



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

**COMPORTAMENTO DOS HEMÓCITOS E DA MATRIZ EXTRACELULAR DE
Biomphalaria glabrata COM DIFERENTES GRAUS DE RESISTÊNCIA AO
Schistosoma mansoni: (Estudo Ultraestrutural)**

CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES

SALVADOR

BAHIA - BRASIL

2000



001763

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

COMPORTAMENTO DOS HEMÓCITOS E DA MATRIZ EXTRACELULAR DE

Biomphalaria glabrata **COM DIFERENTES GRAUS DE RESISTÊNCIA AO**

Schistosoma mansoni:

(Estudo Ultraestrutural)

CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES

PROFESSOR ORIENTADOR: ZILTON DE ARAÚJO ANDRADE

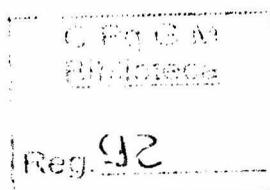
Dissertação apresentada para obtenção

do grau de Mestre em Patologia Experimental

SALVADOR

BAHIA - BRASIL

2000



Ficha catalográfica elaborada na Biblioteca do Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Bahia

Borges, Claudia Maria da Cunha

B732c Comportamento dos Hemócitos e da matriz extracelular
de *Biomphalaria glabrata* com diferentes graus de resistência
ao *Schistosoma mansoni*: estudo ultraestrutural. Claudia Maria da Cunha Borges. –
Salvador: Faculdade de Medicina da UFBA / CPqGM,
2000.

83 p. : il. tab.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)
Universidade Federal da Bahia, 2000.

1. *Biomphalaria glabrata*. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Hemócitos.

4. Complexos encapsulantes. 5. Fibras colágenas. 6. Fibras elásticas. I. Título.

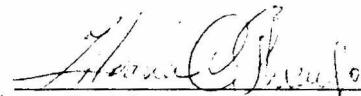
CDU: 594.36:616.995.122

COMPORTAMENTO DOS HEMÓCITOS E DA MATRIZ EXTRACELULAR DE *Biomphalaria glabrata*
COM DIFERENTES GRAUS DE RESISTÊNCIA AO *Schistosoma mansoni*: (Estudo Ultraestrutural)

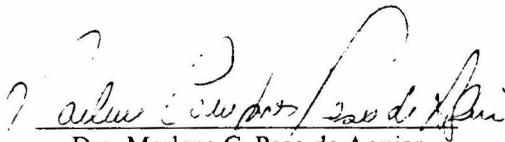
CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES

FOLHA DE APROVAÇÃO

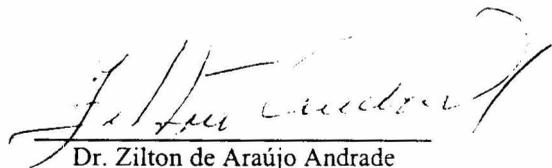
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Silvana C. Thiengo
Pesquisador Associado
IOC-FIOCRUZ



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



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

**Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas um sonho que se sonha junto
É realidade.**

(Raul Seixas)

**A Deus por direcionar os meus caminhos,
A minha mãe e minha avó pelos exemplos de força e dedicação,
A minha tia cuja presença nunca será esquecida,
A meu companheiro por seu respeito e extrema sensibilidade.**

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Zilton de Araújo Andrade pela orientação objetiva e amiga, pelo seu bom humor de Mestre e pela simplicidade em transmitir seus conhecimentos.

A Dra. Sônia Gumes Andrade pela agradável companhia e pelo exemplo de mulher brilhante.

A Dra. Cecília Pereira de Souza, Chefe do Laboratório de Malacologia do Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, Minas Gerais, pela colaboração e apoio inestimáveis e pelo fornecimento de moluscos daquela localidade; sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pelo apoio institucional dado para a realização desta tese.

Ao Dr. George Barreto de Oliveira, Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade que me foi dada. Condição esta, que me possibilitou estar sob a orientação de Dr. Zilton de Araújo Andrade.

À Doutoranda e “amiga de longos anos” Luciana Menezes da Silva pela paciência, pela colaboração e apoio recebidos durante o desenvolvimento dos experimentos.

À Bióloga Queli Teixeira Lemos pela análise crítica, pelo companheirismo e pelos exemplos de responsabilidade, dedicação e capacidade profissional.

Ao Sr. Antônio Carlos da Silva Santos e a Sra. Rejane Márcia Chaves Menezes pelo convívio amigável e pelo auxílio na manutenção dos moluscos durante o desenvolvimento desse estudo.

Aos demais amigos do LAPEX (Alena, Márcia, Sheilla, Tininha) por estarem presentes em todos os momentos de sufoco.

Aos vizinhos do Laboratório de Chagas pela boa vontade e disponibilidade sempre presentes.

Às meninas da histopatologia, Creuza Santos, Cristina Mota e Kátia, pela preparação do material histológico para análise em Microscopia Óptica.

Ao Sr. Cláudio Pereira Figueira, técnico do Laboratório de Patologia e Biologia Celular, pelas noções básicas e essenciais para cortes em ultramicrotomo.

As bibliotecárias do CPqGM pelo auxílio na localização dos artigos científicos que constam nesta tese e pelas correções da bibliografia.

A Rosália Meire, por seu profissionalismo e simpatia. Qualidades que nos permitiram um convívio tranquilo.

A todos os funcionários e amigos do CPqGM que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	02
2.1 Dados Gerais.....	02
2.2 Sistema Interno de Defesa (SID).....	03
2.2.1 O Componente Celular.....	03
2.2.2 Os Componentes Plasmáticos.....	05
2.3 Tecido Conjuntivo.....	06
2.3.1 “Hemócitos” {=hialinócitos + granulócitos (=amebócitos)}.....	08
2.3.1.1 O Órgão Produtor de Amebócitos (OPA).....	08
2.3.1.2 Características Morfológicas.....	09
2.3.1.2.1 Hialinócitos.....	09
2.3.1.2.2 Granulócitos.....	09
2.3.2 Matriz Extracelular.....	10
2.3.2.1 Fibras Colágenas.....	11
2.4 Reações Teciduais e Formação dos Complexos Encapsulantes.....	12
3 OBJETIVO GERAL.....	14
3.1 Objetivos Específicos.....	14
4 JUSTIFICATIVA.....	15
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
5.1 Moluscos Utilizados.....	16
5.2 Criação dos Moluscos.....	17
5.3 Infecção Experimental dos Moluscos.....	18
5.4 Seleção dos Moluscos.....	18
5.4.1 Teste de Positividade.....	18
5.5 Postura.....	19
5.6 Acompanhamento do Crescimento.....	20
5.7 Processamento do Material Histológico.....	20
5.7.1 Técnica de Fixação e Coloração para Microscopia Óptica.....	20
5.7.1.1 Hematoxilina-Eosina/Sírius-Vermelho/Orceína/Resorcina-Fucsina de Weigert.....	20
5.7.1.2 Giemsa/Vermelho Neutro.....	21
5.7.2 Técnica de Fixação e Coloração para Microscopia Eletrônica.....	21
5.7.2.1 Tecidos.....	21
5.8 Técnica de Quantificação da Hidroxiprolina.....	22
6 RESULTADOS.....	24
6.1 Dados Malacológicos.....	24
6.2 Dados Histológicos.....	29
6.2.1 Microscopia Óptica.....	29
6.2.1.1 Tecidos.....	29
6.2.1.2 Hemolinfa.....	31
6.2.2 Microscopia Eletrônica.....	33
6.2.2.1 Ultraestrutura.....	33

6.2.3 Bioquímica	35
6.2.3.1 Dosagem de Hidroxiprolina	35
6.3 Pranchas	39
7 DISCUSSÃO	59
8 CONCLUSÕES	69
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

RESUMO

COMPORTAMENTO DOS HEMÓCITOS E DA MATRIZ EXTRACELULAR DE *Biomphalaria glabrata* COM DIFERENTES GRAUS DE RESISTÊNCIA AO *Schistosoma mansoni*: (Estudo Ultraestrutural). **CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES**.

[INTRODUÇÃO]: O sistema interno de defesa dos moluscos é baseado sobretudo no encapsulamento, fagocitose e destruição das formas invasoras pelos hemócitos. Estudos realizados com o auxílio de técnicas de microscopia eletrônica permitiram elucidar as principais características ultraestruturais destas células e das cápsulas ou complexos encapsulantes por elas formados. Entretanto, as modificações que os hemócitos exibem em animais com diferentes graus de susceptibilidade ao *S. mansoni*, o comportamento da matriz extracelular nos complexos encapsulantes e a formação de granulomas ainda não foram suficientemente explorados.

[MATERIAIS E MÉTODOS]: Exemplos de *B. glabrata* provenientes de regiões geográficas distintas foram submetidos às análises histológicas (coloração pela hematoxilina/eosina, sírius-vermelho, orceína e Weigert), ultraestruturais e bioquímicas (técnica de hidroxiprolina). [RESULTADOS]: Os achados confirmam que somente um tipo celular (hemócito fagocítico) está presente nas reações celulares. Os elementos da matriz extracelular pesquisados não mostraram participação no interior ou na periferia das reações celulares hemocitárias. [CONCLUSÃO]: As reações teciduais de defesa em *B. glabrata* contra o *S. mansoni* são exclusivamente celulares não estando associadas à síntese e deposição de elementos da matriz extracelular.

[PALAVRAS CHAVES]: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; hemócitos; complexos encapsulantes; fibras colágenas e elásticas.

ABSTRACT

BEHAVIOR OF *Biomphalaria glabrata* HEMOCYTES AND EXTRACELLULAR MATRIX IN SPECIMENS WITH DIFFERENT DEGREES OF RESISTANCE TO *Schistosoma mansoni* (An ultrastructural study). **CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES.**

[INTRODUCTION]: The internal defense system in snails is mainly based on encapsulation, phagocytosis and destruction of parasite larvae by hemocytes. Electron microscopic studies have demonstrated the principal ultrastructural features of cells, capsule and encapsulating complexes. However, the changes presented by hemocytes in snails with different degrees of susceptibility to *S. mansoni*, and the role played by the extracellular matrix in granuloma formation (encapsulating complexes) have not yet been sufficiently explored. [MATERIALS AND METHODS]: Normal and *S. mansoni*-infected *B.glabrata* from different geographic areas were submitted to histologic (H & E, sirius-red for collagen and orcein stain for elastic tissue), ultrastructural and biochemical methods (hydroxiprolin measurement). [RESULTS] Although two cell types were found in hemolymph, in tissue reactions the hemocytes were the only cell-type present. Extracellular components, such as collagen-like and orcein-positive fibers did not participate of the anti-parasite reactions. [CONCLUSIONS]: Tissue reactions against *S. mansoni* is exclusively dependent on one type of cell: the hemocyte in the snail *B. glabrata*; synthesis and deposition of extracellular matrix is conspicuously absent, in and around zones of reactive cell accumulations.

[KEY-WORDS] *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; hemocytes; encapsulating complexes; collagen and elastic fibers.

1 INTRODUÇÃO

Nas reações de defesa dos moluscos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) contra as formas embrionárias e larvárias deste trematódeo há a participação proeminente de um tipo celular - o hemócito - o qual exhibe características muito próximas, senão semelhantes, às daquelas dos macrófagos dos vertebrados. Estas células participam da fagocitose e lise das estruturas parasitárias e formam lesões difusas e focais (encapsulantes), estas últimas morfologicamente semelhantes aos granulomas vistos nos mamíferos. Nas lesões difusas e principalmente na periferia das reações encapsulantes, formam-se estruturas que simulam uma fibrose intersticial e mesmo a formação de cápsulas fibrosas. Estes achados sugerem a participação de elementos da matriz extracelular nas lesões em torno de estruturas do *S. mansoni*, um assunto de extraordinária significação para a patologia comparada e para o entendimento da patogenia das reações de defesas no molusco. Os dados existentes na literatura pertinente têm explorado relativamente muito pouco esta área da patologia dos invertebrados. O presente trabalho é uma tentativa inicial para explorar alguns aspectos do comportamento da matriz extracelular da *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) nas lesões resultantes das formas evolutivas invasivas do *S. mansoni*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dados Gerais

Numerosos parasitas, incluindo diversas espécies de interesse médico e veterinário, possuem um ciclo de vida que inclui o desenvolvimento e/ou reprodução assexuada em vários invertebrados. Os moluscos (usualmente gastrópodos) que servem como hospedeiros intermediários de trematódeos digenéticos, nematódeos e cestódeos demonstram uma diferença marcante na capacidade de defesa contra tais parasitas (LOKER, 1994).

De acordo com FILES & CRAM (1949) e FILES (1951), diversas cepas geográficas de moluscos do gênero *Biomphalaria* têm demonstrado diferenças na susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*. Nos exemplares fisiologicamente incapazes de responder eficientemente, os miracídeos penetram através das superfícies expostas, sofrem modificações anatômicas e funcionais e transformam-se nos esporocistos que permanecem viáveis e ativos produzindo um grande número de cercárias que migram tanto pelos espaços intercelulares, cheios de hemolinfa, como através do sistema venoso do caramujo até sua saída para o meio exterior através de vesículas no epitélio do manto e pseudobrânquia. Existem, entretanto, populações do gênero *Biomphalaria* não adaptadas, isto é, resistentes ou refratárias a determinadas cepas do *S. mansoni*. Desde o trabalho de NEWTON (1952), sabe-se que as formas parasitárias que penetram nestes exemplares resistentes servem como um estímulo patológico; ativando um conjunto de reações, de natureza celular, frequentemente associado aos processos de reconhecimento e fagocitose. Em 1985, RATCLIFFE ET AL. assinalaram que a defesa celular incluía, também, a formação de granulomas, coagulação da hemolinfa e cicatrização. Há, no

entanto, carência de linfócitos, imunoglobulinas, sistema complemento e respostas anaminéticas para antígenos específicos (BAYNE, 1983; KLEIN,1989). Entretanto, mecanismos humorais estudados por MACKIN (1961), FENG (1962) e MICHELSON (1963), revelaram também fatores biologicamente ativos na hemolinfa, que funcionalmente simulavam anticorpos. TRIPP (1966) e FRYER & BAYNE (1989) puderam observar, ainda, a presença de fatores plasmáticos (opsoninas) que iniciariam ou facilitariam o processo de fagocitose das formas parasitárias do *S. mansoni*.

2.2 Sistema Interno de Defesa (SID)

2.2.1 O Componente Celular

Segundo CHENG (1975, 1977) e MOORE & LOWE (1977), o sistema interno de defesa dos gastrópodos (SIDG), assim como o dos bivalvos, é constituído por um grupo celular, morfológica e funcionalmente heterogêneo, onde puderam ser identificados dois subtipos celulares bem distintos: **os hialinócitos ou células arredondadas e os granulócitos ou células ricas em prolongamentos citoplasmáticos (pseudópodos) (anteriormente referidos como amebócitos)** que representariam, respectivamente, 10% e 90% do total de células encontradas na circulação. Como os moluscos possuem um sistema vascular semi-aberto, tais células também podem ser observadas movendo-se livremente pelo no tecido conjuntivo. Outros autores acham que os gastrópodos, bem como os cefalópodos, possuem apenas um tipo celular, o qual desempenha várias funções (SMINIA, 1972; SMINIA ET AL., 1973). Usando a fosfatase ácida como marcador, CHENG & GARRABRANT (1977) concluíram que as células que participavam da destruição dos esporocistos-mãe do *S. mansoni*, em *B. glabrata* (linhagem 10-R2), são

exclusivamente os granulócitos, visto que, a presença daquela enzima não foi detectada nos hialinócitos. SMINIA & BARENSEN (1980) discutem que as diferenças morfológicas e bioquímicas apresentadas por estes subtipos são mais quantitativas do que qualitativas. Os autores citam que mesmo entre os hialinócitos são encontradas células que possuem pseudópodos, lisossomos e partículas fagocitadas. Assim, sugerem que as células fagocíticas representam células maduras, provenientes das células arredondadas, que têm características de células jovens: núcleos relativamente grandes e muitos ribossomos livres. Já em 1979, SMINIA ET AL. haviam proposto o termo neutro “**amebócito**” para designar esta população celular; em vez de adotar termos que são utilizados para as células dos vertebrados: **granulócitos, leucócitos, linfócitos ou macrófagos**.

Em seu artigo de revisão, VAN DER KNAAP & LOKER (1990) discutem, no entanto, a existência de quatro tipos celulares, com diferentes funções, que atuam no sistema interno de defesa dos moluscos (fig. 01a). Três destes tipos celulares são fixos ou não circulantes e incluem as **células endoteliais capturadoras de antígenos** que impedem a disseminação dos microorganismos e podem apresentá-los às células fagocíticas; as **células reticulares** que estão ancoradas aos tecidos por fibrilas extracelulares e têm uma alta capacidade de endocitose para partículas (“não – próprias”) e as **células poro** que estão justapostas às células reticulares e fazem endocitose seletiva para proteínas (fig. 01a). Entretanto, o papel destes grupos na defesa contra a infecção por larvas de trematódeos permanece incerto e, ainda, não foi especificamente estudado. Os autores reafirmam que a função mais importante na defesa contra estes agentes invasores é realizada por células móveis, denominadas coletivamente de **hemócitos**; adotam esta nomenclatura porque, em

vários estudos experimentais com antígenos de superfície destas células, incluindo anticorpos monoclonais (YOSHINO & GRANATH, 1985) e lectinas (DIKKEBOOM, TIJNAGEL & KNAAP, 1988), conseguiram evidências de que há uma heterogenicidade na população de hemócitos.

MATRICON-GONDRAN & LETOCART (1999) propõem o reconhecimento de três tipos celulares, de acordo com o critério morfológico: **hemócitos assimétricos grandes** com numerosas mitocôndrias, sistema tubulo-vesicular bem desenvolvido e presença de numerosos grânulos de glicogênio; **hemócitos de tamanho médio**, pobres em organelas e grânulos e **hemócitos arredondados pequenos**, com pouquíssimas organelas e grânulos. Pela comparação com as descrições pré-existentes, sugerem uma equivalência de termos entre os três tipos celulares citados e os granulócitos e hialinócitos descritos por SMINIA (1981) e CHENG (1984). Estas autoras citam, ainda, que esta população celular pode ser bem definida pela caracterização de seus determinantes de superfície reconhecidos por lectinas (SCHOENBERG & CHENG, 1981) ou por anticorpos monoclonais (YOSHINO & GRANATH, 1985).

2.2.2 Os Componentes Plasmáticos

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos para se estabelecer quais fatores solúveis da hemolinfa são importantes na interação entre o parasita e o mecanismo de defesa dos moluscos (LOKER ET AL., 1984; RENWRANTZ, 1986). Nos moluscos, as lectinas são sintetizadas pelos hemócitos e liberadas no plasma, onde imobilizam os “materiais estranhos” por aglutinação, ou são expressas na superfície dos hemócitos circulantes, onde aparentemente funcionam como receptores citofílicos

(FRYER & BAYNE, 1989; RICHARDS & RENWRANTZ, 1991). JOHNSTON & YOSHINO (1996) demonstraram que, lectinas similares às da: *Canavalia ensiformis* (Con A), *Erythrina corallodendrom* (ECA), *Glycine max* (SBA), *Tetragonolobus purpureas* (TPA) e *Triticum vulgare* (WGA), estão presentes na hemolinfa de *B. glabrata* e ligam-se às proteínas presentes na superfície do esporocisto do *S. mansoni*. A ausência ou presença destas proteínas multivalentes, que se ligam especificamente a certos carboidratos, poderá influenciar na susceptibilidade deste caramujo à infecção pelo *S. mansoni* (ZELCK & BECKER, 1990). Recentemente, uma proteína semelhante ao fator de necrose tumoral (TNF α) foi identificada na hemolinfa dos gastrópodos (GRANATH ET AL., 1994). OTTAVIANI ET AL. (1993), relataram a produção de uma proteína homóloga à interleucina 1 (IL-1) em moluscos. Esta proteína, por sua vez, pode estar associada a ativação dos hemócitos (HUGHES ET AL., 1991; RAFTOS ET AL., 1992), estimulação da proliferação celular (RAFTOS ET AL., 1991); aumento da fagocitose (BECK ET AL., 1993) e produção de superóxidos (GRANATH ET AL., 1994). Caramujos de linhagens resistentes de *B. glabrata*, apresentam níveis de IL-1-símile, maiores do que às das linhagens susceptíveis. Caramujos resistentes mantêm quantidades significativamente mais elevadas desta proteína após exposição ao *S. mansoni*, do que caramujos de linhagens susceptíveis (GRANATH ET AL., 1994). Porém, o grau de homologia destas proteínas com o IL-1 ou TNF α de mamíferos, ainda não foi confirmada por sequenciamento de DNA.

2.3 Tecido Conjuntivo

Segundo PAN (1958), o tecido conjuntivo de *Australorbis glabratus* (= *Biomphalaria glabrata*) ocupa a região entre os órgãos e os tecidos e forma uma membrana de revestimento ou um saco que inclui todos os órgãos da cavidade do

corpo. Este tecido contém vários componentes celulares e fibras e pode ser classificado de acordo com a proporção relativa de cada um dos componentes. O mesmo autor, reconhece dois tipos distintos de tecido conectivo: o tecido conectivo vascular frouxo e o tecido conectivo vascular denso. A denominação “vascular” dada por Pan, deve-se ao fato de que os elementos fibrosos presentes nestes tecidos apresentariam fendas e orifícios, por onde circula a hemolinfa; na qual aparece o pigmento rosáceo (=hemoglobina), similar ao encontrado no sangue dos vertebrados. O tecido conectivo vascular frouxo foi identificado na parede dorsal da cavidade celomática, na pseudobrânquia, nas glândulas digestivas e ovoteste, enquanto que, o tecido conectivo vascular denso foi descrito nas regiões do pé e no centro dos tentáculos. Entre estes dois “extremos”, formas intermediárias podem ocorrer.

PAN (1958) descreve, ainda, quatro componentes celulares: a) fibroblastos; b) células pigmentares; c) células vesiculares e d) células mucosas, e os componentes fibrosos: a) fibras colágenas e b) fibrilas musculares. O autor acredita que, os fibroblastos do tecido conectivo vascular denso, quando estimulados patologicamente, teriam a habilidade de se transformar em uma variedade de outros tipos celulares; inclusive nos “amebócitos” que participariam ativamente do mecanismo de defesa dos moluscos e estariam envolvidos na reparação das lesões teciduais. Células de transição entre os amebócitos e os fibroblastos, também, seriam abundantes.

2.3.1 “ Hemócitos” {= hialinócitos + granulócitos (= amebócitos)}

2.3.1.1 O Órgão Produtor de Amebócitos (OPA)

Os amebócitos podem ser produzidos por vários tecidos hematopoiéticos. Foi identificado um órgão bem definido, em *B. glabrata* e *Bulinus* sp., localizado entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto. A ultraestrutura deste órgão foi descrita, pela primeira vez, por JEONG ET AL (1983). Em repouso o órgão se caracteriza como uma estrutura pequena, pouco espessa e conspícua, sendo formada por células arredondadas e alongadas de citoplasma basófilo e núcleos ovais, também alongados, provindas da membrana posterior da cavidade do manto; onde as mitoses aparecem em pequeno número ou são inexistentes (LIE ET AL., 1976). Em caramujos infectados e re-infectados, o OPA apresenta-se consideravelmente maior, resultado da hipertrofia e/ou hiperplasia. As mudanças na atividade mitótica são aparentes entre o 1° - 3° dia pós-exposição. Há formação de nódulos que começam a se agrupar formando maciços celulares confluentes e curvilíneos, que podem atingir +/- 230 - 400µm. Estas estruturas são constituídas pelos ameboblastos primários, que são ricos em ribossomos livres, mitocôndrias, retículo endoplasmático escasso e complexo de Golgi e nucléolo proeminentes, que se espalham ao longo dos seios sanguíneos e dão origem aos ameboblastos secundários, com citoplasma menos basófilo e núcleo oval ou em forma de rim, morfológicamente idênticos aos amebócitos maduros. O OPA lança, então, na circulação periférica, tanto os amebócitos maduros, quanto os ameboblastos secundários que vão se dividir nos tecidos. A porção sacular dos túbulos renais, margeando o pericárdio e, ocasionalmente, a região dorsal do reto, também são capazes de produzir os amebócitos. Contudo, o número de mitoses nestas áreas é escasso; os nódulos formados são pequenos e as células coram-se e aderem ao

substrato de forma diferente. A presença de células precursoras de hialinócitos não foi detectada nestes órgãos (LIE ET AL., 1975; 1976).

2.3.1.2 Características Morfológicas

2.3.1.2.1 Hialinócitos

São geralmente esféricas (5–8 μ m), possuem citoplasma escasso, esparsamente granular e opaco, com grande núcleo central; baixo conteúdo enzimático, pequena tendência de aderir ao vidro, formar deigados prolongamentos citoplasmáticos (pseudópodos) ou fagocitar objetos. Apresentam-se ainda como células “imaturas”, ricas em ribossomos livres, tendo um retículo endoplasmático rugoso (RER) pouco desenvolvido, além de raras mitocôndrias (BARRACO ET AL, 1993).

