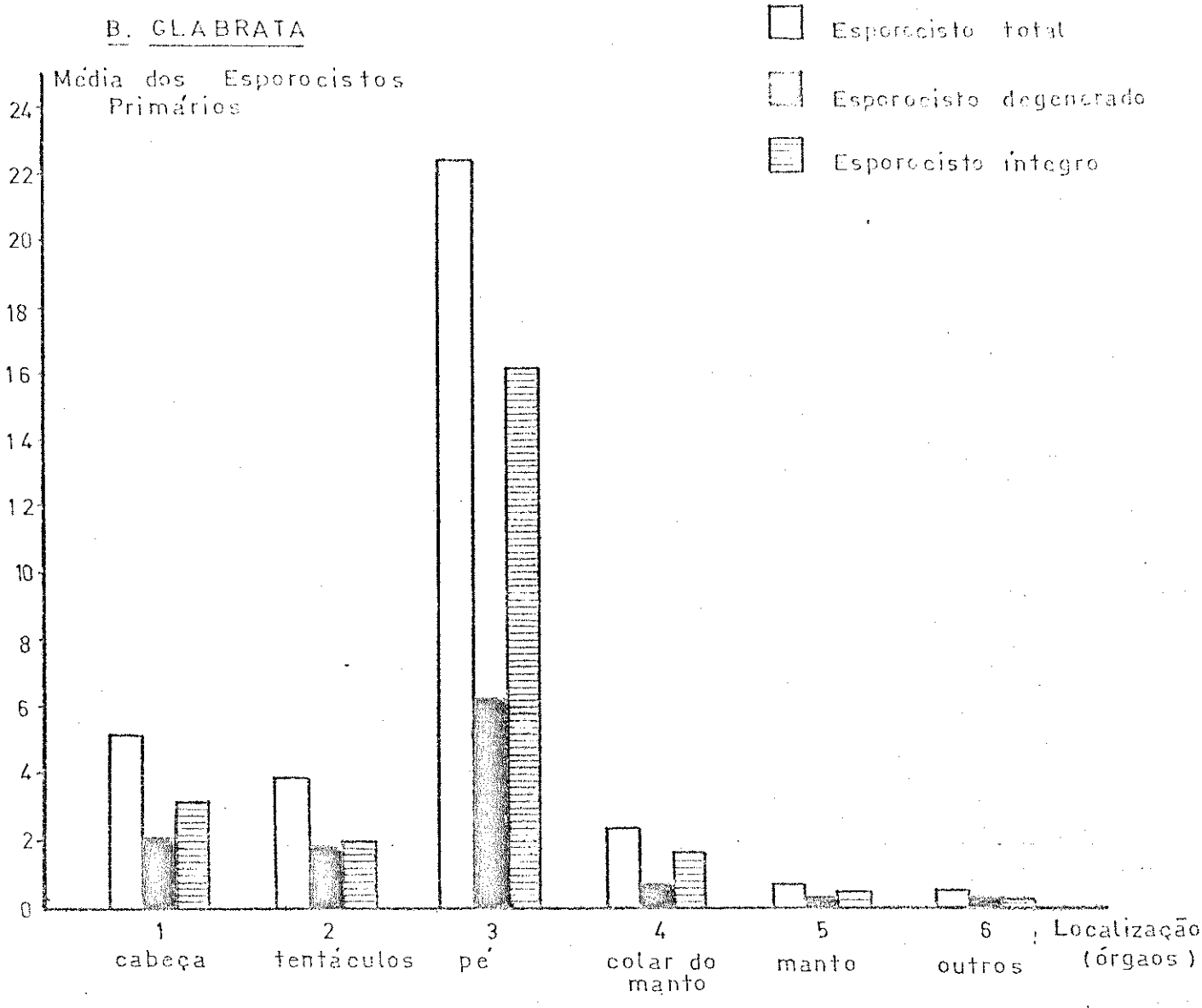


FIG. 3 - Valores médios do número de esporocistos primários totais, íntegros e degenerados encontrados no decorrer da primeira semana do desenvolvimento de *S. mansoni* em *Biomphalaria glabrata* *Biomphalaria tenagophila*.



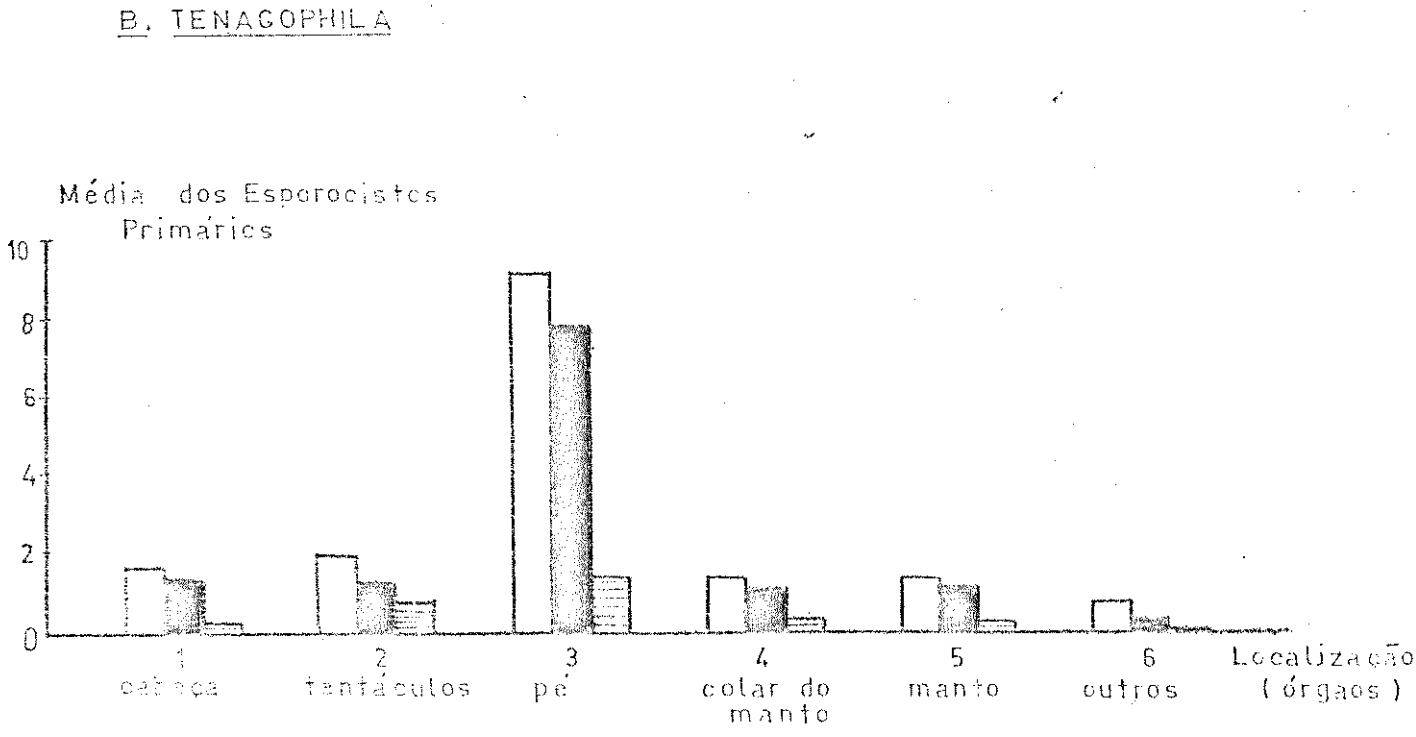


FIG.4 - Média de esporocistos primários totais, íntegros e degenerados e sua distribuição em diferentes órgãos de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* ,durante a primeira semana de evolução de *S. mansoni*.

III. 3 - ASPECTOS GERAIS DA EVOLUÇÃO DOS ESPOROCISTOS.

A localização das larvas, nos primeiros estágios do desenvolvimento, restringe-se às áreas mais expostas à infecção: região cefalopodal, tentáculos e colar do manto. Nestas áreas os esporocistos primários permanecem semanas, produzindo esporocistos secundários.

É notável a evolução assincrônica de esporocistos, principalmente nos moluscos de Belo Horizonte. Desconhece-se a causa determinante do fenômeno. Será decorrente da expressão de potencial germinativo diferente de cada miracídio ou resultante das diferenças quanto ao ritmo de crescimento apresentado pelas larvas.

