



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ALTERAÇÕES INDUZIDAS EM *Biomphalaria glabrata*
(SAY, 1818) APÓS TENTATIVAS DE ESTIMULAÇÃO
ARTIFICIAL DO SEU SISTEMA INTERNO DE
DEFESA**

CARINE MACHADO AZEVEDO

**Salvador - Bahia - Brasil
2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós – Graduação em Patologia

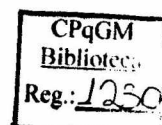
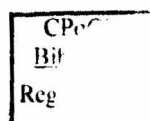
**ALTERAÇÕES INDUZIDAS EM *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) APÓS
TENTATIVAS DE ESTIMULAÇÃO ARTIFICIAL DO SEU SISTEMA INTERNO DE
DEFESA.**

CARINE MACHADO AZEVEDO

Orientador: DR. ZILTON DE ARAÚJO ANDRADE

Dissertação apresentada para obtenção do
grau de Mestre em Patologia Experimental

SALVADOR – BAHIA – BRASIL
2006

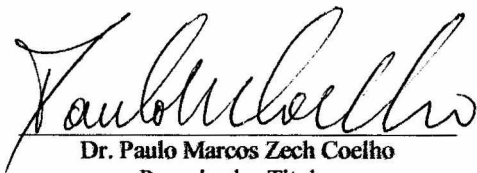


“ ALTERAÇÕES INDUZIDAS EM *Biomphalaria Glabrata* (SAY 1818) APÓS TENTATIVAS DE ESTIMULAÇÃO ARTIFICIAL DO SEU SISTEMA INTERNO DE DEFESA “

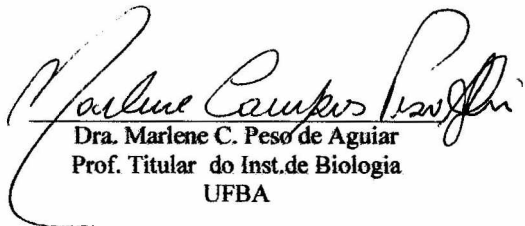
CARINE MACHADO AZEVEDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

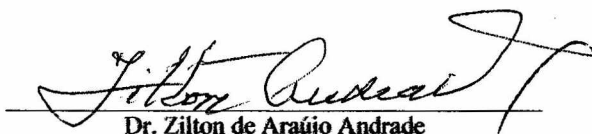
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Paulo Marcos Zech Coelho
Pesquisador Titular
CPqRR-FIOCRUZ



Dra. Marlene C. Pesó de Aguiar
Prof. Titular do Inst. de Biologia
UFBA



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

A Deus por iluminar meu caminho e derramar sempre suas bênçãos em minha vida;

Aos meus pais (Maria e David) por todo apoio em todos os momentos e amor incondicional, por terem me dado as bases para minha formação pessoal e realização desse sonho;

Aos meus irmãos (Cristiane e Isaac) que mesmo distantes, estão sempre torcendo pelo meu crescimento e realização;

A minha tia Florência pelo carinho e boa vontade em ajudar sempre que necessário.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Zilton Andrade pela oportunidade de iniciar minha vida científica, pela orientação e simplicidade, além do exemplo de mestre e pesquisador;

A Claudia Borges pela amizade, colaboração e sugestões fundamentais no desenvolvimento deste trabalho;

Ao técnico Antônio Carlos pelos momentos de descontração, amizade e pela ajuda na criação e infecção dos caramujos;

Aos companheiros do LAPEX (Manuela Caldas, Manuela Ribeiro, Rafael, Zaira, Liliane, Elizangela, Samaly, Tininha, Queli) e todos os outros que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, especialmente a mestranda Bárbara Assis por estar sempre disposta a ajudar e por ter me ensinado diversas técnicas importantes;

A Torriceli Thé por acompanhar minha vida científica e sempre me instigar a dar passos cada vez mais largos;

Aos vizinhos do LACEI pela convivência agradável e disponibilidade;

As bibliotecárias do CPqGM (Vânia e Fiscina) pelo auxílio na procura dos artigos e normatização da dissertação;

Ao CPqGM/Fiocruz e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	COMPONENTES CELULARES.....	17
2.2	COMPONENTES HUMORAIS.....	21
2.3	IMUNIDADE ADQUIRIDA.....	24
2.3.1	Memória imunológica	27
3	OBJETIVO GERAL	29
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4	JUSTIFICATIVA	30
5	MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1	ANIMAIS UTILIZADOS.....	32
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	32
5.2.1	Grupo I: Animais previamente “sensibilizados” com miracídios irradiados pelo Césio137 e infectados	32
5.2.2	Grupo II: Animais previamente “sensibilizados” com antígenos e infectados	33
5.2.3	Grupo III: Animais infectados e tratados	34
5.3	INOCULAÇÃO DOS ANIMAIS.....	34
5.4	OBTENÇÃO E IRRADIAÇÃO DOS MIRACÍDIOS.....	35
5.5	INFEÇÃO DOS CARAMUJOS.....	35
5.6	IRRADIAÇÃO DOS MIRACÍDIOS.....	36
5.7	PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE VERMES.....	36
5.8	DOSAGEM PROTÉICA DO CONTEÚDO ANTIGÊNICO OBTIDO.....	37
5.9	AVALIAÇÃO DA INFEÇÃO PELO <i>S. mansoni</i>	37

5.9.1	Preparação histológica	37
5.9.2	Teste de positividade	38
5.10	CONTAGEM DE CÉLULAS	38
5.11	Morfometria	39
5.12	Análise estatística	39
6	RESULTADOS	40
6.1	ELIMINAÇÃO DE CERCÁRIAS	40
6.2	CONTAGEM DE CÉLULAS	44
6.3	DADOS HISTOLÓGICOS	46
6.4	PRANCHAS	49
7	DISCUSSÃO	60
8	CONCLUSÕES	70
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01:** Média e desvio padrão do total de cercárias eliminadas/grupo de 5 caramujos em diferentes períodos de infecção ($p>0,05$). Os caramujos foram previamente inoculados com miracídios irradiados e não irradiados e posteriormente infectados com miracídios normais. dpe – dias pós-exposição.....41
- Figura 02:** Média e desvio padrão do total de cercárias eliminadas/grupo de 5 caramujos em diferentes períodos de infecção ($p>0,05$). Os caramujos foram previamente inoculados com antígenos de *S.mansoni*, *C. hepatica* e PBS e posteriormente infectados com miracídios normais.....41
- Figura 03:** Dinâmica da emissão de cercárias/indivíduo tratado com 250 mgOXA +500 mg PZQ.....42
- Figura 04:** Dinâmica da emissão de cercárias/indivíduo tratado com 500 mgOXA +1000 mg PZQ.....42
- Figura 05:** Dinâmica da emissão de cercárias/indivíduo controle.....43
- Figura 06:** Média e desvio padrão do total de células/grupo de 5 caramujos em diferentes períodos de infecção ($p> 0,05$). Os caramujos foram previamente inoculados com miracídios irradiados e não irradiados e posteriormente infectados com miracídios normais.....45
- Figura 07:** Média e desvio padrão do total de células/grupo de 5 caramujos em diferentes períodos de infecção ($p>0,05$). Os caramujos foram previamente inoculados

com antígenos de *S.mansoni*, *C. hepatica* e PBS e posteriormente infectados com miracídeos normais.....45

Figura 1A: Pequenos granulomas na região do pé (seta). Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 35 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 100x.....51

Figura 1B: Granulomas grandes na região do manto (setas). Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 42 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.....51

Figura 1C: Pequenos granulomas (seta) próximos à glândula nidamental. Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e não infectado, sacrificado 10 dias após a inoculação. Hematoxilina – eosina. Aumento 100x.....51

Figura 2A: Granuloma com micronódulos em seu interior (seta larga), sem evidências de restos parasitários. Algumas camadas de células alongadas na periferia (seta estreita). Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 35 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 400x.....53

Figura 2B: Glândulas digestivas com parasitismo moderado, observar a presença de esporocistos (seta estreita) e cercárias (seta larga) na ausência de reações celulares. Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 49 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 100x.....53

Figura 2C: Região do manto, observar a presença de granulomas (seta) próximos a parasitos em desenvolvimento normal, sem reação em torno (cabeça de seta). Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 35 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.....53

Figura 3A: Pequeno granuloma na região renal. Observar a presença de esporocistos íntegros próximos à reação (seta). Animal inoculado com antígeno de *C. hepatica* e infectado, sacrificado 42 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.....55

Figura 3B: Pequenos granulomas na região do colar do manto (setas). Notar a diferença de tamanho em relação às reações observadas nos animais inoculados com antígenos de *S. mansoni*. Animal inoculado com antígeno *C. hepatica* e infectado, sacrificado 35 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.....55

Figura 3C: Granuloma (seta) no ovoteste de um animal inoculado com miracídios irradiados e não infectado, sacrificado 35 dias após a inoculação. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.....55

Figura 4A: Região abaixo do colar do manto, animal inoculado com miracídios irradiados e infectado com miracídios normais, sacrificado 42 dpe. Observar a presença de algumas células frouxas na periferia (seta). Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.....57

Figura 4B: Região periférica da reação da figura anterior. Observar a presença de células com citoplasma alongando dando uma aparência fibrosa. Hematoxilina – eosina. Aumento 1000x (imersão).....57

Figura 4C: Nódulos hemocitários na região cefalopodal, notar a presença de material fagocitado no interior das células (cabeça de seta) e parasitos íntegros na periferia dos nódulos (seta). Caramujo inoculado com miracídios normais e infectado com miracídios normais (controle), sacrificado 42 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.....57

Figura 5A: Tecido próximo ao rim, observar a presença de células com citoplasma claro, floculoso (seta). Caramujo tratado com oxamniquina e praziquantel, sacrificado 31 dias após o final do tratamento. Hematoxilina – eosina. Aumento 400x.....59

Figura 5B: detalhe da figura anterior. Hematoxilina – eosina. Aumento 1000x (imersão).....59

Figura 5C: Desenvolvimento normal de esporocistos (cabeça de seta) e cercárias (seta) na região renal de um caramujo não tratado (controle). Hematoxilina – eosina. Aumento 100x.....59

RESUMO

ALTERAÇÕES INDUZIDAS EM *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818) APÓS TENTATIVAS DE ESTIMULAÇÃO ARTIFICIAL DO SEU SISTEMA INTERNO DE DEFESA. **CARINE MACHADO AZEVEDO**. A *Biomphalaria glabrata* pode responder de diferentes maneiras à penetração dos miracídios de *Schistosoma mansoni*, conforme os variados graus de resistência existentes entre as diferentes linhagens. Sabe-se que o caráter resistência/susceptibilidade é determinado geneticamente, sendo a resistência dominante sobre a susceptibilidade. Por outro lado, caramujos muito susceptíveis de início (como os da linhagem FS) podem vir a exibir um padrão de eliminação de cercárias e de reações histopatológicas sugestivo da presença de alta resistência, com o decorrer do tempo de infecção. Esta observação sugere que a *B. glabrata* pode desenvolver um tipo de imunidade adaptativa. O presente trabalho teve como objetivo estudar o comportamento da infecção pelo *S. mansoni* em *B. glabrata* após tentativa de estimulação artificial do Sistema Interno de Defesa destes caramujos. Para isso, caramujos foram previamente inoculados (Grupo I) com miracídios irradiados; tratados com antígenos do *S. mansoni* (Grupo IIA) ou de um outro parasito a ele não relacionado, a *Capillaria hepatica* (Grupo IIB); e um outro grupo (Grupo III) constituído por caramujos infectados e posteriormente tratados com oxamniquina + praziquantel. Em seguida, os animais de todos os grupos foram desafiados com 20 miracídios normais, exceto o último grupo, pois no mesmo não ocorreu a cura esperada. Os animais de todos os grupos foram analisados quanto à emissão de cercarias e sacrificados em diferentes pontos da infecção para exame histopatológico. Nos tecidos dos animais previamente "sensibilizados" apareceram nódulos de proliferação hemocitária (granulomas) sem elementos parasitários em seu interior, sendo em menor numero e intensidade no grupo inoculado com antígeno de *C. hepatica*. O aparecimento destes granulomas não evitou o desenvolvimento normal da infecção de prova, a qual ocorreu em vários órgãos sem aparente reação do hospedeiro, com emissão de cercarias, tal como visto nos controles. Os dados indicam que os hemócitos reagem focalmente e que sua mobilização por estimulação "antigênica" não se transmite ao resto da população hemocitária.

PALAVRAS – CHAVE hemócitos, *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, reação a antígenos.

ABSTRACT

CHANGES INDUCED IN *BIOMPHALARIA GLABRATA* (SAY, 1818) FOLLOWING TRIALS FOR ARTIFICIAL STIMULATION OF ITS INTERNAL DEFENSE SYSTEM. **CARINE MACHADO AZEVEDO.** *Biomphalaria glabrata* can react through different pathways to *Schistosoma mansoni* miracidium penetration, according to the degree of resistance/susceptibility presented by different snail strains, which is a genetically determined character, resistance being dominant..However, it has been observed that previous susceptible snail strain may change its reactive behavior along the course of infection, and later exhibits a pattern of cercarial shedding and histopatopathological picture compatible with high resistance. Such observation suggests the possibility of *B. glabrata* to develop a sort of adaptative immunity face a schistosome infection. To explore on this aspect, the present investigation looked for the behavior of *S. mansoni* infection in *B. glabrata* previously subjected to different means of artificial stimulation of its internal defense system. Snails previously inoculated with irradiated miracidia (Group IA); treated with *S. mansoni* antigens (Group IIA) or with a non-related parasite antigen (Group IIB) were challenged with 20 viable *S. mansoni* miracidia, and later looked for cercarial shedding and histopathologic changes at different times from exposition. Nodules of hemocyte accumulations were found at the site of "antigen" injection. These nodules resembled solid granulomas, and were larger and more frequent in snails injected with *S. mansoni* products as compared to those injected with *C. hepatica*. However, the presence of such granulomas did not avoid the *S. mansoni* challenge infection from developing in a similar way as that seen in their controls. The data are indicative that hemocytes are able to proliferate locally when stimulated, such capacity also remaining localized, not being shared by the population of hemocytes located everywhere else within the snail body.

Key-words – Hemocytes, *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*. Reaction to antigens.

1 INTRODUÇÃO

As interações parasito-hospedeiro intermediário ainda são relativamente pouco conhecidas na esquistossomose, mas elas se apresentam como das mais interessantes, o que tem servido para estimular um bom número de pesquisas sobre o assunto. O fato do hospedeiro-intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*, poder exibir diferentes graus de susceptibilidade ou resistência face ao parasito trematódeo, que varia dos extremos de refratário à tolerante, tem levado os pesquisadores a investigar as bases do sistema de defesa destes moluscos.

O Sistema Interno de Defesa (SID) dos invertebrados é primitivo, não possuindo linfócitos diversificados capazes de reconhecer diferentes antígenos, conseqüentemente também não ocorre expansão clonal de linhagens específicas destas células após apresentação de determinados antígenos. Além disso, estes invertebrados não possuem uma memória imunológica altamente específica e de longa duração como ocorre nos vertebrados (LOKER, 1994). Todavia, eles são capazes de mobilizar células e fatores plasmáticos, produzindo respostas celular e humoral eficientes contra os parasitos (YAKOVLEVA *et al.*, 2001).

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* (família Planorbidae) são os principais hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, que é um parasito do sistema sangüíneo do homem, causador da esquistossomose mansônica. Esta doença apesar de antiga e muito bem estudada, ainda afeta milhões de pessoas

distribuídas em 76 países da África, Ásia e América. No Brasil, a transmissão atualmente ocorre em diversas áreas endêmicas desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, além de focos isolados em diversos outros estados constituindo, portanto, um problema de saúde pública de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (COURA & AMARAL 2004). Nesse gênero três espécies são as principais transmissoras naturais desse verme: *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1848) e *B. glabrata* (Say, 1818), que é considerada a mais susceptível, sendo encontrada principalmente nos estados da Bahia (onde esta espécie é predominante) e Minas Gerais. A espécie *B. straminea* apresenta a maior distribuição geográfica com focos em diversos estados do país e predominância na região Nordeste e, mais ao sul do país encontra-se a *B. tenagophila* (ARAÚJO 1986, PARAENSE 1986 *apud* COURA & AMARAL 2004).