2.3.1.2.2 Granulócitos

Segundo CHENG (1975); LIE ET AL. (1980); LOKER ET AL. (1982) e BARRACO ET AL. (1993), estas células possuem um núcleo excêntrico, esférico ou reniforme, com 5 μ m de diâmetro, rico em heterocromatina, fortemente corado pelo Giemsa. O citoplasma granular, protegido por uma membrana celular bem definida, mostra uma delimitação acentuada entre o endoplasma, que é rico em mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, ribossomos livres, grânulos de glicogênio, gotículas lipídicas, corpos lisossômicos, fagossomos, corpos mielínicos e corpos multivesiculares, além de exibir um ectoplasma homogêneo. Estas células emitem ainda projeções citoplasmáticas, que se desenvolvem no interior de dobras lameliformes. Estas estruturas se entrelaçam, formando uma rede ramificada, que permite a inter-conexão entre duas ou mais células, facilitando o deslocamento destas através dos espaços intersticiais, bem como o aprisionamento dos parasitas.

2.3.2 Matriz Extracelular

2.3.2.1 Fibras Colágenas

Nos vertebrados, as células do tecido conjuntivo estão distribuídas no seio de uma matriz que é composta por fibras e miofibrilas imersas em um material amorfo, um gel hidratado e poroso (proteoglicanos), além de glicoproteínas estruturais (laminina, fibronectina, etc.) e moléculas que funcionam como conectoras celulares transmembranais (integrinas). Nestes animais, os colágenos representam o elemento protéico mais abundante da matriz; constituindo uma família de proteínas estreitamente correlacionadas que possuem como papel principal proporcionar força tensil aos tecidos. Além disso, um tipo de colágeno forma o arcabouço estrutural das membranas basais. Atualmente, já foram identificados 19 isótipos de colágeno. Entretanto, os colágenos de tipo I, II e III são os mais abundantes, arrumados como fibrilas semelhantes formando fibras e septos (ANDRADE, 1999).

Nos moluscos, CARRIKER & BILSTAD (1946) descreveram em *Lymnaea stagnalis* (Linné, 1758) normais a presença de fibras que lembram as fibras colágenas dos animais mais evoluídos. Em *A. glabratus* normais (= *B. glabrata*), PAN (1958) descreveu a presença de fibras colágenas mais delicadas do que as fibras musculares. Estas, por sua vez, apareciam pouco diferenciadas nas preparações de hematoxilina-eosina. BROOKS (1953) também já havia observado a ocorrência de fibrilas colágenas nas paredes das cápsulas hemocitárias que estavam circundando os esporocistos-mãe do *S. mansoni* em *Tropicorbis havenensis*. RIFKIN ET AL. (1969), relataram a presença de fibras extracelulares em associação com as formações capsulares que ocorrem em *Cassostrea virginica* (Gmelin, 1791). SMINIA ET AL (1974) relataram a deposição de filamentos fibrilares, tipo colágeno, na periferia dos

complexos encapsulantes formados em resposta a implantes de “esponjas sintéticas” em *L. stagnalis*. Em experimentos com marcadores radioativos (H^3 – prolina), demonstraram que as células achatadas das camadas mais externas das cápsulas amebocitárias e os miofibroblastos estavam envolvidos na síntese destes filamentos. Estas células apresentavam um RER bem desenvolvido. HARRIS (1975) verificou que elementos extracelulares não contribuíam para a formação das cápsulas. YOSHINO (1976) e KRUPA ET AL. (1977) também notaram a presença de fibrilas extracelulares em associação com as formações capsulares de *Cerithidea californica* (Haldeman, 1840) e *Bulinus guernei* (Bautzenberg, 1890), respectivamente. Entretanto, LIE ET AL. (1975, 1980) não descreveram a presença de fibras extracelulares em associação às cápsulas amebocitárias que continham esporocistos-mãe do *S. mansoni* em *B. glabrata* da linhagem resistente 10-R₂. Contudo, estes mesmos autores, observaram a presença de fibras com uma periodicidade de 80nm nas camadas mais externas das cápsulas amebocitárias que continham esporocistos-filhos em caramujos que passaram pelo processo de autocura. LOKER ET AL. (1982) observaram fibras extracelulares, dispondo-se com uma periodicidade de 20nm, na superfície externa e no centro das cápsulas amebocitárias, mas não em contato direto com os esporocistos.

2.4 Reações Teciduais e Formação dos Complexos Encapsulantes

A destruição ou estabilização do parasita está na dependência de fatores genéticos, que controlam tanto a infectividade do parasita quanto o nível de resistência do hospedeiro, e fatores fisicoquímicos dos participantes. Contudo, a mais “fina discriminação” entre o próprio e o não-próprio pode requerer moléculas específicas para o reconhecimento. Nos exemplares resistentes, várias etapas distintas estão envolvidas na destruição das formas invasoras pelos hemócitos. A interação inicial entre o caramujo e a larva digenética do *S. mansoni* começa quando o miracídio penetra no epitélio externo e se transforma em esporocisto-mãe. A resposta imediata após infecção, provavelmente envolve um pequeno deslocamento destas células em direção às formas larvais que estão espalhadas pelos espaços intercelulares, em torno do estômago, intestino, túbulos renais, glândula do albúmem, glândula digestiva e ovoteste. A acumulação de hemócitos em torno das larvas sugere quimiotaxia. LODES & YOSHINO (1990) demonstraram que uma fração isolada do esporocisto-mãe excreta/secretava produtos que estimulam a mobilidade dos hemócitos em *B. glabrata* resistentes, mas inibia a mobilidade dos hemócitos de caramujos susceptíveis. Uma vez que, os hemócitos são recrutados, é estabelecido o contato com o tegumento do parasita. Um novo suprimento de células é requerido e, então, uma cápsula de múltiplas camadas é formada (Fig. 01b). JOURDANE (1982) não evidenciou a formação de cápsulas hemocitárias de grande espessura ($> 10\mu\text{m}$), contrariando as observações feitas por outros autores (LIE ET AL., 1976 assinalaram a formação de cápsulas com até $100\mu\text{m}$ de diâmetro; CHENG & GARRABRANT, 1977 observaram cápsulas de $150\mu\text{m}$ de diâmetro). Apesar disso, não houve diminuição na eficácia da reação de defesa; havendo na maioria dos casos completa reabsorção do material parasitário após 48 horas de infecção.

BAYNE ET AL. (1980) demonstraram que a ação mecânica dos hemócitos combinada à ação de substâncias solúveis no plasma resulta em dano ao tegumento do parasita. LOKER ET AL. (1982) demonstraram que estas células são capazes de iniciar a fagocitose do tegumento dos esporocistos com 7,5 horas de infecção. Neste mesmo período, observaram a presença de material amorfo no interior de vacúolos localizados no citoplasma dos hemócitos. Isso sugeriu que esta estrutura foi destruída em pequenas porções. Em 48 horas, estes pesquisadores puderam observar o rompimento da membrana basal enfraquecida. Em consequência, os hemócitos se infiltram pelos tecidos do parasita dividindo-o em peças e promovendo a lise de suas estruturas internas. As mudanças degenerativas que ocorrem a partir daí são análogas aos fenômenos de destruição dos esquistosomos nos camundongos (MCLAREN ET AL., 1978). As células fagocitadas são, então, eliminadas por exocitose (Fig. 01c). Após destruição parasitária, as cápsulas regridem rapidamente e os hemócitos vacuolizados dispersam-se pelos tecidos do hospedeiro, usualmente sem deixar cicatriz (PAN, 1963 e 1965; LIE & HEYNEMAN, 1980; LOKER ET AL., 1982; LIE ET AL., 1987). Na ausência de formas invasoras, os hemócitos fagocitam detritos ou mesmo resíduos resultantes do metabolismo do animal. Por isso, é natural que mesmo os exemplares não-infectados apresentem hemócitos infiltrando-se intersticialmente pelos tecidos, embora em menor quantidade.

3 OBJETIVO GERAL

Estudo morfológico, histológico, ultraestrutural e bioquímico, de *B. glabrata* com diferentes graus de resistência aos miracídios do *S. mansoni*, para melhor caracterizar a morfologia de suas reações de defesa, a participação dos elementos da matriz extracelular e entender a patogenia das mesmas.

3.1 Objetivos Específicos

A - Caracterização celular dos complexos encapsulantes, verificando as diferenças fenotípicas apresentadas pelos “hemócitos” (granulócitos e hialinócitos) durante sua maturação e o papel de cada uma destas células nas lesões em torno das formas parasitárias (esporocistos e cercárias).

B - Comparar as características ultraestruturais de hemócitos em repouso - controles normais - e nos tecidos e nas lesões encapsulantes de caramujos com diferentes graus de resistência ao *S. mansoni*.

C - Caracterizar o comportamento da matriz extracelular nas lesões encapsulantes e verificar se ela mostra variações em moluscos com diferentes graus de resistência ao *S. mansoni*, verificando se há a formação de novas fibras, e quais os tipos (colágenas, elásticas, microfibrilas) e as características (periodicidade e formação de feixes) das mesmas.

4 JUSTIFICATIVA

Embora a incidência de formas graves da esquistossomose tenha diminuído muito nos últimos anos no Brasil, a infecção pelo *S. mansoni* continua a ter uma alta prevalência. Uma das áreas menos conhecida no estudo desta parasitose diz respeito às relações estabelecidas entre este verme e seu hospedeiro intermediário.

Um melhor conhecimento da patologia dos moluscos hospedeiros intermediários do *S. mansoni*, além de poder contribuir para o controle biológico da doença, poderá, também, trazer aporte de interesse para a patologia geral, dado o caráter primitivo e básico das lesões envolvidas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Moluscos Utilizados

Os exemplares da espécie *B. glabrata* utilizados neste estudo provieram, em sua maior parte, da colônia de Feira de Santana (FS), BA. Esta é uma colônia mantida há vários anos no moluscário do CPqGM, e utilizada na rotina de manutenção do ciclo do *S. mansoni*. Além disso, foram usados espécimes de *B. glabrata* provenientes de Belo Horizonte - CPqRR (infectados pela cepa LE do *S. mansoni*), cedidos pela Dra. Cecília Pereira de Souza, com indicação de que se tratava de uma cepa moderadamente resistente. Estes exemplares foram incluídos na esperança de virem a apresentar muitas lesões encapsulantes em torno de esporocistos e cercárias. Foram examinados ainda exemplares colhidos no campo, na região de Itaquara (IT) - BA, que se revelaram naturalmente negativos. Todos os moluscos de FS/IT foram expostos a 20 miracídios do *S. mansoni* (cepa FS – ANDRADE & SADIGURSKY, 1985) e sacrificados em diferentes intervalos de tempo durante e após o período pré-patente; sendo divididos em dois grupos distintos:

A - Grupo Controle: caramujos (08 - 20mm) normais, não infectados.

B - Grupo Infectado: caramujos (08 - 20mm) subdivididos em 3 subgrupos, após verificação de positividade e de acordo com média quinzenal de eliminação de cercárias; de acordo com a classificação proposta por FRANSEN (1979):

Subgrupo I - Caramujos muito compatíveis (classe 5): caramujos infectados e que estejam eliminando entre 150,1-500 cercárias.

Subgrupo II - Caramujos compatíveis (classe 4): caramujos infectados e que estejam eliminando entre 50,1 - 150 cercárias.

Subgrupo III - Caramujos muito pouco compatíveis (classe 2): caramujos infectados ou expostos e que estejam eliminando entre 0 - 10 cercárias.

5.2 Criação dos Moluscos

Os exemplares de Feira de Santana e Itaquara foram coletados, aleatoriamente, dos aquários de criação após um período de 40 - 60 dias quando, então, haviam atingido a maturidade sexual. Em seguida, foram colocados em pequenos cristalizadores contendo 3 litros de água desclorificada e sem terra; sendo selecionados para os grupos controle e experimental ao atingirem 8 - 20mm. SZUMLEWICZ (1958) admite que o tamanho tem mais importância que a idade do molusco e, assim, exemplares de *B. glabrata* atingem a maturidade sexual em torno de 7,7 a 8,9 mm ou, segundo BARBOSA & SILVA (1951) prestes a completar o seu quarto giro. Estes animais foram, então, expostos a 20 miracídios do *S. mansoni* (cepas FS), como descrito no item 5.3. Este procedimento permite uma maior chance de infecção, uma vez que, apenas cerca de 30% dos miracídios são capazes de penetrar e evoluir em *B. glabrata* (CHERNIN & ANTOLICS, 1975). Após exposição, cada caramujo foi colocado, individualmente, em frascos de 180 ml. Durante o período pré-patente, os exemplares foram alimentados, 3 vezes por semana, com folhas de alface fresca previamente lavadas em água desclorificada onde acrescentava-se 1 ml de ácido acético para cada 5 litros; ração para rato em pó, misturada a 10% de carbonato de cálcio e leite em pó. A fim de evitar-se a proliferação de fungos e bactérias nos frascos, a água foi trocada periodicamente, sempre que observada a presença excessiva de detritos orgânicos ou opacificação da mesma.

5.3 Infecção Experimental dos Moluscos

Oito (8) camundongos suíços, com no mínimo 50 dias de infecção pelo *S. mansoni*, foram anestesiados com éter etílico e sacrificados pelo deslocamento da coluna cervical. Após tal procedimento fez-se a retirada dos fígados os quais foram esmagados em um tamis Granutest, USBS 40, com abertura de 0,42mm – número 35. Colocou-se, então, o material em um cálice de sedimentação, completando com salina a 0,85% e levou-se à geladeira por 50 minutos. Decorrido este tempo desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se nova salina a 0,85%; levando-se novamente à geladeira por mais 50 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e adicionou-se água destilada ao recipiente, despejando todo o conteúdo do cálice em um vasilhame de boca larga (tipo cristalizador) que foi deixado sob luz intensa (3 lâmpadas de 60 watts) por 30 minutos. Em seguida, transferiu-se o líquido 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. Retirou-se 1 ml do líquido do gargalo, contou-se o número de miracídios e ajustou-se o inóculo necessário para obtenção de 20 miracídios/ml. Fez-se, a partir daí, a infecção individual dos moluscos colocados em pequenos poços de placas de cultura; onde foi acrescentado um pequeno volume de água, o suficiente para que cada animal ficasse totalmente submerso.

5.4 Seleção dos Moluscos

5.4.1 Teste de Positividade

A partir da 4^a semana (= 28 dias), foi realizado quinzenalmente o teste de positividade para eliminação de cercárias no qual os moluscos foram lavados em

água corrente e colocados individualmente em vidros pequenos de 50ml, com cerca de 4 ml de água e expostos a um foco de luz (3 lâmpadas de 60w), durante 1 hora. Decorrido este tempo de exposição os vidros foram examinados sob microscópio estereoscópio e os animais retirados dos frascos onde foi acrescentado 1 ml de Nynhidrina para fixação e coloração das cercárias. O conteúdo de cada frasco foi, então, derramado em placas de Petri forradas com papel filtro devidamente identificados e colocados na estufa a 50 °C durante 2 a 3 horas ou em temperatura ambiente por 48 horas para secagem. A contagem das cercárias coradas e presas ao papel filtro foi realizada com o auxílio de uma lupa estereoscópica, um contador de células e uma circunferência plástica milimetrada colocada sobre o papel filtro. Os valores obtidos foram somados e divididos pelo número total de observações, obtendo-se assim uma média aritmética para cada exemplar até o momento do sacrifício. Os resultados obtidos permitiram que os animais fossem agrupados conforme os índices de compatibilidade calculados de acordo com FRANSEN (1979) e enquadrados nos subgrupos descritos anteriormente.

5.5 Postura

Pequenas placas de isopor foram colocadas nos frascos de cada exemplar exposto e controle. Uma vez por semana até o sacrifício (= 64 dias), período no qual verificou-se uma alta taxa de mortalidade para os exemplares da linhagem proveniente de Feira de Santana, as desovas foram retiradas com auxílio de uma espátula e colocadas em uma gota de água sobre uma lâmina de vidro. Cada amostra foi, então, contada sob microscópio estereoscópico e os dados registrados.

5.6 Acompanhamento do Crescimento

Cada exemplar foi colocado sobre um papel milimetrado onde estavam demarcados vários raios de circunferência correspondentes aos diversos tamanhos da concha. Este procedimento foi realizado no início do experimento e no momento do sacrifício afim de verificar a interferência da infecção sobre a taxa de crescimento de cada animal (dados não demonstrados).

5.7. Processamento do Material Histológico

5.7.1 Técnica de Fixação e Coloração para Microscopia Óptica

5.7.1.1 Hematoxilina-Eosina/Sírius-Vermelho/Orceína/Resorcina-Fucsina de Weigert

Exemplares de cada grupo foram anestesiados com cristais de mentol por 4 horas (BARBOSA ET AL., 1960). Em seguida procedeu-se a quebra da concha; sendo a parte mole retirada com o auxílio de pequenas pinças oftálmicas. No momento da fixação, tomou-se 28 ml do fixador Bouin adicionando-se 2 ml de ácido acético onde o material permaneceu por 4 - 6 horas. Decorrido esse tempo, o material foi transferido para pequenos frascos de plástico e conservados em álcool a 70% ou formol millong a 10%; de acordo com a técnica de coloração, até o momento da inclusão em parafina. Os blocos foram submetidos a cortes escalonados ou seriados de 5 micrômetros de espessura, os quais foram corados com hematoxilina/eosina, sírius - vermelho para fibras colágenas, orceína para fibras elásticas e resorcina de Weigert com prévia oxidação para evidenciação de fibras oxitalâmicas e elaunínicas do tecido elástico.

5.7.1.2 Giemsa/Vermelho Neutro

A concha de caramujos normais e infectados foi lavada em água destilada e limpa em álcool a 70%; secando-se em papel filtro. Após tal procedimento, os exemplares foram perfurados com agulha de 13 x 4mm, próximo a região cefalopodal. A hemolinfa extravazada foi coletada em placas de Petri. Usou-se uma pipeta automática de 20µl e acondicionou-se a hemolinfa em placas de cultura estéreis mantidas sobre o gelo; deixando-se descansar por 5 minutos para deposição dos resíduos da concha. Pequenas amostras de 10 µl foram colocadas sobre lâminas de vidro lavadas em solução de sulfocrômica e deixadas incubando por 30 minutos a 22 °C. Por inclinação das lâminas, a hemolinfa foi removida obtendo-se uma camada de hemócitos aderidos. As lâminas foram fixadas em álcool metílico por 5 minutos, coradas com giemsa ou vermelho neutro por 20 minutos e observadas ao microscópio óptico da marca Leica Galen III para contagem e verificação dos subtipos celulares sendo utilizado 10 campos em objetiva de 40 x.

5.7.2. Técnica de Fixação e Coloração para Microscopia Eletrônica

5.7.2.1 Tecidos

Animais de cada grupo foram anestesiados e sacrificados como descrito no item 5.7.1. Os fragmentos obtidos foram fixados em glutaraldeído a 2% + tampão cacodilato a 0,2M, na proporção de 1:1, durante uma hora em temperatura de 4°C, sofrendo lavagens rápidas em tampão cacodilato a 0,2M. Para pós-fixação foi utilizada uma mistura de tetróxido de ósmio a 2% + cacodilato 0,2M, na proporção de 1:1, por uma hora em temperatura de 4°C. Decorrido este tempo, o material foi lavado em cacodilato a 0,2M à temperatura ambiente e desidratado em acetona. Dando continuidade ao processamento, o material foi colocado em uma mistura de

resina Poly-bed 812 e acetona pura por uma hora à temperatura ambiente, seguindo impregnação, por 12 horas (“overnight”), em resina pura no vácuo e temperatura ambiente e posterior emblocamento em moldes plásticos, previamente secos em estufa a 37°C. Estes moldes foram colocados na estufa, durante 3 dias a 60°C a fim de que a resina polimerizasse. Após polimerização, estes moldes foram levados ao ultramicrotomo de marca Reichert-Supernova onde foram feitos cortes semi-finos de 0,5µm. Selecionados os melhores cortes, foram feitos cortes ultrafinos de 450 Å, os quais foram contrastados com acetato de uranila, e depois em citrato de chumbo para análise ao microscópio eletrônico da marca Zeiss, sob 50 kV.

5.8 Técnica de Quantificação da Hidroxiprolina

O teor de colágeno foi quantificado a partir da dosagem de hidroxiprolina realizada de acordo com o método de BERGMAN & LOXLEY (1963); caramujos normais e infectados, após sacrifício, foram pesados e fixados em formol millonig a 10%. Paralelamente, fragmentos de fígado com pesos similares aos obtidos na pesagem dos moluscos, foram coletados de camundongos normais e infectados com 100 cercárias e fixados como descrito acima. Em seguida, todos os fragmentos foram hidrolizados por 9 e 18 horas, respectivamente, a 110 °C em 5 ml de cloreto de sódio (HCl - 6N). Após digestão, acrescentou-se 5 ml de água destilada, sendo o total da amostra filtrada para retirada de impurezas e sedimentação. As amostras foram neutralizadas em hidróxido de sódio (NaOH - 10N) e HCl a 6N. Subsequentemente, 100µl de cada amostra foi colocado em tubos teste, previamente lavados, acrescentando-se água destilada para ajustar o volume final a 200µl. Concomitantemente, foram preparados os padrões que continham 50, 100, 150 e 200µl de hidroxiprolina de peso molecular previamente conhecido. Foram

100,150 e 200 μl de hidroxiprolina de peso molecular previamente conhecido. Foram acrescentadas em todos os tubos as soluções A (cloramina T + tampão citrato acetato) e B (reagente de Erlich's + álcool isopropanol). Em seguida, todas as amostras foram colocadas em banho maria 60 °C por 25 minutos e feita a leitura, com o comprimento de onda de 558nm, em espectrofotômetro da marca Hitachi 200. Os resultados finais obtidos foram calculados levando-se em conta a densidade óptica, a diluição, o peso do fragmento e um fator relativo ao padrão da curva. O conteúdo de hidroxiprolina foi expresso em μmol por grama de tecido. Como o μmol deste aminoácido equivale a 1 mg de colágeno, os resultados passaram a ser expressos em miligrama de colágeno por grama de tecido.

6. RESULTADOS

6.1. Dados Malacológicos

Os exemplares que exibiram uma alta taxa de eliminação de cercárias até o momento do sacrifício apresentaram conchas quebradiças, pouco espessas e esbranquiçadas. Os animais controle, não-infectados, apresentaram conchas mais resistentes, brilhantes e de coloração marrom-escuro.

Nos cinco exemplares infectados (cepa FS) observou-se um menor número de ovos quando comparados aos exemplares normais (gráficos 01a, 01b). Em alguns momentos verificou-se, inclusive, que a cápsula ovífera estava apenas constituída pelo envoltório gelatinoso protetor. Ao final do experimento, verificou-se ausência de postura indicando castração parasitária.

Os caramujos da linhagem FS (subgrupo II) representam um grupo de exemplares que, segundo a classificação de Frandsen (1979), podem ser considerados como pertencentes à classe 4 (50,1 - 150 cercárias) (gráfico 03); onde 80% mostraram-se positivos (gráfico 02a). Entretanto, observou-se que em alguns exemplares a taxa de eliminação era nula ou inferior a apresentada pelo grupo como um todo. Constatou-se, ainda, que os animais expostos estavam negativos até a 4ª semana (=28 dias). A partir deste momento, o número de positivos foi crescente e a produção cercariana se tornou mais intensa por volta da 9ª semana (+/- 63 dias) (gráfico 04). Este período coincidiu com o aumento na taxa de mortalidade (dados não demonstrados).

Os caramujos proveniente de Itaquara (= cepa IT) não evidenciaram eliminação

cercariana após 6 meses de observação (04/99 – 10/99). Quando expostos, experimentalmente, a 20 miracídios do *S. mansoni* (cepa FS) comportaram-se como um grupo de classe 2 (1-10 cercárias) – subgrupo III (gráfico 03); onde apenas 20% dos animais mostraram-se positivos (gráfico 02b). Nestes casos, a taxa de eliminação foi superior, a apresentada pelo grupo FS, no 35º dia da exposição.

Estes parâmetros não foram avaliados nos animais provenientes de Belo Horizonte, uma vez que, o número de exemplares cedidos foi bastante reduzido (n = 6) .

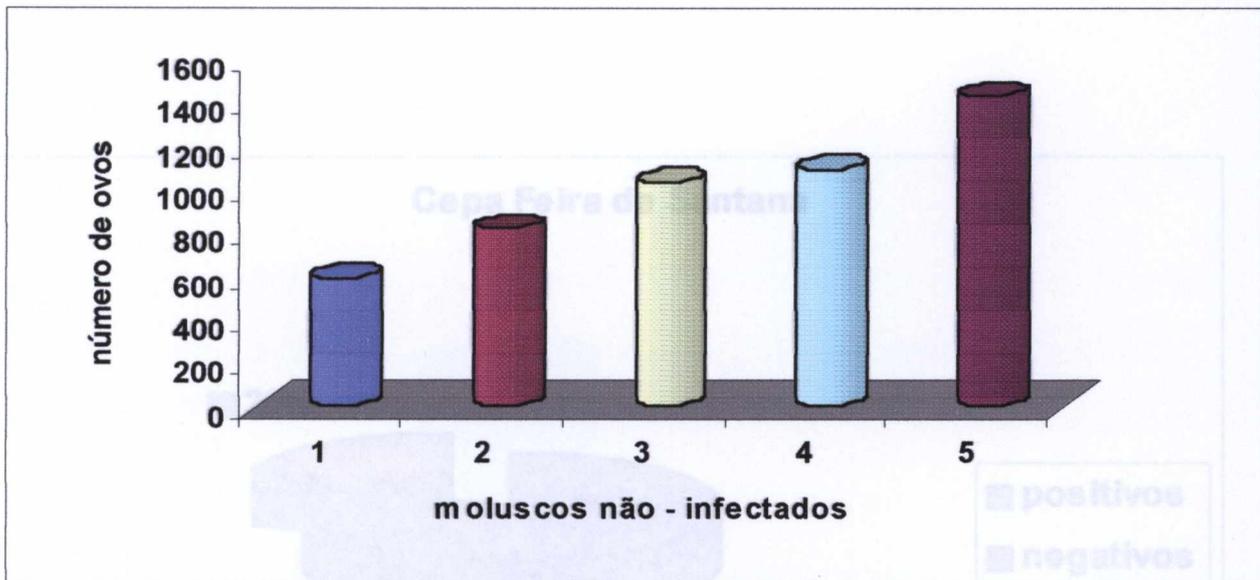


Gráfico 01a: Número total de ovos obtido até o momento do sacrifício. (64 dias pós-exposição) (cepa FS; n=05).

