



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**HEMÓCITOS DE *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) NA
INTERAÇÃO COM *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907**

CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES



002147

**Salvador - Bahia - Brasil
2005**

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**HEMÓCITOS DE *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) NA INTERAÇÃO
COM *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907**

CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES

Professor-orientador: ZILTON DE ARAÚJO ANDRADE

Tese apresentada para
Obtenção do Grau de Doutor
em Patologia Experimental.

Salvador – Bahia – Brasil
2005

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ – Salvador – Bahia.

B726 Borges, Claudia Maria da Cunha
Hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) na
Interação com *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907
[manuscrito] / por Claudia Maria da Cunha Borges – 2005
136f.: il. 29 cm.

Datilografado (fotocópia)
Tese (Doutorado em Patologia Experimental)
Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina.
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

Professor Orientador: Dr. Zilton de Araújo Andrade,
Laboratório de Patologia Experimental.

1. *Biomphalaria glabrata*. 2. *Schistosoma mansoni*.
3. Hemócitos. 4. Atividade fagocítica. 5. Fosfatase ácida.

I.Título

CDU 616.995.122

HEMÓCITOS DE *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) NA INTERAÇÃO COM *Schistosoma manson* (Sambon, 1907)

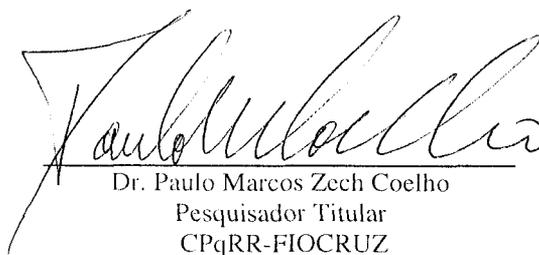
CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES

FOLHA DE APROVAÇÃO

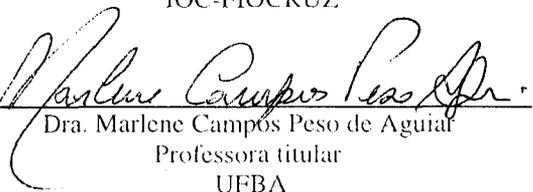
COMISSÃO EXAMINADORA



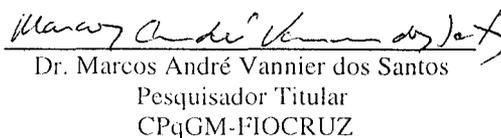
Dra. Silvana Aparecida Thiengo
Pesquisadora Titular
IOC-FIOCRUZ



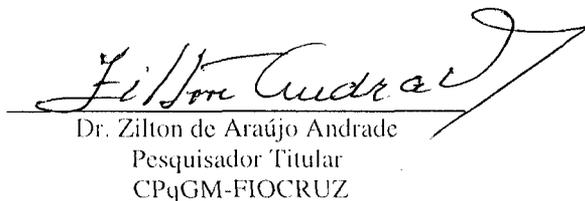
Dr. Paulo Marcos Zech Coelho
Pesquisador Titular
CPqRR-FIOCRUZ



Dra. Marlene Campos Peso de Aguiar
Professora titular
UFBA



Dr. Marcos André Vannier dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ



Dr. Zilton de Araújo Andrade
Pesquisador Titular
CPqGM-FIOCRUZ

**“ Por mais raro que seja, ou mais antigo,
só um vinho é deveras excelente:
aquele que tu bebes, docemente,
com teu mais velho e preferido amigo. “**

Mário Quintana.

A Deus por direcionar os meus caminhos;

A minha mãe e a minha avó pelos exemplos de força e dedicação;

A meu companheiro por seu respeito e extrema sensibilidade;

As minhas "glabratas-verdadeiras" (Carine, Luciana, Sheilla e Zaira) pelos exemplos de amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Zilton de Araújo Andrade pela orientação objetiva e amiga, pelo seu bom humor de MESTRE e pela simplicidade e paciência em transmitir seus conhecimentos. Minha profunda gratidão e respeito.