À medida que o número de células do esporocisto aumenta, o corpo do esporocisto se alonga; encontramos esporocistos primários que apresentam uma constrição na zona mediana, de maneira a dividí-los em dois compartimentos(Fig.5). A transformação do esporocisto primário em secundário é gradual e este processo pode ter início já na primeira semana de desenvolvimento do parasito. Daí em diante, o número de septos parietais aumenta, dividindo o esporocisto primário em vários compartimentos com áreas irregulares, preenchidas por células esporocísticas(Figs. 6,7 e 8). Neste estágio, a multiplicação celular é abundante e parece não interromper num período cuja duração varia entre 14 a 21 dias, ocasião em que se observa a presença de esporocistos secundários aptos à migração(Figs. 7, 8 e 9). Nos primeiros estágios, os esporocistos secundários apresentam-se como aglomerados celulares sem membrana envolvente(Figs. 10 e 11). Posteriormente, tais aglomerados assumem a forma esférica, já envoltos por fina membrana (Fig.12). As fases subsequentes são caracterizadas por alongamento da larva e aparecimento de sistema excretor, constituído por duas

cêlulas-flamas alojadas, simetricamente, na porção mediana da larva e próximas do tegumento do esporocisto secundário(Figs. 11 e 13).

Em consequência da assincronia do desenvolvimento, não pudemos avaliar o ritmo de crescimento das linhagens BH e SJ. As Figs. 7, 8 e 14 ilustram o estágio alcançado pelos esporocistos secundários na terceira semana de desenvolvimento. Nota-se frequentemente a organização de um epitélio germinativo, na superfície interna da parede do esporocisto secundário maduro, sugerindo contínua produção de cêlulas germinativas destinadas à formação das cercárias. Além disso, dentro do mesmo esporocisto secundário, há assincronia no desenvolvimento das cercárias (Figs. 15, 17 e 18).

Em nosso estudo foi possível observar, na 10º semana de infecção, esporocistos primários degenerados ainda não absorvidos. É possível que nestes casos tenha havido um retardamento na evolução das larvas, associado a fatores fisiológicos ou relacionados com o meio ambiente.

Parece existir um estímulo que leva o esporocisto secundário a se separar do esporocisto primário, migrando através do tecido conjuntivo frouxo ou sendo transportado pelo fluxo hemolinfático. Esta migração dos esporocistos secundários processa-se por pequenos grupos; tem início a partir do 13º dia de infecção e pode demorar alguns dias. É difícil precisar o tempo necessário para que alcancem órgãos mais propícios ao desenvolvimento das cercárias, mesmo porque o número de esporocistos primários resultantes de uma única exposição, que se desenvolvem assincrônicamente é grande (Tabs. I e II). Tal circunstância impossibilita a identificação da procedência das larvas migrantes. A nosso ver, parece existir necessidade de chegada dos esporocistos secundários

ao hepatopâncreas e ovotestis, para que se inicie a diferenciação das cercárias, pois só nestas regiões é que se observa a presença de esporocistos secundários maduros com cercárias bem diferenciadas (Figs.17 e 18). No caso de *B. glabrata*, o fenômeno da diferenciação de cercárias pode ter início na quinta semana de infecção, enquanto que para *B. tenagophila* , nos poucos exemplares parasitados, foram vistas cercárias diferenciadas a partir da oitava semana de penetração dos miracídios.

Raramente tivemos oportunidade de observar cercárias plenamente evoluídas em esporocistos secundários situados na região cefalopodal do hospedeiro. Quando isto ocorre, existe parasitismo intenso do molusco, fato que pode dificultar a migração dos esporocistos secundários para órgãos internos. Verificamos que, nestes casos de maturação ectópica, é habitual o encontro de afluxo de amebócitos em torno do esporocisto maduro (Fig.15).

Dada a impossibilidade de isolar esporocistos secundários, por dissecção dos conglomerados em que por vêzes estão situados, não foi possível contá-los. Estes conglomerados são constituídos por formações tubulares retorcidas (Fig.19), cada uma delas representando um esporocisto secundário. Outro fator que torna inexequível a determinação numérica segura das larvas é o aumento constante da população. É a razão pela qual apresentamos apenas a relação dos órgãos encontrados albergando esporocistos secundários, imaturos e maduros: pé, colar do manto, manto, tentáculos, esôfago, rim, crista renal, reto, crista retal, parede pulmonar, glândula de albumen, estômago, glândula prostática, canal hermafrodita, saco bucal, anel ganglionar peri-esofagiano , hepatopâncreas e ovotestis. É possível observar a presença de parasitos em todos esses órgãos mencionados, quer por formas jovens, quer por formas já evoluídas, simultâneamente, no mesmo exemplar de molusco.

FIG.(5) - *B. glabrata* (1 dia, HE, 275 X). Esporocisto primário íntegro no colar do manto. Observar septação no sentido transversal da parede do esporocisto na sua região mediana; estágio inicial da transformação de esporocisto primário em secundário.

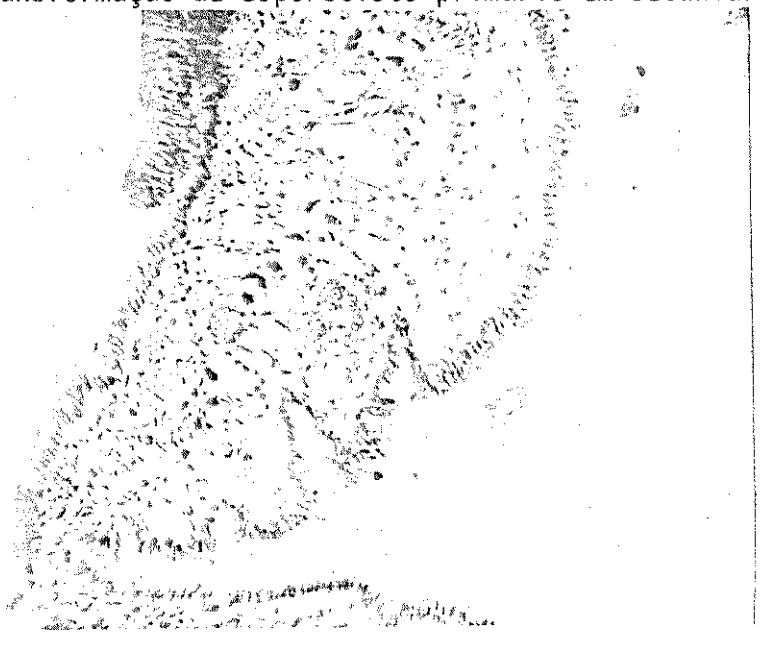


FIG.(6) - *B. glabrata* (14 dias, T. Gomori, 65 X). Esporocistos secundários íntegros na região podal. Processo de septação parietal bastante evoluído.

FIG.(7) - *B. glabrata* (21 dias, HE, 65 X). Esporocistos secundário no interior do esporocisto primário íntegro, alojado no colar do manto. Observar alguns esporocistos secundários nas proximidades do conjunto principal devido o deslocamento ativo para migração. O epitélio do colar do manto sofreu deformação juntamente com as glândulas de muco pela compressão das larvas.
E = epitélio de revestimento ; M = glândulas de muco;

FIG.(8) - *B. tenagophila* (21 dias, PAS-hematoxilina, 65 X). Esporocistos secundários íntegros no manto. A parede dos esporocistos secundários é PAS positiva.

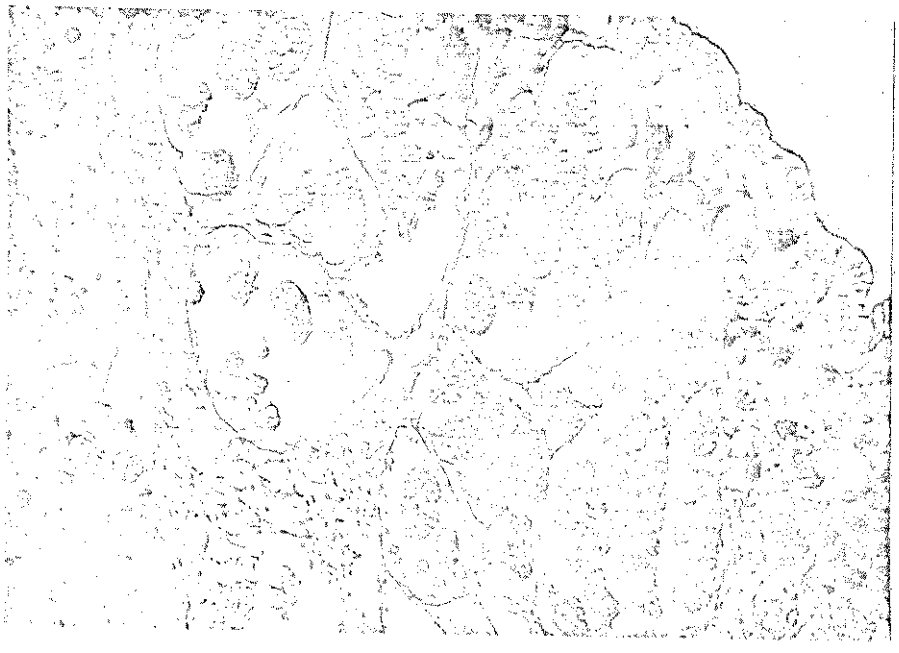


FIG.(9) - *B. glabrata* (28 dias, T. Gomori, 105 X). Esporocisto secundário imaturo no tentáculo. Parede dos esporocistos dotadas de espículos. Notar desorganização estrutural do tecido conjuntivo adjacente, de causa ignorada.