Gráfico 02a: Taxa de Positividade para infecção (95 dias pós-exposição) (n=24).

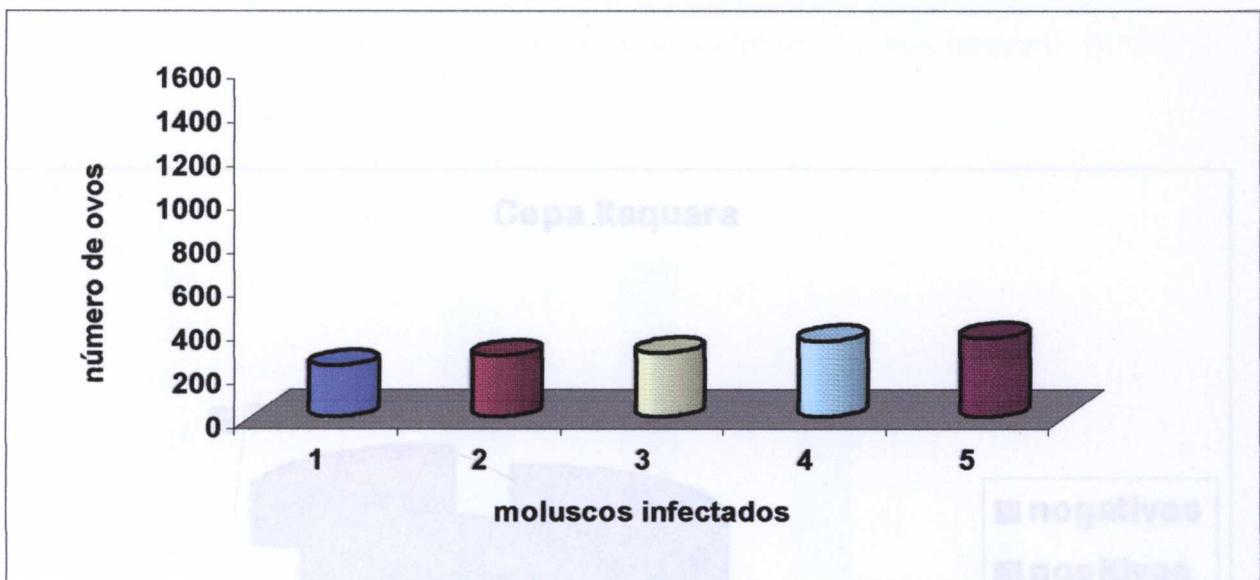


Gráfico 01b: Número total de ovos obtidos até o momento do sacrifício. (64 dias pós-exposição) (cepa FS; n=05).

Gráfico 02b: Taxa de Positividade para infecção (95 dias pós-exposição) (n=24).

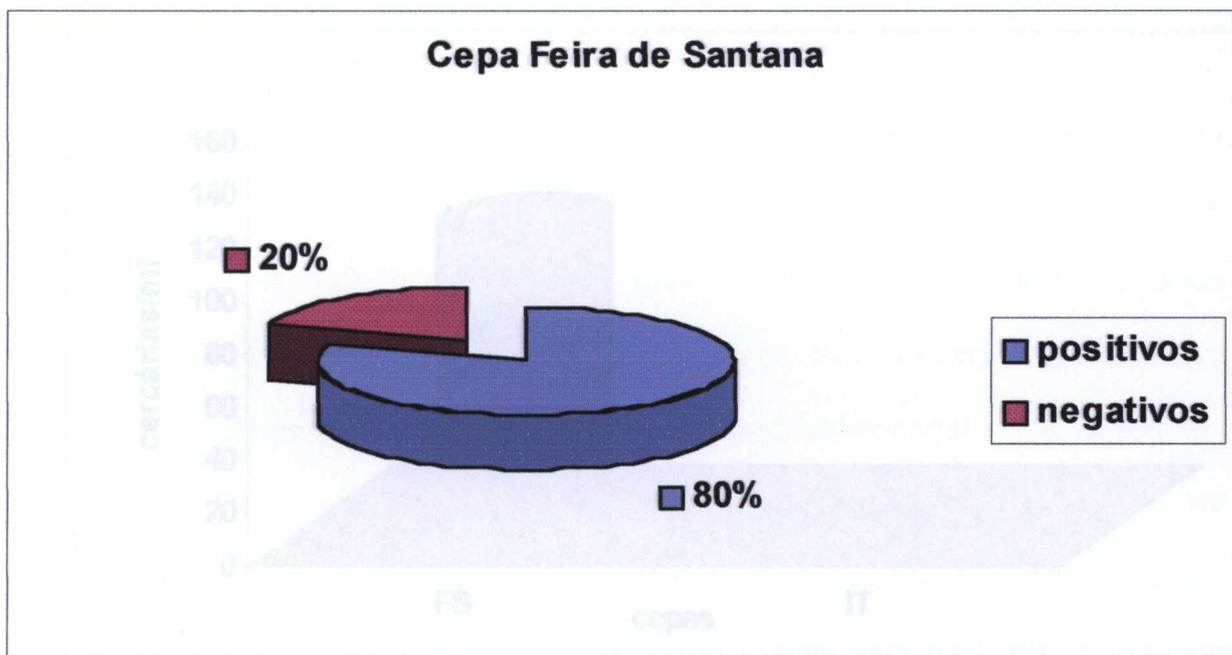


Gráfico 02a: Taxa de Positividade para infecção (95 dias pós-exposição) (n=24).

Gráfico 03: Média total de cercárias eliminadas em cada grupo experimental (35 dias pós-exposição) (FS: cepa Feira de Santana; IT: cepa Itaquiara) (n=24).

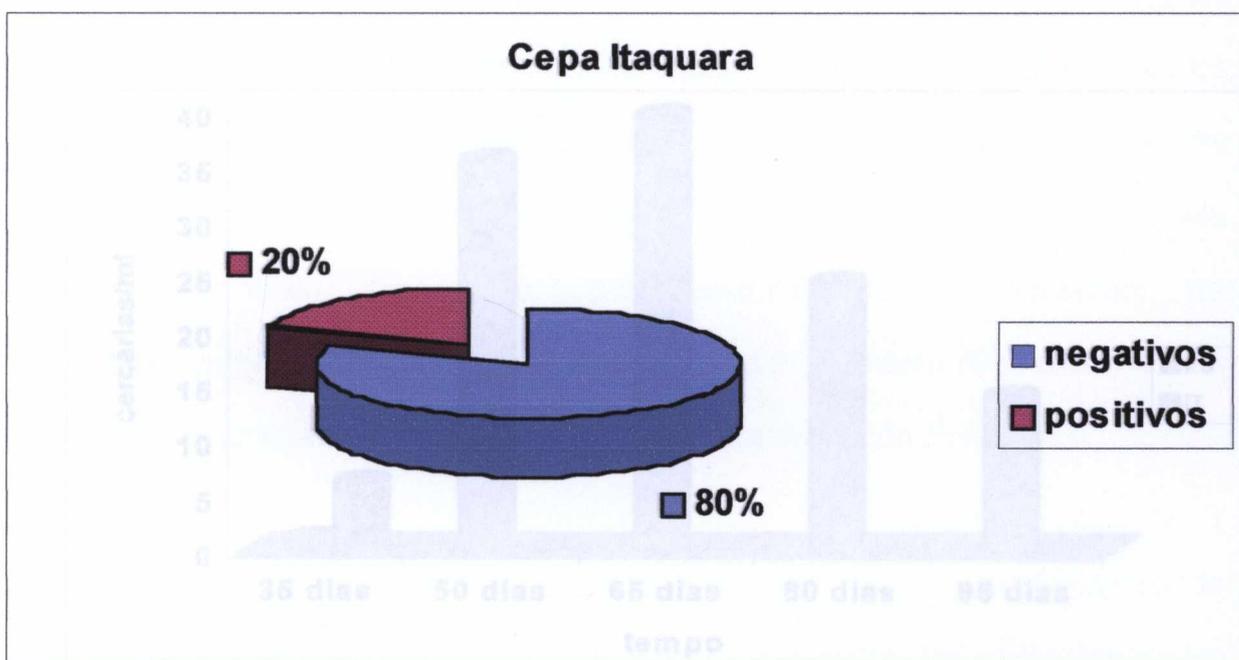


Gráfico 02b: Taxa de Positividade para infecção (95 dias pós-exposição) (n=24).

Gráfico 04: Média de cercárias obtidas em cada dia de exposição (95 dias pós-exposição) (FS: cepa Feira de Santana; IT: cepa Itaquiara) (n=24).

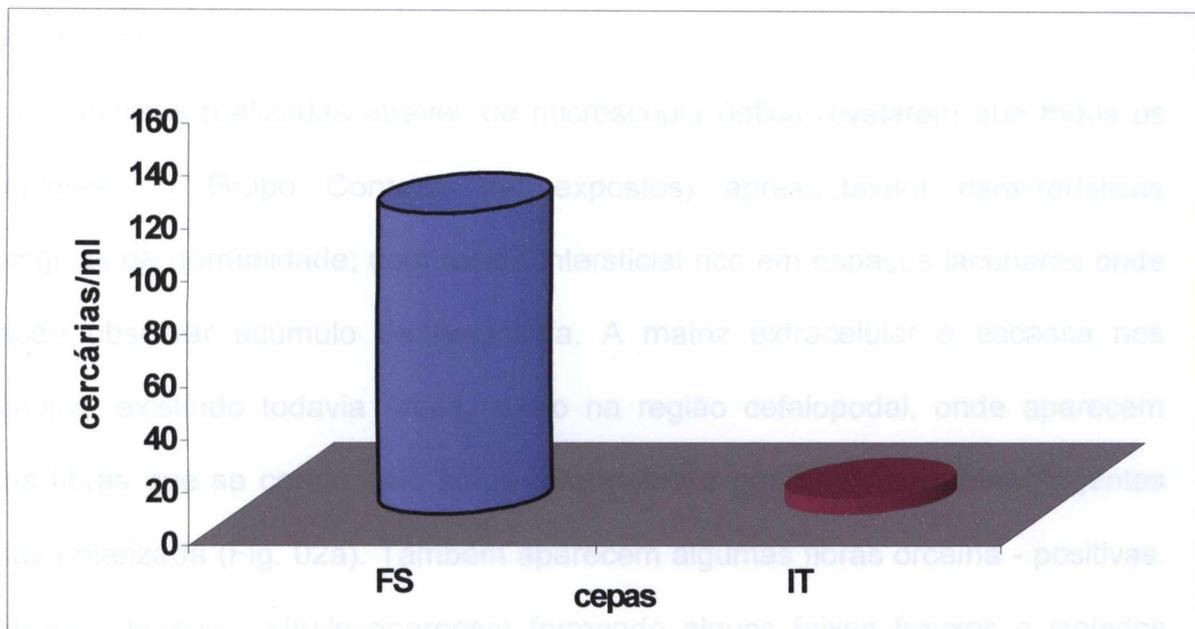


Gráfico 03: Média total de cercárias eliminadas em cada grupo experimental. (95 dias pós-exposição) (FS: cepa Feira de Santana; IT: cepa Itaquara) (n=24).

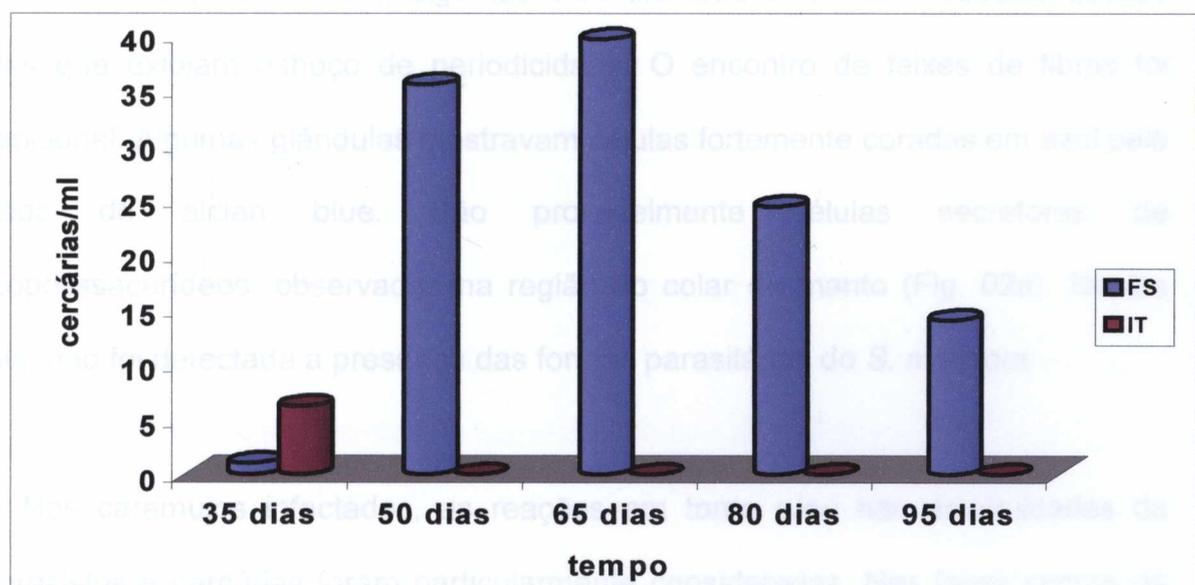


Gráfico 04: Média de cercárias obtidas em cada dia de exposição. (95 dias pós-exposição) (FS: cepa Feira de Santana; IT: cepa Itaquara) (n=24).

6.2 Dados Histológicos

6.2.1 Microscopia Óptica

6.2.1.1 Tecidos

As análises realizadas através da microscopia óptica revelaram que todos os exemplares do Grupo Controle (não-expostos) apresentavam características histológicas de normalidade; com tecido intersticial rico em espaços lacunares onde se pôde observar acúmulo de hemolinfa. A matriz extracelular é escassa nos caramujos, existindo todavia áreas, como na região cefalopodal, onde aparecem muitas fibras que se coram pelo sítius - vermelho e que se tornam birrefringentes sob luz polarizada (Fig. 02a). Também aparecem algumas fibras orceína - positivas. As fibras colágeno - símile aparecem formando alguns feixes frouxos e isolados entre as glândulas digestivas, nidamental, do albúmen e no ovoteste, sempre acompanhadas de algumas fibrilas orceína - positivas (Figs. 02b e 02c). Nas preparações examinadas ao microscópio eletrônico, o mais comum foi o encontro de fibrilas isoladas (microfibrilas), algumas com diâmetro bem mais reduzido que as fibrilas que exibiam esboço de periodicidade. O encontro de feixes de fibras foi excepcional. Algumas glândulas mostravam células fortemente coradas em azul pelo método do alcian blue. São provavelmente células secretoras de mucopolissacarídeos, observadas na região do colar do manto (Fig. 02d). Nestes locais, não foi detectada a presença das formas parasitárias do *S. mansoni*.

Nos caramujos infectados, as reações em torno e/ou nas proximidades de esporocistos e cercárias foram particularmente consideradas. Nas fases iniciais da infecção, nos exemplares da cepa FS, as numerosas formações parasitárias encontradas, apenas deslocavam e comprimiam as estruturas teciduais dos

moluscos, especialmente na região das glândulas digestivas, nas porções sacular e tubular do rim e no ovoteste e, em menor grau, nas glândulas nidamental e do albúmen (Figs. 03a e 03b). Em fases mais tardias (entre a 12^a e 15^a semana) as reações tissulares se tornaram progressivamente mais evidentes. Células de núcleo vesiculoso e citoplasma amplo e fracamente eosinofílico (= hemócitos) apareciam em número crescente, num tecido intersticial escasso e edemaciado. Estas células eram muito regulares em tamanho e aspecto e não apresentavam atividade mitótica evidente. Estavam presentes em todas as estruturas dos moluscos, acumulando-se em muitas áreas, especialmente naquelas mais parasitadas. Em torno de esporocistos e cercárias, os hemócitos se dispunham num manto difuso ou concentricamente, neste último caso formando estruturas encapsulantes frouxas e/ou compactas, que nas fases mais avançadas pareciam formar anéis concêntricos de células e fibras ou fibrilas (Figs. 04a, 04b, 04c e 04d). Infiltrações difusas, espessas, similares às estruturas encistadas foram também observadas em torno de várias formas parasitárias que estavam aparentemente íntegras (Fig. 05a). Os esporocistos e as cercárias mostraram sinais evidentes de alterações regressivas quando no seio dos hemócitos. Transformavam-se em um material grumoso, fortemente eosinófilo, com material nuclear agregado (picnótico) ou em várias fases de desintegração. Restos deste material desagregado podiam ser observados no interior de células fagocíticas. Este material fagocitado sofria modificações progressivas. No interior de vários hemócitos foram identificados restos nucleares, grumos arredondados e eosinófilos e um material esférico, pálido, homogêneo, cujo diâmetro variava, podendo chegar a ter quase 80% do tamanho da célula que o continha (Figs. 06a, 06b, 06c e 06d). Nestas formações celulares, difusas ou focais e encapsulantes, as fibras sírius - vermelho ou orceína - positivas, apareciam

excepcionalmente. Formavam apenas alguns finos feixes isolados aqui e ali. Nas lesões encapsulantes, tais fibras, quando presentes, apareciam na periferia, sem circunscrever totalmente a lesão (Figs. 07a, 07b, 07c, 07d). Nos infiltrados difusos de hemócitos, as fibras estiveram ausentes, a coleção celular assumindo o aspecto de um compacto tecido epitelial, com limites celulares por vezes bem distintos. No seio deste tecido, algumas células apareciam comprimidas, alongadas, pouco a pouco simulando fibras com disposição paralela, mas sem reatividade para o sÍrius - vermelho ou orceína (Figs. 08a e 08b).

Algumas estruturas parasitárias, especialmente a cabeça de cercárias já bem diferenciadas, apareciam fortemente coradas pelo sÍrius-vermelho, mas não exibiam refringência sob luz polarizada (Fig. 09a). As secções histológicas coradas pela orceína ou pela resorcina-fucsina de Weigert, para evidenciar fibras elásticas, revelaram fibras orceína positivas, finas, raras e inconstantes em relação com os hemócitos infiltrantes (Figs. 10a, 10b e 10c). Não foram observados sinais evidentes de mitose nos hemócitos, seja nas lesões encapsulantes ou nos infiltrados difusos.

6.2.1.2 Hemolinfa

Dois tipos morfológicos foram observados na hemolinfa coletada de exemplares normais e infectados: células arredondadas pequenas e células de citoplasma expandido representando, respectivamente, 20% e 80% do total de células (Fig. 11a). Entretanto, não se verificou a ocorrência de variação numérica estatisticamente significativa ($p=0,05$) desta população celular nos períodos iniciais da infecção (gráfico 05: 24h – 35d). Nos animais expostos sobreviventes, com baixa taxa de eliminação de cercárias, o número total de células obtido foi menor (gráfico 05: 49d -100d).

6.2.2 Microscopia Eletrônica

6.2.2.1 Ultraestrutura

As análises se concentravam na observação da morfologia dos hemócitos e nas suas relações com a matriz extracelular. A morfologia dos hemócitos foi variável, tanto quanto ao tamanho, densidade do citoplasma, número e disposição dos filopódios, presença de organelas citoplasmáticas e características nucleares. A

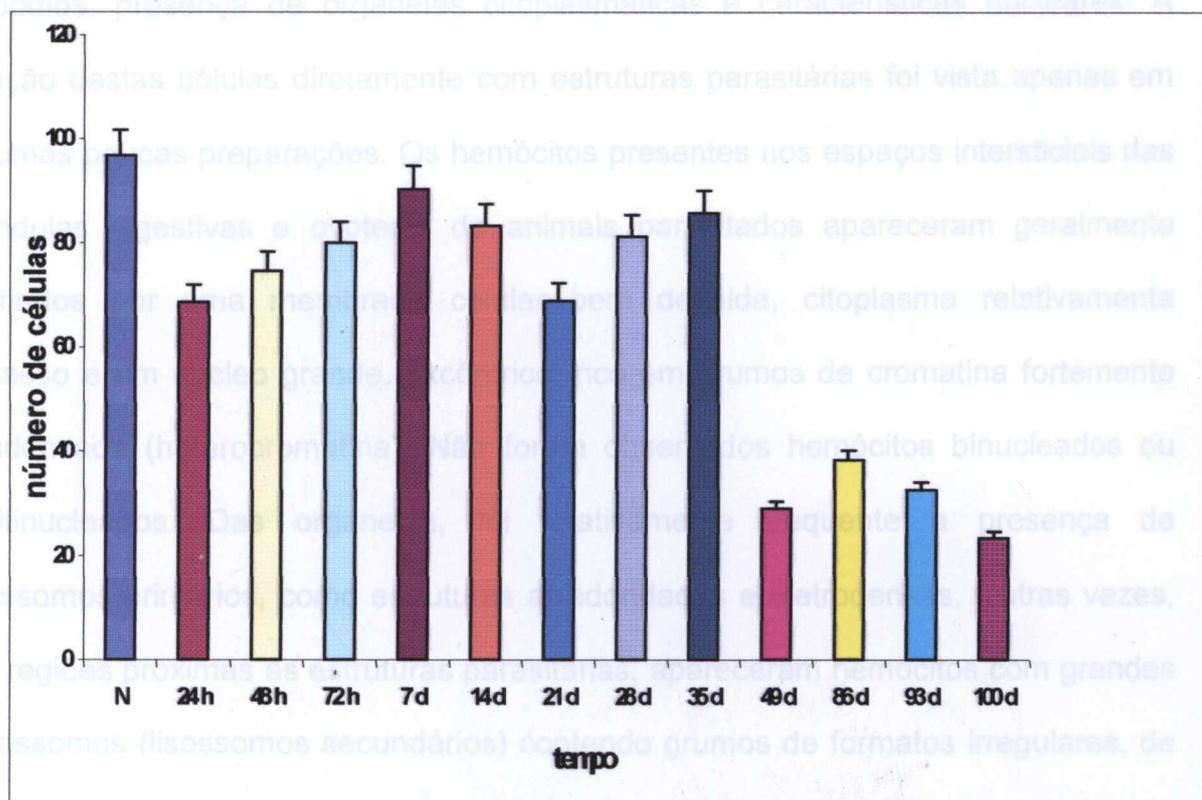


Gráfico 05: Médias de hemócitos obtidas em diferentes tempos da infecção. Coleta de hemolinfa fresca (n = 4 por ponto; amostra 10 μ l) (h=horas; d=dias).

(Fig. 12a). Na região perinuclear apareciam algumas mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e finos grumos eletrodensos (glicogênio) (Figs. 13a, 13b e 13c). As estruturas mais salientes foram os filopódios, que apareciam numerosos, fazendo contatos uns com outros na mesma célula ou com células vizinhas e com a matriz extracelular, formando no conjunto um aspecto labiríntico característico (Fig. 14a). Esta disposição reticular mostra a existência de um intensa interconexão entre duas ou mais células. Entretanto, não foi constatada

6.2.2 Microscopia Eletrônica

6.2.2.1 Ultraestrutura

As análises se concentraram na observação da morfologia dos hemócitos e nas suas relações com a matriz extracelular. A morfologia dos hemócitos foi variável, tanto quanto ao tamanho, densidade do citoplasma, número e disposição dos filopódios, presença de organelas citoplasmáticas e características nucleares. A relação destas células diretamente com estruturas parasitárias foi vista apenas em algumas poucas preparações. Os hemócitos presentes nos espaços intersticiais das glândulas digestivas e ovoteste de animais parasitados apareceram geralmente formados por uma membrana celular bem definida, citoplasma relativamente escasso e um núcleo grande, excêntrico, rico em grumos de cromatina fortemente condensada (heterocromatina). Não foram observados hemócitos binucleados ou multinucleados. Das organelas, foi relativamente frequente a presença de lisossomos primários, como estruturas arredondadas e eletrodensas. Outras vezes, em regiões próximas às estruturas parasitárias, apareceram hemócitos com grandes fagossomos (lisossomos secundários) contendo grumos de formatos irregulares, de eletrodensidade variável, presumivelmente de origem esporocística. Foram notadas também algumas estruturas filamentosas, densas, concêntricas (figuras de mielina) (Fig. 12a). Na região perinuclear apareciam algumas mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e finos grumos eletrondensos (glicogênio) (Figs. 13a, 13b e 13c). As estruturas mais salientes foram os filopódios, que apareciam numerosos, fazendo contatos uns com outros na mesma célula ou com células vizinhas e com a matriz extracelular, formando no conjunto um aspecto labiríntico característico (Fig. 14a). Esta disposição reticular mostra a existência de um intensa interconexão entre duas ou mais células. Entretanto, não foi constatada

a presença de sincícios ou a formação de células gigantes multinucleadas (Fig. 14b). Nos pontos de contato entre filopódios ou entre estes e as fibras da matriz extracelular, não foram vistas evidências de estruturas conectantes especializadas, tais como zonas aderentes ou ocludentes. Os espaços entre os prolongamentos estavam preenchidos por material amorfo, sob a forma de grumos com fraca eletrodensidade, que ficavam aparentemente aprisionados entre os filipódios (Figs. 14a e 14b). Por vezes aparecia material fibrilar, isolado ou formando feixes. Alguns destes feixes exibiam fibrilas com grumos claros e escuros alternados, dando a impressão da existência de periodicidade (Figs. 15a, 15b e 15c). Outros tipos celulares, como fibroblastos, não foram detectados nos espaços intersticiais das regiões examinadas (glândulas digestivas e ovoteste).