NEWTON (1953) verificou que a característica de resistência ou susceptibilidade tem uma determinação genética, sendo transmitida ao longo das gerações como uma herança mendeliana. Todavia, tal característica não é fixa, havendo graus diferentes de respostas, mesmo entre moluscos de uma mesma geração. Nos caramujos muito resistentes a resposta pode ocorrer logo em seguida à penetração dos miracídios, dentro de 24 – 48h (VAN DER KNAAP & LOKER 1990) ou após alguns dias. GODOY *et al.* (1997) observaram em animais resistentes, que após três meses de infecção, poucas cercárias foram eliminadas (aproximadamente 10) e no tecido, havia focos com esporocistos em diferentes estágios de diferenciação ao lado de forte infiltração de hemócitos, freqüentemente acumulados e formando estruturas encapsulantes contendo

esporocistos em desintegração no seu centro. Os caramujos considerados susceptíveis, no mesmo período de infecção, estavam eliminando muitas cercárias (acima de 100) e histologicamente existiam esporocistos em diferentes estágios de desenvolvimento distribuídos em diversos órgãos, mas sem sinal de reação tecidual. A correlação morfológico-funcional é bem constante, sendo que um quadro histológico de proliferação hemocitária, com formação de lesões encapsulantes em torno das formas evolutivas do parasito, com freqüentes sinais de degradação das estruturas parasitárias, corresponde à uma escassa eliminação de cercárias e, vice-versa; a presença de parasitos em multiplicação, sem sinais de reação hemocitária nos tecidos, se correlaciona com forte eliminação de cercárias. Aspectos intermediários destes dois extremos são encontrados freqüentemente. Que fatores são responsáveis pela reatividade mais ou menos eficiente dos caramujos face ao parasito? LEMOS & ANDRADE (2001) verificaram que caramujos tidos como altamente susceptíveis iam eliminando cada vez menos cercárias ao longo do tempo. Similarmente, o quadro histopatológico sofria uma correspondente alteração, com o aparecimento de reações teciduais cada vez mais intensas. Tal achado foi interpretado como uma evidência de imunidade adaptativa ocorrendo nos caramujos.

Na presente investigação se tentou induzir uma mudança de reatividade em *B. glabrata* altamente susceptível ao *S. mansoni* através da inoculação de miracídios, irradiados e não irradiados (controle), além de antígenos parasitários.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A defesa interna dos invertebrados se caracteriza por processos não específicos, não antecipatórios e não clonais que agem imediatamente após o contato com o organismo invasor sendo chamada imunidade inata ou natural. Diferentemente, nos vertebrados, além da imunidade inata composta por células (como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos) e componentes humorais, existe também a imunidade adaptativa composta por linfócitos T e B.

O Sistema Interno de Defesa (SID) dos moluscos inclui componentes celulares (hemócitos – células fagocíticas) e humorais (moléculas de reconhecimento de padrão, peptídeos antimicrobianos e citocinas), além de diferentes estratégias como produção de oxigênio tóxico e metabólitos do nitrogênio que são eficientes na destruição dos patógenos. Contudo, as propriedades do SID variam dentro dos diferentes grupos de moluscos. VAN DER KNAAP & MEULEMAN, (1986) demonstraram que a imunização induzida em *Lymnaea* é menos específica e mais duradoura que em *B. glabrata*. Eles verificaram que a imunização de *Lymnaea* com *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885) também destrói *Staphylococcus saprophyticus*, uma bactéria relacionada, e dura cerca de 64 dias, enquanto em *B. glabrata* dura apenas 21 dias. As diferenças podem existir também dentro do mesmo gênero, em *Biomphalaria*, por exemplo, a diferença no grau de susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni* varia entre as espécies (interespecífica) e entre suas diferentes linhagens (intraespecífica), sendo condicionada por fatores genéticos do hospedeiro e do parasito.

A primeira evidência de que a susceptibilidade dos moluscos é condicionada por fatores genéticos foi fornecida por NEWTON (1953, 1954), testando uma linhagem de *B. glabrata* de Salvador (Ba) com cepas portorriquenhas do verme. Além da contribuição da carga genética do caramujo no tipo de resposta desenvolvida, KAGAN & GEIGER (1965) verificaram que a constituição genética do parasito também influencia na infectividade. Assim, podem-se classificar as espécies de *Biomphalaria* em três diferentes grupos: susceptível ou tolerante (o parasito se desenvolve sem reação do hospedeiro); refratário (falta interação entre o parasito e o hospedeiro, pois esse não encontra sítios para penetrar no molusco) e resistente (onde há o reconhecimento, encapsulação e destruição do parasito após sua penetração no molusco).

2.1 COMPONENTES CELULARES

Segundo VAN DER KNAAP & LOKER (1990), em caramujos *Biomphalaria glabrata* são encontrados quatro diferentes tipos celulares funcionais: três deles são não circulantes ou células fixas e inclui as células endoteliais, células reticulares e células-poro. O outro tipo celular, chamado hemócito ou amebócito, circula na hemolinfa. As células endoteliais impedem a disseminação de micróbios e podem apresentá-los as células fagocíticas móveis. As células reticulares estão ancoradas nos tecidos por fibrilas extracelulares e têm alta capacidade para endocitar material particulado não próprio. E, as células-poro são semelhantes às células reticulares e endocitam seletivamente proteínas. Já para os hemócitos (células fagocíticas móveis) foram descritos por MATRICON *et al.* (1999a), três tipos distintos: células grandes (8 a 12 µm) com um compartimento túbulo-vesicular, um componente do sistema endocítico,

e com numerosas mitocôndrias e grandes agregados de partículas de glicogênio; células de tamanho médio (cerca de 8 μm de diâmetro) pobres em organelas e glicogênio; e células pequenas (5 a 6 μm) com poucas organelas e pobres em grânulos de secreção.

As células fagocíticas ou hemócitos ocorrem em todos os filos de invertebrados, atuam sozinhas ou em conjunto com fatores humorais. Estas células fagocitam partículas ou organismos relativamente pequenos, participam na formação de nódulos que seqüestram bactérias ou formam reações encapsulantes em torno de parasitos que são muito grandes para serem fagocitados. De acordo com LOKER & BAYNE (1986), o número de hemócitos circulantes aumenta quando caramujos *B. glabrata* são infectados com cepas compatíveis de *Schistosoma* em torno de dois dias pós-exposição e continua até 15 dias.

Os hemócitos apresentam heterogeneidade morfológica e bioquímica, podendo ter aparência granular ou hialina. De acordo com VAN DER KNAAP & LOKER (1990), os hemócitos de *Biomphalaria* podem ser distinguidos em duas subpopulações: os granulócitos e os hialinócitos. Os hialinócitos têm alta proporção núcleo/citoplasma, poucas estruturas lisossomais e apresentam pouca tendência para adesão no vidro e para formar pseudópodos ou fagocitar objetos. Já os granulócitos têm relativamente mais citoplasma e lisossomas, pseudópodos extensos e fagocitose ativa. Alguns autores classificam as duas categorias de hemócitos como tipos celulares distintos (HARRIS, 1975; YOSHINO, 1976; CHENG & GUIDA, 1980), enquanto outros acreditam

que eles representam diferentes estágios de desenvolvimento de uma mesma linhagem celular (SMINIA & BARENSEN, 1980).

Acredita-se que as células do Sistema Interno de Defesa (SID) dos caramujos são formadas no APO (órgão produtor de amebócitos); este órgão está localizado entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto (LIE *et al.* 1975). Trabalhos realizados por SULLIVAN *et al.* (1994), demonstraram a importância deste órgão no controle da infecção de *Biomphalaria*. Tais autores observaram uma redução significativa na produção de esporocistos e cercárias de *S. mansoni* por caramujos susceptíveis após o transplante do APO de uma linhagem resistente. Estudos neste sentido têm demonstrado que este órgão sofre hiperplasia e hipertrofia quando exemplares de *B. glabrata* são infectados com miracídios irradiados de *Echinostoma lindoense* (Sandground & Bonne, 1940) e desafiados com miracídios normais (LIE *et al.* 1975) ou quando inoculados com extrato de miracídios ou cercárias de *S. mansoni* (SULLIVAN *et al.* 2004). Contudo, o aumento no número de mitoses nem sempre está associado ao encapsulamento do parasito uma vez que caramujos de linhagens susceptíveis também são capazes de produzir mais hemócitos como consequência do estímulo parasitário.

Os hemócitos participam na destruição dos parasitos através de um processo denominado fagocitose. Este mecanismo de defesa é utilizado por seres de todos os filos de invertebrados e vertebrados e pode ser considerada uma resposta celular primária contra microrganismos invasores. Ensaio citoquímico realizado por KROSCHINSKI & RENWRANTZ (1988) demonstraram que estas células contêm

lisossomas que se fundem com fagossomas e liberam suas enzimas digestivas no vacúolo fagolisossomal cuja membrana possui bombas de prótons que garantem um decréscimo transitório no pH. Além disso, os hemócitos podem liberar enzimas no plasma. De acordo com MILLAR & RATCLIFFE (1994), as enzimas lisossomais são a fosfatase ácida e alcalina, lipase, esterase não específica, proteases, amilase e glicosidase.

As etapas principais da fagocitose são: reconhecimento, ingestão e morte. Segundo VAN DER KNAAP & LOKER (1990), após a infecção os hemócitos são direcionados para o local da infecção provavelmente por quimiotaxia. O passo seguinte seria o estabelecimento de contato com o tegumento do parasito; esta etapa de reconhecimento envolve a participação de lectinas que funcionam como opsoninas. As moléculas envolvidas no reconhecimento podem estar solúveis na hemolinfa ou ligadas à membrana dos hemócitos. O próximo passo consiste na morte do parasito que envolve a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos hemócitos (HAHN *et al.*, 2001).

De acordo com BAYNE *et al.* (2001), a explosão respiratória pelas células fagocíticas e a conseqüente produção de ROS é o resultado da ativação e reunião do complexo NADPH oxidase na membrana plasmática do fagócito. Este complexo enzimático catalisa a produção de superóxido (O_2^-), que serve como primeiro radical na cadeia de produção de oxigênios reativos adicionais: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio simples (1O_2). Adicionalmente, a maioria dos tipos celulares fagocíticos possuem uma óxido nítrico

sintase induzível (iNOS), que gera óxido nítrico (NO) a partir de oxigênio molecular e arginina. Embora NO tenha atividade citotóxica por si só, ele rapidamente reage com O_2^- para formar uma molécula muito mais reativa, o peroxinitrito ($ONOO^-$). Nos neutrófilos de mamíferos a maioria do O_2^- produzido é convertido em H_2O_2 (MAKINO *et al.* 1986) e a maior parte deste é consumida por mieloperoxidase (MPO), uma enzima que usa H_2O_2 e íon clorido para produzir HOCl, o mais potente antibiótico produzido pelas células de defesa. Assim como nos mamíferos, os hemócitos dos moluscos geram HOCl (TORREILLES *et al.*, 1997) e NO (CONTE *et al.*, 1995). Desta forma, os hemócitos têm o potencial de produzir moléculas altamente reativas (O_2^- , OH, 1O_2 , HOCl e $ONOO^-$) e de vida relativamente longa (NO e H_2O_2); cada molécula oxidante difere em suas propriedades reativas. O papel específico de cada molécula oxidante na morte do patógeno não está muito claro, mas estudos indicam que depende da bactéria ou fungo envolvido. Isto se deve ao fato dos patógenos terem desenvolvido uma variedade de estratégias antioxidantes e a morte efetiva requer a produção da molécula adequada no tempo e local certos.

2.2 COMPONENTES HUMORAIS

De acordo com BAYNE *et al.* (1980b), o plasma livre de células, tanto de caramujos susceptíveis quanto resistentes, não causa dano aos esporocistos. Em estudos *in vitro* esses autores observaram que a hemolinfa livre de células provenientes de linhagens susceptíveis e resistentes de *B. glabrata* não é capaz de alterar visivelmente a morfologia do esporocisto. Na verdade, os componentes do plasma possuem papel importante na ativação dos hemócitos e opsonização de material

estranho. De acordo com BOSWELL & BAYNE (1986) e FRYER & BAYNE (1989), fatores plasmáticos de caramujos resistentes podem facilitar a destruição citotóxica do parasito por hemócitos de caramujos susceptíveis. Evidências para isto foram obtidas tanto *in vitro* (BAYNE *et al.*, 1980a) quanto *in vivo* pela transferência de plasma de caramujos resistentes para susceptíveis (GRANATH & YOSHINO, 1984). Os diferentes fatores humorais presentes na hemolinfa possuem papel fundamental na sobrevivência ou morte dos parasitos na interação com os moluscos hospedeiros. Entre estes fatores estão as lectinas, também conhecidas como aglutininas pela sua habilidade de aglutinar partículas como eritrócitos de vertebrados, bactérias, protozoários e fungos. As lectinas são proteínas sintetizadas por hemócitos, capazes de se ligar específica e reversivelmente a carboidratos. Podem ser encontradas no plasma, onde imobilizam partículas estranhas por aglutinação, integradas na membrana dos hemócitos ou adsorvidas na sua superfície (MILLAR & RATCLIFFE, 1994). Elas possuem, portanto, um papel importante no reconhecimento do não próprio, apesar de os mecanismos pelos quais isto ocorre serem pouco conhecidos.

De acordo com BAYNE *et al.* (1980a), as lectinas do plasma de *B. glabrata* possuem receptores de carboidratos que têm sido encontrados na superfície de esporocistos. Em alguns moluscos funcionam também como opsoninas, facilitando, assim, o processo de fagocitose. Estas proteínas apresentam grande heterogeneidade em termos de estrutura e propriedades físico-químicas, uma vez que os invertebrados são um grupo polifilético e sofreram diferentes pressões ambientais ao longo da evolução.

As lectinas podem se ligar aos hemócitos e parasitos de diferentes maneiras. Elas podem estar associadas com a membrana plasmática dos hemócitos, onde aparentemente funcionam como receptores. Alternativamente, podem ligar-se a carboidratos dos parasitos e então associar-se a superfície dos hemócitos via receptores específicos ou ainda, ligar-se simultaneamente a epítomos carboidratos (ou polipeptídeos) do parasito e do hospedeiro, funcionando como uma ponte entre eles. Além disso, uma mesma lectina pode-se ligar a diferentes carboidratos com graus variados de afinidade e tem sido mostrado que muitos gastrópodos possuem múltiplas lectinas na hemolinfa, o que permite um maior grau de reconhecimento (BAYNE *et al.*, 1980a).

Além das lectinas, outras proteínas têm sido identificadas na hemolinfa de *Biomphalaria*: as citocinas. Estas moléculas têm sido encontradas não só em moluscos, mas também em outros invertebrados como insetos, anelídeos, equinodermos e tunicados (OTTAVIANI *et al.*, 1993, 1995). Moléculas com atividade imunológica, funcional e/ou biológica semelhante a IL-1 têm sido detectadas ou isoladas em caramujos (GRANATH *et al.*, 1994). Nos invertebrados esta citocina (IL-1) estimula a proliferação e migração celular, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio. Em experimentos utilizando *B. glabrata*, CONNORS *et al.* (1998a) verificaram que a infecção com larva de *Schistosoma* decresce significativamente os níveis plasmáticos de IL-1 em animais de uma linhagem susceptível, enquanto em animais resistentes os níveis desta molécula são significativamente mais elevados e permanecem mais altos após a infecção. As citocinas são, portanto, moléculas ancestrais funcionalmente

conservadas que durante a evolução mantiveram seu modo de ação redundante e a alta promiscuidade de seus receptores (OTTAVIANI *et al.*, 1995).