FIG.(10)- *B. glabrata* (13 dias, preparação a fresco em microscopia de fase, 26 X). Esporocistos secundários extraídos por dissecção do tentáculo. Observar deformação tentacular pela compressão das larvas.

FIGS. (11 a 13)- *B. glabrata* (13 dias, preparação a fresco observada em microscopia de fase. FIG. (11) mostra aglomerados celulares que representam o estágio inicial do desenvolvimento de esporocistos secundários. FIGS. (12 e 13) mostram 2 estágios evolutivos já individualizados por membrana. O estágio representado na Fig. (13) é mais evoluído que o antecedente e a larva já apresenta sistema excretor formado por 2 células-flama (explicação no texto).

FIG.(11)

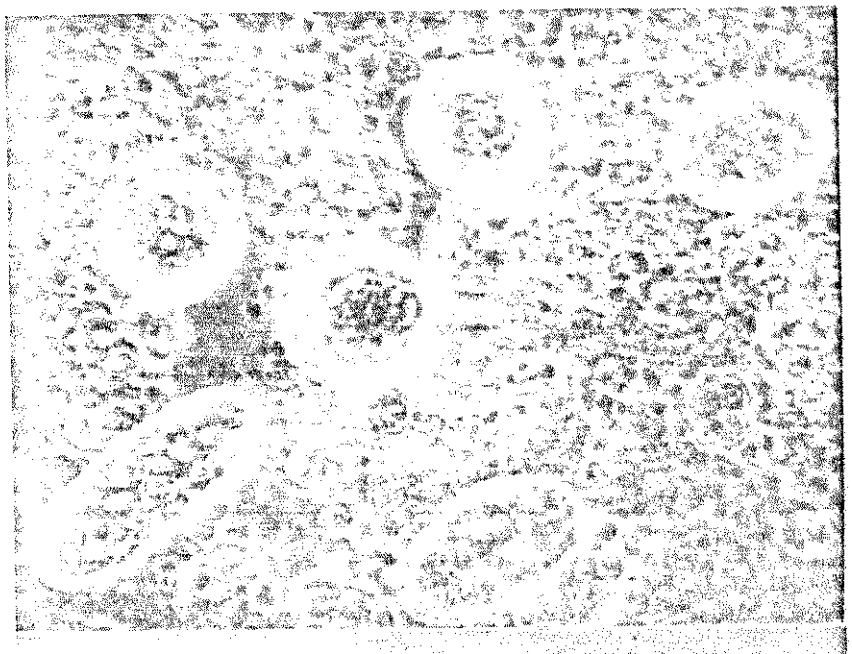


FIG.(12)

FIG.(13)

FIG.(14)- *B. glabrata* (21 dias, HE, 47 X). Esporocistos secundários dominando a região podal. Notar ausência de tecido conjuntivo e de fibras musculares, sugerindo lise celular. Glândulas mucosas aparentemente normais.

FIG.(15)- *B. glabrata* (90 dias, T. Gomori,26 X). Esporocisto secundário maduro no pé do molusco; degeneração parcial das larvas com encapsulação por amebócitos.

FIG.(16)- *B. glabrata* (51 dias, HE, 105 X). Presença simultânea de esporocistos secundários íntegros e degenerados. Coroa de fibroblastos encapsulando larvas degeneradas.

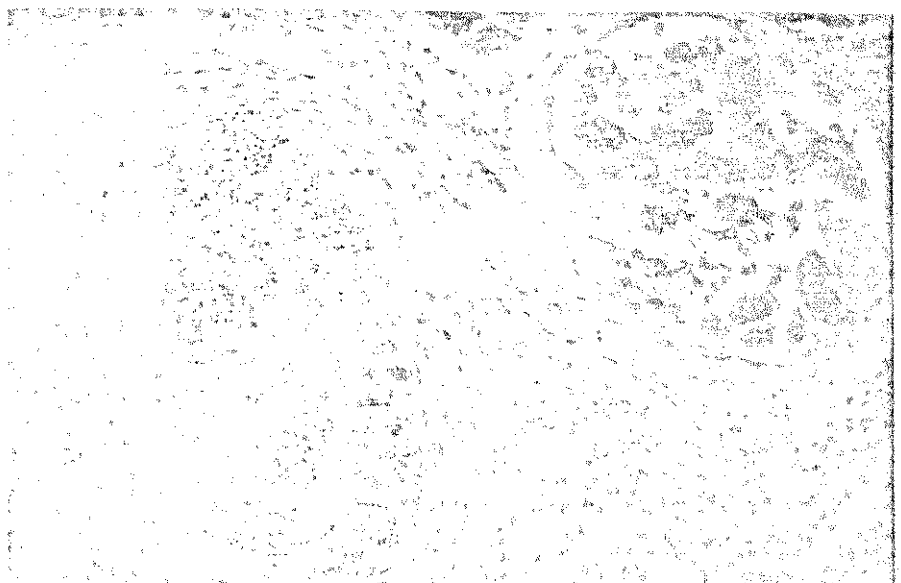


FIG.(17) - *B. glabrata* (10º semana, HE, 105X). Esporocisto secundário maduro no hepatopâncreas com cercárias em desenvolvimento. P=parede do esporocisto; V= glândulas da ventosa ventral da cercária.

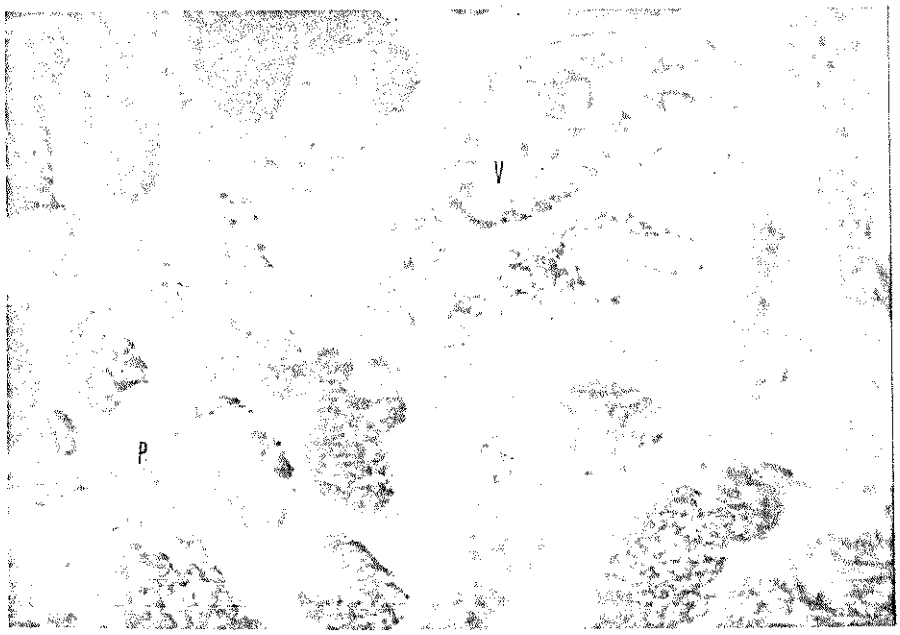


FIG.(18) - *B. tenagophila* (22º semana, T.Gomori, 65 X). Ovotestis contendo esporocistos secundários maduros íntegros, inter-foliculares. Cercária com diferenciação de cauda e acetábulo (C); epitélio germinativo do ovotestis com espermatogônias em disposição de semi-roseta (E).