6.2.3 Bioquímica

6.2.3.1 Dosagem de Hidroxiprolina

Os resultados obtidos com a dosagem de hidroxiprolina em fragmentos de fígado de camundongos normais e infectados com 100 cercárias apresentaram diferenças significantes (teste t, $p=0,05$). Entretanto, quando correlacionados caramujos normais inteiros x caramujos infectados inteiros o teor de hidroxiprolina observado não diferiu significativamente (teste t, $p=0,05$) (tabela 1; gráficos 6 e 7).

TABELA 01: COMPARAÇÃO DO TEOR DE HIDROXIPROLINA OBTIDA NOS QUATRO GRUPOS EXPERIMENTAIS

COMPARAÇÕES (GRUPOS)*	DIFERENÇAS DAS MÉDIAS	VALOR DE T	p=0,05
Frag. Fígado Normal (FN) x Frag. Fígado Infectados (FI)	0,34	9,55	sim
Frag. Fígado Normal (FN) x Caramujos Inteiros Normais (CN)	0,33	2,72	sim
Frag. Fígado Normal (FN) x Caramujos Inteiros Infectados (CI)	0,63	3,06	sim
Frag. Fígado Infectado (FI) x Caramujos Inteiros Normais (CI)	0,36	6,52	sim
Frag. Fígado Infectado (FI) x Caramujos Inteiros Infectados (CI)	0,66	1,9	não
Caramujos Inteiros Normais (CN) x Caramujos Inteiros Infectados (CI)	0,65	1,67	não

• valor médio por grupo: (FFN)= 3,74; (FFI)= 6,99; (CIN)= 4,64; (CII)= 5,73

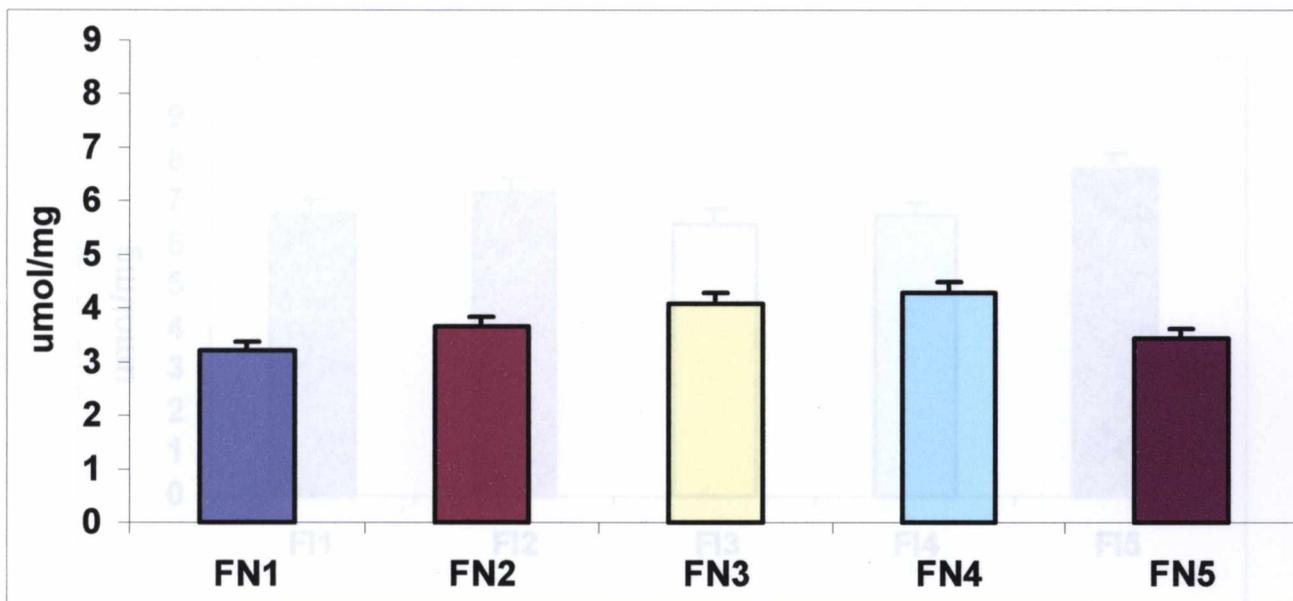


Gráfico 06a: Dosagem de hidroxiprolina em fragmentos de fígado de camundongos normais (n=5).

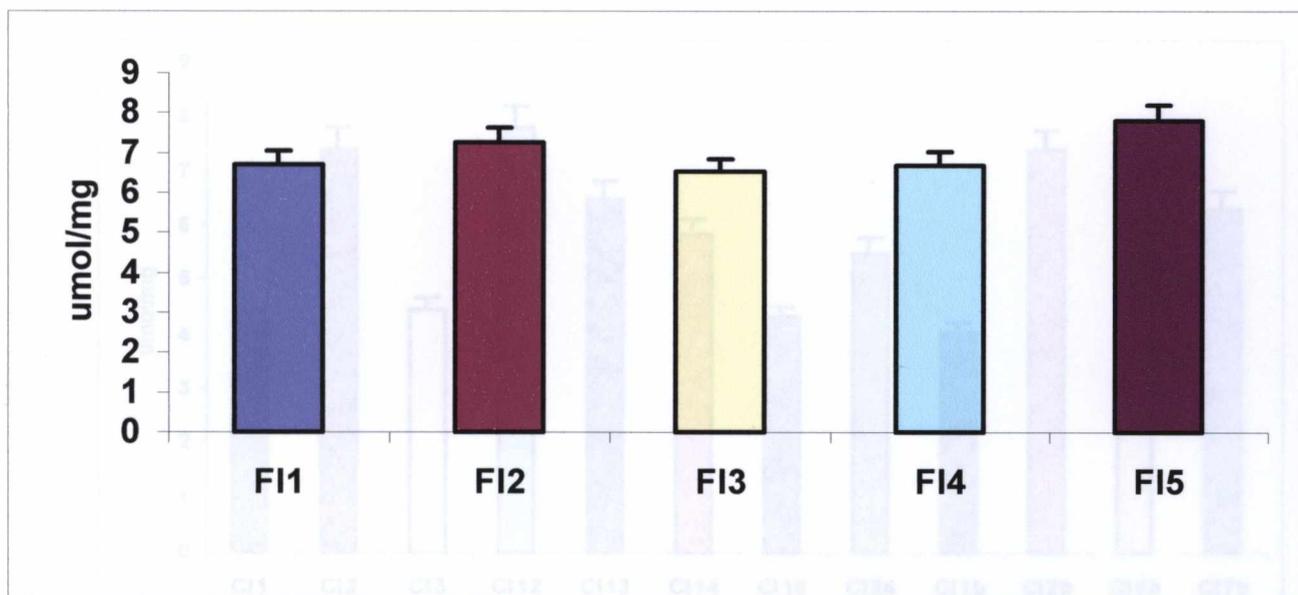


Gráfico 06b: Dosagem de hidroxiprolina em fragmentos de fígado de camundongos infectados com 100 cercárias (n=5).

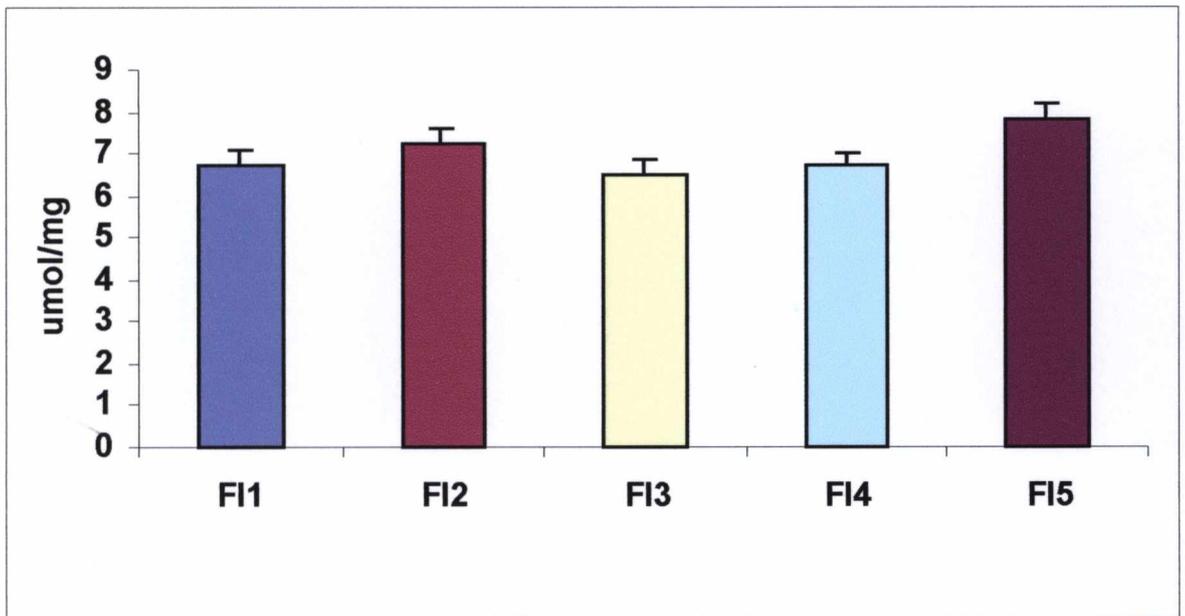


Gráfico 07a: Dosagem de hidroxiprolina em caramujos normais inteiros (cepa Feira de Santana) (n=5).

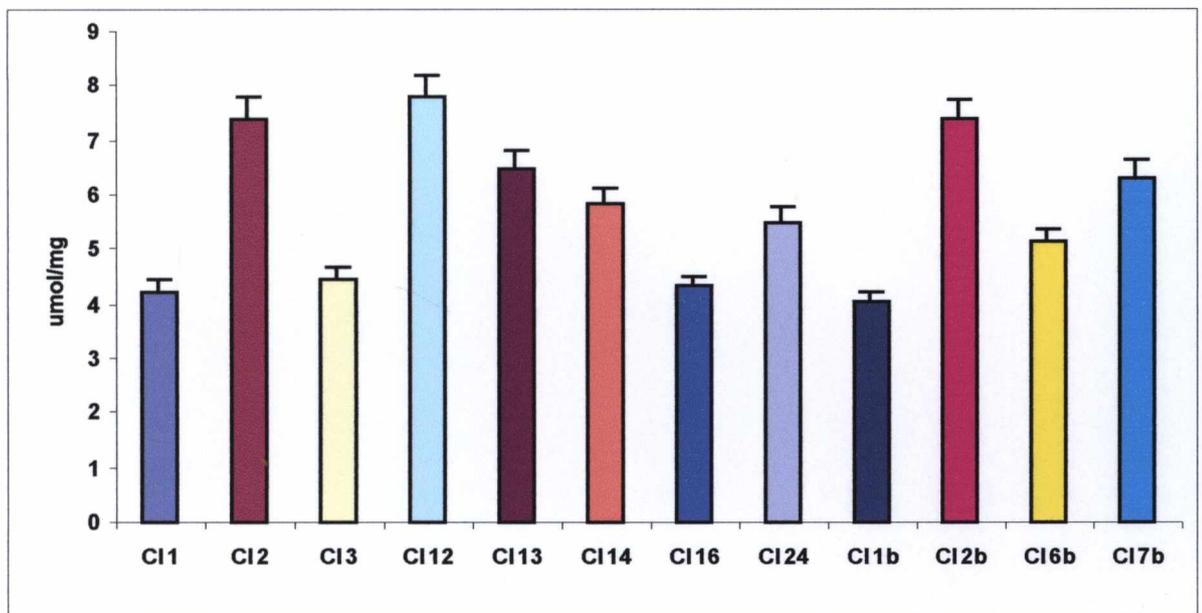


Gráfico 07b: Dosagem de hidroxiprolina em caramujos infectados inteiros (cepa Feira de Santana) (n=12).

6.3 PRANCHAS

6.3.1 PRANCHA 1

PRANCHA 1

1a Representação esquemática das células efetoras do sistema interno de defesa dos moluscos. CE: células endoteliais; CR: células reticulares; CP: células poro; HC: hemócitos circulantes; TC: tecido conectivo; V: vaso.

(Reproduzido de Knaap et al., 1990).

1b Região do ovoteste de *Biomphalaria glabrata* (BH/MG) parasitada pelo *Schistosoma mansoni* (LE/BH) apresentando reação tecidual com a formação de uma cápsula de múltiplas camadas celulares (hemócitos teciduais). Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

→ cápsula de múltiplas camadas celulares

■ Óvulo

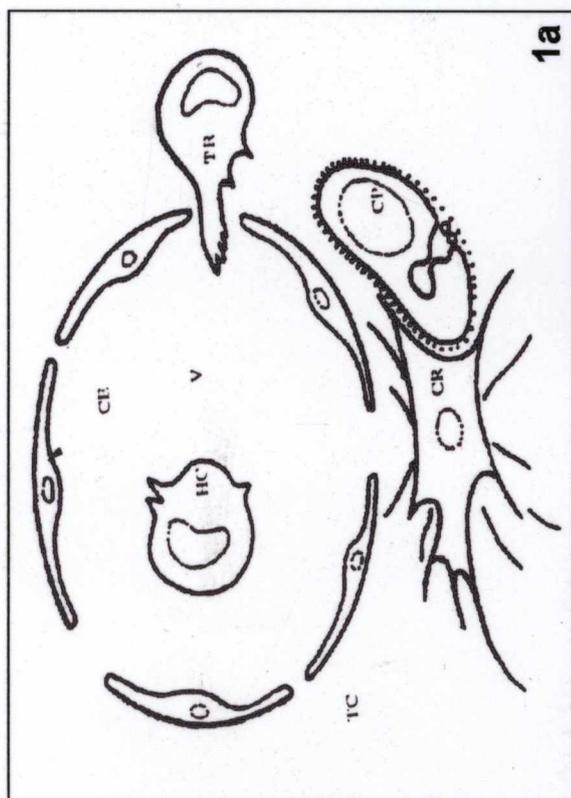
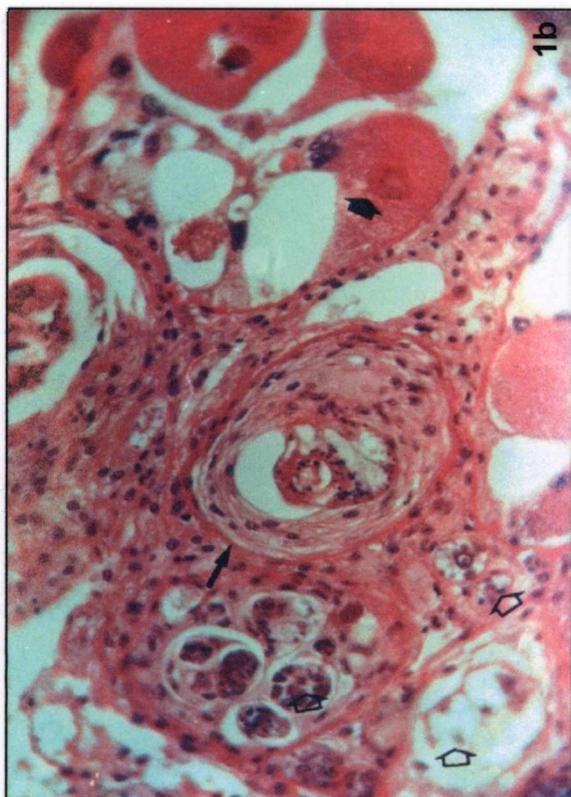
□ esporocistos

1c Pseudópodos, de um exemplar de *B. glabrata* (BH/MG) parasitado pelo *S. mansoni* (LE/BH), englobando material claro possivelmente para ser exocitado. Microscopia eletrônica, aumento 7.000 x.

→ Pseudópodos

□ exudato

PRANCHA 1



6.3.2 PRANCHA 2

PRANCHA 2

2a Região do pé de um exemplar normal de *B. glabrata* (FS/BA) mostrando no tecido conectivo vascular denso, abundância de fibras birrefringentes (seta) quando coradas pelo sírius-vermelho e observadas sob luz polarizada. Microscopia óptica, sírius-vermelho. Aumento 250 x. (Reproduzido de Lemos, 1999).

2b Fibras do tecido conectivo localizadas entre o tegumento e o tecido adjacente das glândulas digestivas de um exemplar normal de *B. glabrata* (FS/BA). Observar que a membrana basal do tegumento também está corada positivamente pelo sírius - vermelho. Microscopia óptica, sírius - vermelho. Aumento 400 x.

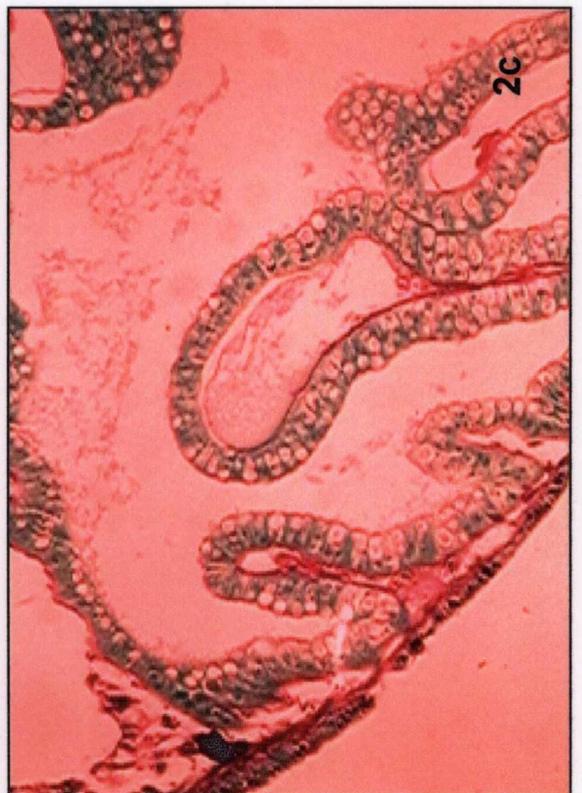
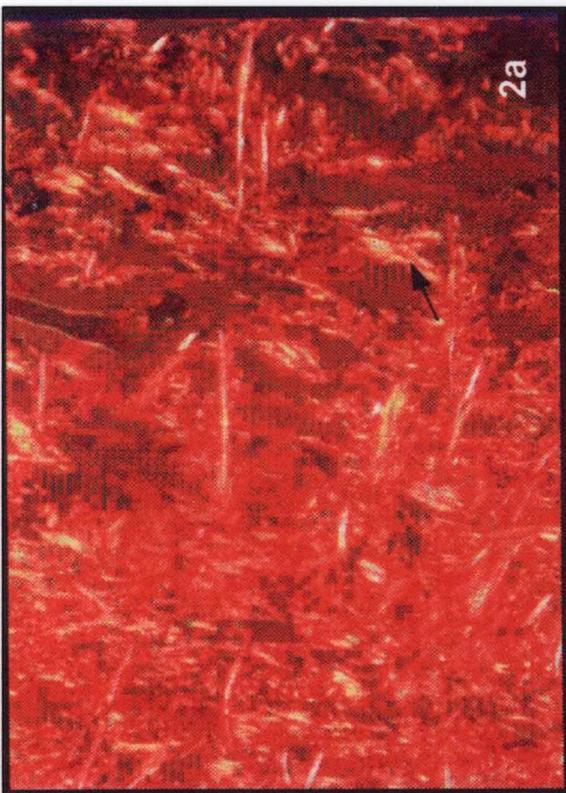
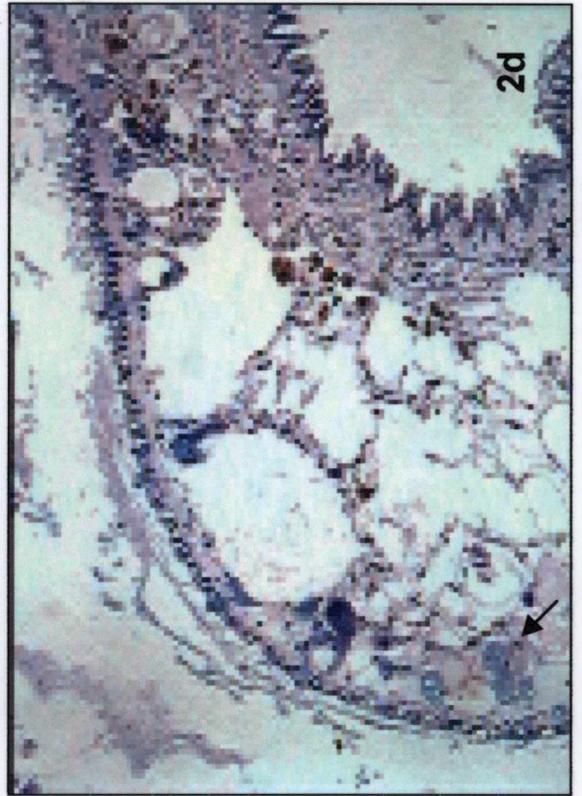
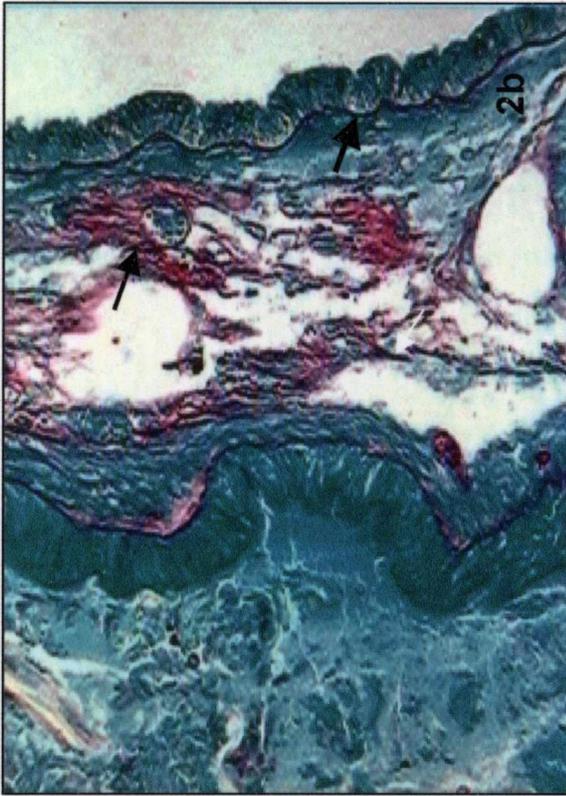
—▶ fibras tipo colágeno

—▶ membrana basal

2c Matriz normal dos túbulos renais de *B. glabrata* (FS/BA) aparecendo bem distinta a membrana basal. Microscopia óptica, sírius - vermelho. No espaço intersticial pode-se observar hemolinfa coagulada. Aumento 200 x.

2d Colar do manto onde podem ser observadas células ricas em mucopolissacarídeos (seta). Microscopia óptica, alcian-blue. Aumento 200 x

PRANCHA 2



6.3.3 PRANCHA 3

PRANCHA 3

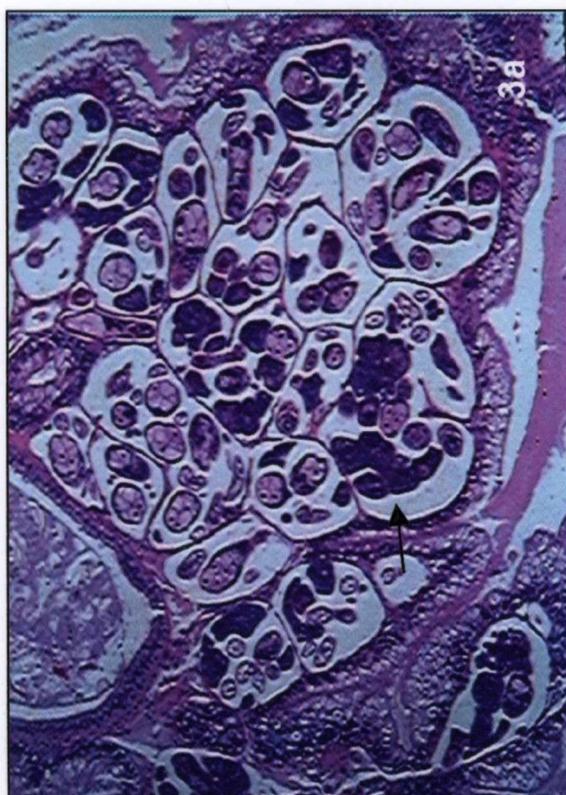
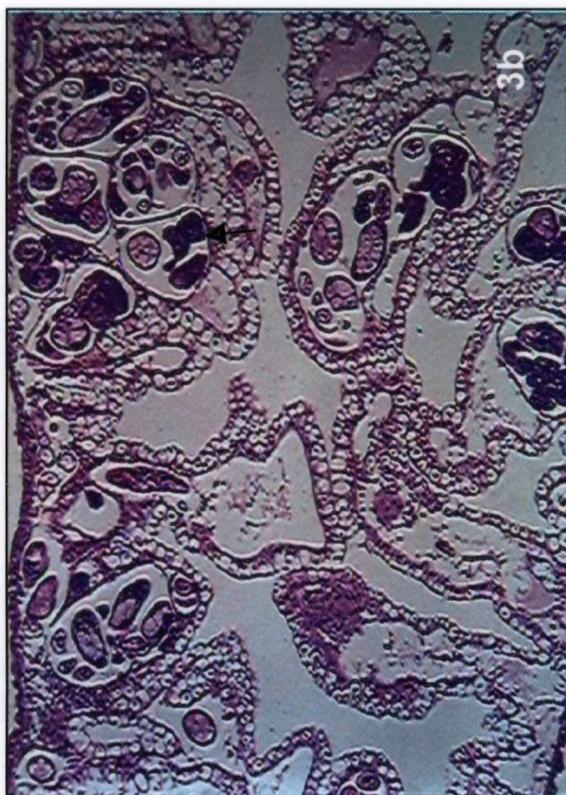
3a Proliferação parasitária intensa no interstício das glândulas digestivas de *B. glabrata* (FS/BA), onde não é observada a ocorrência de reações teciduais por parte do hospedeiro; que é francamente susceptível. Molusco sacrificado aos 71 dias pós-exposição. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 100 x.