2.3 IMUNIDADE ADQUIRIDA

A resposta induzida nas interações parasito – hospedeiro tem sido chamada imunidade adaptativa ou adquirida e geralmente refere-se à resposta mais rápida ou mais intensa dos vertebrados após um segundo contato com determinados antígenos. Este tipo de resposta envolve a participação de linfócitos T e B que reconhecem especificamente diferentes tipos de antígenos, sofrem expansão clonal, produzem anticorpos específicos (linfócitos B) e alguns destes se tornam células de memória. Até o presente momento, a imunidade adaptativa tem sido sugerida em invertebrados, mas não se conhece quais mecanismos estariam envolvidos neste processo.

Diversos autores têm realizado estudos para verificar se os invertebrados podem apresentar uma resposta aumentada a um segundo desafio com o mesmo material antigênico. Em alguns destes estudos, miracídios irradiados foram utilizados como “vacina” numa tentativa de sensibilizar caramujos. SULLIVAN *et al.* (1982) verificaram o desenvolvimento de resistência contra *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967) em caramujos *B. glabrata* previamente infectados com miracídios *Ribeiroia marini* (Faust & Hoffman, 1934) irradiados. Neste caso, todos os esporocistos irradiados devem ser mortos para que a resistência adquirida se desenvolva, uma vez que a presença de esporocistos viáveis interferem no processo. No caso de LIE *et al.* (1975), a resistência em *B. glabrata* foi induzida através da infecção desses caramujos com miracídios

irradiados de *E. lindoense*. Eles observaram que nos animais re-infectados com miracídios normais da mesma espécie, estes foram destruídos de forma semelhante a que ocorre nos animais resistentes, com encapsulação dos esporocistos pelos hemócitos. Esta resistência observada foi espécie-específica e parece estar condicionada a destruição total dos esporocistos da primeira infecção. Diferentemente, SIRE *et al.* (1998) infectaram caramujos *B. glabrata* com 1 miracídio de *S. mansoni* e após infecção desafio com 1 a 5 miracídios verificaram que estes parasitos apresentaram desenvolvimento anormal e alterações estruturais. Contudo, os parasitos estavam livres de encapsulação celular sugerindo o desenvolvimento de imunidade humoral homóloga adquirida.

LIE *et al.* (1983) também conseguiram induzir resistência em *B. glabrata* susceptíveis, infectando-os com miracídios de *S. mansoni* irradiados e, após alguns dias, re-infectando-os com miracídios da mesma espécie, não irradiados. Eles obtiveram uma taxa de 23% de infecção, enquanto nos animais controles esta taxa foi de 73%. Tais autores sugerem que a resistência induzida indica a presença de algum grau de resistência prévia ou latente do hospedeiro contra o parasito, que foi ativada pelos miracídios irradiados, já que estes sofreram encapsulação em um período relativamente curto. Contudo, não se conhece quais fatores poderiam estar envolvidos neste processo, no que se refere aos detalhes moleculares e mesmo como as células de defesa estariam atuando e fazendo o reconhecimento dos miracídios após uma re-infecção.

LEMOS & ANDRADE (2001) verificaram que uma mudança do estado reacional pode se desenvolver espontaneamente ao longo do tempo de uma primeira e única infecção. Eles utilizaram caramujos *B. glabrata* de uma linhagem altamente susceptível a infecção pelo *S. mansoni* e observaram que ocorria grande eliminação de cercárias nas fases iniciais de infecção, com um quadro histológico mostrando proliferação parasitária intensa na ausência de resposta tecidual. Porém, com o passar do tempo ocorreu uma redução progressiva na quantidade de cercárias eliminadas, ao mesmo tempo em que foram observadas, histologicamente, reações encapsulantes em torno de parasitos em desintegração. Assim, foi sugerido que tais resultados se deviam ao desenvolvimento de algum tipo de imunidade adaptativa.

Em trabalho recente, AZEVEDO *et al.* (2004) irradiaram caramujos *B. glabrata* infectados pelo *S. mansoni* a fim de curá-los para então re-infectá-los com o objetivo de verificar se esses caramujos desenvolveriam algum tipo de imunidade. Estes autores observaram que a maioria dos parasitos apresentou lesões (necrose, tumefação, dissolução, etc). Apesar disto, alguns poucos escaparam dos efeitos da irradiação e reiniciaram a infecção. Este fato impossibilitou a re-infecção, já que segundo SULLIVAN *et al.* (1982) todos os esporocistos devem ser mortos para que a resistência adquirida possa ser observada.

Esses diversos trabalhos reforçam a hipótese de COOPER (1969b) *apud* LIE *et al.* (1975) de que a evolução da imunidade, com componentes e respostas similares àquelas dos vertebrados, pode ter se originado, não em peixes ciclóstomos, mas muito mais inicialmente, entre os invertebrados.

2.3.1 Memória imunológica

O processo de imunidade adquirida está relacionado ao desenvolvimento de uma memória imunológica. O conhecimento acerca do processo de memória imunológica que se desenvolve na resposta imune adaptativa nos vertebrados baseia-se em mecanismos identificados no sistema imune destes organismos. Estes consistem na produção de células T de memória, que respondem de forma mais rápida e eficiente frente à uma segunda infecção. Assim, existe dificuldade em se pensar em outro mecanismo que poderia resultar em memória e uma vez que os invertebrados não possuem a maquinaria molecular e celular existente nos vertebrados, eles são tidos como organismos incapazes de desenvolver memória (KURTZ, 2004). Contudo, a possibilidade de existência de memória nos invertebrados tem sido argumentada, e esta seria menos específica e duradoura em relação aos vertebrados.

A maior parte das evidências de especificidade e memória nos invertebrados provêm de estudo de rejeição tecidual entre diferentes colônias de celenterados, esponjas e tunicados. Este processo nos vertebrados é provocado por uma reação imunológica específica e pode ser mediada por células T CD8 citotóxicas, por células Th1 ou por ambas (JANEWAY, 2002). Do ponto de vista evolutivo, a pressão de seleção que levaria a evolução desse sistema não seria a defesa contra patógenos e sim a necessidade de proteção contra a competição por organismos de outros grupos (HARVELL, 1990).

O termo memória refere-se à habilidade do sistema imune em recordar características previamente encontradas e está relacionado à especificidade (grau pelo qual o sistema imune identifica diferentes antígenos). Tal termo deve ser utilizado com cuidado já que é um mecanismo dependente de especificidade e não está claro o quão específicas são as reações de defesa nos invertebrados. Parece que este mecanismo varia muito entre os diferentes grupos, por exemplo, larva do besouro da farinha *Tenebrio molitor* (L.) tem resistência aumentada ao fungo após o desafio com LPS, que é de origem bacteriana. Entretanto, KURTZ & FRANZ (2003), utilizaram um sistema modelo de um copépodo (mini crustáceo) infectado com uma tênia e mostraram que o sucesso da reinfecção depende da semelhança antigênica entre os parasitos consecutivamente encontrados (infecção e re-infecção). Estes investigadores analisaram o desenvolvimento de memória linhagem-específica no hospedeiro copépodo *Macrocyclops albidus* (J.) contra o parasito natural *Schistocephalus solidus*. Após a infecção, cada copépodo foi reinfectado com parasitos irmãos ou não relacionados. Eles observaram uma redução na infecção secundária nos copépodos reinfectados com parasitos irmãos em relação àqueles re-infectados com parasitos não relacionados. Da mesma forma, LIE *et al.* (1975) verificaram que caramujos *B. glabrata* infectados com miracídios irradiados de *Echinostoma* apresentavam reduzida taxa de infecção quando re-infectados com parasitos da mesma espécie ou de espécie relacionada, mas o mesmo não ocorria quando re-infectados por outras espécies como *S. mansoni* ou *Paryphostomum segregatum* (Dietz, 1909). Este achado indica que o sistema de defesa dos invertebrados pode ser capaz de desenvolver memória

específica. Porém, o mecanismo responsável pela memória espécie-específica ainda é desconhecido, mas é possível que ocorra a participação de lectinas.

3 OBJETIVO GERAL

Estudar o comportamento da infecção causada pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) após tentativas de estimulação artificial do seu sistema de defesa interna.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Testar diversos métodos de estimulação artificial, tais como, o contato prévio com miracídios irradiados, injeções de antígenos do verme adulto, o tratamento de moluscos infectados pela quimioterapia específica, quanto à capacidade de induzir imunidade nos caramujos face à uma infecção de prova;
- ▶ Estudar histologicamente o comportamento da infecção de prova nos animais “sensibilizados” e seus controles;
- ▶ Relacionar os quadros histológicos observados com o número de hemócitos circulantes nos animais “sensibilizados” e seus controles.

4 JUSTIFICATIVA

De acordo com TELES (2005), a esquistossomose ainda é um problema de saúde pública no Brasil, principalmente nas regiões sudeste e nordeste, sendo que nas regiões norte e sul, as áreas endêmicas apresentam-se mais dispersas e isoladas. A transmissão da esquistossomose ocorre em áreas endêmicas do Maranhão ao Espírito Santo e Minas Gerais. Existem também focos isolados no Distrito Federal, Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Assim, de acordo com COURA e CAMILLO-COURA (1980) nenhum método isolado é capaz de controlar a esquistossomose sendo necessário abordagens multidisciplinares tais como a melhoria das condições sanitárias básicas, educação sanitária, tratamento específico da população e controle dos caramujos.

Nas regiões onde os caramujos são muito susceptíveis e conseqüentemente eliminam grande quantidade de cercárias, existe maior risco de desenvolvimento da forma grave da doença. Segundo ZUIM *et al.* (2005) e ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.* (1991 e 1995), os trematódeos oriundos de moluscos mais susceptíveis provocam patogenicidade mais grave e altos níveis de mortalidade no hospedeiro definitivo e os miracídios têm maior capacidade de infectar os hospedeiros intermediários (ZANOTTI-MAGALHÃES, 1997). Em roedores infectados experimentalmente com cercárias provenientes de moluscos mais susceptíveis, ZUIM *et al.* (2005) e ZANOTTI-MAGALHÃES *et al.* (1993) verificaram que ocorria maior eliminação de ovos e maior número de granulomas por área de tecido hepático. Com isso, estudos sobre a relação

parasito-hospedeiro em caramujos susceptíveis na tentativa de melhor entender os mecanismos envolvidos nos processos de defesa destes caramujos podem ser importantes (mesmo que de forma indireta) no controle da doença.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados exemplares adultos (medindo 11 a 13 mm de acordo com a classificação de (Theron *et al.*, 1998) de *B.glabrata* (linhagem Feira de Santana, Ba) susceptíveis à infecção pela cepa FS do *S. mansoni*, mantidos há cerca de 25 anos no moluscário do CPqGM (Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz). Os caramujos foram mantidos em aquários com água desclorificada contendo CaCO_3 (carbonato de cálcio) e alimentados 3 vezes por semana com folhas de alface fresca ou ração para rato em pó. Após o período pré-patente os caramujos foram transferidos individualmente para frascos plásticos de 180 mL. A água foi trocada periodicamente, sempre que observada a presença excessiva de detritos orgânicos ou opacificação da mesma. As seguintes estratégias para a sensibilização foram usadas: 1) Injeção de miracídios irradiados, 2) Injeções de antígenos solúveis do *S. mansoni* e da *Capillaria hepatica* (Bancroft, 1893), 3) Cura de uma infecção prévia com praziquantel e oxamniquina.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

5.2.1 Grupo I: Animais previamente “sensibilizados” com miracídios irradiados pelo Césio 137 e infectados

Grupo IA - 30 caramujos inoculados com aproximadamente 15 miracídios irradiados com 4000 rads;

Grupo IB - 30 caramujos inoculados com aproximadamente 15 miracídios não irradiados (controle);

Grupo IIIC - 30 caramujos apenas infectados

5.2.2 Grupo II: Animais previamente “sensibilizados” com antígenos e infectados

Grupo IIA - 30 caramujos inoculados com 20µl de antígeno do *S. mansoni* (0.5mg/ml);

Grupo IIB - 30 caramujos inoculados com 20µl de antígeno de *C. hepatica* (0.5mg/ml);

Grupo IIC - 30 caramujos inoculados com 20µl de PBS (Phosphate Buffered Saline) (controle).

Grupo IID – 30 caramujos apenas infectados

Os animais dos diferentes grupos acima foram submetidos à infecção de prova (20 miracídios normais de *S. mansoni*) em diferentes períodos após a sensibilização: Grupo I 10 dias e Grupo II 3 dias após a segunda inoculação. Como controle comum para todos os grupos foram ainda utilizados animais normais (não infectados) para comparação do número de hemócitos circulantes. Para avaliar histologicamente o efeito isolado da inoculação de miracídios irradiados ou antígenos, alguns animais dos grupos acima não foram submetidos à infecção de prova e foram sacrificados 10 e 35 dias após a inoculação.

5.2.3 Grupo III: Animais infectados e tratados

Caramujos infectados como descrito no item 5.5 foram submetidos ao teste de positividade (item 5.9.2) na 5ª semana de infecção e aqueles positivos foram separados nos seguintes grupos:

Grupo IIIA: 30 caramujos infectados e tratados com 250mg/Kg de Oxamniquina (Mansil® 250mg Lote 304-42001) + 500mg/Kg de Praziquantel (600mg Lote 198);

Grupo IIIB: 30 caramujos infectados e tratados com 500mg/Kg de Oxamniquina (Mansil® 250mg Lote 304-42001) + 1000mg/Kg de Praziquantel (600mg Lote 198);

Os caramujos foram tratados individualmente com doses diárias destas drogas misturadas a 100 mg da ração durante 5 dias consecutivos e após 10 dias o tratamento foi repetido. A 5ª semana de infecção corresponde ao tempo 0 (inicial) do tratamento.

Grupo IIIC: 30 caramujos infectados e não tratados (controle).

5.3 INOCULAÇÃO DOS ANIMAIS

Os caramujos foram anestesiados numa solução com cristais de mentol a 0.30% durante 7h a 8h e após exposição das partes moles, foram inoculados na região cefalopodal através de uma seringa de insulina (1/2cc), de acordo com os respectivos grupos. No Grupo I os miracídios concentrados foram contados com o auxílio de microscópio estereoscópico (Leica Zoom 2000) e o inóculo ajustado para aproximadamente 15 miracídios/20 µl. E os animais do Grupo II sofreram duas inoculações (com intervalo de 6 dias) do antígeno diluído.

5.4 OBTENÇÃO E IRRADIAÇÃO DOS MIRACÍDIOS

Oito (8) camundongos suíços, com no mínimo 50 dias de infecção pelo *S. mansoni*, foram previamente anestesiados e em seguida sacrificados por deslocamento da coluna cervical. Em seguida, os fígados foram retirados e esmagados em um tamis Granutest, USBS 40, com abertura de 0,42 mm – número 35, colocando-se o material em um cálice de sedimentação, completando com salina a 0,85% e acondicionado a 4°C para evitar a eclosão dos miracídios. Após 50 minutos os ovos do parasito foram lavados com salina a 0.85% a 4°C por 50 min. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuspenso em água destilada (em temperatura ambiente) e despejado em um vasilhame de boca larga que foi deixado sob luz intensa (três lâmpadas de 60 watts) por 30 minutos para eclosão dos miracídios. Posteriormente, o líquido foi transferido para um balão volumétrico envolto em papel escuro, deixando-se apenas o gargalo descoberto, por um tempo de 10 a 20 minutos exposto à luz.

5.5 INFECÇÃO DOS CARAMUJOS

O líquido da região do gargalo foi transferido para um béquer e contou-se o número de miracídios em 1 mL e ajustou-se o inóculo para obtenção de 20 miracídios/ml. Os moluscos de todos os grupos foram colocados em pequenos poços de placas de cultura (24 poços), onde foi acrescentado um volume de água contendo os

respectivos miracídios e água destilada suficiente para que cada animal ficasse totalmente submerso, durante 4h.