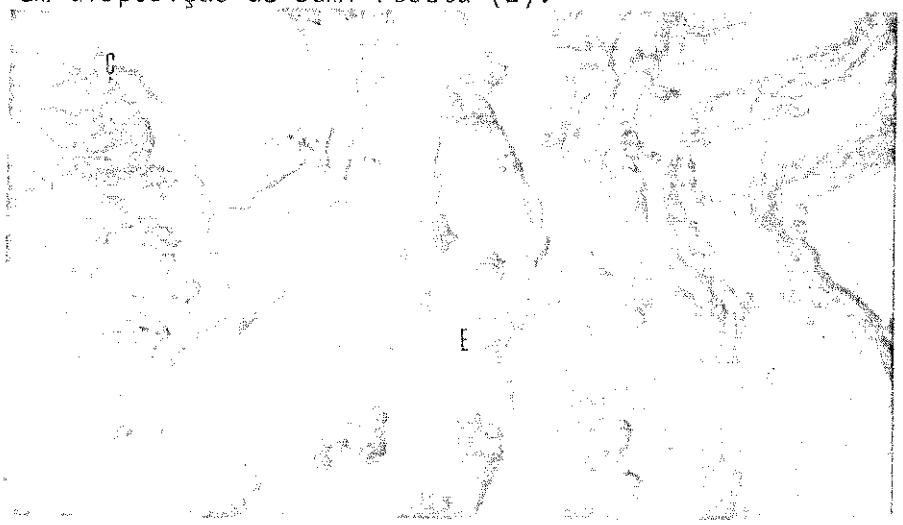
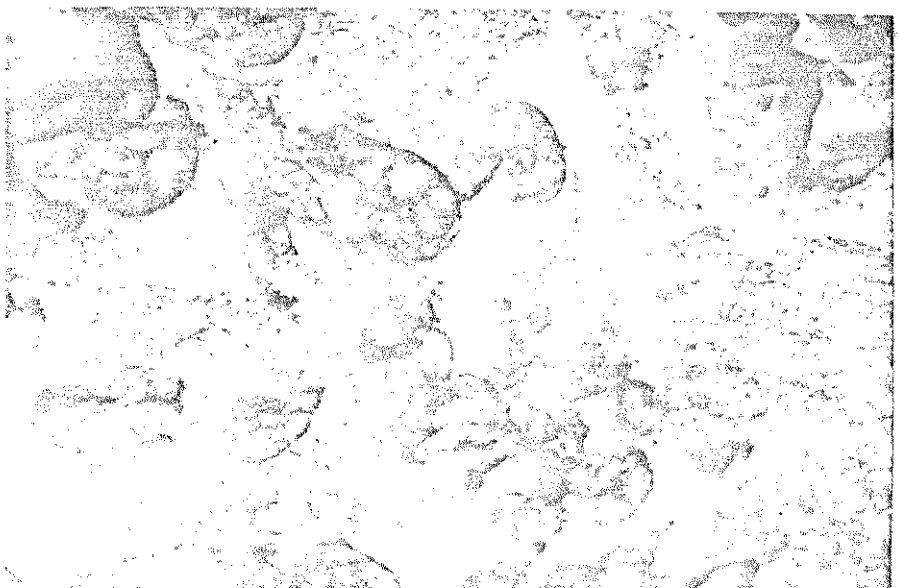


FIG.(19) - Esporocistos secundários maduros contendo cercárias; visualizar o formato dos esporocistos secundários em preparação a fresco à microscopia óptica comum. (26 X).



III. 4 - REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.

Verificamos, desde logo, que os antissoros obtidos em coelhos preenchiam os requisitos necessários para as finalidades propostas, pois revelaram acentuada capacidade reativa com relação ao *S. mansoni* nas diversas fases de sua evolução. Além disso, foi possível concluir que o esquema de imunização adotado induziu satisfatória produção de anticorpos, já que os títulos obtidos para os antissoros anti- *S. mansoni* revelaram valores superiores a 1024, que é o título apresentado pelo controle positivo da "Behring" na técnica de hemaglutinação na esquistossomose. Outro fato que atesta a eficácia da imunização dos coelhos se refere à obtenção da reação de Arthus.

Submetendo os imune-soros à absorção com vermes liofilizados, verificou-se total inibição da hemaglutinação. Do mesmo modo, a reação de imunofluorescência também acusou resultado negativo com soro absorvido com esquistossomos, tanto para preparações de vermes, como aquelas obtidas com cercárias livres e esporocistos.

Na Tab. VIII, evidenciamos os principais resultados da imunofluorescência, obtidos pelo tratamento dos diferentes antígenos com imune-soros. No estágio de esporocisto primário, larvas com uma semana de vida já são dotadas de tênue membrana que se cora fracamente, quer pela baixa especificidade dos anticorpos para este tipo de antígeno ou pela pequena quantidade de determinantes antigênicos disponíveis. Da mesma forma que os esporocistos secundários, os de primeira geração também tiveram a fluorescência abolida pela absorção do soro com vermes adultos.

Em todas a preparações, as reações com esporocistos se

cundários revelaram comportamento bem característico. Cercárias, em desenvolvimento no interior do esporocisto, apresentaram fraca fluorescência, localizada apenas no tegumento da larva. À medida que a cercária diferencia, a fluorescência do tegumento aumenta e surge intensa reação ao nível da ventosa ventral; ao mesmo tempo, a parede do esporocisto também apresenta intensa fluorescência (Figs. 22 e 23).

As reações inespecíficas com tecidos de molusco foram abolidas, através da absorção dos imune-soros com ovotestis e hepatopâncreas liofilizados. Convém salientar que na glândula hermafrodita a autofluorescência tecidual foi nula, mesmo com tratamento de soro não absorvido. Portanto, parece viável o emprego deste órgão parasitado, incluído em parafina, para fins de diagnóstico da esquistossomose humana. O mesmo não ocorreu com tecido de hepatopâncreas que, em preparações executadas com a mesma técnica, apresenta intensa autofluorescência.

Esporocistos primários e secundários obtidos por meio de dissecção e fixação em acetona não deram bom resultado, pelo fato de tais preparados possuírem contaminantes em quantidade suficiente para dar reação inespecífica, prejudicando a leitura.

Em relação à fluorescência com vermes, as preparações constituídas por esquistossomos liofilizados deram melhor resultado que as obtidas em cortes histológicos, talvez devido à preservação dos determinantes antigênicos.Quando submetidos à técnica de fluorescência, os vermes adultos apresentaram intensa reação ao nível do tegumento e do tubo digestivo. Contudo, as fêmeas liofilizadas são dotadas de autofluorescência nas glândulas vitelínicas e na casca do ovo (Figs. 20 e 21).

De acordo com estes dados, é permitido supor a existência de determinantes antigênicos comuns a esporocistos e vermes adultos. Outra constatação que comprova este fato está relacionada com a obtenção de reação completamente negativa com cercárias livres, vermes e esporocistos, quando os antissoros foram absorvidos com esquistossomos liofilizados.

Nas diversas condições testadas, as reações foram produzidas nos sistemas homólogos e heterólogos. Em termos qualitativos, os antígenos das linhagens BH e SJ parecem não diferir, considerando a sensibilidade do método adotado. Este fato, porém, não exclui a possibilidade da existência d diferenças quantitativas no teor de anticorpos específicos induzidos em cada uma das linhagens de *S. mansoni*.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

TAB. VIII - RESULTADO DAS REAÇÕES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM IMUNE-SOROS DE COELHOS INOCULADOS COM ESQUISTOSSOMOS DAS LINHAGENS BH e SJ DE *S.mansoni*.