→ esporocistos e cercárias

3b Proliferação de parasitas observada na região dos túbulos renais de um exemplar de *B. glabrata* (FS/BA). Ausência de reações teciduais por parte do hospedeiro. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Molusco sacrificado aos 71 dias pós - exposição. Aumento 100 x.

→ esporocistos e cercárias

PRANCHA 3



6.3.4 PRANCHA 4

PRANCHA 4

ASPECTOS EVOLUTIVOS DAS LESÕES ENCAPSULANTES EM DIFERENTES REGIÕES E TEMPOS DE INFECÇÃO.

4a Região do ovoteste de *B. glabrata* (FS/BA) parasitada pelo *S. mansoni* (FS/BA) apresentando a formação de lesões encapsulantes frouxas circundando esporocistos em desintegração. Molusco sacrificado aos 135 dias pós - exposição. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

→ camadas celulares concêntricas

4b Lesão encapsulante de aspecto fibroso formada por camadas celulares de citoplasma distendido. Observar a ocorrência de duas formas parasitárias no centro da reação. Região das glândulas digestivas de um molusco sacrificado aos 135 dias pós - exposição. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

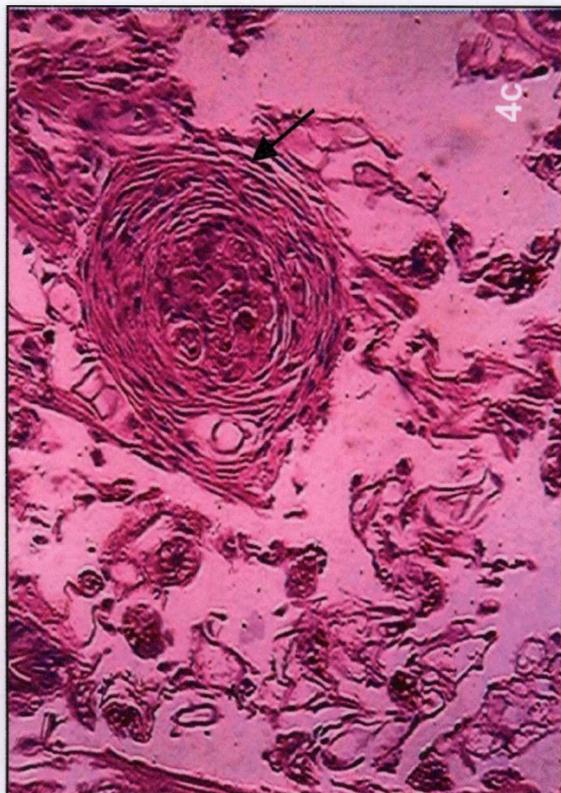
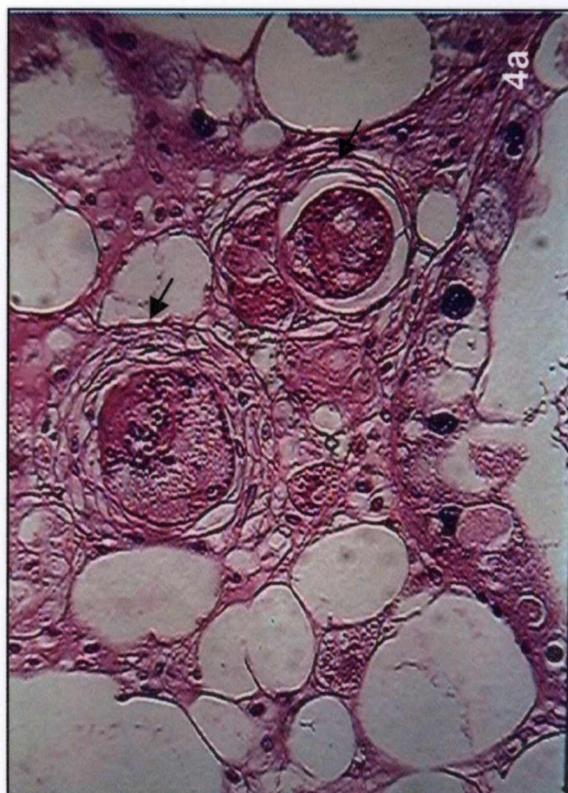
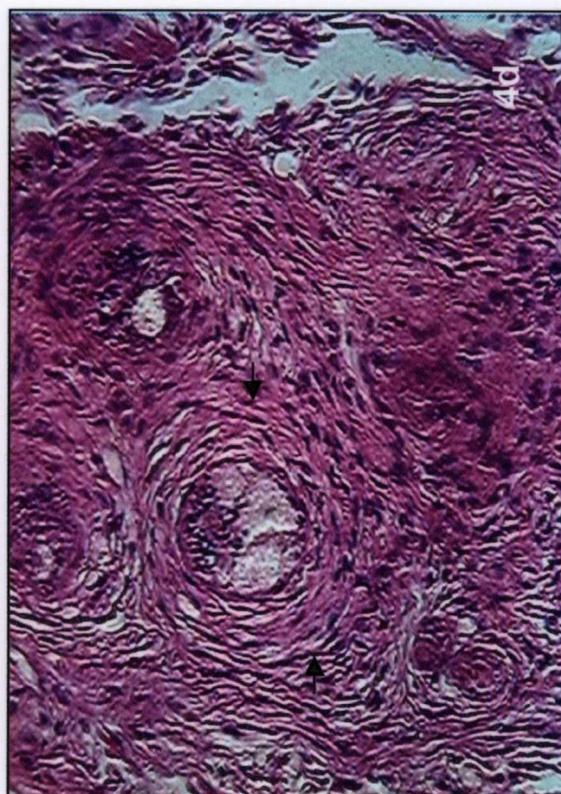
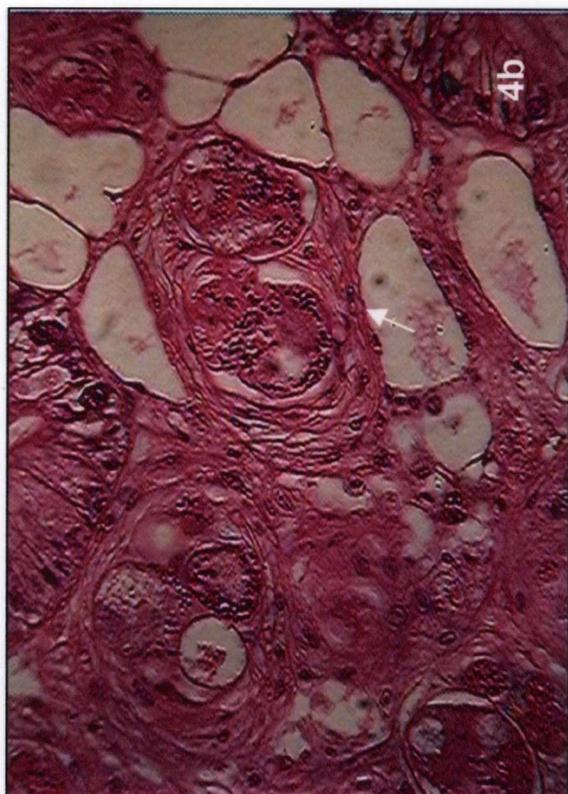
→ lesão encapsulante de aspecto fibroso

4c Lesão encapsulante isolada observada nas glândulas digestivas de *B. glabrata* (FS/BA) sacrificado aos 71 dias. Nas camadas celulares mais externas é nítido o "afinamento citoplasmático" (seta). Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

4d Lesões encapsulantes compactas constituídas por diversas camadas celulares, de aspecto morfológico homogêneo, observadas na glândula nidamental de *B. glabrata* (FS/BA) sacrificado aos 71 dias. No centro da reação podem ser vistos parasitas em degeneração. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

→ camadas celulares

PRANCHA 4

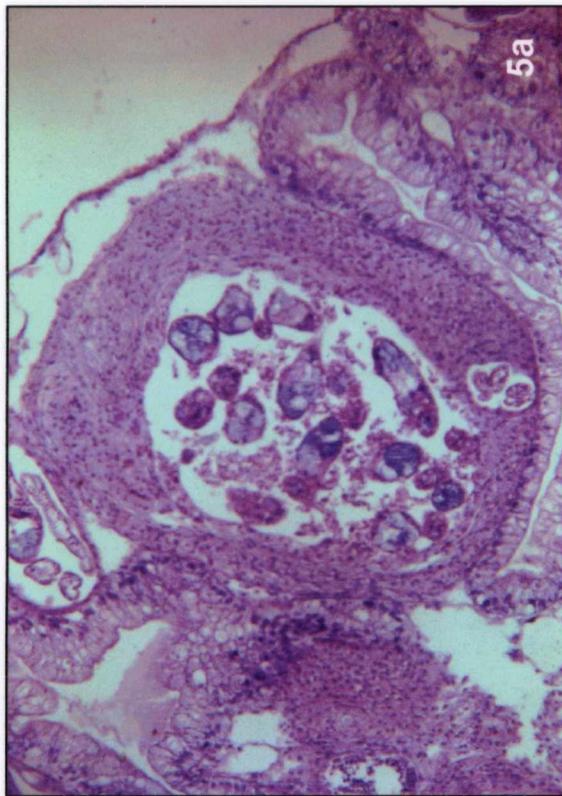


6.3.5 PRANCHA 5

PRANCHA 5

5a Formação infiltrativa espessa similar a uma estrutura encistante em torno de várias formas parasitárias do *S. mansoni* (FS/BA) em proliferação. Região das glândulas digestivas de *B. glabrata* (FS/BA) sacrificado aos 105 dias pós-exposição. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 200 x.

PRANCHA 5



6.3.6 PRANCHA 6

PRANCHA 6

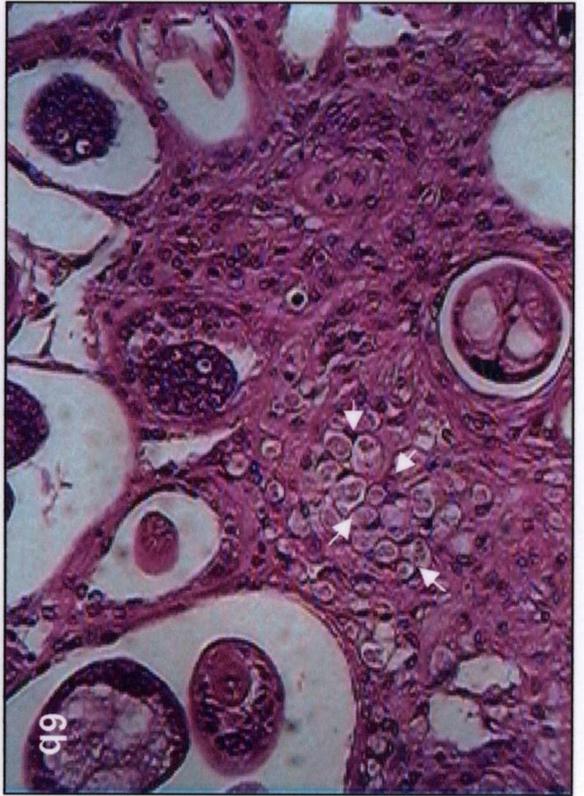
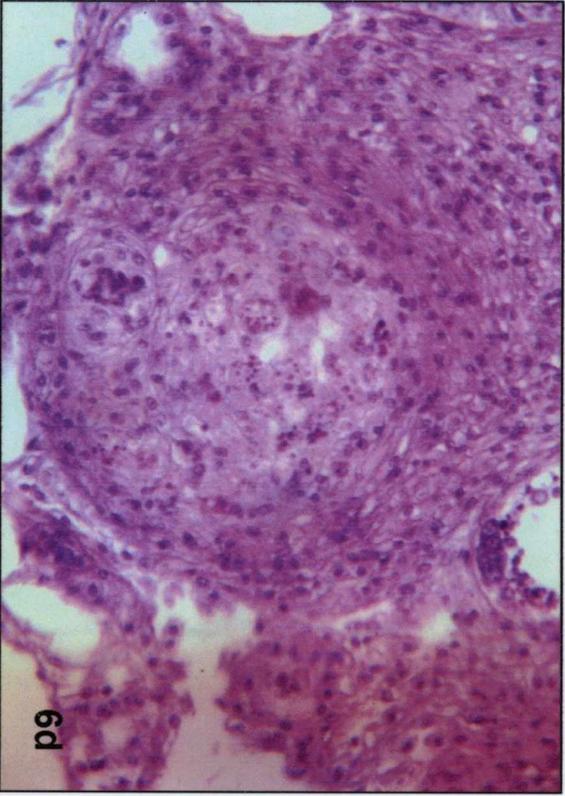
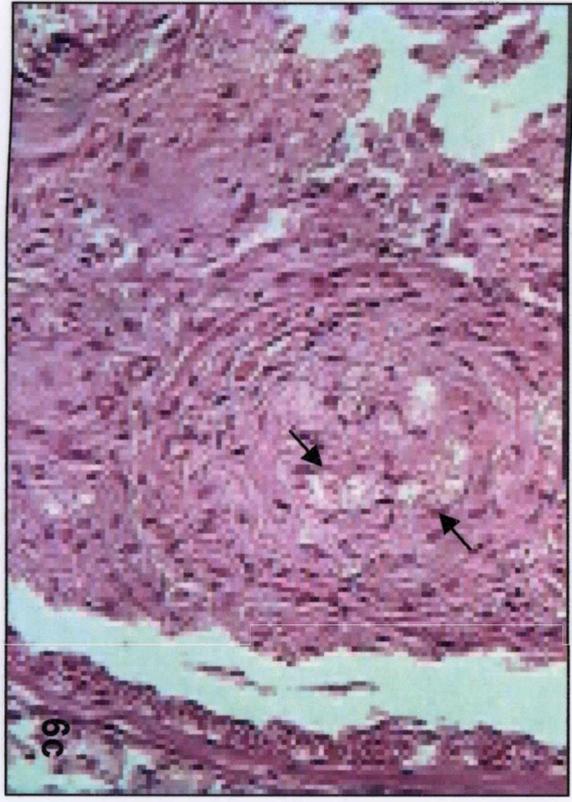
ASPECTOS ILUSTRATIVOS DE ALTERAÇÕES REGRESSIVAS DE ESTRUTURAS PARASITÁRIAS ISOLADAS.

6a Material grumoso em degeneração (= formas parasitárias) localizado no centro da reação infiltrativa (setas). Região ao redor do intestino de *B. glabrata* (BH/MG) sacrificado aos 58 dias pós-exposição. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

6b Infiltração hemocítica difusa nas glândulas digestivas de *B. glabrata* (FS/BA) sacrificado aos 105 dias pós-exposição. Material fagocitado eosinofílico é observado no centro da reação (setas). Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

6c Grumos arredondados e eosinofílicos em estágio mais avançado de degeneração (setas), podendo ser observados no interior dos hemócitos fagocíticos. A lesão tecidual formada é similar a um pequeno granuloma. Região ao redor do intestino de *B. glabrata* (BH/MG) sacrificado aos 58 dias pós-exposição. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

6d Ovoteste de *Biomphalaria glabrata* (BH/MG) exposto a 20 miracídios do *S. mansoni* (LE/BH) sem eliminar cercárias 90 dias pós-exposição. Observar a ocorrência de um granuloma na ausência de material parasitário em degeneração. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.



PRANCHA 6

6.3.7 Prancha 7

PRANCHA 7

ILUSTRAÇÃO DAS RELAÇÕES ENTRE FIBRAS DO TECIDO CONECTIVO E ESTRUTURAS REACIONAIS.

7a Discreta reação celular em torno de larvas do *S. mansoni* (FS/BA). A ocorrência de fibras coradas pelo sírius-vermelho é quase inexistente e observada como finos feixes isolados na periferia da reação (setas). Glândulas digestivas parasitadas em um molusco *B. glabrata* (FS/BA) sacrificado aos 135 dias pós - exposição. Microscopia óptica, sírius-vermelho. Aumento 400 x.

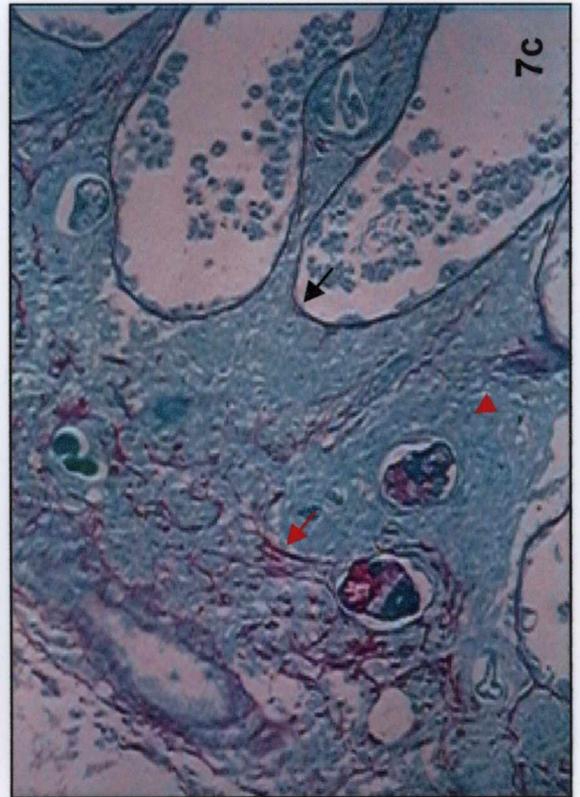
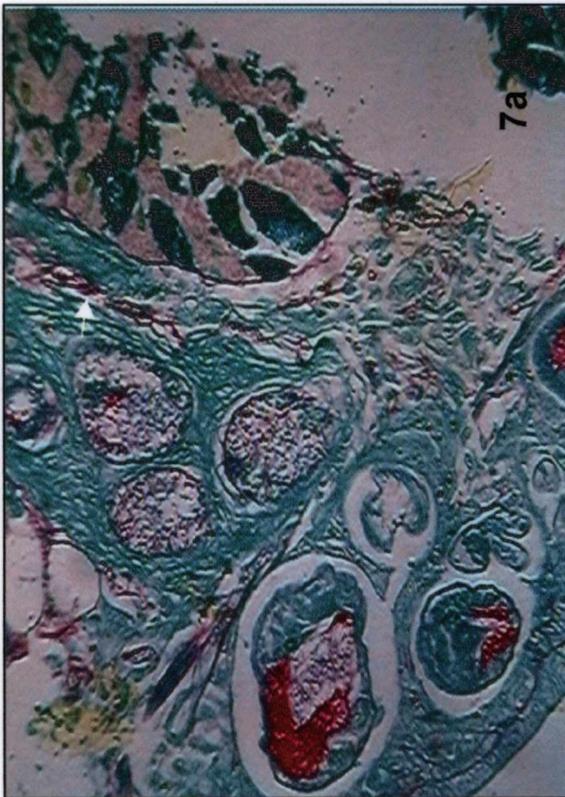
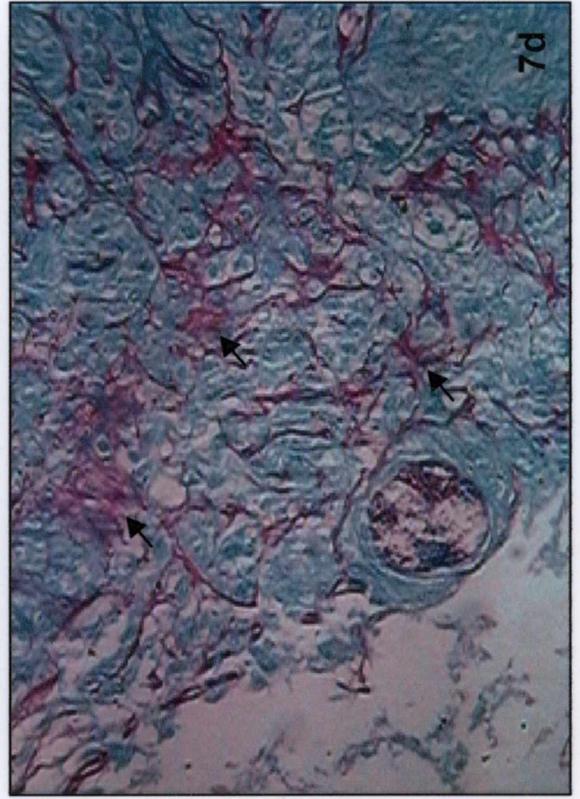
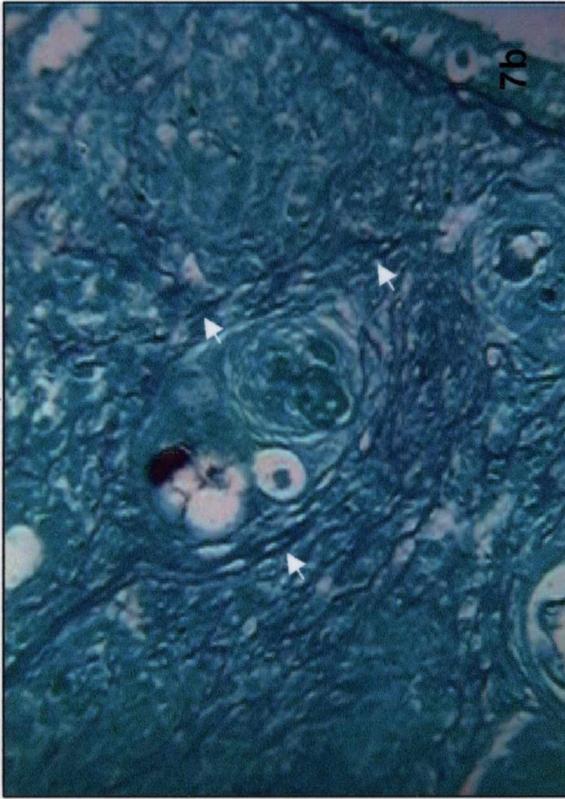
7b Fibras do tecido conectivo (setas) periféricas a uma reação hemocítica infiltrativa no ovoteste de um molusco *B. glabrata* (FS/BA) sacrificado aos 135 dias pós-exposição. Microscopia óptica, sírius-vermelho. Aumento 250 x.

7c Lesão encapsulante circundando parasita em degeneração. Na periferia da lesão são observadas fibras corando-se positivamente pelo sírius-vermelho. A coloração da membrana basal dos lóbulos do ovoteste também é evidente. Molusco sacrificado aos 105 dias pós - exposição. Microscopia óptica, sírius-vermelho. Aumento 200 x.

→ fibras coradas pelo sírius-vermelho → membrana basal
▶ lesão encapsulante

7d Maior detalhe da região periférica a lesão. Fibras coradas pelo sírius - vermelho (setas). Microscopia óptica, sírius-vermelho. Aumento 400 x.

PRANCHA 7



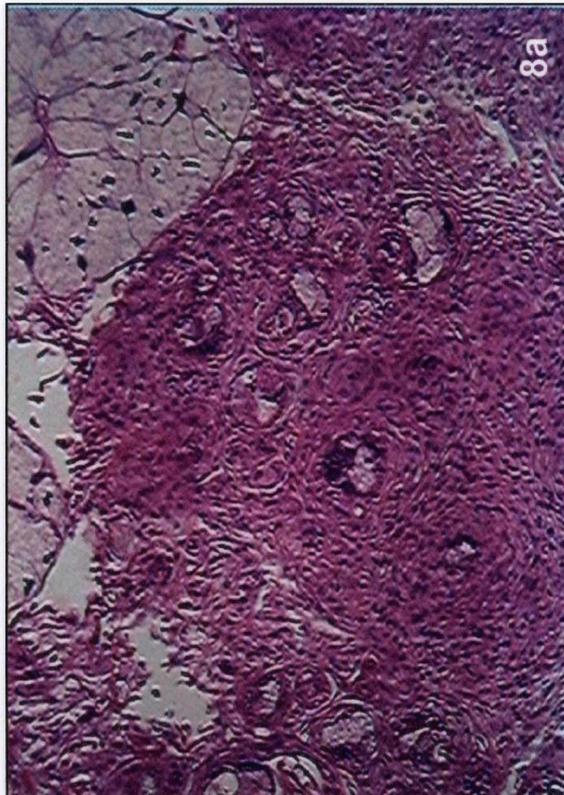
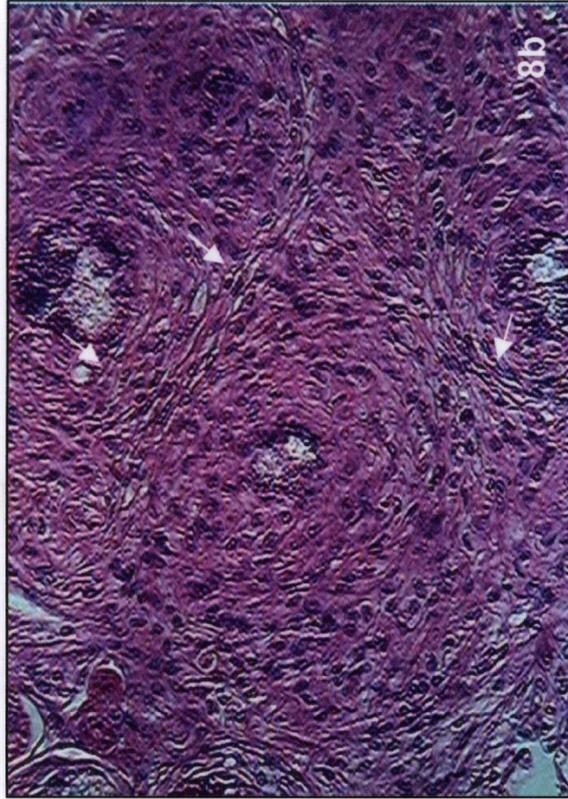
6.3.8 PRANCHA 8

PRANCHA 8

8a Glândula nidamental com proeminente infiltração hemocítica, no seio da qual são observadas células alongadas de aspecto morfológico homogêneo. Nos demais órgãos a proliferação parasitária ocorre na ausência de reação. Molusco *Biomphalaria glabrata* (FS/BA) sacrificado aos 71 pós-exposição. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 200 x.