5.6 IRRADIAÇÃO DOS MIRACÍDIOS

O líquido da região do gargalo foi transferido para um tubo falcon (50 ml) e levado para o irradiador IBL 937 C (tipo H, fonte céσιο 137, Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France), onde os miracídios receberam doses de 4000 rads. Após irradiação, os miracídios foram acondicionados a 4°C durante 1h e 40min para que pudessem concentrar no fundo do tubo, o sobrenadante foi descartado e os miracídios inoculados como descrito no item 5.3.

5.7 PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE VERMES

Com uma pipeta estéril foram colocados 2.0 mL de PBS pH 7.4 (esterilizado) no homogeneizador de vidro (Wheaton) com capacidade para 7.0 mL. Neste mesmo homogeneizador, foram colocados os vermes adultos e no gelo fez-se a maceração dos mesmos 6 a 7 vezes em intervalos de 5 minutos durante 1 hora. Em seguida, este líquido foi distribuído em um eppendorf e centrifugado a temperatura de 4° C por 45 min. a 14000 rpm. Após a centrifugação, a parte protéica foi retirada com uma pipeta e depositada em eppendorf e então guardado no freezer a – 20°C, para posterior dosagem e utilização.

5.8 DOSAGEM PROTÉICA DO CONTEÚDO ANTIGÊNICO OBTIDO

Foi feita a dosagem protéica pelo método BCA. Utilizando-se o “Micro BCA Protein Assay Kit” da PIERCE (lote GA93284). Este kit é uma técnica baseada na utilização do ácido bicinconínico (BCA) para detecção colorimétrica do total de proteínas presentes numa amostra possibilitando a sua quantificação. Para isto, utiliza-se a curva padrão de soroalbumina bovina e posterior leitura no espectrofotômetro (Molecular Devices E max precision microplate reader, U.S.A) a 650 nm de absorvância. Neste método há uma reação púrpura que se forma devido à quelação de duas moléculas de BCA com um íon de cobre, presentes em um meio alcalino. Essa solução aquosa apresenta uma grande absorvância a 650 nm. O conteúdo antigênico obtido foi diluído em PBS (pH 7.4) no momento do uso para a concentração desejada.

5.9 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PELO *S. mansoni*


* Para avaliar se os caramujos expostos aos miracídios foram infectados e como estava se desenvolvendo a infecção, foi realizada análise histopatológica e teste de eliminação de cercárias. Visando verificar alterações quantitativas nos hemócitos periféricos, foi realizada a contagem total de células na hemolinfa.

5.9.1 Preparação histológica

* Cinco (5) animais/grupo foram sacrificados 35, 42 e 49 dpe (dias pos exposição) para análise histopatológica. Para isto, os animais de cada grupo foram anestesiados

em cristais de mentol e em seguida, a concha foi quebrada fazendo-se pressão com uma lâmina, sendo o corpo do animal retirado com o auxílio de pequenas pinças oftálmicas. Posteriormente fixados em 28mL de líquido de Bouin misturados a 2 mL de ácido acético por 4 horas; após este tempo o fixador foi substituído por álcool a 70% e o material enviado para o Laboratório de Histopatologia (Localizado no CPqGM), onde procederam as etapas até a preparação das lâminas.

5.9.2 Teste de positividade

 O teste de eliminação de cercárias foi realizado 35, 42 e 49 dias pós exposição de prova nos caramujos sensibilizados e semanalmente (a partir da 5ª semana) nos caramujos tratados. Para isso os caramujos foram colocados individualmente em frascos contendo 5 mL de água desclorada e expostos à luz intensa (3 lâmpadas de 60 watts) durante 1h. Após exposição, 1 mL da água contendo as cercárias foi distribuído em placa escavada de 12 poços e em cada poço adicionou-se uma gota de lugol para imobilização e coloração das mesmas, que foram contadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio.

5.10 CONTAGEM DE CÉLULAS

Inicialmente os animais (5/grupo) foram lavados em água destilada e colocados para secar em papel filtro, em seguida foi feita à limpeza da concha com álcool a 70% com o auxílio de um cotonete. Posteriormente, os caramujos foram colocados

individualmente sobre uma placa de Petri e perfurados com uma agulha 26-G ½ próximo à região do hepatopâncreas. A hemolinfa extravasada foi aspirada e colocada em tubos de hemólise siliconizados (Vacuum II Labnew®), mantidos no gelo. Em seguida, 10 µl da hemolinfa foram misturados a 5 µl do corante vermelho neutro a 5% e então 10 µl desta mistura foram colocados numa câmara de Neubauer para contagem das células (Bezerra et al., 1997).

5.11 Morfometria

A morfometria foi realizada em microscópio (Zeiss Axioskop 2, Alemanha) com sistema de câmera acoplada (JVC TK-128OU, Japão) utilizando software Axiovision 2.0 Zeiss. Após observação de todas as lâminas, foram selecionadas aquelas que possuíam o menor e o maior nódulo. Estes foram fotografados no aumento de 10X10 e em seguida a superfície do nódulo foi delimitada com o “mouse” para o cálculo da área (em µm²) pelo programa acima citado.

5.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis que compara três ou mais grupos independentes, e o pós-teste de Dunn. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$ entre os diferentes grupos em cada ponto de análise (35, 42 ou 49 dpe) ou dentro do mesmo grupo nos diferentes dias.

6 RESULTADOS

6.1 ELIMINAÇÃO DE CERCÁRIAS

Nos animais que sofreram algum tipo de “sensibilização” algumas diferenças discretas quanto à eliminação das cercárias foram observadas em relação aos controles. Os caramujos inoculados previamente com miracídios irradiados eliminaram menos cercárias que o grupo controle em ambos os pontos analisados, sendo a média do grupo experimental (Grupo IA) 46,8 aos 35 dpe e do grupo controle (Grupo IB) 90,4 no mesmo período (Figura 01). Quando inoculados com antígenos de *S. mansoni* os valores foram sempre menores que o grupo controle apenas infectado (Figura 02). Por outro lado, aqueles inoculados previamente com antígenos de *C. hepatica* apresentaram valores maiores que ambos os controles aos 42 e 49 dpe (Figura 02). Contudo, quaisquer das diferenças observadas entre os diversos grupos chegaram a alcançar significância estatística.

Os animais tratados com oxamniquina+praziquantel deixaram de eliminar cercárias a partir da primeira semana após o início do tratamento, permanecendo negativos por um período de 4 (Grupo IIIA – Figura 03) a 6 semanas (Grupo IIIB – Figura 04). Porém, após esse período os animais sobreviventes voltaram a eliminar um número progressivamente maior de cercárias (Grupo IIIA). Diferentemente, os animais controles permaneceram eliminando cercárias por todo o período do experimento (Figura 05).

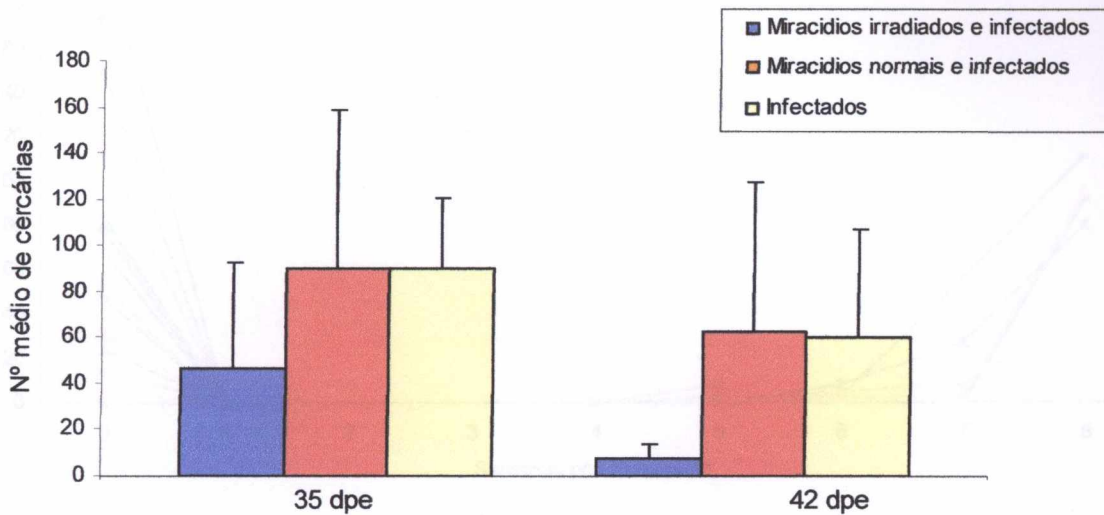


Figura 01: Média e desvio padrão do total de cercárias eliminadas/grupo de 5 caramujos em diferentes períodos de infecção ($p > 0,05$). Os caramujos foram previamente inoculados com miracidios irradiados e não irradiados e posteriormente infectados com miracidios normais.
dpe – dias pos exposição.

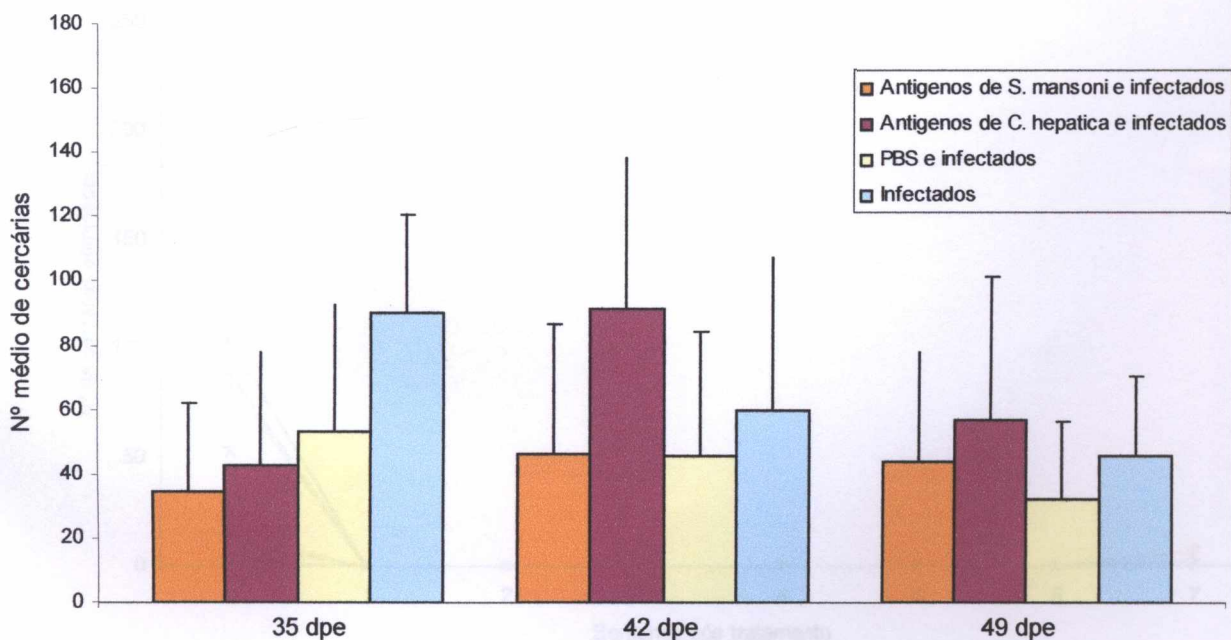


Figura 02: Média e desvio padrão do total de cercárias eliminadas/grupo de 5 caramujos em diferentes períodos de infecção ($p > 0,05$). Os caramujos foram previamente inoculados com antígenos de *S.mansoni*, *C. hepatica* e PBS e posteriormente infectados com miracidios normais.
dpe – dias pos exposição.

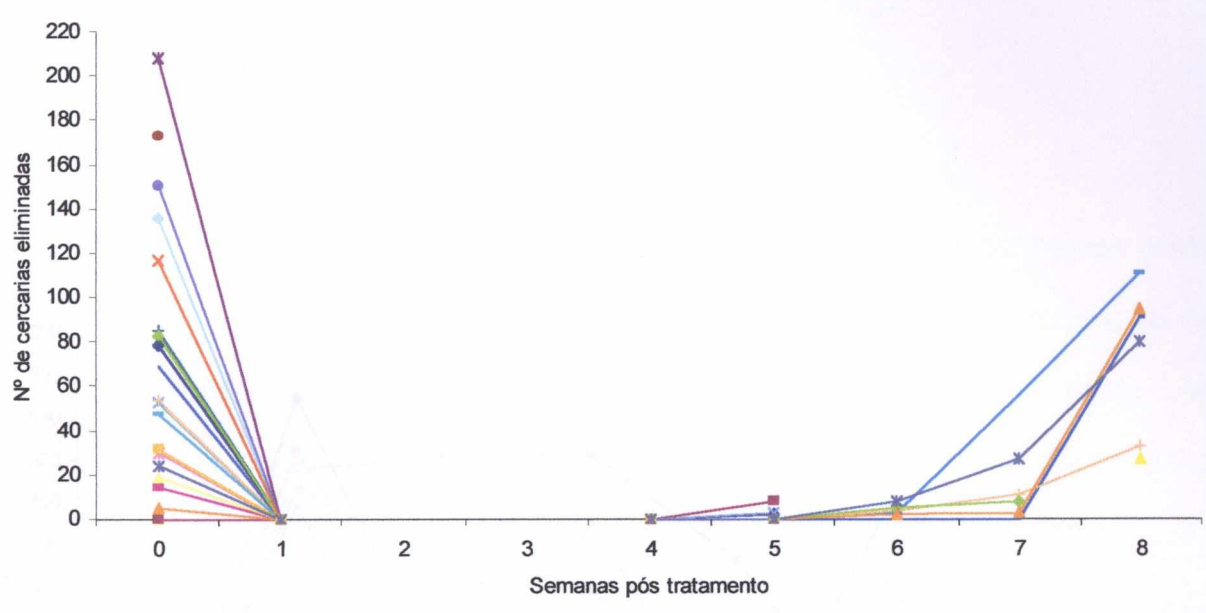


Figura 03: Dinâmica da emissão de cercárias/indivíduo tratado com 250 mgOXA +500 mg PZQ.

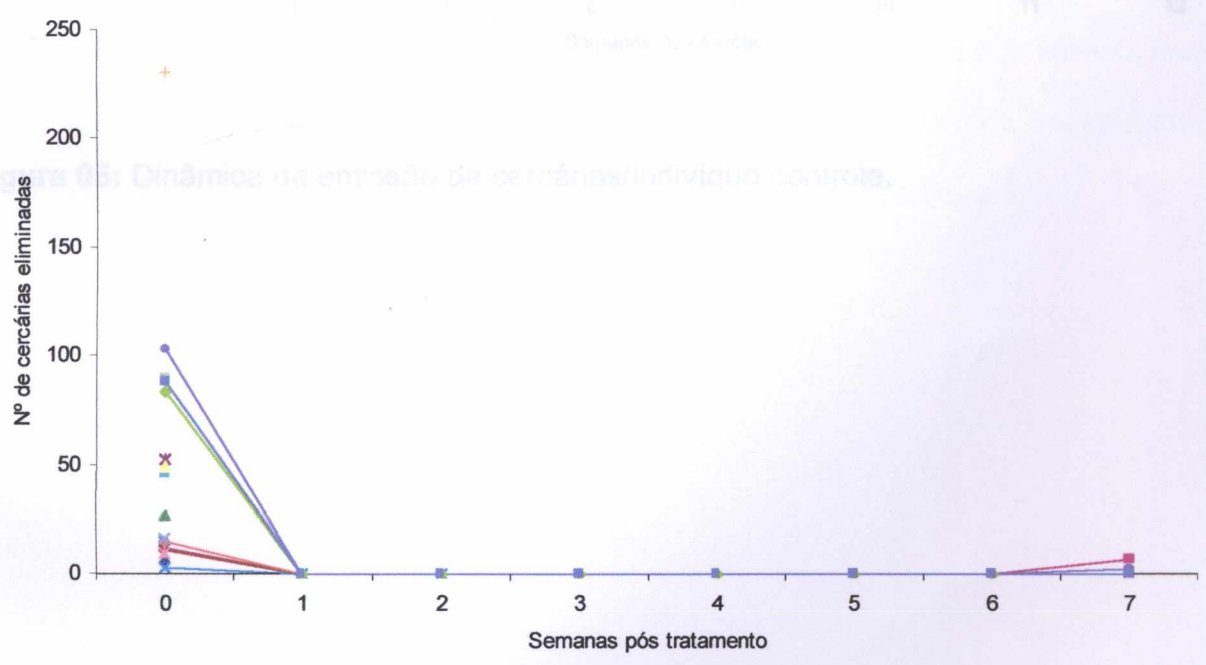


Figura 04: Dinâmica da emissão de cercárias/indivíduo tratado com 500 mgOXA +1000 mg PZQ.