	PREPARAÇÕES ANTIGÊNICAS				
ANTISSOROS DAS LINHAGENS BH e SJ	Esporocisto primário (corte hist.)	Esporocisto secundário (corte hist.)	cercárias (fixadas em formol)	esquistossomos (liof.)	esquistossomos (corte)
Soros sem absorção	+*	++*	+++	+++	++
Soros absorvidos com esquistossomos	-	-	-	-	-
Soros absorvidos com ovotestis e hepatopâncreas de *B.glabrata* sem infecção	+	+++	+++	+++	++

Interpretação dos resultados : * presença de reação inespecífica (autofluorescência do tecido)

- negativo ; + fracamente positivo ; ++ positivo ;

+++ fortemente positivo

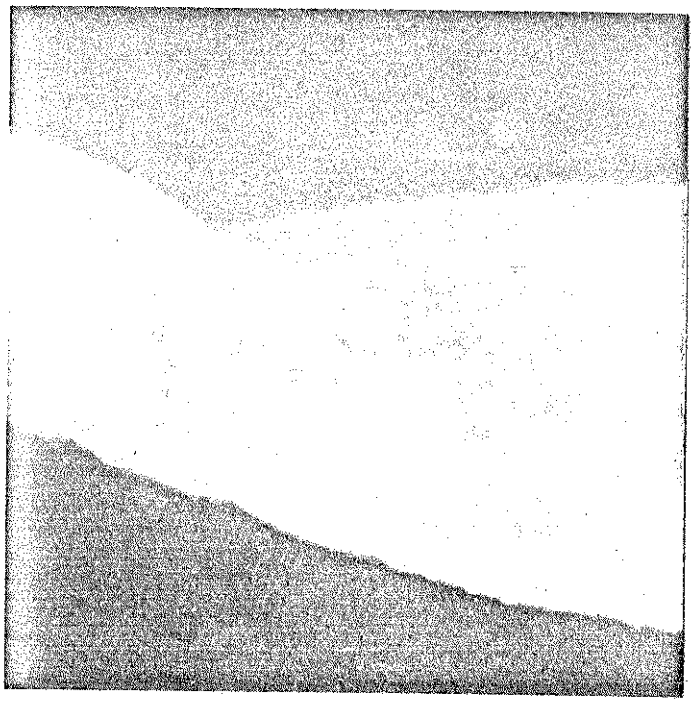


FIG. 20 - Verme adulto (macho) liofilizado. Reação de imunofluorescência indireta positiva para *S. mansoni* ; tegumento fluorescente.

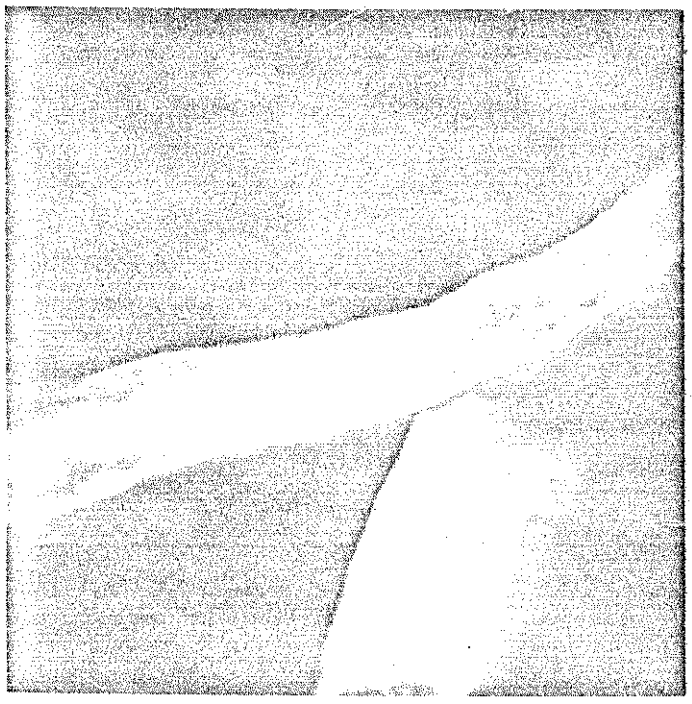


FIG. 21 - Verme adulto (fêmea) liofilizado. Reação de imunofluorescência indireta positiva para tegumento e tubo digestivo de *S. mansoni*. Autofluorescência no ôvo e glândulas vitelínicas.

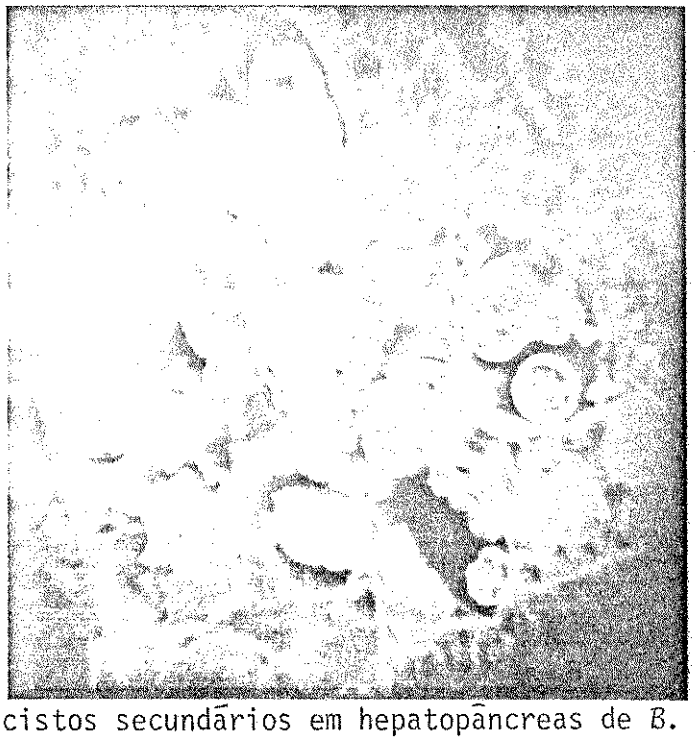


FIG. 22 - Esporocistos secundários em hepatopâncreas de *B. glabrata* . Cercárias em desenvolvimento mostram tegumento fluorescente e maior intensidade da fluorescência ao nível das ventosas oral e acetabular. Parede dos esporocistos com reação positiva.

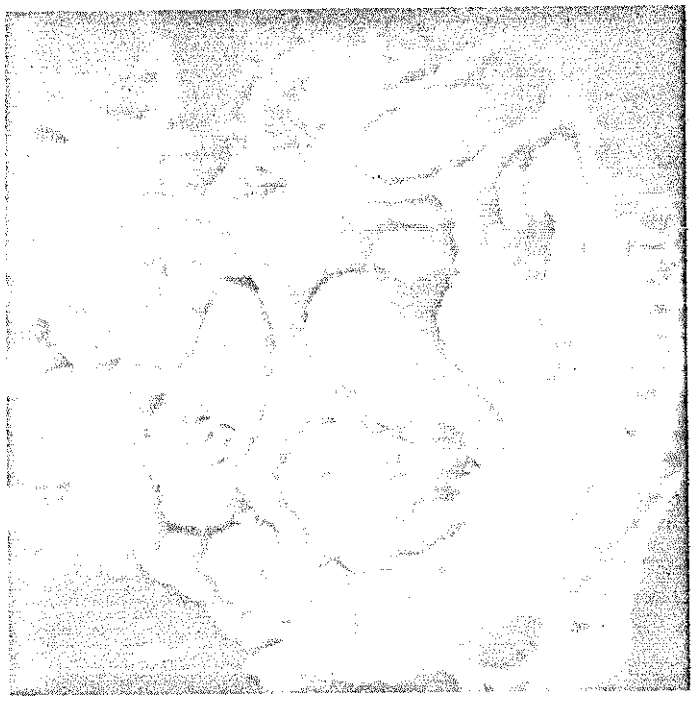


FIG. 23 - Esporocistos secundários em hepatopâncreas de *B. glabrata* . Reação negativa em tecido tratado com soro normal de coelho e conjugado.

IV - DISCUSSÃO

Nossos dados, referentes à localização dos miracídios nos tecidos, estão de acordo com os assinalados por MALDONADO & ACOSTA -MATIENZO (1947)[38], OLIVIER & MAO (1949)[44], COELHO (1957)[13] e PAN (1965)[48].

A distribuição dos esporocistos primários nos órgãos do hospedeiro também foi observada por vários autores; LUTZ (1919)[31] havia registrado a preferência dos miracídios pelo tentáculo, fato confirmado por BRUMPT (1940)[5], por MALDONADO & ACOSTA-MATIENZO (1947)[38] e COELHO (1957)[13].Entretanto, as duas espécies de moluscos por nós examinadas apresentaram maior incidência dos esporocistos primários na região podal, conforme ficou demonstrado pela análise estatística.

Durante o desenvolvimento dos esporocistos primários, os danos celulares provocados pelos parasitas foram reversíveis e não acarretaram morte do hospedeiro. Porém, foi grande a mortalidade dos moluscos que se encontravam na fase de eliminação de cercárias. Nesta fase, a sobrevivência dos planorbídeos pode ser afetada por vários fatores: ação de determinados componentes metabólicos liberados pelas cercárias; compressão dos tecidos pelos parasitas; formação de êmbolos na hemolinfa, devido à eliminação simultânea de grande número de larvas infectantes.