8b Maior detalhe da figura anterior. As células alongadas estão comprimidas simulando fibras de disposição paralela (setas), sem reatividade para o sítius-vermelho ou orceína. Microscopia óptica, hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

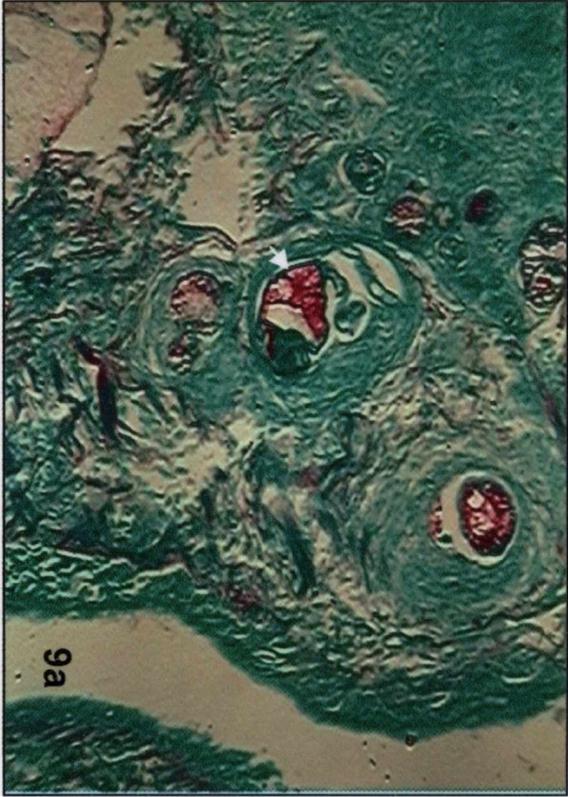
PRANCHA 8



6.3.9 PRANCHA 9

PRANCHA 9

9a Infiltração celular difusa (canto superior esquerdo) onde aparecem parasitas em degeneração. Em paralelo, são observadas duas lesões encapsulantes frouxas englobando cercárias com coloração inespecífica pelo sírius - vermelho (seta) na região da cabeça. A membrana basal do epitélio aparece novamente positiva para o sírius - vermelho. Molusco sacrificado aos 71 dias pós-exposição. Microscopia óptica, sírius - vermelho. Aumento 200 x.



FRANCHA 9

6.3.10 PRANCHA 10

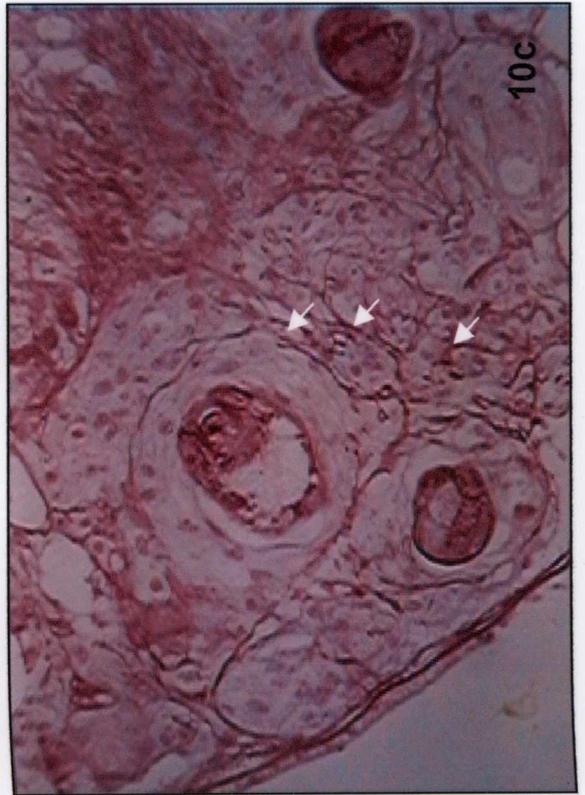
PRANCHA 10

10a Cercária observada próxima a região epitelial onde há a ocorrência de fibras orceína positivas na túnica externa (setas) das glândulas digestivas de *B. glabrata* (FS/BA) sacrificado aos 135 dias pós - exposição. Microscopia óptica, orceína. Aumento 200 x.

10b Reação infiltrativa difusa onde são observados vários parasitas. Não há marcação para fibras elásticas no seio desta reação. Alguns finos feixes isolados são observados na periferia (setas). Glândula nidamental de um exemplar sacrificado aos 135 dias pós-exposição. Microscopia óptica, orceína. Aumento 200 x.

10c Reação encapsulante nas glândulas digestivas onde é observada a ocorrência de fibras orceína-positivas na periferia, sem circunscrever totalmente a lesão (setas). Molusco sacrificado aos 135 dias pós-exposição. Microscopia óptica, orceína Aumento 400 x.

PRANCHA 10



6.3.11 PRANCHA 11

PRANCHA 11

11a Amostra de hemolinfa fresca (10 μ l) de um exemplar de *B. glabrata* (FS/BA) normal onde são observadas células de núcleo arredondado e citoplasma distendido (“hemócitos fagocíticos”), com prolongamentos. Também são observadas células redondas que não apresentam projeções citoplasmáticas (“hialinócitos”). Microscopia óptica, Giemsa. Aumento 400 x.

→ hemócitos fagocíticos ⇨ hialinócitos

PRANCHA 11



6.3.12 Prancha 12

PRANCHA 12

12a Hemócito tecidual mostrando um núcleo grande, excêntrico, rico em grumos de cromatina fortemente condensada (heterocromatina). Na região perinuclear aparecem alguns corpos eletrodensos (lisossomos primários) e dois fagolisossomos: no primeiro são observadas laminações concêntricas em torno do vacúolo (figura de mielina) e o segundo é representado por um vacúolo onde aparece um lisossomo primário fazendo aderência e ligeira protusão para o interior onde se notam restos de membranas (vacúolo fagocítico). Microscopia eletrônica, aumento 12.000 x.

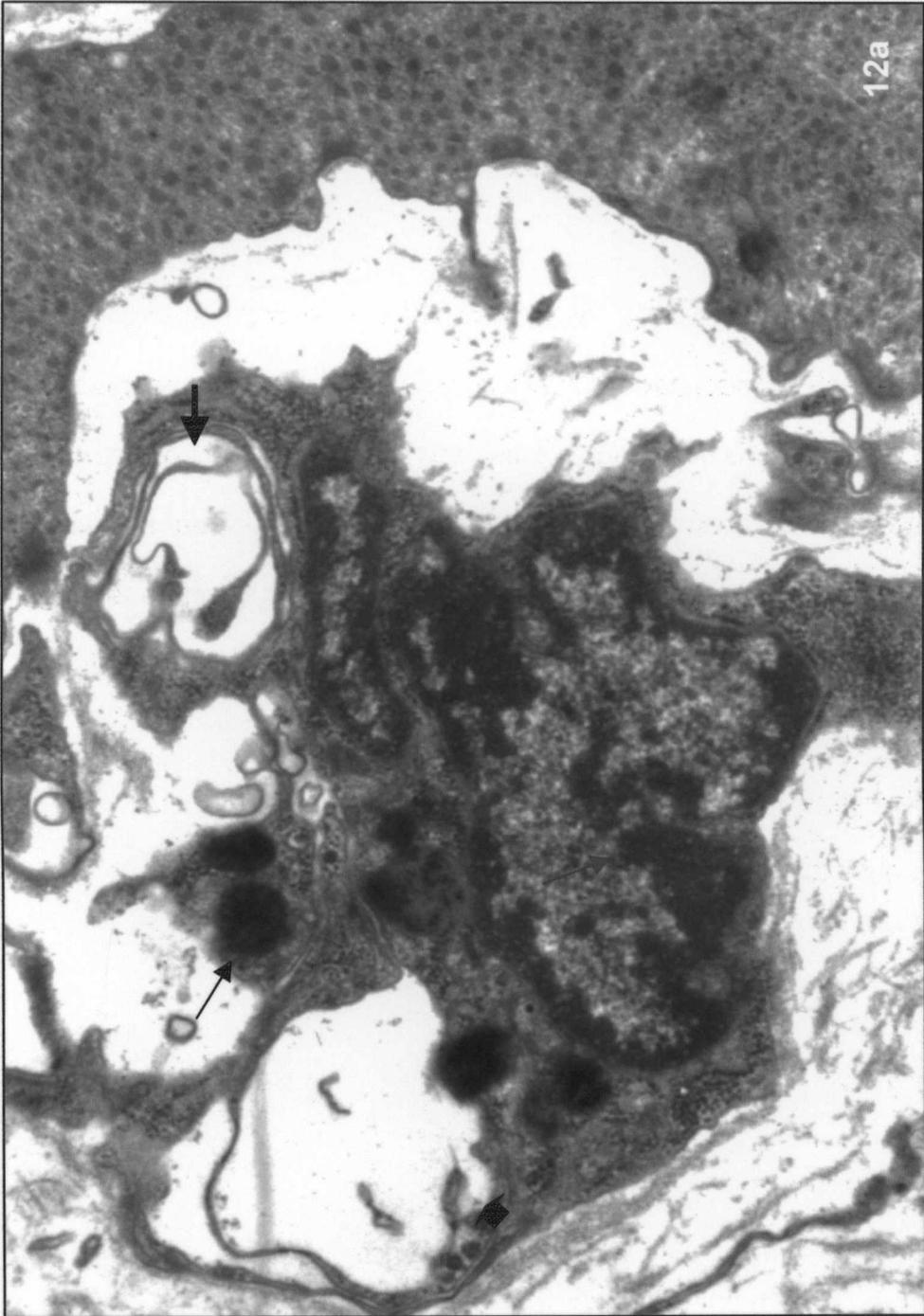
→ heterocromatina

→ lisossomos primários

→ figura de mielina

▣ vacúolo fagocítico

PRANCHA 12



**6.3.13 Prancha 13
(figura 13 a)**

PRANCHA 13

13a Célula no canto inferior esquerdo com núcleo excêntrico e numerosos corpúsculos eletrodensos (lisossomos primários). Célula no canto direito com citoplasma bastante distendido onde são vistas algumas mitocôndrias de cristas escassas e vários grânulos de glicogênio. Nesta célula, o núcleo apresenta um nucléolo proeminente. Microscopia eletrônica, aumento 3.000 x.

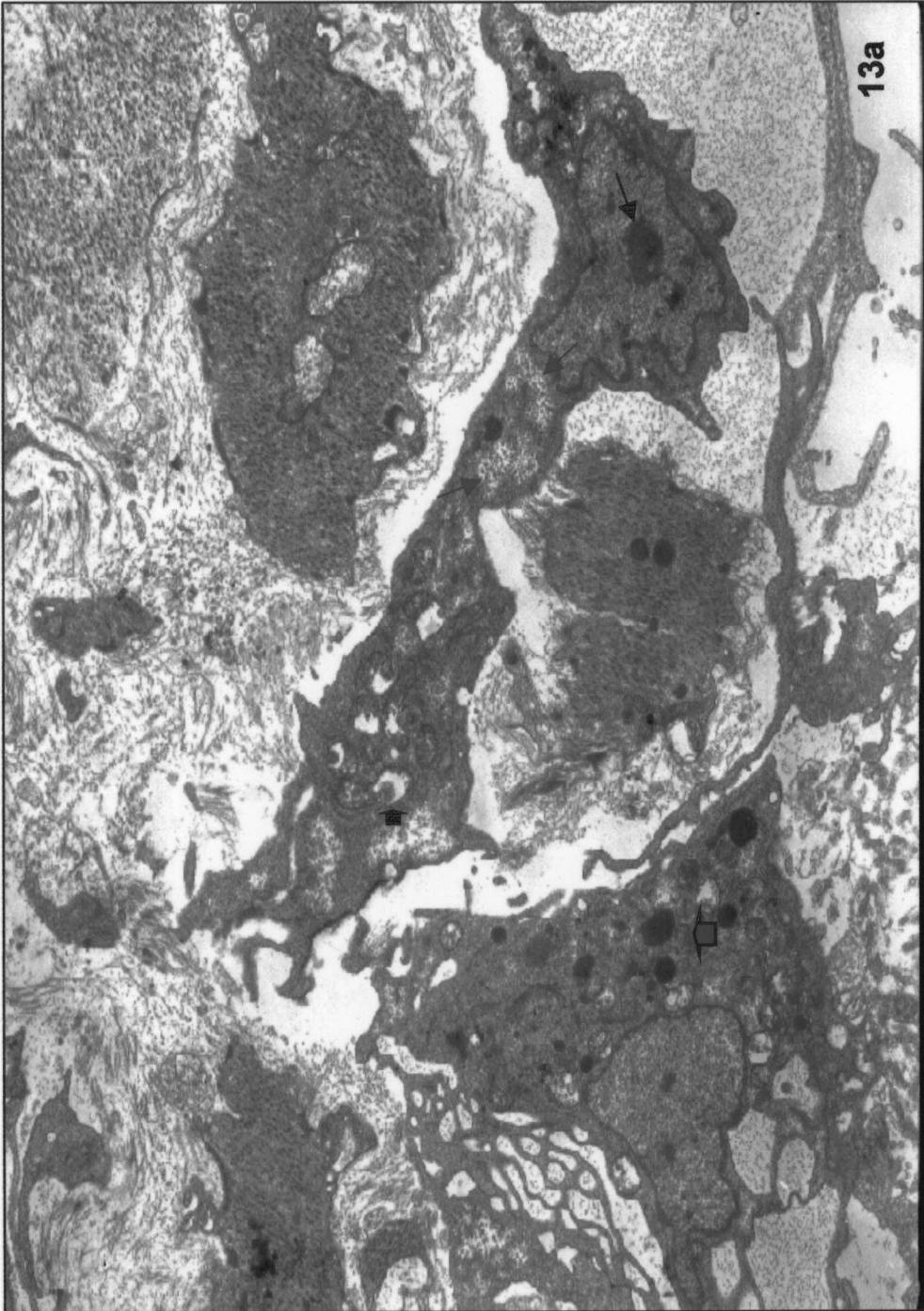
■ lisossomas primários

■ mitocôndrias

→ grânulos de glicogênio

→ nucléolo

PRANCHA 13



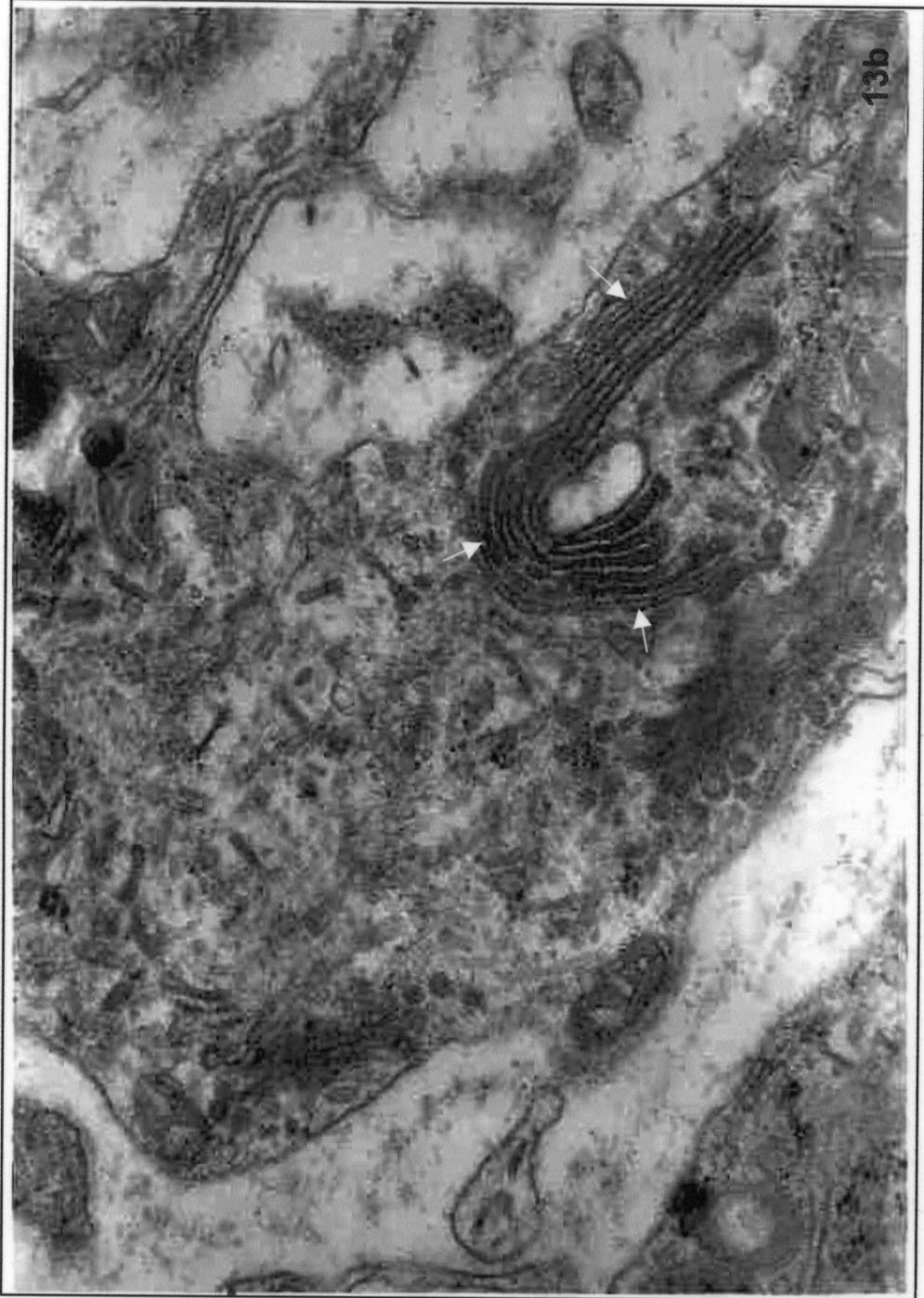
6.3.14 PRANCHA 13

(FIGURA 13b)

PRANCHA 13

13b Detalhe do complexo de Golgi (setas). Organela bem desenvolvida nos hemócitos teciduais visto que esta estrutura é responsável pela formação dos lisossomos. Microscopia eletrônica, aumento 30.000 x.

PRANCHA 13



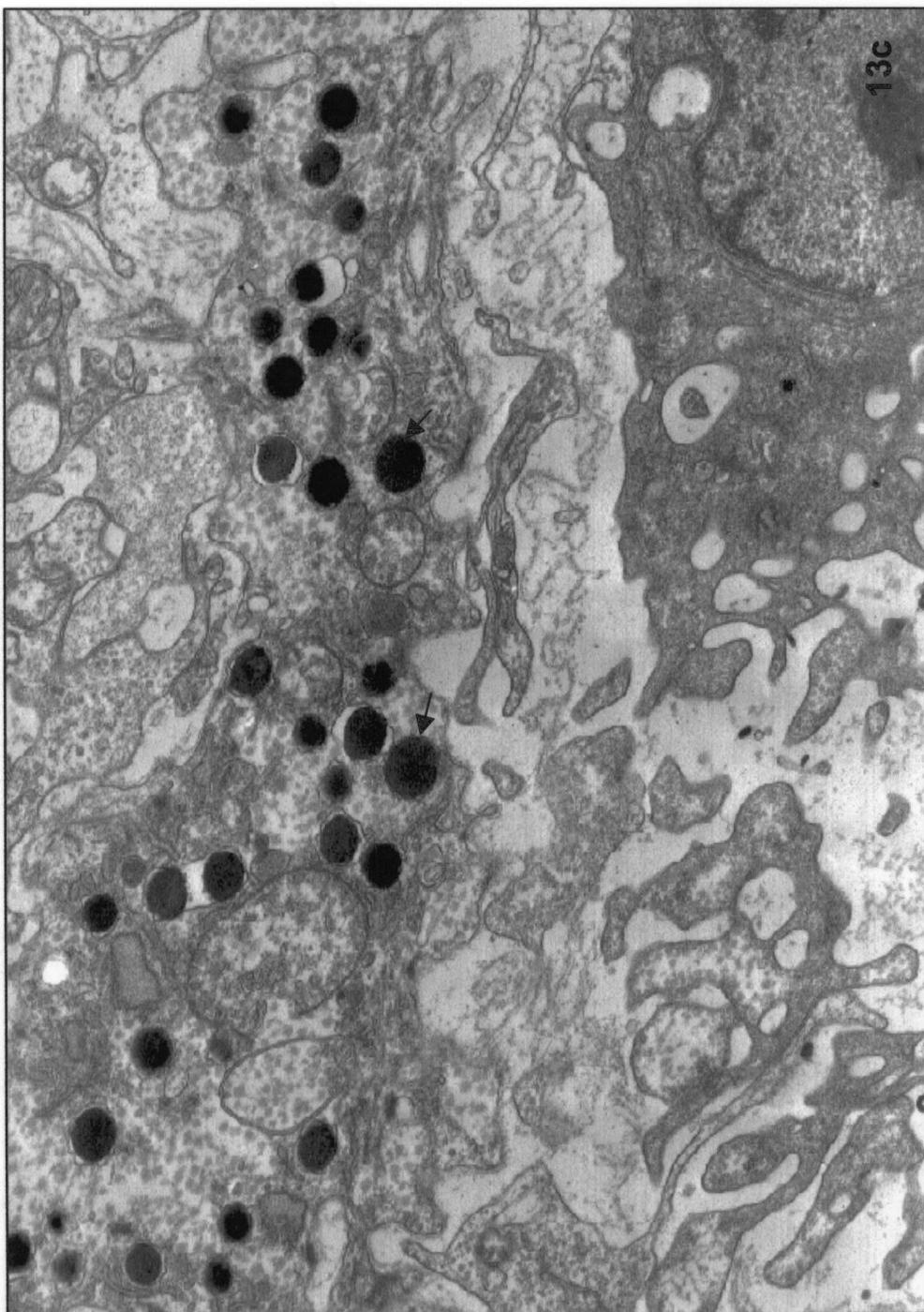
6.3.15 PRANCHA 13

(FIGURA 13c)

PRANCHA 13

13c Detalhe dos numerosos corpúsculos eletrodensos (lisossomos primários – setas) presentes no citoplasma dos hemócitos teciduais. Microscopia eletrônica, aumento 7.000 x.