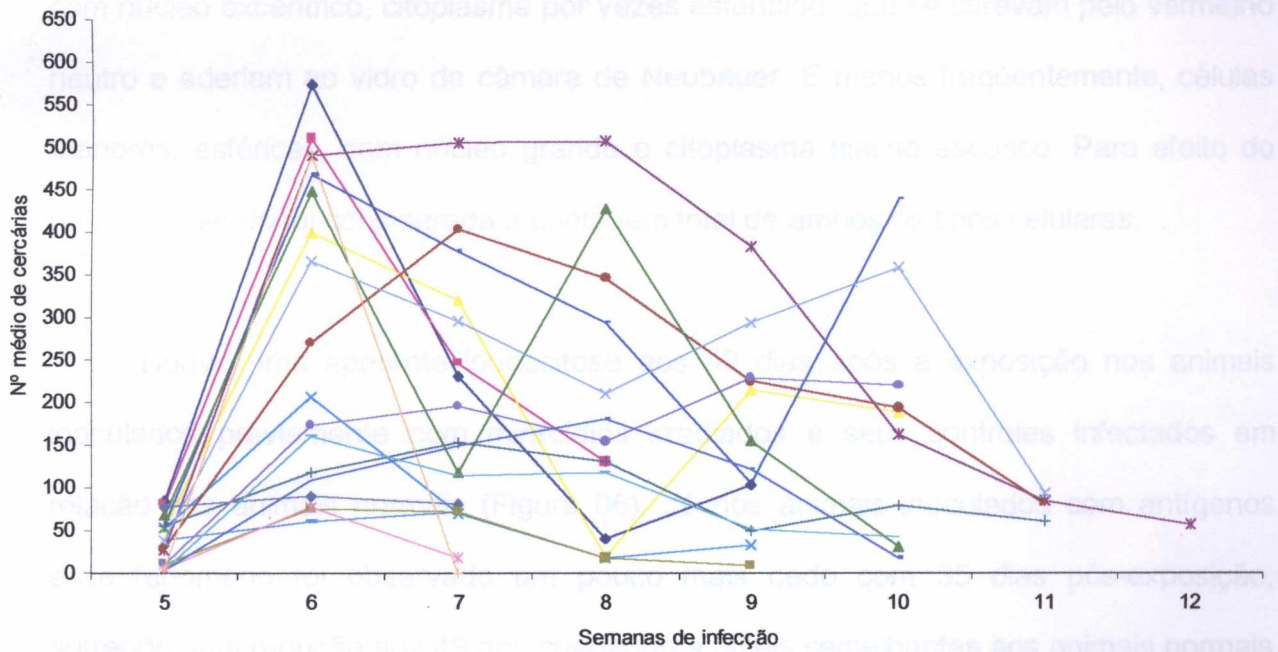


Figura 05: Dinâmica da emissão de cercárias/indivíduo controle.

6.2 CONTAGEM DE CÉLULAS

Foram observados dois tipos celulares presentes na hemolinfa: células grandes, com núcleo excêntrico, citoplasma por vezes estendido, que se coravam pelo vermelho neutro e aderiam ao vidro da câmara de Neubauer. E menos freqüentemente, células menores, esféricas, com núcleo grande e citoplasma hialino escasso. Para efeito do presente estudo foi considerada a contagem total de ambos os tipos celulares.

Houve uma aparente leucocitose aos 42 dias após a exposição nos animais inoculados previamente com miracídios irradiados e seus controles infectados em relação aos animais normais (Figura 06). Já nos animais inoculados com antígenos esse fenômeno foi observado um pouco mais cedo com 35 dias pós-exposição, sofrendo uma redução aos 49 dpe chegando a níveis semelhantes aos animais normais (Figura 07). Nenhuma das diferenças observadas entre os grupos experimentais e controles nos pontos analisados foram estatisticamente significantes.

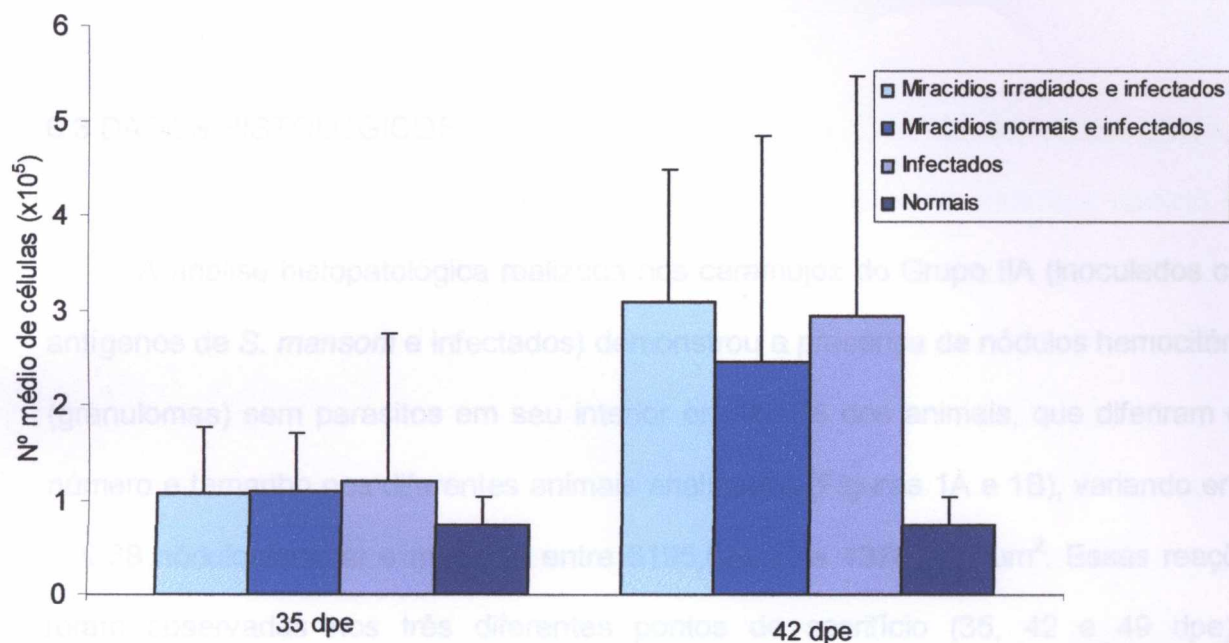


Figura 06: Média e desvio padrão do total de células/grupo de 5 caramujos em diferentes períodos de infecção ($p > 0,05$). Os caramujos foram previamente inoculados com miracídeos irradiados e não irradiados e posteriormente infectados com miracídeos normais.

dpe – dias pos exposição.

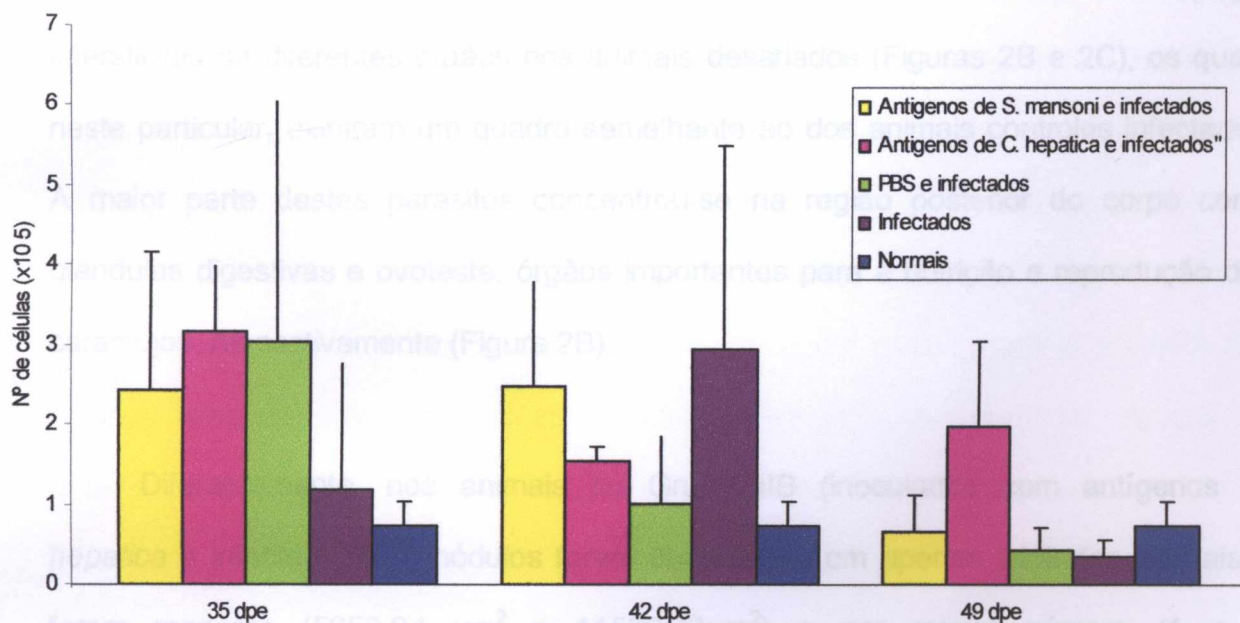


Figura 07: Média e desvio padrão do total de células/grupo de 5 caramujos em diferentes períodos de infecção ($p > 0,05$). Os caramujos foram previamente inoculados com antígenos de *S. mansoni*, *C. hepatica* e PBS e posteriormente infectados com miracídeos normais.

dpe – dias pos exposição.

6.3 DADOS HISTOLÓGICOS

A análise histopatológica realizada nos caramujos do Grupo IIA (inoculados com antígenos de *S. mansoni* e infectados) demonstrou a presença de nódulos hemocitários (granulomas) sem parasitos em seu interior em 92.3% dos animais, que diferiram em número e tamanho nos diferentes animais analisados (Figuras 1A e 1B), variando entre 1 a 38 nódulos/animal e medindo entre $6195,07\mu\text{m}^2$ e $137625,73\mu\text{m}^2$. Essas reações foram observadas nos três diferentes pontos de sacrifício (35, 42 e 49 dpe) e predominaram na porção anterior do corpo, principalmente na região cefalopodal (Figura 1A). Estas reações ocorreram mesmo na ausência de infecção pelo *S. mansoni*, como observado nos animais que não sofreram infecção de prova (Figura 1C) e não impediram o desenvolvimento normal dos esporocistos e cercárias nos espaços intersticiais de diferentes órgãos dos animais desafiados (Figuras 2B e 2C), os quais, neste particular, exibiram um quadro semelhante ao dos animais controles infectados. A maior parte destes parasitos concentrou-se na região posterior do corpo como glândulas digestivas e ovoteste: órgãos importantes para a nutrição e reprodução dos caramujos, respectivamente (Figura 2B).

Diferentemente, nos animais do Grupo IIB (inoculados com antígenos *C. hepatica* e infectados), os nódulos foram observados em apenas 31% dos animais e foram menores ($5250,24\mu\text{m}^2$ a $11530,76\mu\text{m}^2$) e em menor número (1 a 3 nódulos/animal) em relação àqueles inoculados com antígenos de *S. mansoni* e também estavam restritos à parte anterior do corpo (Figuras 3A e 3B). O parasitismo foi

leve ou moderado nos diversos tecidos, sendo um pouco mais acentuado nas glândulas digestivas. Essas reações não foram observadas nos animais controles (Grupo IIC-inoculado PBS/infectado) em quaisquer dos três pontos de sacrifício.

Nos caramujos que foram apenas inoculados com miracídios irradiados e não sofreram infecção desafio, não foram observados esporocistos nem cercárias e aos 35 dias após a inoculação, apareceram nódulos de reação semelhantes àqueles observados no Grupo IIA. Da mesma forma estavam distribuídos na região anterior (cefalopodal, colar do manto e renal) e em alguns animais nódulos mais discretos apareceram nas glândulas digestivas e ovoteste (Figura 3C). Estes nódulos não apresentaram qualquer indício da presença de parasitos. Diferentemente, nos animais controles, inoculados com miracídios normais (não irradiados), observou-se esporocistos e cercárias em desenvolvimento normal sem aparente reação do hospedeiro, no mesmo período de infecção. Quando esses animais foram submetidos a uma infecção de prova, os nódulos foram observados tanto nos animais experimentais (Grupo IA) quanto nos controles (Grupo IB), porém em menor número quando comparados com os animais do Grupo IIA, sendo 1 a 8 nódulos/animal em 80% dos animais experimentais e 1 a 8 nódulos/animal em 50% dos controles. Apesar da quantidade de nódulos ser a mesma, o tamanho foi diferente: $10029,3 \mu\text{m}^2$ a $158300,78 \mu\text{m}^2$ nos experimentais e $13063,5 \mu\text{m}^2$ a $85699,48 \mu\text{m}^2$ nos controles. Em algumas reações apareceram células frouxas e com citoplasma alongado na periferia (Figuras 4A e 4B) e também foi observada, em alguns dos animais controles, a presença de material fagocitado (provavelmente restos parasíticos) no interior das células (Figura

4C). Contudo, nenhuma dessas reações evitou o desenvolvimento dos parasitos de uma infecção de prova, da mesma forma que nos outros grupos “sensibilizados”. Não foi possível observar os animais dos Grupos IA e IB aos 49 dpe, pois neste ponto todos já haviam morrido.

Os animais foram tratados com uma mistura de oxamniquina e praziquantel na tentativa de cura da infecção, como observado por Mattos *et al.* (comunicação pessoal) que conseguiram curar alguns caramujos *B. glabrata* após este tipo de tratamento. Caso a cura fosse alcançada em nossos animais, eles seriam reinfectedados para verificar se ocorreria alguma mudança de reatividade aos parasitos. Como a cura parasitológica não foi alcançada, os animais foram sacrificados para análise histopatológica.

Os caramujos sacrificados 31 ou 39 dias após o término do tratamento revelaram a presença de poucos parasitos íntegros, caracterizando uma infecção leve a moderada com predominância de esporocistos, alguns destes envolvidos por reações discretas do hospedeiro. Contudo, observou-se nos tecidos, aglomerados de células com citoplasma claro e floculoso sem reação significativa do hospedeiro (Figuras 5A e 5B) que não estavam presentes nos animais controles (Figura 5C). O parasitismo e as reações celulares foram mais intensas nas regiões das glândulas digestivas e ovoteste.