Os amebócitos dos moluscos são capazes de reconhecer "in vivo" : leveduras, bactérias, grãos de pólen e esferas de poliestireno (TRIPP-1961)[60]. Uma grande variedade de respostas pode ser obtida contra diferentes agentes estranhos, dependendo de sua natureza, de alterações químicas na sua superfície, da presença de opsoninas e de outros fatores ainda não determinados (ANDERSON & GOOD-1976)[1]. Em 1972, LIM & HEYNEMAN[29], ao estudar o antagonismo entre *Schistosoma mansoni* e *Paryphostomum segrega*

tum, em *Biomphalaria glabrata*, observaram a necessidade do rompimento do tegumento de esporocistos de *S. mansoni* , por ação predatória das rédias de *P. segregatum*, para induzir imediatamente a reação amebocitária em torno de esporocistos de *S. mansoni* . Desta forma, parece-nos que os fatores mais importantes que interferem na resposta do molusco à infecção estão associados às características da superfície do corpo estranho.

Algumas teorias foram sugeridas para explicar a adaptação entre molusco e trematódeo. WRIGHT (1971)[65] admitiu a possibilidade dos esporocistos escaparem da ação dos mecanismos de defesa dos planorbídeos mediante três maneiras: conformações moleculares do tegumento dos esporocistos que não sejam reconhecidas como corpo estranho pelo hospedeiro; possibilidade da incorporação das moléculas do hospedeiro pela superfície dos esporocistos. Sabe-se que existem antígenos comuns ao trematódeo e ao molusco hospedeiro (CAPRON & cols.- 1965[7]; 1968[8]; HEYNEMAN & cols. -1971[22]) Em 1974, KEMP & cols.[25] também constataram a ocorrência de antígenos comuns ao molusco, cercárias e vermes adultos, sugerindo que o acetábulo das cercárias poderia atuar como absorvente de determinadas substâncias do planorbídeo. Este comportamento pode provocar o mimetismo das larvas.

Se amebócitos de moluscos são capazes de aceitar ou rejeitar o transplante, respectivamente, de tecidos homólogos e heterólogos(TRIPP-1961)[60], é possível que um agente estranho, que tenha a capacidade de incorporar ou sintetizar substâncias do hospedeiro, possa passar desapercebido pelo sistema de defesa do caramujo. Em última análise, no processo de adaptação entre molusco e *S. mansoni* , pode ocorrer um fenômeno análogo ao descrito na "imunidade concomitante"(SMITHERS & TERRY - 1969)[57], no processo de adaptação entre o vertebrado e trematódeo.

Pesquisas já foram realizadas com a finalidade de estudar comparativamente a constituição antigênica das linhagens BH e SJ de *S. mansoni*, no estágio de cercárias e vermes adultos. A existência de determinantes antigênicos comuns em cercárias BH e SJ foi muito bem documentada por SANTANA & cols. (1978)[56] e LEMOS NETO (1975)[26], utilizando a técnica de imunofluorescência indireta. A análise comparativa entre vermes adultos de ambas as linhagens, pelo estudo dos antígenos, adotando-se técnica de precipitação em gel, não revelou diferenças entre as linhagens estudadas. É possível que, com emprego de técnicas mais sensíveis, sejam detetadas diferenças de constituição antigênica entre as referidas linhagens (CASTRO DIAS-1977)[9]. Em nosso trabalho, também ficou demonstrada a presença de determinantes antigênicos comuns em vermes adultos e esporocistos. Entretanto, não dispomos de dados conclusivos sobre diferenças antigênicas entre linhagens de *S. mansoni* que possam explicar comportamentos distintos dos vermes dessas linhagens, no hospedeiro definitivo.

Se realmente não existirem diferenças quanto ao mosaico antigênico presente em esporocistos BH e SJ, a suscetibilidade do molusco frente à linhagem simpátrica pode ser explicada pela perda da capacidade do caramujo em reconhecer o trematódeo como corpo estranho.

Em preparações histológicas, pudemos observar comportamentos distintos de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, principalmente durante a primeira semana de evolução de *S. mansoni* ; *B. tenagophila* revelou- se capaz de eliminar a infecção na maioria dos exemplares; a linhagem SJ mantida por esta espécie de molusco apresentou menor capacidade de penetração dos miracídios. A resistência de *B. tenagophila* tem sido apontada por outros autores (COELHO-1957[13]; COELHO-1962[14]; PARAENSE & CORRÊA-1963b[50], 1963c[51]; BASTOS & cols. -1978[2]; SANTANA & cols-1978[56]). O ajuste fisiológ-

gico entre caramujo e trematódeo estaria na dependência do comportamento do molusco durante a infecção e, como vimos anteriormente, condicionado pela constituição genética do molusco. Entretanto, é muito provável que este não seja o único mecanismo atuante no complexo relacionamento hospedeiro-parasita. Parece-nos que o fator determinante do sucesso do parasitismo se refere à constituição genética de cada espécie, pois na infecção alopátrica de moluscos, geneticamente selecionados para o caráter suscetibilidade, não foram detetadas reações amebocitárias em torno das larvas. Talvez, neste processo seletivo, os moluscos suscetíveis ao *S. mansoni* , também apresentem menor capacidade de reconhecimento a outros agentes estranhos.

Diante da possibilidade do aproveitamento da imunofluorescência indireta, como rotina no diagnóstico laboratorial, tornou-se imprescindível o aprimoramento deste método para obtenção de material antigênico mais estável e passível de maior rendimento e disponibilidade. Os trabalhos de CAMARGO & cols. (1965)[6], LE VIGUELLOUX & cols. (1969)[28] preconizam reações com fragmentos de esquistossomos adultos, devidamente liofilizados e aderidos em lâmina. Entretanto, os mesmos autores encontraram dificuldade na interpretação dos resultados, devido à interferência de reações inespecíficas. Este inconveniente foi minimizado por COUDERT & cols. (1967)[16] , da escola francesa de Lyon, mediante o preparo de cortes de congelação de vermes localizados no fígado de animais parasitados. A autofluorescência

do helminto foi atenuada com coloração de contraste pelo azul de Evans (FRY & WILKINSON-1963)[21].

Recentemente, inúmeros pesquisadores têm adotado cortes de vermes não fixados e incluídos em meio próprio(Tissue Tek O.C.T.) segundo técnica recomendada por WILSON & cols.(1974)[64]. Este método tem apresentado sensibilidade e especificidade satisfatórias; entretanto, há exigência do uso de criostato, condição que nem todos os laboratórios podem dispor.

Propomos a utilização de método mais simples para obtenção de material antigênico que atenda as principais exigências de especificidade, estabilidade, sensibilidade e alto rendimento. Em vista de nossos resultados, com a aplicação de moluscos parasitados por *S. mansoni* , sugerimos que as reações de imunofluorescência indireta sejam executadas sobre cortes histológicos de ovotestis do planorbídeo infectado, incluído em parafina.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

Conhecendo-se as diferenças de suscetibilidade entre *B. glabrata* de Belo Horizonte(MG) e *B. tenagophila* da região do Vale do Rio Paraíba do Sul (SP), com relação às linhagens simpátricas(BH e SJ) de *S. mansoni* , entendemos ser oportuno o estudo do desenvolvimento dos esporocistos nos tecidos de moluscos. A evolução dos esporocistos primários e secundários foi avaliada mediante observações de cortes histológicos de moluscos sacrificados em diferentes estágios da infecção. Desta maneira, as preparações, examinadas em microscopia óptica comum, foram obtidas a intervalos semanais até a oitva semana após o contato de cada planorbídeo com 100 miracídios.

Os resultados referentes à primeira semana de infecção revelam que :

- *B. glabrata* foi portadora de maior número de esporocistos primários viáveis. Em *B. tenagophila* predominaram esporocistos primários degenerados, envolvidos por infiltrados amebocitários. No 3º dia de infecção, *B. glabrata* apresentou 70,5% dos esporocistos primários íntegros, enquanto que em *B. tenagophila* apenas 1,6% dos esporocistos primários presentes nos tecidos apresentaram-se em condições de progredir no processo evolutivo no hospedeiro intermediário.

- os miracídios da linhagem BH apresentaram maior capacidade de penetração que os da linhagem SJ.