À Doutora Sônia Gumes Andrade pela agradável companhia e pelo exemplo de mulher brilhante.

Ao Curso de Pós-Graduação em Patologia pela concessão da Bolsa de Estudos, da CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, que possibilitou a minha dedicação exclusiva, durante quatro anos, a este trabalho.

Ao Diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ, Salvador – Bahia), Doutor Lain Pontes de Carvalho, pelo apoio Institucional.

Ao Doutor Joseph Schrével, Chef du Laboratoire de Biologie Parasitaire et Chimiothérapie – Museum National D'Histoire Naturelle, Paris, France, por ter me aceito como estudante de doutorado “Sandwich” em seu laboratório e por ter possibilitado o meu treinamento e amadurecimento científico. Muito Obrigada!

Ao Sr. Antônio Carlos da Silva Santos, Técnico do Laboratório de Patologia Experimental (Lapex), pelo convívio amigável e pelo auxílio na manutenção dos moluscos durante o desenvolvimento desse estudo.

À Mestranda Samaly dos Santos e aos estudantes de biologia Igor Pereira, Manuela Caldas, Manuela Ribeiro e Rafael Valente Veiga pela ajuda na realização das técnicas utilizadas nesta Tese.

Aos vizinhos do Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular pela boa vontade e disponibilidade sempre presentes.

Às bibliotecárias do CPqGM pelo auxílio na localização dos artigos científicos que constam nesta Tese e pelas correções das referências bibliográficas.

À Rosalia Meire, por seu profissionalismo e simpatia: qualidades que nos permitiram um convívio tranqüilo.

Às meninas da histopatologia, pela amizade, disponibilidade e profissionalismo na realização das técnicas histológicas.

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

RESUMO

HEMÓCITOS de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) NA INTERAÇÃO COM *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES.

[INTRODUÇÃO] Os hemócitos são células móveis, fagocíticas e secretoras, que têm sido comparados aos macrófagos dos vertebrados. Durante a infecção da *B. glabrata* pelo *S. mansoni* o comportamento dos hemócitos teciduais é fundamental para determinar a evolução da interação hospedeiro-parasito. **[OBJETIVOS]** Correlacionar o número e o grau de atividade dos hemócitos periféricos, com a quantidade e o tipo de reação histológica presente em *B. glabrata* submetida à infecção pelo *S. mansoni*. Analisar alguns aspectos histológicos, ultraestruturais e histoquímicos dos hemócitos em condições normais e durante a infecção. **[MATERIAIS E MÉTODOS]** Exemplares de *B. glabrata* foram submetidos às análises histológicas (coloração pela hematoxilina/eosina, sírius-vermelho, ácido periódico de Schiff), ultraestruturais, histoquímicas (fosfatase ácida, succinodesidrogenase) e a avaliação da capacidade fagocítica (incorporação do zimozan A). **[RESULTADOS]** Os achados não revelaram modificações significativas no número ou no grau de atividade (capacidade fagocítica) dos hemócitos circulantes, nem na relação granulócitos/hialinócitos, quando comparados aos controles intactos ou após serem submetidos à radiação ionizante. Os dados ultraestruturais revelaram evidências de alterações induzidas pela infecção. Os métodos histoquímicos mostraram que os hemócitos, além de conterem enzimas hidrolíticas que refletem seu estado de ativação, também liberam aparentemente tais enzimas ao seu redor. **[CONCLUSÃO]** As reações de defesa em *B. glabrata* contra o *S. mansoni* são formadas por células com características similares aos macrófagos dos mamíferos. Não há correlação positiva entre os hemócitos periféricos, quanto à sua concentração e seus sinais de ativação e os tipos e graus de reações teciduais formadas em torno dos esporocistos e cercárias.

Palavras chave: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; hemócitos; atividade fagocítica; fosfatase ácida; succinodesidrogenase.