PRANCHAS

(Microscopia óptica)

PRANCHA 1

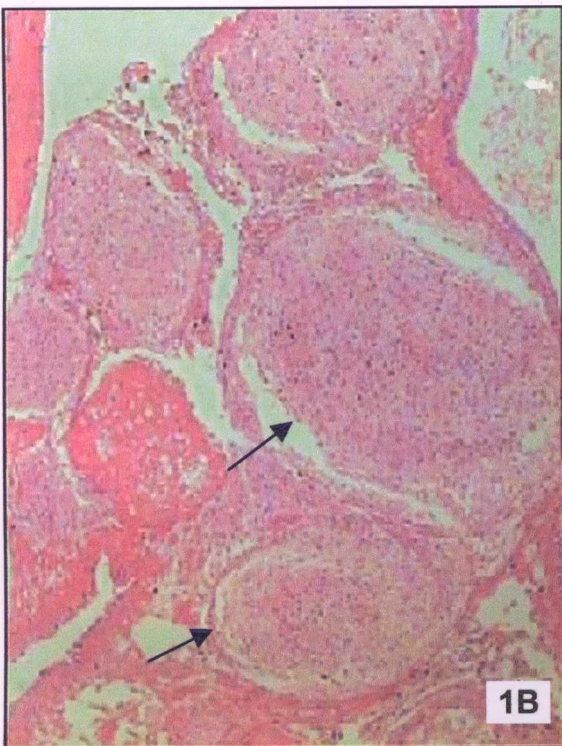
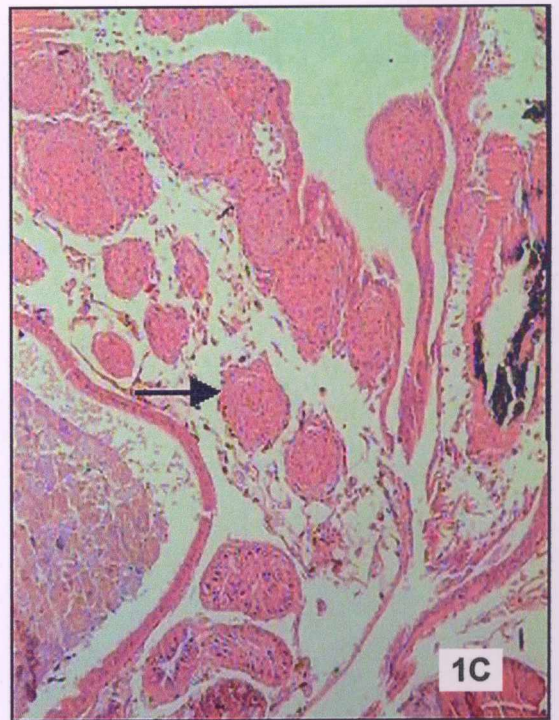
PRANCHA 1

Figura 1A: Pequenos granulomas na região do pé (seta). Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 35 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 100x.

Figura 1B: Granulomas grandes na região do manto (setas). Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 42 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.

Figura 1C: Pequenos granulomas (seta) próximos à glândula nidamental. Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e não infectado, sacrificado 10 dias após a inoculação. Hematoxilina – eosina. Aumento 100x.

PRANCHA 1



PRANCHA 2

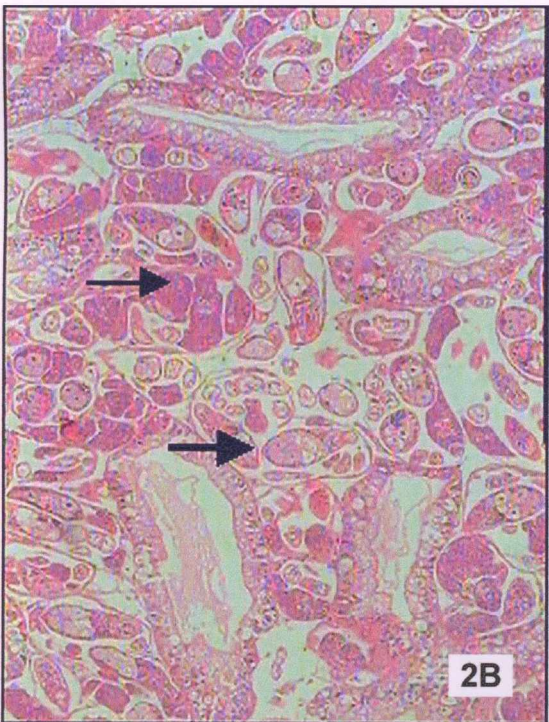
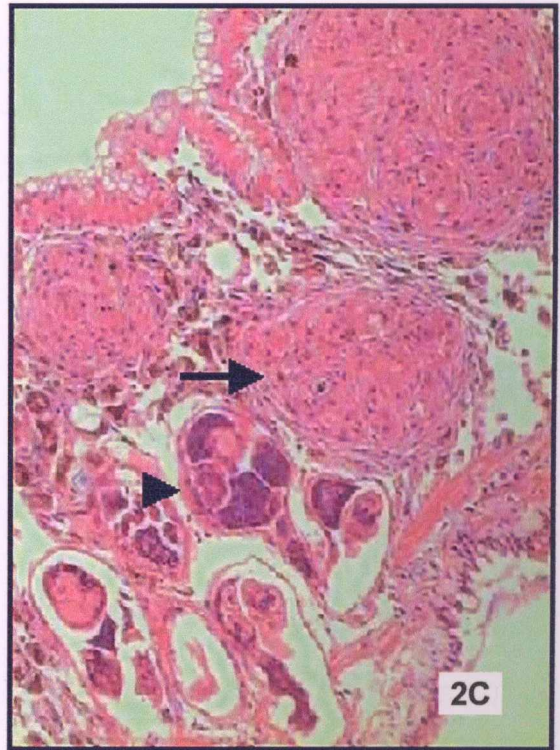
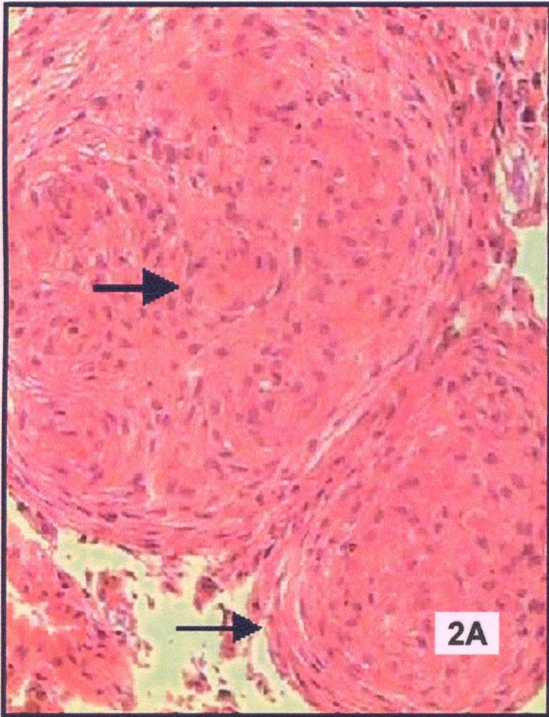
PRANCHA 2

Figura 2A: Granuloma com micronódulos em seu interior (seta larga), sem evidências de restos parasitários. Algumas camadas de células alongadas na periferia (seta estreita). Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 35 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 400x.

Figura 2B: Glândulas digestivas com parasitismo moderado, observar a presença de esporocistos (seta estreita) e cercárias (seta larga) na ausência de reações celulares. Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 49 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 100x.

Figura 2C: Região do manto, observar a presença de granulomas (seta) próximos a parasitos em desenvolvimento normal, sem reação em torno (cabeça de seta). Animal inoculado com antígeno de *S. mansoni* e infectado, sacrificado 35 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.

PRANCHA 2



PRANCHA 3

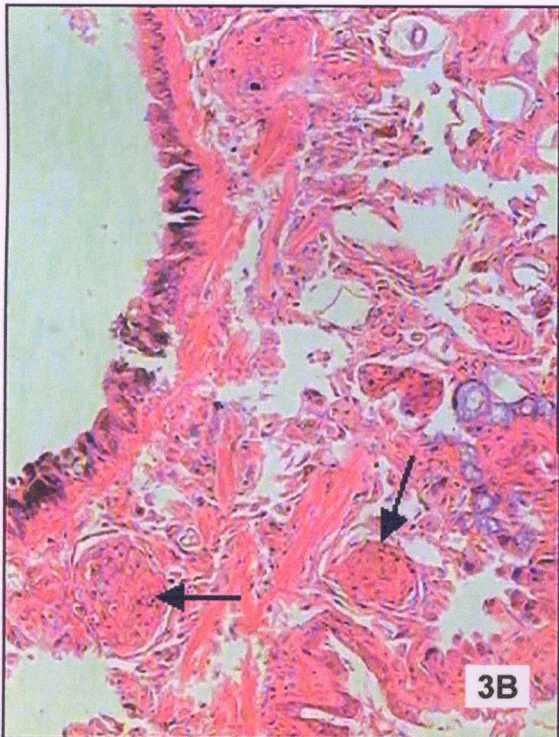
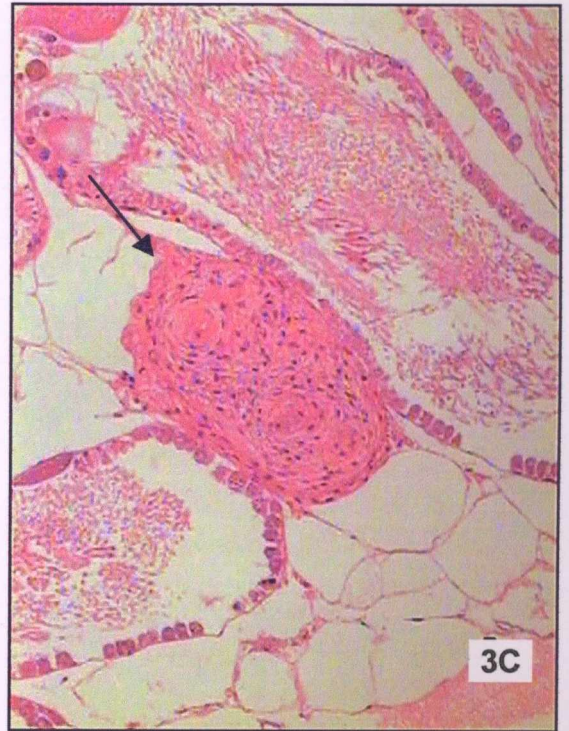
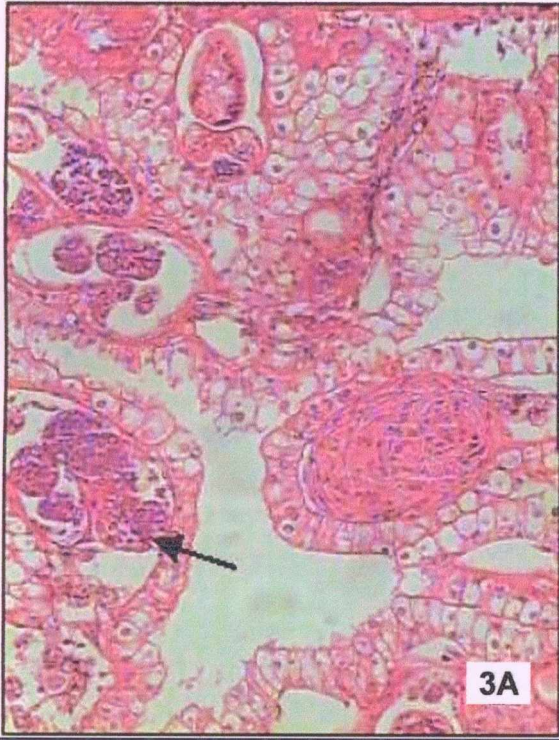
PRANCHA 3

Figura 3A: Pequeno granuloma na região renal. Observar a presença de esporocistos íntegros próximos à reação (seta). Animal inoculado com antígeno de *C. hepatica* e infectado, sacrificado 42 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.

Figura 3B: Pequenos granulomas na região do colar do manto (setas). Notar a diferença de tamanho em relação às reações observadas nos animais inoculados com antígenos de *S. mansoni*. Animal inoculado com antígeno *C. hepatica* e infectado, sacrificado 35 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.

Figura 3C: Granuloma (seta) no ovoteste de um animal inoculado com miracídio irradiado e não infectado, sacrificado 35 dias após a inoculação. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.

PRANCHA 3



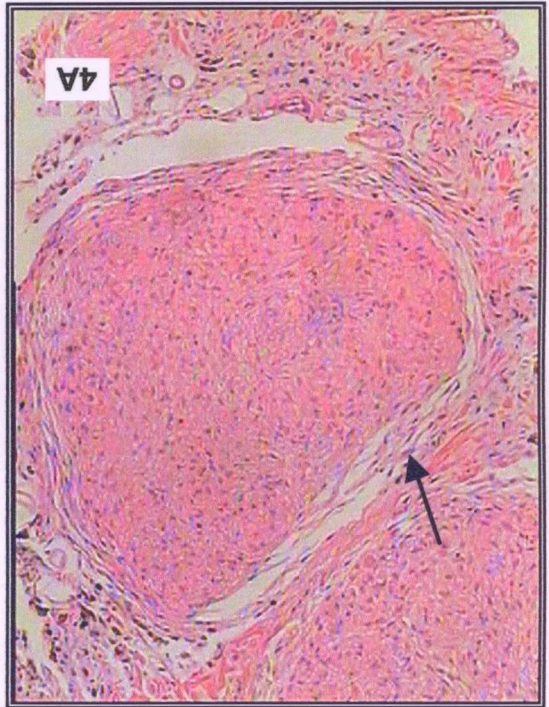
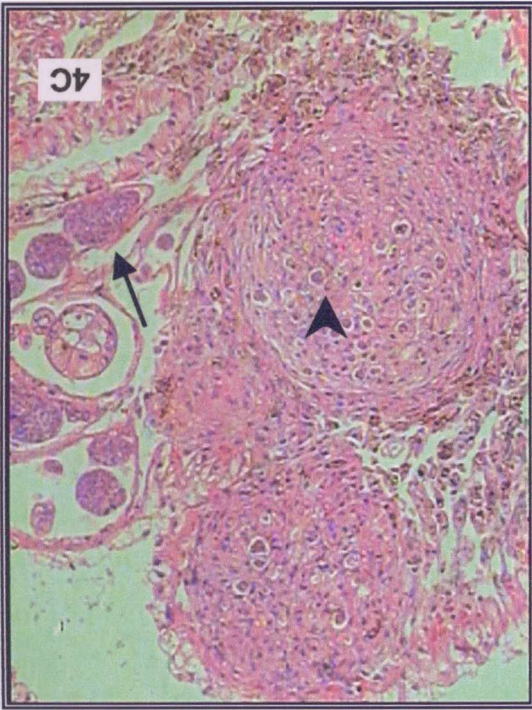
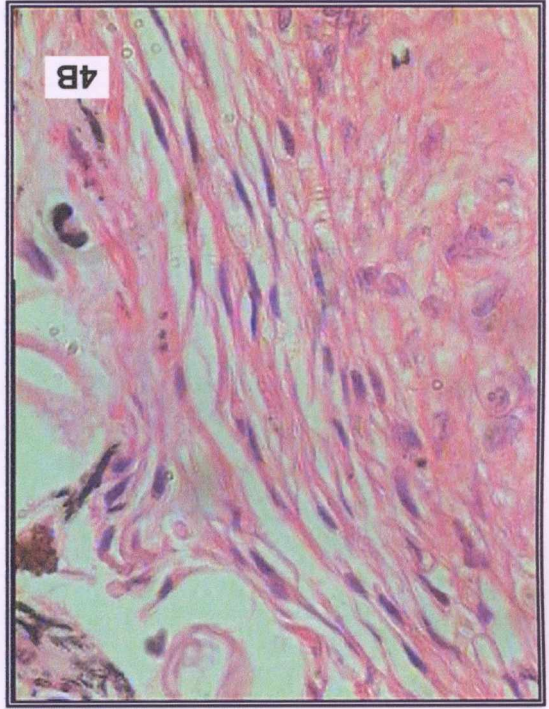
PRANCHA 4

PRANCHA 4

Figura 4A: Região abaixo do colar do manto, animal inoculado com miracídio irradiado e infectado com miracídios normais, sacrificado 42 dpe. Observar a presença de algumas células frouxas na periferia (seta). Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.

Figura 4B: Região periférica da reação da figura anterior. Observar a presença de células com citoplasma alongando dando uma aparência fibrosa. Hematoxilina – eosina. Aumento 1000x (imersão).

Figura 4C: Nódulos hemocitários na região cefalopodal, notar a presença de material fagocitado no interior das células (cabeça de seta) e parasitos íntegros na periferia dos nódulos (seta). Caramujo inoculado com miracídios normais e infectados com miracídios normais (controle), sacrificado 42 dpe. Hematoxilina – eosina. Aumento 200x.