PRANCHA 13



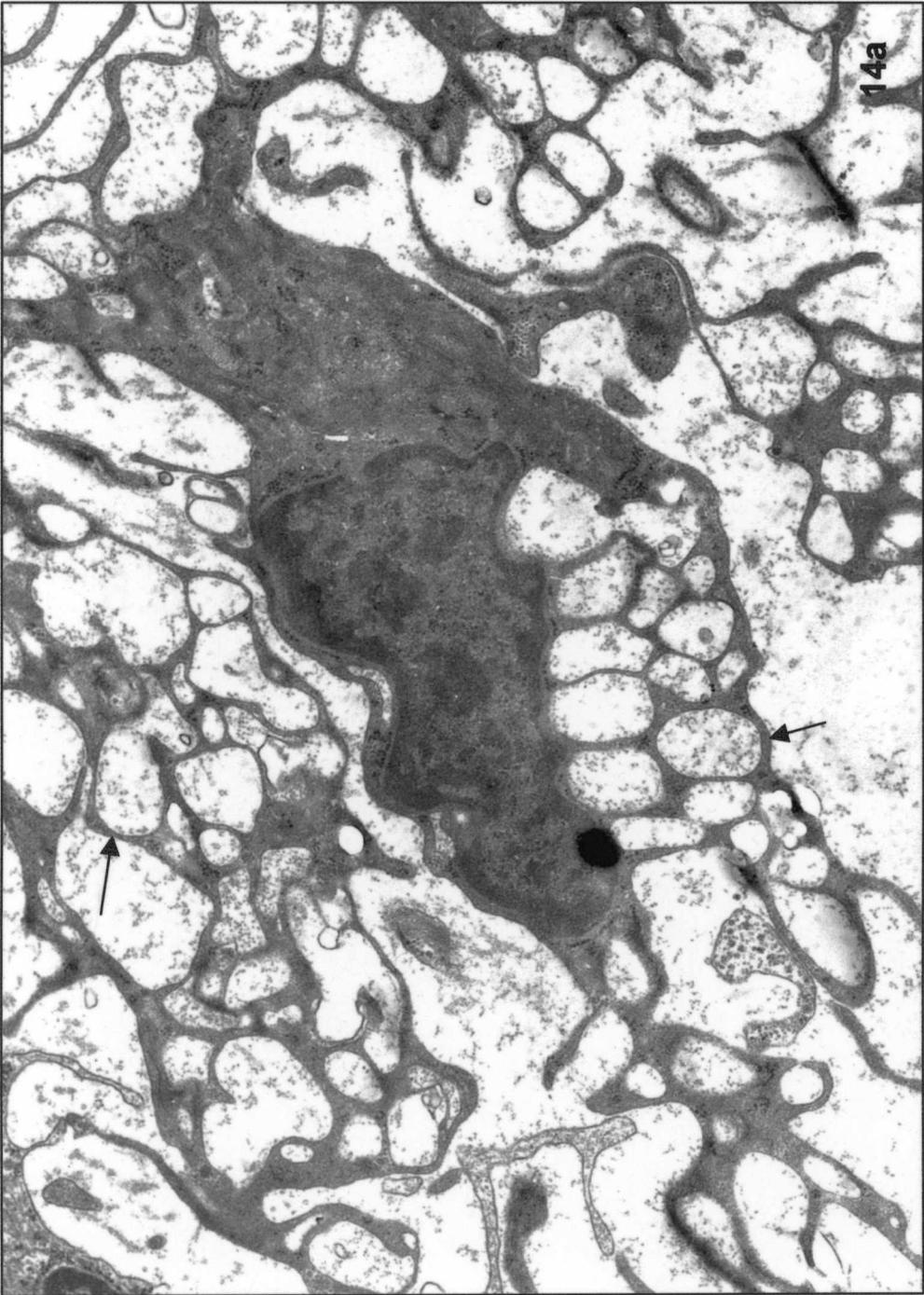
6.3.16 PRANCHA 14

(FIGURA 14a)

PRANCHA 14

14a Aspecto geral de um hemócito tecidual mostrando os numerosos prolongamentos citoplasmáticos (filopódios) longos e finos que formam um emaranhado no interstício do qual aparece um estroma abundante e amorfo (setas). Microscopia eletrônica, aumento 3.000 x.

PRANCHA 14



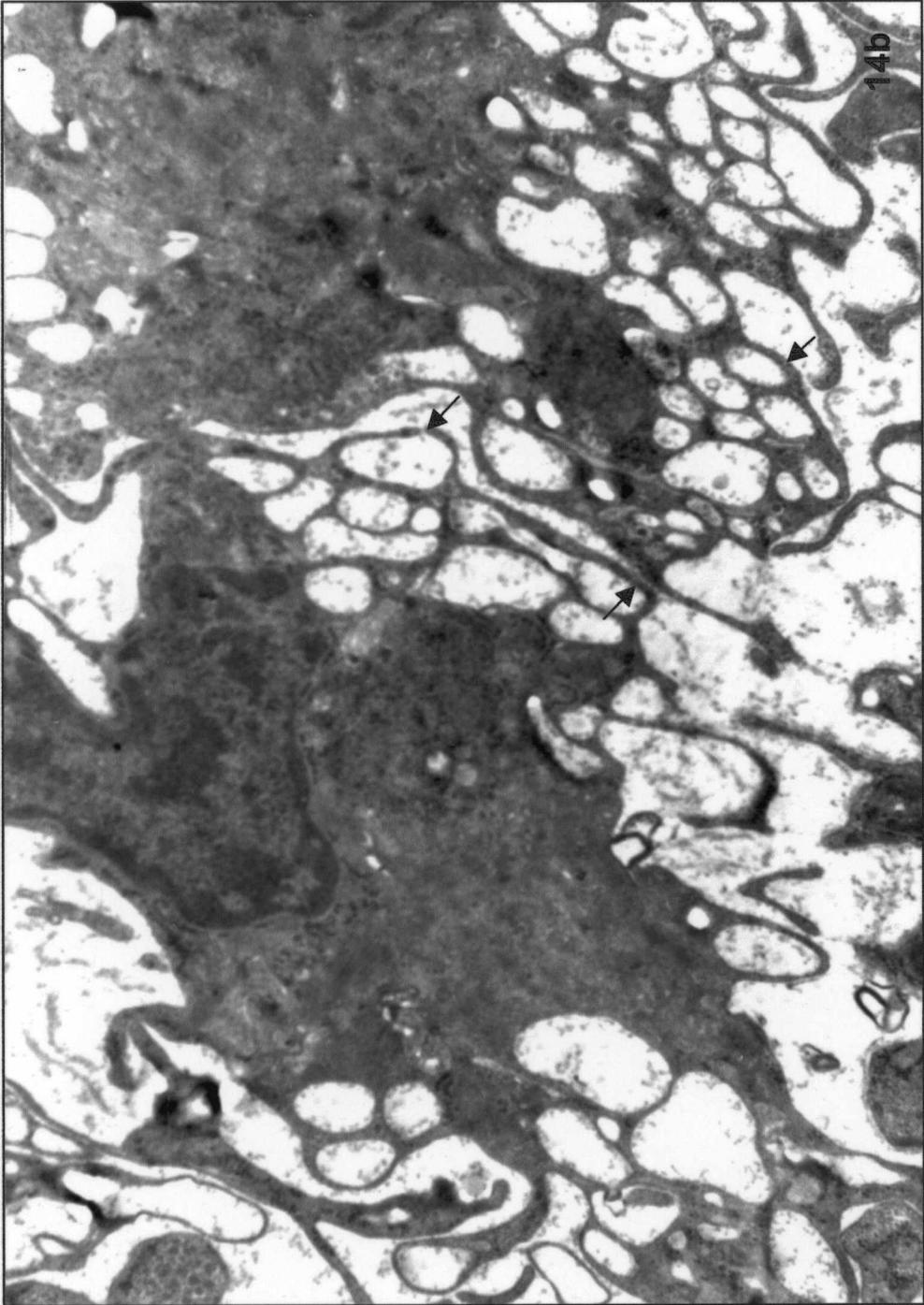
6.3.17 PRANCHA 14

(FIGURA 14b)

PRANCHA 14

14b Hemócitos teciduais formando uma rede intercomunicante nas malhas da qual aparece novamente um estroma fibrilar escasso (setas). Não há formação de sincícios celulares. Microscopia eletrônica, aumento 7.000 x.

PRANCHA 14



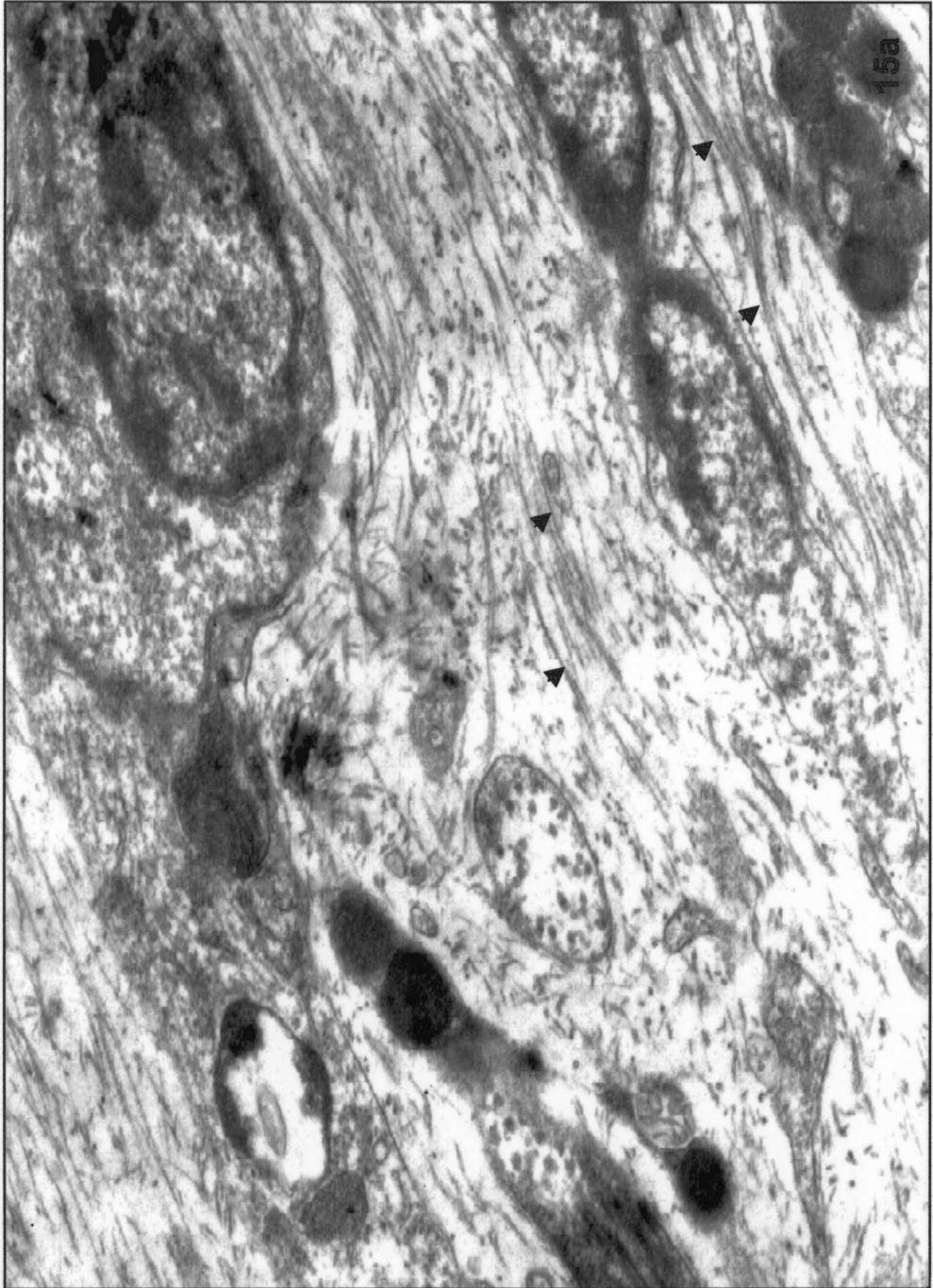
6.3.18 PRANCHA 15

(FIGURA 15a)

PRANCHA 15

15a Microfibrilas dispersas no estroma (setas). Microscopia eletrônica, aumento 3.000 x.

PRANCHA 15



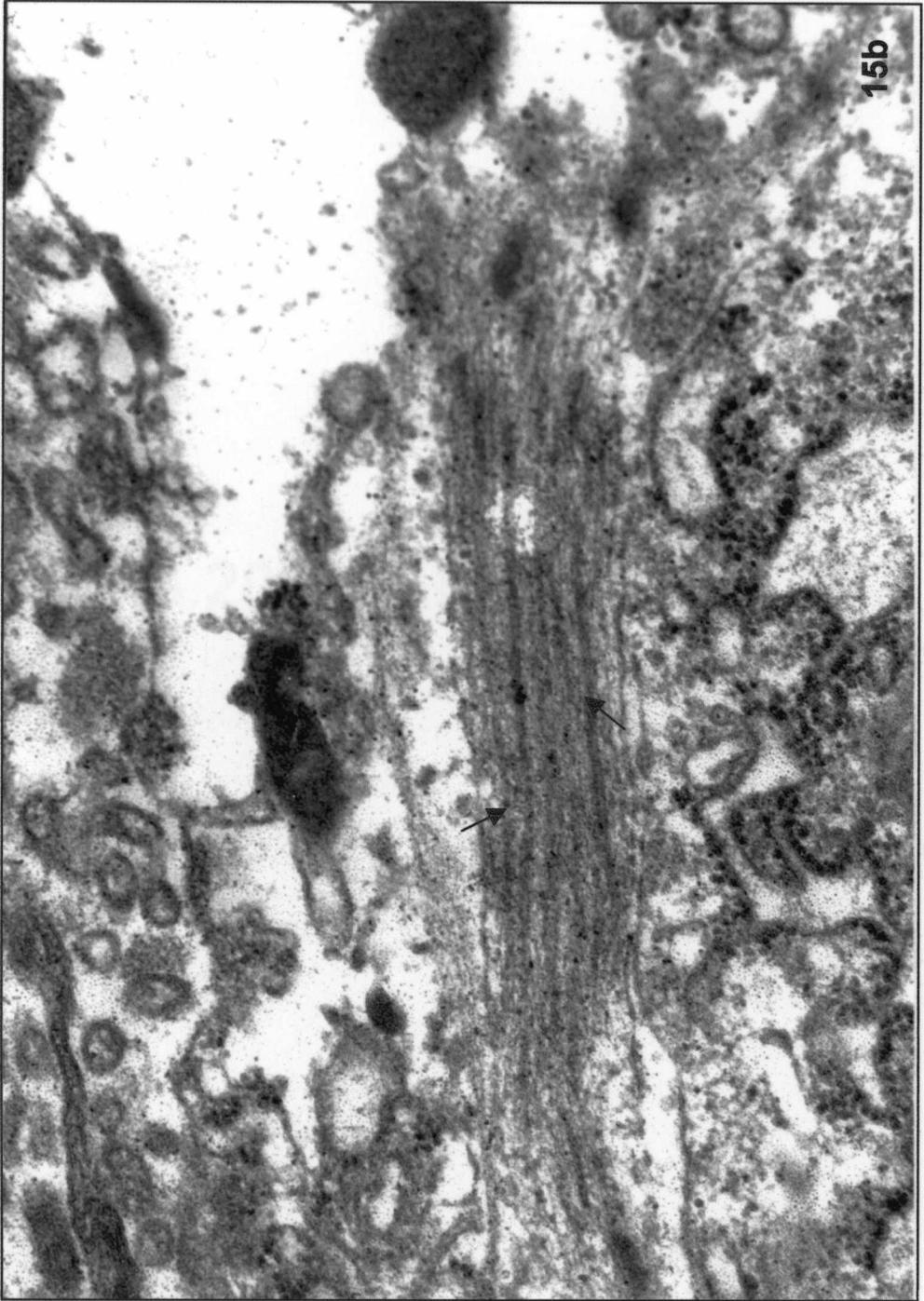
6.3.19 PRANCHA 15

(FIGURA 15b)

PRANCHA 15

15b Diferenciação de fibrilas na matriz extracelular, com pequenos grumos claros e escuros, sugerindo a presença de periodicidade (setas). Microscopia eletrônica, aumento 12.000 x.

PRANCHA 15



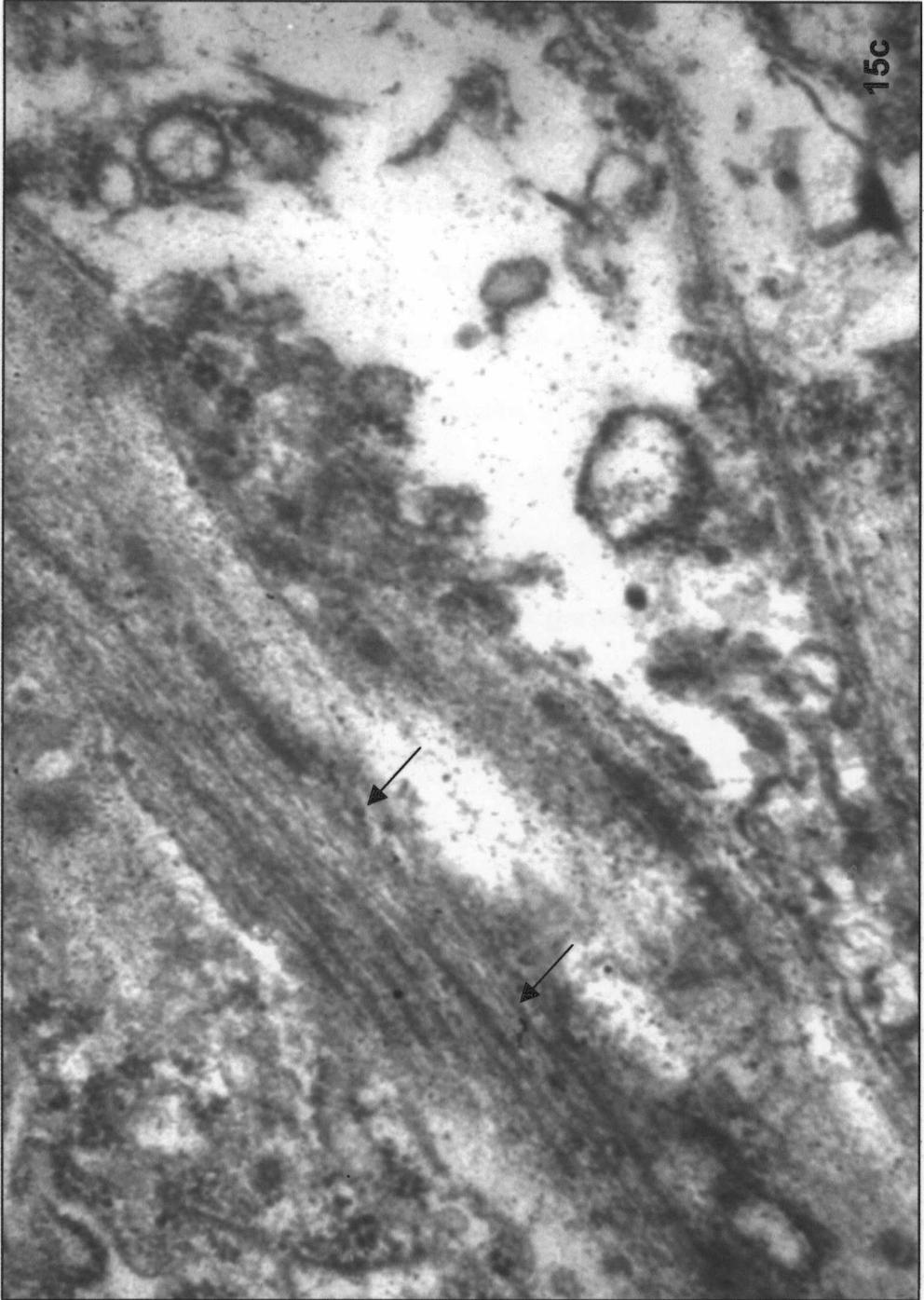
6.3.20 PRANCHA 15

(FIGURA 15c)

PRANCHA 15

15c Maior detalhe das fibrilas na matriz extracelular. Os grumos de densidade variável estão mais nítidos (setas). Similaridade com as fibrilas colágenas dos vertebrados. Microscopia eletrônica, aumento 20.000 x.

PRANCHA 15



7 DISCUSSÃO

Inicialmente nosso estudo teve como objetivo verificar a participação da matriz extracelular nas reações de defesa que os moluscos *B. glabrata*, com diferentes graus de resistência, exibem contra as formas evolutivas do *S. mansoni*. Através da análise de secções histológicas, de observações ao microscópio eletrônico e da dosagem bioquímica de hidroxiprolina, o que chamou mais a atenção foi a quase ausência de componentes da matriz associados às lesões, fossem elas difusas ou localizadas (complexos encapsulantes). Deste modo, não podendo ser considerada como uma participação significativa. Este aspecto constitui um nítido contraste com o que habitualmente acontece com as reações inflamatórias crônicas em animais situados em pontos mais elevados da escala zoológica. Nos vertebrados esquistosomóticos, por exemplo, os ovos maduros alojados nos tecidos provocam o aparecimento de um granuloma periovular que geralmente é acompanhado pela proliferação do tecido conjuntivo onde há síntese, deposição e posterior degradação de colágeno. Como já suspeitado há muito tempo, as reações de defesa observadas em *B. glabrata* contra o *S. mansoni* são, de fato, bem primitivas, ficando exclusivamente às custas das células tipo macrofágico (=hemócitos fagocíticos). Todavia, muitos achados morfológicos simulavam uma participação mais saliente da matriz extracelular, tendo sido mesmo considerados como “fibrosantes” ou “cicatrizes” certas lesões que ocorrem em animais resistentes (GODOY ET AL., 1997). Na realidade, foram estas observações que estimularam a realização do presente estudo.

O caramujo tem uma matriz extracelular rica em material amorfo (proteoglicanos), mas também contém uma variável quantidade de fibras, tanto com

características de fibras colágenas, corando-se pelo sírius-vermelho e exibindo birrefringência quando examinadas sob a luz polarizada do microscópio, como fibras de tipo elástico, orceína-positivas (LEMONS, 1999). Em algumas lesões encapsulantes, por vezes, apareciam fibras coradas pelo sírius-vermelho ou pela orceína, concentricamente dispostas na periferia. Todavia, a ocorrência dessas fibras poderia ser explicada por sua pré-existência como constituinte básico do tecido desses moluscos que, uma vez parasitados, apresentam reações teciduais de crescimento expansivo comprimindo e comprometendo a organização e o arranjo de tais elementos. Estas fibras nunca chegavam a formar um anel completo e, no mais das vezes, se limitavam a passar tangencialmente na periferia de uma ou mais lesões encapsulantes ou entre os hemócitos de uma infiltração difusa. Como já observado por vários autores (HARRIS, 1975; LIE ET AL., 1975, 1980) a ilusão criada na microscopia óptica da existência de fibrilas concêntricas separadas por núcleos alongados nas lesões encapsulantes é, na realidade, criada pelos filopódios dos hemócitos, que se distendem e se tocam, formando uma verdadeira rede de prolongamentos citoplasmáticos que circundam as estruturas parasitárias em desintegração.

Assim sendo, o estudo da matriz extracelular demonstrou que o aparecimento de reações infiltrativas difusas, complexos encapsulantes e granulomas em caramujos FS (subgrupos II e IV) não está associado à síntese e deposição de colágeno. A dosagem bioquímica de hidroxiprolina, aminoácido marcador desta proteína, não demonstrou elevação significativa na taxa desse elemento nos animais infectados, quando comparados aos controles normais. Enquanto que, os fragmentos de fígado de camundongos esquistossomóticos, com o mesmo peso de

um caramujo, apresentaram um aumento no teor deste aminoácido, quando comparados com fragmentos tomados de fígados normais de camundongos. Todavia, ainda restaria a possibilidade de tal quantidade de colágeno ser tão pequena nas lesões dos caramujos, que estaria abaixo do limiar de detecção da técnica.

PAN (1958) descreve a existência de fibroblastos no tecido conjuntivo de *B. glabrata* normais. Este mesmo autor cita a possibilidade desta célula poder se transformar em uma variedade de outros tipos celulares; inclusive nos “amebócitos” (=hemócitos fagocíticos) que participariam ativamente dos mecanismos de defesa e estariam envolvidos na reparação das lesões teciduais. Nos vertebrados, a ativação dos macrófagos permite que uma série de fatores, estimuladores da proliferação fibroblástica e produção de colágeno, sejam secretados. Parece, então, que em condições patológicas (infecção pelo *S. mansoni*), estas células descritas por PAN não são estimuladas a sintetizar tal proteína. É possível, ainda, que nestes moluscos as fibras tipo colágeno, produzidas em condições normais, não sejam similares aos colágenos tipo III e I, característicos da lesão fibrosante observada no fígado dos vertebrados esquistossomóticos. Entretanto, se tais fibras não são constituídas de verdadeiros colágenos do ponto de vista bioquímico e evolutivo, estão muito próximas disto. Estes resultados estão de acordo com os achados de HARRIS (1975) e LIE ET AL. (1975; 1980) que verificaram a formação das cápsulas hemocitárias na ausência de fibras extracelulares. Nestes animais, estas reações são tipicamente celulares não havendo participação dos componentes matriciais.

Nossas observações ultraestruturais, realizadas nos tecidos das glândulas

digestivas e ovoteste, e aquelas feitas por LIE ET AL. (1980) revelaram apenas a presença de células com características similares aos macrófagos ativados (ricas em pseudópodos, vacúolos fagocíticos e numerosas organelas lisossômicas); indicando que este tipo celular predomina nos tecidos patológicos destes animais. BAYNE ET AL. (1980), demonstraram que o fenômeno do encapsulamento de partículas pelo hemócito é acompanhado por fagocitose. Estas células, do mesmo modo que os macrófagos dos vertebrados, seriam capazes de gerar radicais livres citotóxicos como o superóxido e o peróxido de oxigênio (ADEMA ET AL, 1991), mas o mecanismo preciso ainda é desconhecido. BEZERRA ET AL. (1997), demonstraram que cerca de 80% dos hemócitos, tanto de *B. glabrata* quanto de *B. tenagophila* (Orbigny, 1835), têm capacidade de incorporar partículas de vermelho neutro, de maneira semelhante aos macrófagos, sendo esta população denominada de granulócitos. SOUZA (1999), demonstrou que a inoculação de sílica em *B. tenagophila* da linhagem Taim elimina parcialmente a população de granulócitos da hemolinfa, mas não altera a atividade fagocítica dessas células e não altera a resistência destes caramujos à infecção por *S. mansoni*. Em mamíferos, o tratamento com sílica também produz a destruição de macrófagos. Nas preparações obtidas para o presente estudo, ficou bem evidenciado de que o “cerco” das estruturas parasitárias pelos hemócitos coincidia com a presença, cada vez mais nítida, dos sinais de degradação extracelular dos parasitos (aumento da eosinofilia, condensação nuclear, fragmentação citoplasmática e nuclear, etc). Estudos posteriores poderão demonstrar toda a gama de produtos “citóxicos”, secretados pelos hemócitos. Ao lado deste ataque aos parasitos situados no meio extracelular, estruturas parasitárias menores (possivelmente esporocistos) foram encontradas isoladas no interior do citoplasma dos hemócitos. Estas estruturas foram vistas ao

microscópio eletrônico como esferas ou discos amorfos, delimitadas por membranas, no interior do citoplasma de hemócitos, ao lado de lisossomos ou no interior de fagossomos. Estes achados comprovam a atividade fagocítica dos hemócitos confirmando sua semelhança morfológica e principalmente funcional com os macrófagos de mamíferos.