ABSTRACT

***Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) HEMOCYTES and THEIR INTERACTION with *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 CLAUDIA MARIA DA CUNHA BORGES.**

[INTRODUCTION] The hemocytes are mobile, fagocytic and secretory cells that have been compared with the macrophages of vertebrates. During the infection of *B. glabrata* by *S. mansoni* the behavior of the tissue hemocytes is fundamental to determine the evolution of the host-parasite interaction. [OBJECTIVE] To correlate the number and degree of activity of the peripheral hemocytes with the amount and type of histological reaction present in *B. glabrata* submitted to infection by *S. mansoni*. To analyze some histological, ultrastructural and histochemical aspects of the hemocytes under normal conditions and during the infection. [MATERIAL and METHODS] Normal and infected *B. glabrata* subjected to histological (H & E, sírius-red, acid periodic of Schiff), ultrastructural and histochemical methods (acid phosphatase, succinic dehydrogenase) and evaluation the effect of zymozan A on fagocytic capacity. [RESULTS] The findings do not reveal significant modifications in the number or the degree of activity (fagocytic capacity) of the circulating hemocytes, nor in the granulocyte/hialinocyte ratio when compared with the normal control or after ionizing radiation. The ultrastructural data revealed evidence of induced alterations by the infection. The histochemical methods showed that the hemocytes, besides containing hydrolytic enzymes that reflect the state of activation, also liberate similar enzymes to milieu. [CONCLUSION] The defense reactions of *B. glabrata* against *S. mansoni* are mediated by cells with similar characteristics to macrophages of mammals. There is no positive correlation between the peripheral hemocytes and the tissue reactions around the sporocysts and cercariae.

Key Words: *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*; hemocytes; phagocytic activity; acid phosphatase; succinic-dehydrogenase.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AcP – Fosfatase ácida
- AiP – Fosfatase alcalina
- CAT – Catalase
- ConA – Concanavalina A
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CPqGM – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
- ECA – *Erythrina corallodendrom*
- ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- FS – Feira de Santana
- IL-1 α - Interleucina 1 alfa
- IL-1 β - Interleucina 1 beta
- IL-2 – Interleucina 2
- IL-6 – Interleucina 6
- iNOS – Óxido nítrico sintase iduzível
- LAPEX – Laboratório de Patologia Experimental
- MOP – Mieloperoxidase
- NSE – Esterase não específica
- OPH – Órgão produtor de hemócitos
- PMNs – Polimorfonucleares
- PO – Peroxidase
- RER – Retículo endoplasmático rugoso
- RhIL-1 – Recombinante humano da interleucina 1
- ROS – Radicais tóxicos de oxigênio
- SBA – *Glycine Max*
- SID – Sistema de defesa interna dos moluscos
- SIDG – Sistema interno de defesa dos gastrópodes
- SOD – Superóxido dismutase

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TPA – *Tetragonolobus purpúreas*

UFBA – Universidade Federal da Bahia

WGA – *Triticum vulgare*

WGA – Wheat Germ Agglutinin

FÓRMULAS QUÍMICAS

^{14}C – Carbono 14

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HOCl – Ácido hipocloroso

NO – Óxido nítrico

O_2^- - Ânion superóxido

O_2 – Oxigênio molecular

OH^\bullet – Radical hidroxila

ONOO^- - Peroxinitrito

SUMÁRIO

RESUMO	05
ABSTRACT	06
LISTA DE ABREVIATURAS	07
FÓRMULAS QUÍMICAS	08

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA	11
1.2 SISTEMA DE DEFESA INTERNA DOS MOLUSCOS (SID)	14
1.2.1 Caracterização dos Hemócitos	14
1.2.2 Fagocitose e Citotoxicidade	17
1.2.3 Fatores Humorais	23
1.2.4 Reações Teciduais e Hemolinfa Periférica	28

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Manuscrito I	30
2.2.1 Objetivos Específicos	30
2.3 Manuscrito II	31

2.3.1 Objetivos Específicos	31
3 MANUSCRITO I	32
<hr/>	
4 MANUSCRITO II	67
<hr/>	
5 DISCUSSÃO	94
<hr/>	
6 CONCLUSÕES	100
<hr/>	
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
<hr/>	
8 ANEXOS	116
<hr/>	