PRANCHA 4

PRANCHA 5

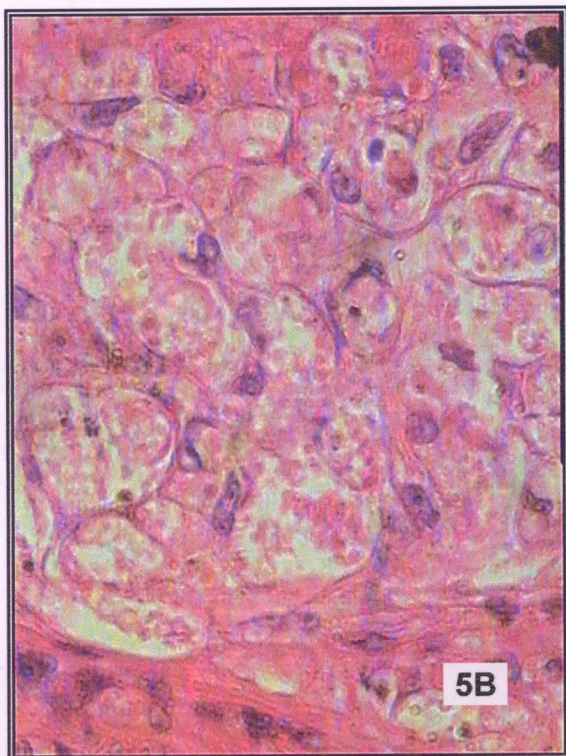
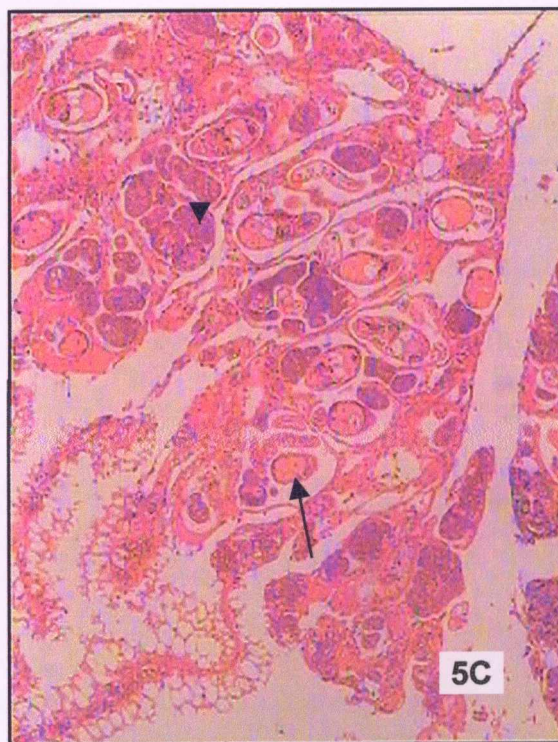
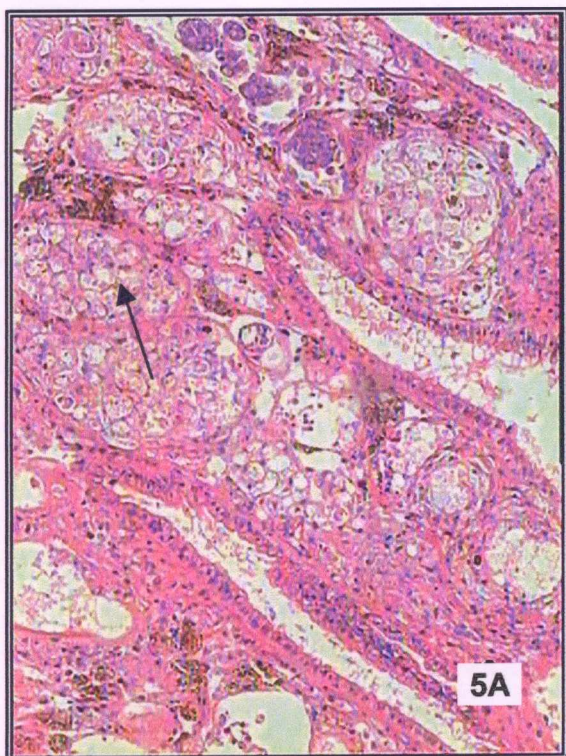
PRANCHA 5

Figura 5A: Tecido próximo ao rim, observar a presença de células com citoplasma claro, floculoso (seta). Caramujo tratado com oxamniquina e praziquantel, sacrificado 31 dias após o final do tratamento. Hematoxilina – eosina. Aumento 400x.

Figura 5B: detalhe da figura anterior. Hematoxilina – eosina. Aumento 1000x (imersão).

Figura 5C: Desenvolvimento normal de esporocistos (cabeça de seta) e cercárias (seta) na região renal de um caramujo não tratado (controle). Hematoxilina – eosina. Aumento 100x.

PRANCHA 5



7 DISCUSSÃO

A emissão de cercárias e a resposta tecidual pelo hospedeiro intermediário são bons parâmetros para se avaliar o grau de susceptibilidade ou de resistência dos caramujos face à infecção pelo *S. mansoni*. Aqueles que são mais resistentes, geralmente eliminam poucas cercárias, e histologicamente, apresentam reações teciduais de encapsulamento e destruição dos parasitos. Diferentemente, nos animais susceptíveis, que eliminam muitas cercárias, os parasitos se multiplicam livremente pelos espaços intersticiais dos tecidos sem induzir uma resposta celular significativa (BORGES *et al.*, 1998). No entanto, nos animais do presente experimento se constatou uma dissociação entre uma resposta tecidual típica dos animais altamente resistentes, com uma eliminação cercariana de alta susceptibilidade. Evidente que temos de levar em consideração que a resposta tecidual de "resistência" foi provocada artificialmente, tendo ficado localizada na área onde se deu a inoculação das "vacinas".

As reações que se processaram localmente no presente experimento foram inteiramente semelhantes às encontradas por GODOY *et al.* (1997) em caramujos resistentes que não eliminaram cercárias após três meses de infecção (auto-cura) e diferentemente, foram predominantes nas glândulas digestivas e porções tubular e sacular do rim, sendo raras na região anterior do corpo. Os autores atribuíram esses achados a uma forte resposta imune que pode ocorrer em caramujos resistentes durante a infecção. Em caramujos susceptíveis, LEMOS & ANDRADE (2001) verificaram reações teciduais encapsulantes que foram se desenvolvendo ao longo do tempo de infecção em torno dos parasitos. Nos casos citados as reações hemocitárias

estavam disseminadas por várias áreas e devem conferir um significado funcional bem diferente das reações estritamente focais induzidas pela injeção de “vacinas”.

De qualquer maneira, é curioso que reações aparentemente estimuladas pela presença dos antígenos introduzidos nos tecidos do molusco, tenham ficado restritas aos locais injetados na região anterior do corpo, sem interferir com a conhecida susceptibilidade ao *S. mansoni* da linhagem de *Biomphalaria* que foi utilizada. Tal achado sugere que os hemócitos respondem apenas aos estímulos locais. Se o agente agressor ou indutor não se movimenta ou não se difunde, a reação tende a permanecer focal. Aparentemente não há mensagens químicas para a mobilização de células de outras áreas distantes. Isto fala a favor de uma origem sistêmica dos hemócitos, que podem ser independentemente mobilizados em qualquer local do organismo a depender do estímulo, e não de uma mobilização à distância para hemócitos formados em um órgão central – o APO.

Observou-se também um certo grau de especificidade para os antígenos utilizados, visto que foram encontrados nódulos menores e em menor número nos animais inoculados com antígenos de *C. hepatica* (31% dos animais), quando comparados com aqueles animais inoculados com antígenos de *S. mansoni* (92.3%). A distribuição das reações teciduais também pode refletir uma circulação lenta dos antígenos inoculados pelo corpo do animal, mesmo os antígenos sendo solúveis. Tal fato poderia ter ocorrido devido ao sistema circulatório desses animais ser semiaberto, dificultando a circulação rápida de hemolinfa pelos tecidos.

A susceptibilidade do caramujo pode variar entre as áreas geográficas, entre populações da mesma área, dentro da população e até no mesmo caramujo em diferentes idades (RICHARDS & SHADE, 1987). Desde os estudos de NEWTON (1953), sabe-se que a resistência ou susceptibilidade dos caramujos à infecção por trematódeos é determinada geneticamente e se apresenta como uma herança mendeliana, sendo a resistência dominante sobre a susceptibilidade. Contudo, animais susceptíveis podem se comportar como resistentes em certos casos, como por exemplo, após inoculação prévia de miracídios irradiados (LIE *et al.*, 1975). Os mecanismos envolvidos nestes processos ainda não são bem entendidos.

Na literatura encontram-se diferentes posicionamentos acerca da especificidade da resposta dos caramujos. De acordo com TRIPP (1961) a resposta tecidual em *B. glabrata* não é específica e pode ser induzida até mesmo por material inerte. Diversamente, BAYNE *et al.* (1984) demonstraram a existência de sítios específicos de ligação para antígenos de esporocistos de *S. mansoni* na superfície dos hemócitos de caramujos susceptíveis e resistentes. Estes antígenos de esporocistos podem ser comuns ao verme adulto, já que representam estágios diferentes de um mesmo parasito, possibilitando o reconhecimento destas moléculas pelos hemócitos e conseqüente formação dos nódulos observados. Ainda de acordo com BAYNE *et al.* (1984), estas moléculas encontradas em seus estudos, provavelmente não são as responsáveis pela reatividade celular diferencial observada entre linhagens susceptíveis e resistentes. Essas diferenças na reatividade dos hemócitos podem ser devidas não apenas às diferenças nas moléculas de superfície envolvidas na capacidade de ligação

com a larva, como também às falhas na transdução de sinal de ligação através da membrana em animais susceptíveis (COUSTOU & YOSHINO, 1994).

Inicialmente a idéia era sensibilizar os caramujos através da infecção prévia com miracídios irradiados para posterior infecção de prova com miracídios normais. No entanto, observou-se através da análise histopatológica e teste de eliminação de cercárias que os caramujos expostos a miracídios irradiados não se infectavam. Este grupo foi então substituído por outro composto por caramujos inoculados com miracídios irradiados. De acordo com ANTUNES *et al.* (1971) os ovos e miracídios de *S. mansoni* são muito resistentes à radiação. Em seus estudos, doses de até 200krads de Cobalto-60 não afetaram a eclosão dos ovos nem o poder de penetração dos miracídios. Nos nossos experimentos, contudo, os caramujos expostos a miracídios irradiados não eliminaram cercárias e, histologicamente, nenhum parasito foi observado. Duas hipóteses podem explicar este fato: a irradiação pode ter alterado as moléculas de superfície dos miracídios, necessárias para sua penetração ou alguns miracídios penetraram, não se desenvolveram e as secções histológicas podem não ter alcançado a região onde eles estavam presentes. Contudo, quando os miracídios irradiados foram inoculados, observou-se nos tecidos dos caramujos o aparecimento de nódulos hemocitários que são o indicativo da destruição destes parasitos. Segundo MICHELSON & DUBOIS (1981) em caramujos susceptíveis, a encapsulação de miracídios ocorre somente quando eles estão mortos e miracídios vivos não são reconhecidos como "não próprios". Estes autores conseguiram induzir resistência em *B. glabrata* susceptíveis irradiando-os com Co60; eles afirmaram que a irradiação pode ter agido como um estímulo para os hemócitos, já que ocorreu uma encapsulação mais

rápida dos miracídios por estas células, ou então ela teria alterado o metabolismo do caramujo tornando-o um ambiente hostil para o miracídio, acelerando, assim, a sua destruição.

Contudo, em nossos experimentos a morte dos miracídios irradiados não ofereceu proteção contra a infecção desafio e os esporocistos e cercárias se desenvolveram sem reação significativa do hospedeiro, a maioria dos nódulos formados não foi em torno dos parasitos e os caramujos continuaram eliminando cercárias. Há que se levar em conta que poderemos estar tratando com uma cepa do *S. mansoni* altamente virulenta ou uma cepa de caramujo altamente susceptível ou de ambos estes fatores ao mesmo tempo. A presença de reações nos animais do Grupo IB (inoculados com miracídios normais/infectados) pode ter ocorrido devido à morte de alguns miracídios durante o processo de preparação do inóculo. Segundo CHERNIN & ANTOLICS (1975), no processo de infecção natural cerca de 30% dos miracídios não evoluem no caramujo após a penetração, 40% são incapazes de penetrar no molusco e apenas 30% dos miracídios são capazes de penetrar e evoluir em *B. glabrata*.

Em paralelo à análise histopatológica foi realizada a contagem total de hemócitos na hemolinfa circulante e foram observadas células que se coraram pelo vermelho neutro. Segundo BEZERRA *et al.* (1997), os granulócitos são capazes de incorporar partículas de vermelho neutro, de maneira semelhante aos macrófagos e constituem cerca de 80% dos hemócitos, tanto de *B. glabrata* quanto de *B. tenagophila*. Por sua vez, os hialinócitos são células menores que aquelas de citoplasma expandido e lembrariam morfológicamente as células da linhagem linfóide dos vertebrados

Apesar da formação de nódulos de reação com grande quantidade de hemócitos, é possível que um aumento no número de células não tenha sido detectado porque a contagem foi realizada após a formação dos nódulos e não se sabe qual o exato período em que a formação destes se inicia. E como observado por JEONG *et al.* (1980), o número de hemócitos retorna a níveis normais 6 a 11 dias após a formação da cápsula de reação. Outra possibilidade é que os hemócitos que entram em contato com o componente estranho (antígenos ou miracídios irradiados) se multipliquem localmente, não provocando alterações quantitativas nos hemócitos da periferia. Diferente do que se observa em animais vertebrados, onde um estímulo inflamatório local pode provocar um aumento no número de células circulantes de forma sistêmica. No entanto, nossos achados são corroborados pelos trabalhos de BORGES (2005), que não encontraram relação entre o número de hemócitos circulantes e as reações teciduais em *B. glabrata* infectadas pelo *S. mansoni*.

Nossos achados apontam para o importante papel da infectividade do parasito no desenvolvimento da infecção, uma vez que os caramujos susceptíveis foram capazes de responder à presença dos miracídios irradiados ou aos antígenos do verme, mas não ao parasito vivo. Os esporocistos e cercárias podem estar liberando substâncias que impedem o reconhecimento e ligação dos hemócitos, ou ainda, podem adsorver em sua superfície moléculas do hospedeiro dificultando, assim, o reconhecimento pelos hemócitos. LODES & YOSHINO (1990) verificaram através de um ensaio *in vitro*, que produtos excretados-secretados por esporocistos de *S. mansoni* em transformação podem conter múltiplos componentes que afetam diferentemente a mobilidade dos hemócitos. Uma destas frações, por exemplo, inibe a mobilidade de

hemócitos de *B. glabrata* susceptíveis, mas tem efeito contrário sobre as células dos caramujos resistentes. LAUFFENBURGER e KELLER (1979) sugeriram que defeitos na mobilidade e quimiotaxia dos hemócitos podem aumentar a susceptibilidade e severidade de certas infecções bacterianas. Estes defeitos podem ser devido à anormalidades celulares intrínsecas ao hospedeiro ou à presença de inibidores. De acordo com PAN (1965) caramujos *B. glabrata* susceptíveis podem responder com uma reação tecidual generalizada à infecção pelo *S. mansoni*, principalmente contra as cercárias. Este autor sugeriu que a reação poderia ser estimulada por produtos secretados pelas glândulas de escape presentes nas cercárias ou que os esporocistos poderiam “sensibilizar” os caramujos que então responderiam com mais intensidade ao estímulo provocado pelas cercárias. Pode ser que os antígenos solúveis de verme adulto de *S. mansoni* exerçam um efeito positivo na quimiotaxia dos hemócitos de *B. glabrata* (FS) susceptíveis, levando à formação dos nódulos observados. O parasitismo preferencial nas glândulas digestivas e ovoteste é um fato bem estabelecido na literatura, por serem locais que fornecem nutrição necessária para o desenvolvimento dos parasitos (COELHO, 1995). As flutuações observadas na quantidade de cercárias eliminadas e no número de células entre os diferentes grupos nos três pontos analisados (35, 42 e 49 dpe) podem não ter alcançado significância estatística devido ao tamanho da amostra. BORGES (2005) verificou que existe diferença estatisticamente significativa entre o número de células de animais infectados e normais aos 49 dpe quando comparados com 42 e 63 dpe, utilizando uma amostra de 10 animais.