Células que apresentavam características ultraestruturais de hialinócitos, como descritas por HARRIS (1975) e SMINIA & BARENSEN (1980) não foram detectadas à nível tecidual, mas na coleta de hemolinfa periférica foi possível a identificação de um pequeno número de células esféricas, com núcleo grande e citoplasma hialino escasso. Segundo RATCLIFFE ET AL. (1985), estas células são menores que as células de citoplasma expandido e lembrariam morfológicamente as células da linhagem linfóide dos vertebrados sendo também capazes de gerar linfocinas que atuariam como mediadores celulares na resposta imune destes animais. Segundo KLEIN (1989), os invertebrados não apresentam as várias linhagens linfocitárias, não reconhecendo diferentes determinantes antigênicos. E, como consequência, uma apropriada seleção clonal de linhagens não ocorre após a apresentação de “partículas estranhas”. Como não foram realizados estudos ultraestruturais, histoquímicos e imunocitoquímicos destas amostras da hemolinfa fresca, existe a possibilidade da identificação de células monocíticas como linfócitos. MOORE & LOWE (1977) descreveram a presença de linfócitos pequenos na hemolinfa circulante e no tecido conectivo do bivalvo *Mytilus edulis* (Linné, 1758) Estes autores sugeriram que os linfócitos e os macrófagos aparentemente representavam uma única série de maturação. Admitiram que os linfócitos observados são análogos aos hialinócitos descritos por FOLEY & CHENG (1972, 1974) em *C. virginica* e *M. mercenaria*. Segundo

BARRACO (1993), seu aspecto “hialinocítico” é típico de uma célula com um número considerável de ribossomas livres, aparelho de Golgi rudimentar e retículo endoplasmático granular pouco desenvolvido. Contudo, a autora assume que somente observações morfológicas não podem determinar se os hialinócitos e os granulócitos representam estágios diferenciados de um mesmo tipo de hemócito ou aparecem como populações celulares distintas com diferentes origens e funções. MATRICON-GONDRAN & LETOCART (1999) citam que este tipo celular em *B. glabrata* não oferece um bom critério para reconhecimento, como por exemplo a presença de grânulos secretórios específicos como aqueles observados em outros invertebrados incluindo os bivalvos ou grânulos peroxidoreativos presentes nos hemócitos de *L. stagnalis* (SMINIA ET AL, 1982; ADEMA ET AL., 1992) ou *Lymnaea truncatolata* (Muller, 1774) (MONTEIL & MATRICON-GONDRAN, 1993). MATRICON-GONDRAN (1990) já havia relatado que observações feitas em diferentes locais do mesmo caramujo podem revelar tipos distintos de hemócitos. Vários autores têm reconhecido a existência de subpopulações hemocíticas, dependendo da idade (DIKKEBOOM ET AL., 1984), do conteúdo enzimático (GRANATH & YOSHINO, 1983) ou de moléculas de superfície (YOSHINO & GRANATH, 1985), mas há poucos dados sobre suas características citológicas e enzimáticas. Embora seja bem evidente que a hemolinfa apresenta, pelo menos, dois tipos distintos de células. Entretanto, nas reações celulares contra o *S. mansoni*, somente um único tipo celular aparece: os hemócitos fagocíticos. As alterações morfológicas observadas em tais células podem facilmente ser interpretadas como estágios funcionais diferentes de um mesmo tipo celular. Nos animais superiores, todos os tipos de células sanguíneas são derivadas de um único tipo de célula-tronco primitivo pluripotencial que se diferencia em cinco tipos de células-tronco unipotenciais, cada um comprometido com uma diferente

linhagem de desenvolvimento: hemácias, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas. A descrição prévia tipo macrofágica nos leva a crer que os hemócitos teciduais observados apresentam precursores monocíticos. E, como tais, ao migrarem para os tecidos possuem um grande conteúdo de enzimas hidrolíticas e uma grande capacidade de fagocitose; onde englobam e destroem o agente agressor como parte do processo de restabelecimento da função normal do hospedeiro. JEONG ET AL. (1983) já haviam descrito a ocorrência de um órgão hematopoiético em *B. glabrata* responsável pela produção de amebloblastos primários e secundários e amebócitos (= granulócitos; hemócitos fagocíticos).

A coleta de hemolinfa permitiu, ainda, a contagem do número de hemócitos circulantes em alguns períodos da infecção pelo *S. mansoni*. A média total obtida durante os primeiros dias pós-exposição não diferiu entre o grupo controle (não-exposto) e o grupo experimental. Entretanto, foram demonstradas flutuações mais acentuadas nas amostras de hemolinfa fresca coletadas em fases mais tardias da parasitose (+/- a partir da 7ª semana). Vários estudos sobre a resposta hemocítica de *Biomphalaria* a infecção pelo *S. mansoni* demonstraram, em combinações compatíveis, que a inalteração no número de hemócitos circulantes pode ser explicada pela falta de resposta imune por parte do hospedeiro. REIS (1995), não observou aumento significativo do número de células estreladas em *B. tenagophila* inoculadas com hemolinfa de moluscos livres de infecção, antes ou após à exposição ao *S. mansoni*. Este mesmo fato ocorreu nos moluscos expostos ao *S. mansoni* e posteriormente inoculados com hemolinfa de caramujos infectados com distomoxifidiocercárias. Estes efeitos poderiam ter sido provocados por mecanismos de imunodepressão. O decréscimo observado no gráfico 7 deve ser considerado

como uma significativa mobilização destas células para os tecidos do hospedeiro com o objetivo de eliminação do parasita e reparação dos danos causados pela infecção, produzindo uma redução no número de hemócitos circulantes (periféricos). Tal fato, pôde ser comprovado histologicamente pela presença maciça destas células em alguns exemplares de *B. glabrata* – cepa FS com infecção tardia (+/- a partir da 12^a semana). BEZERRA ET AL.(1997) também mostraram uma diminuição no número de hemócitos circulantes, 5 horas após a infecção, especulando que tal fato seria decorrente da migração dos hemócitos para o local da penetração do miracídio. A hipótese de uma resposta quimiotática dos hemócitos foi evidenciada pelos estudos in vitro de LODES & YOSHINO (1990), ao demonstrarem que frações isoladas de esporocistos primários do *S. mansoni* (produtos excretados/secretados) estimulam a mobilidade de hemócitos de linhagens resistentes, mas inibe a mobilidade das linhagens susceptíveis.

Na tentativa de melhor entender as relações estabelecidas entre hospedeiro x parasita, uma vez que utilizou-se espécimes de diferentes áreas geográficas, foram feitas algumas observações sobre os dados malacológicos que serão discutidas a seguir. Os resultados obtidos representaram informações importantes na tentativa de se restringir o número de animais que possivelmente apresentariam reações teciduais.

A taxa de eliminação de cercárias vem sendo utilizada como um bom indicativo do comportamento histológico do hospedeiro frente a presença do parasita. Na grande maioria dos casos, os exemplares de *B. glabrata* provenientes de Feira de Santana com alta taxa de eliminação de cercárias (exemplares de classe 4) não

sobreviveram mais que 65 dias (= 9 semanas). Estes animais quando sacrificados apresentavam-se histologicamente comprometidos. FRANSEN (1979), já havia criado um método quantitativo para expressar o grau de compatibilidade existente entre o gênero *Schistosoma* e alguns de seus hospedeiros intermediários (*Biomphalaria* e *Bulinus* sp.); baseando-se no número total de cercárias produzidas/pelo número total de caramujos experimentalmente expostos. Entretanto, em nossos experimentos foram, também, observados animais de infecção tardia com uma alta taxa inicial de eliminação de cercárias (falsa susceptibilidade) e histologicamente reativos; sugerindo a existência de uma resistência adquirida (LEMON & ANDRADE, EM PUBLICAÇÃO). Portanto, tal parâmetro deve ser utilizado com restrições, uma vez que, representa os casos mais comuns de uma população.

A linhagem proveniente de Itaquara apresentou-se mais resistente a cepa do *S. mansoni* (FS) enquanto que a linhagem de Feira de Santana manteve seu padrão de susceptibilidade anteriormente descrito. Esta variação provavelmente reflete pequenas diferenças encontradas entre as duas populações que representam áreas geográficas distintas; onde as combinações genotípicas existentes entre parasita e hospedeiro determinam comportamentos diferenciados durante a infecção. Estes resultados refletem um ajustamento mais estreito entre os moluscos FS e a cepa local. Entretanto, como a cepa do parasito (*S. mansoni* – FS) tem sido mantida por vários anos em nosso laboratório acredita-se que a ocorrência de uma pequena porcentagem (20%) de exemplares que não se infectaram ou estavam eliminando poucas cercárias, entre 0 – 10 até o momento do sacrifício, represente a existência de exemplares com alelos que conferem maior resistência a infecção. Em 1973, RICHARDS já havia demonstrado que nos caramujos jovens susceptíveis de algumas

linhagens de *B. glabrata*, a susceptibilidade do adulto a infecção pelo *S. mansoni* é determinado por um único gene dominante, com herança mendeliana simples. SOUZA ET AL. (1995), através de cruzamentos repetidos entre espécimes que exibiam resistência parcial, obtiveram amostras que não eliminavam cercárias. GODOY ET AL. (1997) examinando histologicamente tais exemplares (F-15/BH), sacrificados aos 90 dias, observaram a formação de reações celulares difusas e encapsulantes, em vários órgãos, mas na ausência do parasita. Estas reações representariam cicatrizes deixadas pela destruição dos esporocistos. Neste momento, a autora sugere a possibilidade de auto-cura já mencionada por LIE ET AL. (1980) em caramujos com dupla infecção (*Echinostoma* x *Schistosoma*). SOUZA ET AL. (1997), sugeriram, nestes casos, que a reação hemocítica é parcialmente inibida pelo desenvolvimento dos esporocistos mostrando-se totalmente efetiva mais tarde.

8 CONCLUSÕES

1. Em *Biomphalaria glabrata*, somente um tipo celular (hemócito fagocítico) está presente nas reações infiltrativas difusas, nos complexos encapsulantes e formações granulomatosas desenvolvidas em torno das formas parasitárias do *Schistosoma mansoni*.
2. As reações teciduais de defesa em *B. glabrata* contra o *S. mansoni* são exclusivamente celulares não estando associadas à síntese e deposição de elementos da matriz extracelular.
3. Os hemócitos circulantes, presentes na hemolinfa, apresentam heterogeneidade morfológica. Nos exemplares *B. glabrata* da linhagem FS, o número de hemócitos circulantes decai nas fases mais tardias da infecção.
4. A linhagem IT mostrou-se mais resistente a cepa do *S. mansoni* (FS) do que a linhagem FS.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEMA, C.M.; DEUTEKOM-MULDER, E. C. van. der ; KNAAP, W. P. W. van der.; MEULEMAN, E. A.; SMINIA, T. Generation of oxygen radicals in haemocytes of snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the phagocytosis. **Dev. Comp. Immunol.**, **15**: 17, 1991.
- ADEMA, C. M.; HARRIS, R. A.; DEUTEKOM-MULDER, E. C. van A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. **J. Invertebr. Pathol.**, **59**, 24-32, 1992.
- ANDRADE, Z. A. Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização. In: MONTENEGRO, M. R. & FRANCO, M. *Patologia: processos gerais*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 8. p.135-42.
- ANDRADE, Z. A. & SADIGURSKY, M. Um estudo comparativo das cepas de Feira de Santana (Bahia) e Porto Rico do *Schistosoma mansoni* na infecção experimental do camundongo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **30**: 37-40, 1985.
- BARBOSA, F. S. & SILVA G. M. Curvas de Crescimento de *Australorbis glabratus* e sua aplicação à epidemiologia e à profilaxia da Esquistossomose. **Publ. Av. Inst. Aggeu Magalhães**, **1**: 35-42, 1951.

- BARBOSA, F. S.; CARNEIRO, E.; BARBOSA, I. *Manual de Malacologia Médica (trabalhos práticos)*. Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ, 1960. p.36-44.
- BARRACO, M. A.; STEIL, A. A.; GARGIONI, R. Morphological Characterization of Hemocytes of Pulmonate Snail *Biomphalaria glabrata*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **88**: 73-83, 1993.
- BAYNE, C. J. Molluscan Immunobiology. In: The Mollusca, vol. 5, Physiology Part 2, eds. SALEUDDIN, A. S. M. & WILBUR, K.M., p. 407. Academic Press, New York, 1983.
- BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. **J. Parasitol.**, **66(3)**: 413-419, 1980.
- BECK, G.; O'BRIEN, R. F.; HABICHT, G. S.; STILLMAN, D. L.; COOPER, E. L.; RAFTOS, D. A. Invertebrate cytokines III: Invertebrate-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. **Cell. Immunol.**, **146**: 284-99, 1993.
- BERGMAN, L & LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyroline. **Anal. Chem.**, **35**: 1961-65, 1963.

- 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 strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **39**: 197-201, 1997.
- BROOKS, C. P. A Comparative Study of *Schistosoma mansoni* in *Tropicorbis Havanensis* and *Australorbis glabratus*. **J. Parasitol.**, **39**: 159-65, 1953.
- CARRIKER, M. R. & BILSTAD, N. Histology of alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis* (Apressa – Say). **Trans. Amer. Micros. Soc.**, **65**: 250-75, 1946.
- CHENG, T. C. A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. In "Comparative Pathobiology". New York: Plenum, 1984. v.6, p.111-46.
- CHENG, T.C. Functional Morphology and Biochemistry of Molluscan Phagocytes. **Ann. New York Acad. Sc.**, **266**:343-79, 1975.
- CHENG, T. C. & AULD K, R. Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. **J. Int. Pathol.**, **30**: 119-22, 1977.

- CHENG, T. C. & GARRABRANT, T. A. Acid Phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol.**, **7**: 467-72, 1977.
- CHERNIN, E. & ANTOLICS, V. M. Penetrative capacity of *Schistosoma mansoni* Miracidia. **J. Parasitol.**, **63**: 560-61, 1975.
- DIKKEBOOM, R; BAYNE, C. J; TIJNAGEL, J. M. G. H. & van der KNAAP, W.P.W. Possible Role of Reactive Forms of Oxygen in in vitro Killing of *Schistosoma mansoni* Sporocysts by Hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. **Parasitol. Res.** **75**, 148-54. 1988.
- DIKKEBOOM, R.; KNAPP, van der; W. P. W.; MEULEMAN, E. A.; SMINIA, T. Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell. Tissue Res.**, **238**: 43-7, 1984.
- FENG, S. Y. **The responses of oysters to the introduction of soluble and particulate materials and factors modifying the response.** New Brunswick, N.J., 1962. Thesis – Rutgers University.
- FILES, V. S. A Study of the Vector - Parasite Relationships in *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, **41** : 264-69, 1951.
- FILES, V. S. & CRAM E. B. A Study on the comparative susceptibility of snail vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, **35**: 555-60, 1949.

- FOLEY, D. A. & CHENG, T. C. Interaction of molluscs and foreign substances: The morphology and behaviour of hemolymph cells of the American oyster, *Cassostrea virginica*, in vitro. **J. Invertebr. Pathol.**, **19**: 383-94.1972.
- FOLEY, D. A. & CHENG, T. C. Morphology, hematologic parameters, and behavior of hemolymph cells of the quahaug clam, *Mercenaria mercenaria*. **Biol. Bull.**, **146**: 343-56, 1974.
- FRANSEN, F. Discussion of the relationships between *schistosoma* and their intermediate host, assessment of the degree of host-parasite compatibility and evaluation of schistosome taxonomy. **Z. Parasitenkd.**, **58**: 275-96, 1979.
- FRYER, S. E. & BAYNE, C. J. Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): a strain specific, time-depend 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**: 121-22, 1997.
- GRANATH, W. O. & YOSHINO, T. P. Characterisation of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzymes markers. **J. Exp. Zool.**, **226**: 205-10, 1983.

- GRANATH, W. O.; 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.
- HARRIS, K. R. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **266**: 446 -63, 1975.
- HUGHES, T. K.; SMITH, E. M.; BARNETT, J. A.; CHARLES, R.; STEFANO, G. B. LPS stimulated invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1. **Develop. Comp. Immunol.**, **15**: 117-22, 1991.
- JEONG, K. H., LIE, K. J.; HEYNEMAN, D. The Ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Dev. Comp. Immunol.**, **7**: 217-28, 1983.
- JOHNSTON, L. A. & YOSHINO, T. P. Analysis of lectin and snail plasma binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, **112**: 469, 1996.
- JOURDANE, J. Etude des mécanismes de rejet dans les couples mollusque-schistosome incompatibles à partir infestations par voie naturelle et par transplantations microchirurgicales de stades parasitaires. **Acta Trop.**, **39**:25-35, 1982.

- KLEIN, J. 1989. Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? **Scan. J. Immunol.**, **29**:499-505, 1989.
- KNAAP, W. P. W. van der & LOKER, E. S. Immune Mechanisms in Trematode-Snail Interactions. **Parasitol. Today.**, **6**:24 175-82, 1990.
- KRUPA, P. L.; LEWIS, L. M.; VECCHIO, P. D. *Schistosoma haematobium* in *Bulinus guernei*: Electron Microscopy of Hemocyte-sporocyst Interactions. **J. Invert. Pathol.**, **30**: 35-45, 1977.
- LEMOS, Q. T. Contribution to the histology of *Biomphalaria glabrata*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **32**: 343-47, 1999.
- LIE, K. J. & HEYNEMAN, D. Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata*. **Int. J. Parasitol.**, **15**: 621-26, 1975.
- LIE, K. J. & HEYNEMAN, D. Tissue Reactions Induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **74**: 157-66, 1980.
- LIE, K. J.; HEYNEMAN, D.; JEONG, K. H. Studies on resistance in snails. 4. induction of ventricular capsules and changes in amebocyte-producing organ during sensitization of *Biomphalaria glabrata* Snails. **J. Parasitol.**, **62**: 286 -91, 1976.

- LIE, K. J.; HEYNEMAN, D.; YAU, D. The Origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, **61**:574-76, 1975.
- LIE, K. J.; JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. Immune responses in parasite infections. 4: protozoa, arthropoda and invertebrates. In: *Molluscan host reactions to helminthic infection*. CRC Press, 1987. p.211-70.
- LODES, M. J. & YOSHINO, T. P. The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. **J. Invertebr. Pathol.**, **56**: 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.; BUCKLEY, P. M.; KRUSE, K.T. Ultrastructure of encapsulation of schistosoma mansonii mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, **68**: 84-94, 1982.
- LOKER, E. S.; YUI. M. A.; BAYNE, C. J. *Schistosoma mansonii*: agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, **58**: 56-62, 1984.
- MACKIN, J. G. Oyster leukocytes in infections diseases. **Am. Zool.**, **1**: 371, 1961.

MACLAREN, D. J., RAMALHO-PINTO, F. J. & SMITHERS, S. R. Ultrastructural Evidence for Complement and Antibody-Dependent Damage to Schistosomula of *Schistosoma mansoni* by Rat Eosinophiles in vitro. In: BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. **J. Parasitol.**, **66(3)**: 413-419, 1980.

MATRICON-GONDRAN, M. The site of ultrafiltration in the kidney sac of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Tissue Cell.**, **22**: 911-23, 1990.

MATRICON-GONDRAN, M. & LETOCART, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. characterization of hemocytes and fixed phagocytes. **J. Invert. Pathol.**, **74**: 224-34, 1999.

MICHELSON, E. II. "Immune" reaction of *S. mansoni* in the snail *Australorbis glabratus*. **J. Insect. Pathol.**, **5**: 412-20, 1963.

MONTEIL, J. F. & MATRICON-GONDRAN, M. Structural and cytochemical study of hemocytes in normal and trematode infected *Lymnaea truncatula*. **Parasitol. Res.**, **76**: 675-82, 1993.

MOORE, M. N. & LOWE, D. M. The Cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. **J. Invert. Pathol.**, **29**: 18-30, 1977.

- NEWTON, W. L. The Comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to Infection with *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, **38**: 362-66, 1952.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; FRANCESCHI, C. Presence of Several Cytokine-Like Molecules in Molluscan Infected with *Schistosoma mansoni*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **195**: 984-88, 1993.
- PAN, CHIA-TUNG. The General histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. **Bull. Mus. Comp. Zool.**, **119**: 237-99, 1958.
- PAN, CHIA-TUNG. Generalized and Focal Tissue Responses in the Snail, *Australorbis glabratus*, Infected with *Schistosoma mansoni*. **Ann. of the New York Acad. Sci.**, **113**: 475-485, 1963.
- PAN, CHIA-TUNG. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** **14**: 931-75, 1965.
- RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGERALD, S. W.; RHODES, C. P. Invertebrate Immunity: basic concepts and advance. **Int. Rev. Citol.**, **97**: 183-350, 1985.
- RAFTOS, D. A.; COOPER, E. L.; HABICHT, G. S.; BECK, G. Invertebrate cytokines: Tunicate cell proliferation stimulated by an interleukin 1-like molecule. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **88**: 9518-22, 1991.

- RAFTOS, D. A.; COOPER, E. L.; STILLMAN, D. L.; HABICHT, G. S.; BECK, G. Invertebrate cytokines II: release of interleukin-1-like molecules from tunicate hemocytes stimulated with zymosan. **Lymphok. Cytok. Res.**, **11**: 235-40, 1992.
- REIS, S. M. P. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Ação da Inoculação de hemolinfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Rev. Saúde Pública**, **29**: 259-64, 1995.
- RENWRANTZ, L. R. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. In: SOUZA, R. L. M. **Fatores associados a resistência de *Biomphalaria tenagophila* na infecção por *Schistosoma mansoni***. Belo Horizonte, 1999. 83p. Dissertação de Mestrado . Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.
- RICHARDS, C. S. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. **Amr. J. Trop. Med. Hyg.**, **22**: 748-56, 1973.
- RICHARDS, C. S. & RENWRANTZ, L. R. Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca²⁺ dependent, GalNac-specific lectin and a Ca²⁺ independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognizes activated homologous opsonins. **J. Comp. Physiol.**, **161**: 43, 1991.

RIFKIN, E; CHENG, T. C.; HOHL, H. R. An Electron microscope study of the constituents of encapsulating cysts in american oyster, *Cassostrea virginica*, formed in response to *Tycephalum Metacestodes*. **J. Invert. Pathol.**, **14**: 211-26, 1969.

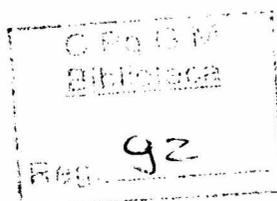
SCHOENBERG, D.A. & CHENG, T. C. The Behavior of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata) hemocytes following exposure to lectins. **Trans. Am. Microsc. Soc.**, **100**: 345-54, 1981.

SMINIA, T. Gastropods. In: "Invertebrate blood cells". RATCLIFFE, N. A. & ROWLEY, A.(Eds.). New York: Academic Press, 1981. p.191-232.

SMINIA, T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. **Z. Zellforsch.**, **130**: 497- 526, 1972.

SMINIA, T. & BARENDSSEN, L. A Comparative Morphological and Enzyme Histochemical Study on Blood Cells of the Freshwater Snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* and *Bulinus truncatus*. **J. Morphol.**, **16**: 31-39, 1980.

SMINIA, T. ; BORGHART-REINDERS, E.; LINDE, A. W. van der Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell. Tiss. Res.**, **153**: 307-26, 1974.



- SMINIA, T.; KNAAP, van der; W. P. W.; BOERRIGTER-BARENSEN, L. H. Peroxidase-positive blood cells in snails. **J. Reticuloendoth. Soc.**, **31**: 339-404, 1982.
- SMINIA, T.; KNAAP, van der; W. P. W.; EDELENBOSCH, P. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Devel. Comp. Immunol.**, **3**: 37-44, 1979.
- SMINIA, T.; PIETERSMA, K.; SCHEERBOOM, J. E. M. Histological and ultrastructural observations on wound healing in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Z. Zellforsch.**, **141**: 561-73, 1973.
- SOUZA, C. P. ; PASSOS-JANNOTTI, L. K.; FREITAS, J. R. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan host in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **90**: 5-10, 1995.
- SOUZA, C. P.; BORGES, C. C.; SANTANA, A. G.; ANDRADE, Z. A. Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* and *Biomphalaria straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **92**: 517-22, 1997.
- SOUZA, R. L. M. **Fatores associados a resistência de *Biomphalaria tenagophila* na infecção por *Schistosoma mansoni***. Belo Horizonte, 1999. 83p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.

SZUMLEWICZ, A. P. Studies on the biology of *Australorbis glabratus*, Schistosome-bearing Brazilian snail. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, **9**: 459-529, 1958.

TRIPP, M. R. Hemagglutinin in the blood of the Oyster *Crassostrea virginica*. **J. Invert. Pathol.**, **8**: 478-84, 1966.

YOSHINO, T. P. Encapsulation response of the marine prosobranch *Cerithidea californica* to natural infections of *Renicola buchmanii* Sporocysts (Trematoda:Renicolidae). **Int. J. Parasitol.**, **6**: 423-31, 1976.

YOSHINO, T. P., & GRANATH JUNIOR, W. O. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes. functional heterogeneity in cell populations recognized by a monoclonal antibody. **J. Invert. Pathol.**, **45**: 174-86, 1985.

ZELCK, U. & BECKER, W. Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* tissue. **J. Invert. Pathol.**, **55**, 93-99, 1990.