1 INTRODUÇÃO

Nas reações de defesa dos moluscos, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, contra as formas larvais deste trematódeo há a participação de um tipo celular – o hemócito – o qual exibe características muito próximas àquelas 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 dos mamíferos. Estudos realizados com o auxílio de técnicas histoquímicas, imunohistoquímicas e de microscopia eletrônica permitiram elucidar as principais características destas células e das cápsulas ou complexos encapsulantes por elas formados. Entretanto, várias questões ainda não foram elucidadas, sendo as modificações que os hemócitos exibem em animais com diferentes graus de susceptibilidade ao *S. mansoni* pouco exploradas.

O presente estudo é uma contribuição à ampliação do conhecimento sobre as características apresentadas pelos hemócitos teciduais. Além disso, pretende-se correlacionar os achados histopatológicos e ultraestruturais, presentes em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) submetida à infecção pelo *S. mansoni*, com o número e o grau de atividade dos hemócitos periféricos.

1. 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA

Os invertebrados constituem aproximadamente 98% de todas as espécies animais e sua sobrevivência, ao longo de milhões de anos, deve-se em parte à habilidade que esses animais possuem de prevenir, controlar ou erradicar infecções. Apesar disso, dados sobre o mecanismo e a função do seu sistema interno de defesa são ainda relativamente escassos.

Os invertebrados estão sujeitos a uma gama de desafios no ambiente onde vivem e aparentemente, por isso desenvolveram diferentes estratégias de sobrevivência durante sua evolução, sejam coloniais ou não, bênticos ou pelágicos, marinhos, dulciaquícolas ou terrestres, com vida longa ou curta. Além disso, muitr

deles possuem uma elaborada e obrigatória relação com simbiontes. Contudo, esses animais encontram diferentes desafios para sua auto-integridade, pois seus habitats usualmente encerram agentes infecciosos, como vírus, bactérias, fungos, protistas, parasitos e outros. Portanto, a ausência de um sistema de defesa eficiente poderia resultar na extinção de um grande número de espécies.

Dois sistemas internos de defesa são utilizados pelos animais para combater e eliminar parasitos e outros patógenos invasores: a imunidade adaptativa e a inata. O princípio da imunidade adaptativa é a presença de receptores específicos na membrana das células de defesa (e. g., linfócitos em vertebrados). Esses receptores ao interagirem com o antígeno iniciam uma cascata de reações, desencadeando a produção de imunoglobulinas (anticorpos) específicas que atuarão na eliminação do antígeno. A imunidade inata não é dependente desta ativação antígeno-receptor específico e, portanto, não há produção de anticorpos específicos (KLEIN, 1989). Outra importante característica que diferencia a imunidade inata da adaptativa é a memória imunológica, isto é, a capacidade que o sistema possui de reconhecer determinado antígeno algumas semanas ou mesmo anos após a primeira infecção. Assim, respostas a uma segunda ou subseqüentes exposições ao mesmo antígeno, denominadas respostas imunes secundárias, são usualmente mais rápidas, mais eficientes, e freqüentemente diferentes, em termos qualitativos e quantitativos, das respostas imunes iniciais àquele antígeno.

Os vertebrados possuem tanto imunidade adaptativa quanto inata. Em mamíferos, por exemplo, a imunidade adaptativa é realizada pelos linfócitos T e B enquanto a imunidade inata é realizada por células como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os invertebrados, por sua vez, apresentam apenas o sistema imune inato. Mas, a despeito da ausência de linfócitos T e B, imunoglobulinas e respostas anamnéticas para antígenos específicos, são capazes de combater adequadamente um amplo espectro de patógenos, sustentar a homeostase do organismo, discriminar o próprio do não - próprio e, no conjunto, sustentar a sobrevivência das espécies (KLEIN, 1989; KNAAP & LOKER, 1990; SUN *et al.*, 1990; YAKOVLEVA *et al.*, 2001).