Nos animais tratados com oxamniquina e praziquantel, os aglomerados compostos por células com citoplasma claro podem ser alterações provocadas pela ação destas drogas. RILEY & CHAPPELL (1990), verificaram nos tecidos de caramujos *B. glabrata* infectados e tratados com doses de 20, 29 ou 37 $\mu\text{g/g}$ de praziquantel, restos de cercárias e cercárias vacuolizadas com poucas estruturas internas reconhecíveis. Entretanto, o tegumento dos esporocistos não mostrou qualquer sinal de dano, parecendo não ser afetado pela droga. Esses estudos corroboram nossos achados, onde os esporocistos secundários aparentemente permaneceram íntegros, sendo responsáveis pelo retorno na emissão de cercárias nos animais tratados com oxamniquina e praziquantel. Diferentemente, segundo MATTOS *et al.* (comunicação pessoal) o praziquantel associado ao oxamniquina também age sobre os esporocistos, possibilitando a cura da infecção nos caramujos tratados. De acordo com diferentes autores esta droga age sobre as diversas formas evolutivas do *S. mansoni*: o verme adulto (GONNERT & ANDREWS, 1977), ovos (RICHARDS *et al.*, 1989), miracídios e cercárias (ANDREWS, 1978). Essa droga age na membrana e altera o fluxo de Ca^{2+} e afeta o potencial de membrana (CHAPPELL, 1988 apud RILEY & CHAPPELL, 1990). Resultados semelhantes aos nossos, em relação à eliminação de cercárias, foram encontrados por AZEVEDO *et al.* (2004) após irradiações sucessivas com doses de 4000 ou 5000 rads de caramujos *B. glabrata* infectados pelo *S. mansoni*. Estes autores verificaram uma suspensão temporária na eliminação de cercárias (cerca de 34 dias), mas a cura não foi possível, pois alguns esporocistos escaparam do efeito da irradiação e retomaram a infecção.

A oxamniquina também é uma droga com efeito danoso sobre *S. mansoni*. KOHN *et al.*, (1979) observaram em vermes adultos recuperados de camundongos tratados com essa droga, alterações degenerativas no corpo do verme como vacuolização, desaparecimento de núcleos e formação de amplos espaços vazios irregulares que, em algumas ocasiões, continham restos nucleares e material amorfo.

O fato do contato prévio com antígenos do verme adulto ou miracídios irradiados provocar as reações teciduais observadas, sem contudo induzir qualquer alteração na reatividade dos caramujos susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni*, abre perspectivas para o estudo da complexa relação entre este parasito e o seu hospedeiro intermediário, no intuito de melhor entender os mecanismos envolvidos nos processos de destruição dos parasitos pelas células de defesa (hemócitos) destes moluscos.

8 CONCLUSÕES

► A inoculação prévia de antígenos solúveis de vermes adultos do *Schistosoma mansoni*, da *Capillaria hepatica* ou de miracídios irradiados, em *Biomphalaria glabrata*, provocou a formação de nódulos hemocitários no local da injeção, mas tal fato não se acompanhou de proteção dos caramujos contra uma infecção de prova pelo *S. mansoni*;

► Os hemócitos respondem focalmente aos estímulos. Tal fato sugere que os mesmos podem se originar em qualquer parte do organismo. Os presentes achados reforçam os indícios de uma origem sistêmica destas células de defesa, ao invés de uma origem central em um órgão específico – o APO;

► Caramujos inoculados com antígenos solúveis de verme adulto do *S.mansoni* exibiram reações histológicas focais mais intensas e mais numerosas ao material injetado, do que aqueles que receberam os antígenos de *C.hepatica*; o que sugere um certo grau de especificidade;

► Os animais apresentaram grande variação individual em relação ao número de cercárias eliminadas e de células circulantes (hemócitos) nos diferentes períodos de infecção, porém as diferenças observadas não alcançaram significância estatística.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, P. Effect of praziquantel on the free living stages of *Schistosoma mansoni*.

Z. Parasitenkd., 56: 99-106, 1978.

ANTUNES, C. M.; KATZ, M.; de ANDRADE, R. M.; MANSUR, NETO E.; LIMA, J. M.

Study of the effects of gamma-radiation on eggs and miracidia of *Schistosoma mansoni*.

Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo., 13: 383-6, 1971.

AZEVEDO, C. M.; BORGES, C. C.; ANDRADE, Z. A. Behavior of *Schistosoma mansoni*-induced histopathological lesions in *Biomphalaria glabrata* submitted to ionizing radiation.

Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 37: 218-21, 2004.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P.M.; DEWAN, P.C. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Biomphalaria glabrata* in vitro. **J.**

Parasitol., 66: 413-9, 1980a.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P.M.; DEWAN, P.C. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail host for sporocysts in plasma from resistant

Biomphalaria glabrata. **Exp. Parasitol., 50:** 409-16, 1980b.

BAYNE, C. J.; LOKER ES, YUI, M. A.; STEPHNENS, J. A. Immune-recognition of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts may require specific receptors on

Biomphalaria glabrata hemocytes. **Parasite Immunol., 6:** 519-28, 1984.

BAYNE, C. J.; HAHN, U. K.; BENDRE, R. C. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. **Parasitology**, **123**: S159-67, 2001.

BEZERRA, F. S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M.; MARTINS, R. L.; COELHO, P. M. Z. Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **39**: 197-201, 1997.

BORGES, C. M. C. B.; SOUZA, C. P.; ANDRADE, Z. A. Histopatologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**: 117-21, 1998.

BORGES, C. M. C. **Comportamento dos Hemócitos e da Matriz Extracelular de *Biomphalaria glabrata* com Diferentes Graus de Resistência ao *Schistosoma mansoni*: (Estudo Ultraestrutural)**. 2000. 83f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BORGES, C. M. C. **Hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) na interação com o *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907**. 2005. 136f. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

BOSWELL, C.A.; BAYNE, C.T. Lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity in an invertebrate model: Con A does not act as a bridge. **Immunology**, **57**: 261-4, 1986.

CHENG, T. C.; GUIDA, V. G. Hemocytes of *Bulinus truncatus rohffsi* (Mollusca: Gastropoda). **J. Invertebr. Pathol.**, **35**: 158-67, 1980.

CHERNIN, E.; ANTOLICS, V. M. Penetrative capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia. **J. Parasitol.**, **63**: 560-1, 1975.

COELHO, Paulo M. Zech. Tópicos em Malacologia Médica. In: BARBOSA, Frederico Simões (org.). Ciclo biológico do parasita no molusco. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. p. 203-207.

CONNORS, V. A.; BURON, I.; JOURDANE, J.; THERON, A.; AGNER, A.; GRANATH, O. Recombinant human interleukin-1-mediated killing of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, **84**: 920-6, 1998a.

CONTE, A.; OTTAVIANI, E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. **FEBS Lett.**, **365**: 120-4, 1995.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic áreas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **99**: 13-9, 2004.

COURA, J. R.; CAMILO-COURA, L. Perspectivas de controle da esquistossomose mansoni com especial referência ao tratamento em massa. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **13**: 157-60, 1980.

COUSTAU, C.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: modulation of hemocyte surface polypeptides detected in individual snails, *Biomphalaria glabrata*, following larval exposure. **Exp. Parasitol.**, **79**: 1-10, 1994.

FRYER, S. E.; BAYNE, C. J. Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): A strain-specific, time-dependent process. **Parasite Immunol.**, **11**: 269-78, 1989.

GODOY, A.; SOUZA, C. P.; GUIMARÃES, C. T.; ANDRADE, Z. A. Unusual histological findings in *Biomphalaria glabrata* with high degree of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**: 121-2, 1997.

GONNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad spectrum antischistosomal agent. **Z. Parasitenkd.**, **52**: 129-50, 1977.

GRANATH, W.O.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, **58**: 188-93, 1984.

GRANATH, J. R.; CONNORS, V. A.; TARLETON, R. L. Interleukin-1 activity in hemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: presence, differential expression, and biological function. **Cytokine**, **6**: 21-7, 1994.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. **J. Parasitol.**, **87**: 292-9, 2001.

HARRIS, K. R. The Fine Structure of Encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **266**: 446 - 64, 1975.

HARVELL, C. D. The evolution of inducible defence. **Parasitology**, **100**: S53-S61, 1990.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JEONG, K. H.; LIE, K. J.; HEYNEMAN, D. Leucocytosis in *Biomphalaria glabrata* sensitized and resensitized to *Echinostoma lindoense*. **J. Invertebr. Pathol.**, **35**: 9-13, 1980.

KAGAN, I. G.; GEIGER, S. J. The susceptibility of three strains of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni* from Brazil and Puerto Rico. **J. Parasitol.**, **51**: 622-27, 1965.

KOHN, A.; SERAPIÃO, C. J.; KATZ, N.; DIAS, E. P. Ação da oxamniquine sobre o *Schistosoma mansoni* em camundongos experimentalmente infectados. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **21**: 217-27, 1979.

KROSCHINSKI, J.; RENWRANTZ, L. Determination of pH values inside the digestive vacuoles of hemocytes from *Mytilus edulis*. **J. Invertebr. Pathol.**, **51**: 73-9, 1988.

KURTZ, J. Memory in the innate and adaptative immune systems. **Microbes Infect.**, **6**: 1410-17, 2004.

KURTZ, J.; FRANZ, K. Evidence for memory in invertebrate immunity. **Nature**, **4**: 37-8, 2003.

LAUFFENBURGER, D.; KELLER, K. H. Effects of leukocyte random motility and chemotaxis in tissue inflammatory response. **J. Theor. Biol.**, **81**: 475-503, 1979.

LEMOS, Q. T.; ANDRADE, Z. A. Sequential histological changes in *Biomphalaria glabrata* during the course of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **96**: 719-21, 2001.

LIE, K. J.; JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. Acquired resistance in snails. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Int. J. Parasitol.**, **13**: 301-4, 1983.

LIE, K. J.; HEYNEMAN, D.; LIM, H. K. Studies on resistance in snails: specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails. **Int. J. Parasitol.**, **5**: 627-31, 1975.

LODES, M.; YOSHINO, T. P. The effect of *Schistosoma* excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocytes motility. **J. Invertebr. Pathol.**, 75-85, 1990.

LOKER, E. S. On being a parasite in an invertebrate host: a short survival course. **J. Parasitol.**, **80**: 728-47, 1994.

LOKER, E. S.; BAYNE, C. J. Immunity to trematode larvae in the snail *Biomphalaria*. **Symp. Zool. Soc. London**, **56**: 199-220, 1986.

MAKINO, R.; TANAKA, T.; IIZUKA, T.; ISHIMURA, Y.; KANEGASAKI, S. Stoichiometric conversion of oxygen to superoxide anion during the respiratory burst in neutrophils. Direct evidence by a new method for measurement of superoxide anion with diacetyldeuteroheme-substituted horseradish peroxidase. **J. Biol. Chem.**, **261**: 1144-7, 1986.

MATRICON-GONDRAN, M.; LETOCART, M. Internal defense of the snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of Hemocytes and Fixed Phagocytes. **J. Invertebr. Pathol.**, **74**: 224-34, 1999a.

MICHELSON, E.H.; DUBOIS, L. Resistance to schistosome infection in *Biomphalaria glabrata* induced by gamma radiation. **J. Invertebr. Pathol.**, **38**: 39-44, 1981.

NEWTON, W.L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. **Exp. Parasit.**, **2**: 242-57, 1953.

NEWTON, W. L. Tissue response to *Schistosoma mansoni* in second generation snails from a cross between two strains of *Australorbis glabratus*. **J. Parasitol.**, **40**: 352-55, 1954.

OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; FRANCESCHI, C. Presence of several cytokine-like molecules in molluscan hemocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **195**: 984-8, 1993.

OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; CASSANELLI, S.; GENEDANI, S. Cytokines and invertebrate immune responses. **Biol. Cell.**, **85**: 87-91, 1995.

PAN, C.T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **14**: 968, 1965.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGERALD, S. W.; RHODES, C. P.

Invertebrateimmunity: basic concepts and advance. **Int. Rev. Citol.**, **97**: 183-350, 1985.

RICHARDS, C. S.; SHADE, P. C. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, **73**: 1146-51, 1987.

RICHARDS, F.; SULLIVAN, J.; RUIZ-TIBEN, E.; EBERHARD, M.; BISHOP, H. Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous system schistosomiasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **83**: 465-72, 1989.

RILEY, E. M.; CHAPPELL, L. H. Praziquantel treatment of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* – influence on snail fecundity. **Parasitology**, **101**: 211-7, 1990.

SMINIA, T.; BARENSEN, L.A. Comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* and *Bulinus truncatus*. **J. Morphol.**, **6**: 31-39, 1980.

SIRE, C.; ROGNON, A.; THERON, A. Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? **Parasitology**, **117**: 117-22, 1998.

SULLIVAN, J. T.; LIE, K. J.; HEYNEMAN, D. *Ribeiroia marini*: irradiated miracidia and induction of acquired resistance in *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, **53**: 17-25, 1982.

SULLIVAN, J. T.; SPENCE, J. V. Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amebocyte-producing organ. **J. Parasitol.**, **80**: 449-53, 1994.

SULLIVAN, J. T.; PIKLOS, S. S.; ALONZO, A. Q. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte – producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, **90**: 92-6, 2004.

TELES, H. M. S. Distribuição geográfica das espécies dos caramujos transmissores de *Schistosoma mansoni* no estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **38**: 426-32, 2005.

THERON, A.; ROGNON, A.; PAGES, J. R. Host choice by larval parasites: a study of *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* miracidia related to host size. **Parasitol. Res.**, **84**: 727-32, 1998.

TORREILLES, J.; GUERIN, M.C.; ROCH, P. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. **Dev. Comp. Immunol.**, **21**: 267-75, 1997.

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

TURNER, R. J. Immunology: a comparative approach. In: Millar, D. A. et al. **Invertebrates**. New York: Wiley, 1994. p. 29-68.

VAN DER KNAAP, W. P. W.; LOKER, E. S. Immune Mechanisms in Trematode – Snail Interactions. **Parasitol. Today**, **6**: 175-82, 1990.

VAN DER KNAAP, W. P. W.; MEULEMAN, E. A. Interaction between the immune system of lymnaeid snails and trematode parasites. **Symp. Zool. Soc. London**, **56**: 179-98, 1986.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. I. Infeciosidade das cercarias e carga de vermes. **Rev. Saúde Pública**, **25**: 359-66, 1991.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do

molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e tamanho dos granulomas nas vísceras. **Rev. Saúde Pública**, **27**: 412-20, 1993.

_____. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. III. Mortalidade, pesos corporal e das vísceras. **Rev. Saúde Pública**, **29**: 265-70, 1995.

_____. Relação entre a patogenicidade de *Schistosoma mansoni* em camundongos e a susceptibilidade do molusco vetor. **Rev. Saúde Pública**, **31**: 488-94, 1997.

ZUIM, N. R. B.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A.; LINHARES, A. X. Seleção genética de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* visando a alteração da susceptibilidade e resistência ao *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **38**: 387-90, 2005.

YAKOVLEVA, N. V.; SAMOILOVICH, M. P.; GORBUSHIN, A. M. The diversity of strategies of defense from pathogens in mollusks. **J. Evol. Bioch. Physiol.**; **37**: 358-67, 2001.

YOSHINO, T. P. Encapsulation Response of the Marine Prosobranch *Cerithidea californica* to natural Infection of *Renicola buchmanii* Sporocysts (Trematoda: Rencolidae). **Int. J. Parasitol.**, **6**: 423-31, 1976.