-não houve diferença significativa entre as linhagens, quanto à distribuição dos esporocistos primários nos tecidos. A região podal mostrou maior número de esporocistos primários, seguindo-se cabeça, tentáculos, colar do manto, manto e outros órgãos.

- observou-se grande assincronia no desenvolvimento de esporocistos primários e secundários nas duas espécies de moluscos.

No decorrer das semanas subsequentes da infecção observou-se que:

- a diferenciação das cercárias tem início na 5º semana de evolução em *B. glabrata* e na 8º semana de infecção de *B. tenagophila*.

- não notamos, nas fases sucessivas (esporocisto primário, esporocisto secundário e cercária) de *S. mansoni* diferenças morfológicas que permitissem caracterizar se tratar de linhagem BH ou SJ.

-encontramos os seguintes órgãos, ou regiões, parasitados por esporocistos secundários imaturos ou plenamente desenvolvidos:
pé, colar do manto, manto, tentáculos, esôfago, rim, crista renal, reto crista retal, parede pulmonar, glândula de albumen, estômago, glândula prostática, canal hermafrodita, saco bucal, anel ganglionar peri-esofagiano, hepatopâncreas e ovotestis.

-foi frequente a ocorrência de processo degenerativo em esporocistos com mais de 7 semanas após a infecção, sobretudo em esporocistos secundários desenvolvidos no mesmo local ocupado pelo esporocisto primário que lhes deu origem.

-nas infecções alopátricas, moluscos geneticamente selecionados para o caráter suscetibilidade, passaram a não reconhecer a linhagem alopátrica como estranha. Nestes moluscos não foi observada reação amebocitária em torno dos esporocistos.

- através da imunofluorescência indireta foi comprovada a presença de determinantes antigênicos comuns a esporocistos(primários e secundários) e vermes adultos. Os determinantes antigênicos revelados estão presentes no tegumento dos esporocistos primários a partir do terceiro dia de desenvolvimento no molusco. As reações foram produzidas em sistemas homólogos e heterólogos para as linhagens BH e SJ de *S. mansoni*.

- foi sugerida a aplicação de cortes histológicos em parafina de ovotestis de planorbídeo infectado, como antígeno para reações de imunofluorescência indireta. Esse teste se presta ao diagnóstico laboratorial da esquistossomose.

VI - APÊNDICE

ANEXO I - Análise de esporocistos primários íntegros, degenerados e totais em *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* na primeira semana de infecção por *S.mansoni*. Teste de rank de WILCOXON para duas amostras.
(EI = esporocistos íntegros ; ED = esporocistos degenerados ;ET= = esporocistos totais).

T de Wilcoxon

EI	ED	ET
109,5**	120**	168**

** significativo ao nível de 1%.

ANEXO II- Teste de WILCOXON para o número de esporocistos primários íntegros (EI), degenerados (ED) e totais (ET) entre *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* nos dias 2 e 3 da infecção por *S. mansoni*.

T de Wilcoxon

EI	ED	ET
7 *	14,5 N.S.	11,5 N.S.

$T_{0,05\ ;3,7} = 7$ * significativo ao nível de 5%

ANEXO III-Teste de WILCOXON para os esporocistos primários íntegros (EI), degenerados (ED) e totais (ET) em *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* no período de infecção compreendido pelos dias 5, 6 e 7.

T de Wilcoxon

EI	ED	ET
15*	30,5	21,5

$T_{0,05;3,20} = 17$ * significativo ao nível de 5%

ANEXO IV - Teste de WILCOXON para esporocistos primários íntegros (EI), degenerados (ED) e totais em *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* no 14º dia de infecção.

T de Wilcoxon

EI	ED	ET
33,5	30,5	24,5

$T_{0,05;4,12} = 17$

ANEXO V - Teste de Wilcoxon para esporocistos primários íntegros (EI), degenerados (ED) e totais em *B. glabrata* e *B. tenagophila* no 21º dia de infecção por *S. mansoni*.

T de Wilcoxon

EI	ED	ET
16**	23	15,5*

$T_{0,05;5,7} = 20$; $T_{0,01;5,7} = 17$

ANEXO VI -Teste de Wilcoxon para esporocistos primários íntegros (EI), degenerados (ED) e totais (ET) em *B. glabrata* e *B. tenagophila* no período compreendido entre o 35º a 70º dia após infecção por *S. mansoni*.

T de Wilcoxon

EI	ED	ET
50,5	43,5*	45

$T_{0,05;7,11} = 44$

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, R.S. & GOOD, R.A., 1976. Opsonic involvement in phagocytosis by mollusk hemocytes. *Invert. Path.* 27:57-64.
2. BASTOS, O. de C., MAGALHÃES, L.A., RANGEL, H.A. & PIEDRABUENA, A.E.,1978. Alguns dados sobre o comportamento parasitológico das linhagens humana e silvestre do *Schistosoma mansoni* , no vale do Rio Paraíba do Sul, SP (Brasil). *Revta. Saúde públ., S. Paulo,* 12 :184-199.
3. BRENER, Z., 1959. Esquistossomose experimental. *Revta. bras. Malar. e Doenç. trop.,* 11:473-506.
4. BROOKS, C.P., 1953. A comparative study of *Schistosoma mansoni* in *Tropicorbis havanensis* and *Australorbis glabratus. J. Parasit.,* 39:159-165.
5. BRUMPT,E., 1940. Confirmation des observations de A. Lutz sur lésions tentaculaires de *Planorbis glabratus (=P. guadelupensis)* determinées par l'évolution sur place des miracidies de *Schistosoma mansoni.Compt. Rend. Soc. Biol.,* 133:625-628.
6. CAMARGO, M.F., HOSHINO,S. & SILVA,I.C.,1965. A slide fluorescent antibody technique with adult worm antigen for the serological diagnosis of schistosomiasis mansoni.*Revta. Inst. Med. trop. S. Paulo,* 7:327-331.
7. CAPRON,A., BIGUET,J., ROSE,F. & VERNES,A.,1965. Les antigènes de *Schistosoma mansoni.*II.Etude immunoelectrophoretique comparée de divers stade larvaires et des adultes de deux sexes. Aspects immunologiques des relations hote-parasite de la carcaire et l'adulte de *Schistosoma mansoni.Annls Inst. Pasteur, Paris,* 109:798-810.
8. CAPRON,A., BIGUET,J., VERNES,A. & AFCHAIN,D.,1968. Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hote-parasite. *Path. Biol.,Paris,* 16:121-138.
9. CASTRO DIAS,C.H., 1976. Contribuição ao estudo comparativo das linhagens mineira e paulista do *Schistosoma mansoni* SAMBON,1907. Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (SP).

10. CHENG,T.C. & SNYDER,R.W., 1962. Studies on host parasite relationships between larval trematodes and their hosts. I.A review. II. The utilization of the host's glycogen by the intramolluscan larvae of *Glypthelmins pennsylvaniensis* Cheng, and associated phenomena. *Trans- Am. microsc. Soc.*, 81:209-228.

11. CHENG,T.C. & BIER , J.W., 1972. Studies on molluscan schistosomiasis: :An analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni* *Parasit.*, 64: 129-141.

12. COELHO,M.V., 1954. Ação das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. *Publ. Avul. Inst. Aggeu Magalhães*, 3:39-53.

13. COELHO,M.V., 1957.Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. *Revta. Bras. Bio.*, 17:325-337.

14. COELHO, M.V.,1962. Suscetibilidade de *Australorbis tenagophilus* à infecção por *Schistosoma mansoni*. *Revta. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 4:289-295.

15. CORRÊA,R.R., CODA,D. & OLIVEIRA,U.A., 1956. Um foco autóctone de esquistossomose no Vale do Paraíba. *Folia clin. biol., S. Paulo*, 26:85-90.

16. COUDERT,J., GARIN,J.P., AMBROISE-THOMAS,P. & POTHIER,M.A. , 1967Premiers résultats à propos du diagnostic sérologique de la bilharziose par immunofluorescence sur coupes à la congelation de *Schistosoma mansoni*. *Ann. Parasit. Hum.Comp.*, 483-492.

17. DAMIAN,R.T.,1966.An immunodiffusion analysis of some antigens of *Schistosoma mansoni* adults. *Expl. Parasit.* 18:255-265.

18. DEANE,L.M., MARTINS,R.S., & LOBO,M.B., 1953. Um foco ativo da esquistossomose mansonica em Jacarepaguá,Distrito Federal. *Revta. bras. Malar. Doenç. trop.*,5:249-252.