Nos invertebrados a defesa é exercida por componentes da hemolinfa, equivalente ao sangue dos vertebrados. Esta hemolinfa, que circula no interior de todo o corpo do animal, é constituída por elementos celulares e humorais (o plasma: fluido rico em proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos, hormônios e vários sais). Alguns destes elementos interagem entre si para discriminar o próprio do não - próprio e atuar na autodefesa como, por exemplo, em infecções por larvas de helmintos. Muitos destes fatores humorais, como aglutininas, lisinas e fatores antimicrobianos, podem originalmente ser sintetizados e secretados pelos elementos celulares atuando como moléculas de reconhecimento e facilitando a fagocitose (MILLAR & RATCLIFFE, 1994).

Nas reações imunes celulares, os hemócitos (ou amebócitos) e os fagócitos fixos são as células responsáveis pela imobilização dos agentes invasores através da encapsulação, nodulação e fagocitose. A fagocitose ocorre em todo Reino Animalia. Nos invertebrados é considerada como uma resposta primária envolvendo os estágios de reconhecimento (atração, quimiotaxia e ataque), ingestão e morte do invasor. Tais processos têm sido estudados em diferentes espécies e a maior parte das informações sobre os mesmos provêm de moluscos e insetos. Entretanto, estes não foram completamente elucidados uma vez que o reconhecimento e a definição dos hemócitos têm sido dificultados pela variedade de tipos morfológicos presentes nos diferentes filos e até mesmo dentro de grupos individuais. Em algumas classes de moluscos, como, por exemplo, no caso dos bivalves, vários subtipos de hemócitos foram identificados (CHENG, 1975; CHENG & GUIDA, 1980; MOORE & LOWE, 1977). Além disso, os dados obtidos sobre as reações de defesa nos moluscos se limitam apenas a um número de representantes dos Pulmonata e dos Bivalvia que são importantes do ponto de vista econômico (*Mytilus*, *Crassostrea* e *Helix*) ou médico (*Biomphalaria*, *Bulinus*, *Lymnaea* – moluscos que servem como hospedeiros intermediários para parasitos do homem ou de animais domésticos). Informações sobre as reações de defesa em outros representantes deste filo são fragmentadas ou completamente ausentes; especialmente nos prosobrânquios, opistobrânquios e cefalópodos que são grupos muito importantes nos ecossistemas do planeta.

1.2 SISTEMA DE DEFESA INTERNA DOS MOLUSCOS (SID)

1.2.1 Caracterização dos Hemócitos

Em geral, as células que constituem o sistema imune dos invertebrados podem ser reunidas em dois grandes grupos: células da hemolinfa circulante e células fixas, sendo estas classificadas de acordo com critérios funcionais.

Em seu artigo de revisão, KNAAP & LOKER (1990) discutem a existência de quatro tipos celulares bem distintos no sistema de defesa dos caramujos: as células reticulares ancoradas aos tecidos por fibrilas extracelulares; as células endoteliais capturadoras de antígenos; as células poro, que fazem endocitose seletiva para proteínas, e os hemócitos: células encontradas na circulação e livres nos espaços intersticiais do tecido conjuntivo, que são as principais células efetoras na defesa contra diversos organismos invasores. Estas células ativadas podem, por sua vez, destruir um patógeno em potencial através da fagocitose (KINOTI, 1971) e/ou por mecanismos citotóxicos oxidativos (ADEMA *et al.*, 1991 e 1992).

A presença de elementos celulares no sistema interno de defesa de *B. glabrata*, infectados por via natural, foi inicialmente sugerida em pesquisas histológicas, que demonstraram reações teciduais em torno de esporocistos do *S. mansoni* (NEWTON, 1952; PAN, 1963 e 1965). Nesta mesma linha experimental, GUARALDO *et al.* (1981) demonstraram que *B. glabrata* apresentava taxas de susceptibilidade mais elevadas que *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) e esta diferença no nível de susceptibilidade estaria, provavelmente, relacionada ao maior número de esporocistos destruídos pelas reações teciduais observadas em *B. tenagophila*. Neste caso em particular, a resistência destes caramujos à infecção pelo *S. mansoni* foi atribuída à capacidade dos hemócitos em envolver e destruir as diferentes formas larvárias intramolusco deste trematódeo.

Muitos estudos utilizando técnicas de microscopia eletrônica têm demonstrado que os hemócitos apresentam heterogeneidade morfológica e bioquímica. Para SMINIA & BARENDSSEN (1980), apesar dos vários estudos

caracterizarem a função e a estrutura das células circulantes dos invertebrados, ainda não existe uma concordância entre o número e os tipos celulares presentes na hemolinfa destes animais. Estes autores consideram, por exemplo, a população de hemócitos circulantes em *Gastropoda* como sendo uma população composta por um único tipo celular. As diferenças morfológicas e estruturais observadas seriam mais quantitativas do que qualitativas, correspondendo, assim, a diferentes estágios de maturação celular e acarretando, em consequência, variações da capacidade funcional. As células jovens, morfológicamente caracterizadas como células pequenas, escuras e arredondadas, apresentam pseudópodos curtos, poucas vesículas de Golgi e poucos lisossomos; uma baixa atividade fagocítica e uma grande atividade mitótica, enquanto que as células maduras, maiores e com prolongamentos citoplasmáticos, têm pouca atividade mitótica, mas alta atividade fagocitária. Entretanto, alguns autores (HARRIS, 1975; YOSHINO, 1976; CHENG & GUIDA, 1980; Lo VERDE *et al.*, 1982; LIE *et al.*, 1987; BARRACO *et al.*, 1993; BORGES & ANDRADE, 2003) fazem distinção de duas subpopulações de hemócitos na hemolinfa de *Biomphalaria* sp.: os hialinócitos (geralmente esféricos, com núcleo central conspícuo, baixo conteúdo enzimático, prolongamentos citoplasmáticos pequenos e escassos) e os granulócitos (que são maiores, possuem núcleo excêntrico, esférico ou reniforme, aderem ao vidro, emitem pseudópodos; são ativamente fagocíticos e possuem citoplasma rico em organelas: mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, lisossomos; representando, respectivamente 10% e 90% do total de células circulantes).

IOKIY *et al.* (1983), foram capazes de definir quatro tipos de hemócitos em *B. glabrata* de acordo com suas características morfológicas e capacidade de ligação com as lectinas ConA (Concanavallina-A) e WGA (Wheat Germ Agglutinin) e com o ferro coloidal. Entretanto, essa caracterização foi feita principalmente em hemócitos jovens, encontrados próximos ao órgão produtor de hemócitos (OPH). Segundo estes autores, os granulócitos do tipo I são células pequenas, com uma superfície irregular, hem como um centro celular hem definido com mitocôndrias e corpos multivesiculares e um retículo endoplasmático extenso ao redor do núcleo. Granulócitos do tipo II também são células pequenas com um núcleo em forma de rim. Em seu citoplasma foram observados sistemas de Golgi e corpos

multivesiculares, além de um ectoplasma de onde se origina uma filopodia radial. Granulócitos do tipo III são fusiformes, grandes, com longos e grossos pseudópodos em seus pólos, o citoplasma é rico em organelas, incluindo várias cisternas de Golgi, retículo endoplasmático, lisossomos e mitocôndrias, além de pequenos grumos de glicogênio. O quarto tipo celular, granulócitos do tipo IV, é composto por células assimétricas, com extensos pseudópodos, o citoplasma com vacúolos superficiais, poucas cisternas de Golgi, mitocôndrias e lisossomos ao redor do núcleo, sendo observado na periferia um rico retículo endoplasmático e um grande depósito de partículas de glicogênio. Os autores também relatam que granulócitos do tipo III e IV apresentam sítios de ligação para o ferro coloidal e receptores para WGA sendo encontrado em menor intensidade no granulócito do tipo III, o qual também se liga a Con A.