19. ESTEVES,M.B., SANT'ANNA,O.A.B., ANNES,V.C.S.& BINAGHI,R.A., 1974. Characterization and properties of an anaphylatic 7S antibody in sheep. *J. Immun.*, 112: 722.

20. FILES,V.S.& CRAM,E.B., 1949. A study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 35 : 555-560.

21. FRY,C.S. & WILKINSON,A.E.,1963. A note on the use of Evans blue as a background stain in the FTA-test. *WHO/VDT/Res 35.*

22. HEYNEMAN,D.,FAULK,W.P. & FUDENBERG,H.H.,1971. *Echinostoma lindoense:* larval antigens from the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata. Expl. Parasit.,* 29 *:480-492.*

23. KABAT,E.A. & MAYER,M.M., 1971. Experimental Immunochemistry. 2º ed. Springfield Illinois, USA.

24. KAGAN,I.G. & GEIGER,S.J., 1965. The susceptibility of three strains of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni* from Brazil and Puerto Rico. *J. Parasit.,* 51 *:622-627.*

25. KEMP,W.M., GREENE,N.D. & DAMIAN,R.T., 1974. Sharing of cercarienhüllen reaktion between *Schistosoma mansoni* -cercariae and adults and uninfected *Biomphalaria pfeifferi. Am. J. trop. Med. Hyg.,*23 *:197 -202* .

26. LEMOS NETO,R.C., 1975. Estudo comparativo do comportamento parasitologico e imunológico das linhagens mineira e paulista do *Schistosoma mansoni* SAMBON,1907. Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (SP).

27. LEMOS NETO,R.C., MAGALHÃES,L.A. & PIEDRABUENA,A.E. 1978. Alguns aspectos referentes ao estudo de linhagens de *Schistosoma mansoni* SAMBON,1907, provenientes dos Estados de Minas Gerais e de São Paulo, Brasil. *Revta. Saúde públ., S. Paulo,* 12 *: 277-290.*

28. LE VIGUELLOUX,J., BOCHE,R., ROUX,J. & ALANSE ,P., 1969. Reâction d'immunofluorescence sur broyat de *Schistosoma mansoni* . Résultats complementaires. *Med. trop.,* 29 *: 680-684.*

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

30. LOWRY,O.H., ROSENBROUGH,N.J., FARR,R.J. & RANDALL,R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* 193 *:275.*

31. LUTZ,A., 1919. O *Schistosoma mansoni* e a Schistosomose segundo observações feitas no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 11 *: 121-155.*

32. McKINNEY, R.M., SPILLANE,J.T. & PEARCE,G.W., 1964. Fluorescein diacetate as a reference color standard in fluorescent antibody studies. *Analyt. Biochem.,* 9 *: 474-476.*

33. MAGALHÃES,L.A., 1966. Moluscos planorbídeos do Distrito Federal,Brasília. Tese de doutoramento apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Campinas- São Paulo.

34. MAGALHÃES,L.A. & CARVALHO,J.F., 1969. Determinação do número de cercárias provenientes de cepas diferentes de *Schistosoma mansoni* que conseguem penetrar, sob determinadas condições de laboratório, em *Mus musculus*. *Revta. Soc. bras. Med. trop.*, 3:249-251.

35. MAGALHÃES,L.A. & CARVALHO,J.F., 1973a. Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* das linhagens de Belo Horizonte(MG) e de São José dos Campos (SP) em *Mus musculus* . *Revta. Saúde públ., S. Paulo*, 7:285-287.

36. MAGALHÃES,L.A. & CARVALHO,J.F., 1973b. Estudo morfológico de *Schistosoma mansoni* pertencentes a linhagens de Belo Horizonte(MG) e de São José dos Campos (SP). *Revta. Saúde públ., S. Paulo*, 7:289-294.

37. MAGALHÃES,L.A., ALCÂNTARA,F.G. & CARVALHO,J.F., 1975. Alguns dados referentes ao estudo parasitológico e anatomopatológico de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon,1907. *Revta. Saúde públ, S.Paulo*,9:1-5.

38. MALDONADO,J.F & ACOSTA-MATIENZO,J., 1947. The development of *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Australorbis glabratus*. *Puerto Rico J, Hlth. trop. Med.*, 22:331-373.

39. MARTINS,R.S., 1957. Focos ativos de esquistossomose em Niterói, Estado do Rio de Janeiro. *Revta. bras. Malar. Doenç. trop.*,9:361-364.

40. MOURA,S.A.L.,1945. Esquistossomose mansoni autóctone em Santos. *Revta. Inst. Adolfo Lutz*, 5:279-311.

41. NEWTON,W.L., 1952. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 38: 362-366.

42. NEWTON,W.L., 1953. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus* Expl.*Parasit.*,2:242-257.

43. NEWTON,W.L., 1954. Tissue responses to *Schistosoma mansoni* in second generation snails from a cross between two strains of *Australorbis glabratus*. *J. Parasit.*, 40:352-355.

44. OLIVIER,L. & MAO,C., 1949.The early larval stages of *Schistosoma mansoni* Sambon,1907 in the snail host, *Australorbis glabratus* (Say,1818). *J. Parasit.*, 35:267-275.

45. OUCHTERLONY,O., 1958. Diffusion-in-gel methods for Immunological analysis. in *Prog. Allergy*, 5:1-78.

46. PAN,C,T., 1963a.Generalized and focal tissue responses in the snail *Australorbis glabratus*, infected with *Schistosoma mansoni*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 113: 475-485.

47. PAN,C.T., 1963 b. Some biochemical and Immunological aspects of host-parasite relationships. Generalized and focal tissue responses in the snail *Australorbis glabratus* infected with *Schistosoma mansoni*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 113: 486-488.

48. PAN,C.T., 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 14: 931-976.

49. PARAENSE,W.L. & CORRÊA, L.R., 1963 a. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Revta. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 5:15-22.

50. PARAENSE,W.L. & CORRÊA,L.R., 1963 b. Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Revta. Inst. Med. trop., S. Paulo*, 5: 23-29.

51. PARAENSE,W.L. & CORRÊA,L.R., 1963 c. Sobre a ocorrência de duas raças biológicas do *Schistosoma mansoni* no Brasil.(Apresentado na 15º reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Campinas-SP).

52. PELLEGRINO,J. & MACEDO,D.G., 1955. A simplified method for the concentration of cercariae. *J, Parasit.*, 41: 329-330.

53. PIZA,J.T., RAMOS,A.S., BRANDÃO, C.S.H. & FIGUEIREDO,C.G., 1959. A Esquistossomose no Vale do Paraíba. Observações sobre a doença em alguns dos seus municípios e a fauna planorbídica da região. *Revta. Inst. Adolfo Lutz*, 19: 97 - 143.

54. RICHARDS,C.S. & MERRITT,Jr, J.W., 1972. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 21: 425-434.

55. RICHARDS,C.S., 1973. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 22:748-756.

56. SANTANA,J.V., MAGALHÃES,L.A. & RANGEL,H.A., 1978. Seleção de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* visando maior suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni*. *Revta. Saúde públ., S. Paulo*, 12: 67 - 77.

57. SMITHERS,S.R. & TERRY,R.J., 1969. The Immunology of Schistosomiasis. *Adv. Parasit.*, 7: 41-93.

58. SNEDECOR,G.W. & COCHRAN,W.G., 1967. Statistical Methods. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA., 6º ed.

59. STANDEN,O.D., 1952. Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni*. I - Individual and mass infection of snail and the relationship of infection to temperature and season. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 46:48-52.

60. TRIPP, M.R., 1961. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasit.*, 47: 747 - -751.

61. TRIPP,M.R., 1970. Defense mechanism of molluscs. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 7: 173-182.

62. TRIPP.M.R., 1974. Molluscan immunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 234:23-27.

63. YOLLES,T.K, MOORE,D,V., De FINST, D.L., RIPSON,C.A. & MELENEY,H.E. , 1947. A technique for the perfusion of the laboratory animals for the recovery of schistosomes. *J. Parasit.*, 33: 419-426.

64. WILSON,M., SULZER,A.J., & WALLS,K.W., 1974. Modified antigens in the indirect immunofluorescence test for schistosomiasis. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 23: 1072-1076.

65. WRIGHT, C. A.,1971. Flukes and Snails. George Allen and Unwin,Ltd., London,168p.