Segundo MATRICÓN-GONDRAN *et al.* (1999), é inadequado o uso do termo granulócito para a *B. glabrata* porque os nemócitos desta espécie não possuem grânulos específicos similares àqueles observados em outros invertebrados incluindo os bivalves ou grânulos peróxido - reativos presentes nos nemócitos de *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (SMINIA *et al.*, 1987; ADFEMA *et al.*, 1992) ou *Lymnaea truncatularia* (Muller, 1774) (MONTLIL & MATRICÓN-GONDRAN, 1993). Realizando um detalhado trabalho ultraestrutural e enzimático, as autoras propõem o reconhecimento de três tipos distintos de nemócitos de acordo com o critério morfológico: 1) Células grandes (8 – 17 µm), apresentando um compartimento tubulo-vesicular, um componente do sistema endocítico e numerosas mitocôndrias e grandes agregados de partículas de glicogênio; 2) Células de tamanho médio, com cerca de 8 µm de diâmetro, tem um citoplasma homogêneo com poucas organelas em torno do núcleo e poucos grânulos de glicogênio; e 3) Células pequenas (5 – 6 µm) de ectoplasma fino e endoplasma escasso, com poucas organelas e nobres em grânulos de secreção.



1.2.2 Fagocitose e Citotoxicidade

O processo de ingestão de matéria particulada, denominado de **fagocitose** (do grego “phagein”, comer) ocorre em todo Reino Animalia. Entre os protistas, no grupo Protozoa, é reconhecido como uma forma de alimentação. Entretanto, nos animais, além de promover a nutrição, habitualmente atua como um mecanismo geral de defesa, através do qual são eliminadas partículas inertes e microorganismos invasores (antigênicos). Nos mamíferos, a fagocitose é realizada por algumas células sanguíneas brancas e pelos macrófagos: células de grande capacidade fagocítica, amebóides com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi bem desenvolvidos e que estão amplamente distribuídas pelo tecido conjuntivo ou no parênquima de algum órgão.

Em condições ideais, o processo de fagocitose é iniciado pela ligação das partículas e moléculas extracelulares a receptores específicos encontrados na membrana dos fagócitos. A ligação destas partículas e moléculas induz a célula fagocitária a estender projeções da membrana plasmática (os pseudópodos) que engolfam o “não - próprio”. Uma vez englobados por estas células, os microorganismos invasores são digeridos no interior dos vacúolos digestivos; sendo expostos a um conjunto de fatores antimicrobianos dentre os quais estão envolvidas as enzimas lisossômicas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Atualmente, são conhecidas em torno de 50 hidrolases lisossômicas capazes de digerir a maior parte das substâncias biológicas, incluindo aquelas que degradam proteínas, ácidos nucleicos, oligossacarídeos e fosfolípidios. Todas otimamente ativas em condições de pH ~5; mantido graças à atuação de uma bomba H^+ ATP-dependente que bombeia prótons H^+ para o lúmen do lisossomo, mantendo, conseqüentemente, o seu conteúdo em pH ácido. A liberação destas enzimas, no interior dos vacúolos fagocíticos inicia a digestão das partículas ingeridas. Na maioria das vezes, todo este processo de digestão é muito rápido. Estudos realizados com bactérias marcadas com ^{14}C e fagocitadas por amebas demonstraram que a digestão destes microorganismos se completava em três horas.

Nos moluscos, os hemócitos que circulam livremente são leucócitos tipicamente fagocíticos que podem se agregar em resposta a um trauma (como por exemplo, fratura da concha); fagocitar pequenas partículas (bactérias, protozoários e fungos) e/ou encapsular parasitos (como no caso das larvas de Digenea). Entretanto, nestes animais estes fenômenos podem ser influenciados pela presença de fatores opsônicos da hemolinfa, pela origem da linhagem do caramujo e/ou pela habilidade que o parasito tem em evitar ou inibir a resposta imune do hospedeiro (KNAAP *et al.*, 1987; BAYNE & YOSHINO, 1989; FRYER & BAYNE, 1989; NODA & LOKER, 1989; FRYER & BAYNE, 1990; BAYNE & FRYER, 1994; FRYER & BAYNE, 1996).

Como descrito anteriormente, diversos estudos têm demonstrado que os hemócitos representam uma população celular bastante heterogênea na qual foram identificados dois subtipos celulares: os hialinócitos e os granulócitos. Nos gastrópodes em geral, a subpopulação de granulócitos tem sido considerada como um grupo celular semelhante, morfológica, ultraestrutural e funcionalmente aos macrófagos de mamíferos; sendo portanto rico em lisossomos que contêm muitas das enzimas hidrolíticas. BEZERRA *et al.* (1997) demonstraram que cerca de 80% dos hemócitos, tanto de *B. glabrata* quanto de *B. tenagophylla*, são células fagocíticas com capacidade para incorporar partículas do vermelho neutro, de maneira semelhante aos macrófagos. Nestes animais, as enzimas hidrolíticas também podem ser liberadas na hemolinfa, onde matam e degradam as partículas não fagocitadas ou alteram as características das membranas para que o microorganismo invasor se torne mais susceptível para o reconhecimento e ingestão (FOLEY & CHENG, 1977; CHENG, 1983). Entretanto, quando presentes no lúmen dos lisossomos, tais enzimas atuam em meio ácido. Estudos desenvolvidos por KROSCHINSKI & RENWRANTZ (1988), demonstraram que, de maneira similar ao que ocorre em mamíferos, o pH dos vacúolos digestivos dos hemócitos de *Mytilus edulis* (d'Orbigny, 1846) decrescia durante a fagocitose de leveduras; atingindo 4,5 – 5,0 após 25 minutos. Além disso, estas células têm sido consideradas capazes de produzir espécies oxidativas derivadas do oxigênio, como o superóxido, o peróxido de hidrogênio ou a hidroxila (HARRIS & CHENG, 1975; CHENG & GARRABRANT,

1977; DIKKEBOOM *et al.*, 1987; SMINIA & van der KNAAP, 1987; ADEMA *et al.*, 1997; HAHN *et al.*, 2001a; YOSHINO *et al.*, 2001).

Estudos citológicos e citoquímicos têm sido desenvolvidos com a finalidade de melhor caracterizar o comportamento fagocítico dos granulócitos em moluscos normais e/ou infectados por larvas de trematódeos. CHENG & GARRABRANT (1977) demonstraram que, em *B. glabrata* da linhagem 10-R₂ infectado pelo *S. mansoni*, os granulócitos que participavam da destruição dos esporocistos-mãe continham altos níveis de fosfatase ácida; que persistiam durante todo o processo de encapsulamento. Estes autores determinaram, ainda, que a encapsulação podia ser dividida em dois estágios distintos: o primeiro envolvendo a acumulação de granulócitos ricos em fosfatase ácida; sendo completado 24 horas após a penetração do miracídio e o segundo caracterizado pela gradual desintegração e eliminação do esporocisto e um gradual decréscimo no tamanho do granuloma. Com a regressão do granuloma, a atividade da fosfatase ácida estava aumentada nos granulócitos remanescentes.

Estudos realizados por GRANATH & YOSHINO (1983) demonstraram que tanto em exemplares de *B. glabrata* susceptíveis (linhagem PR) quanto em exemplares de *B. glabrata* resistentes (linhagem 10-R₂), havia uma discreta subpopulação de hemócitos positivos para três enzimas hidrolíticas (fosfatase ácida, esterase não-específica e peroxidase). Contudo, uma diferença significativa na distribuição e abundância destas enzimas foi observada entre os hemócitos de uma mesma linhagem; ficando claro que algumas destas células possuíam a capacidade para sintetizar uma ou nenhuma das três enzimas estudadas. Este estudo demonstrou, também, uma heterogeneidade enzimática entre as duas linhagens. Caramujos 10-R₂ apresentaram conteúdos enzimáticos maiores quando infectados pelo *S. mansoni* enquanto que nos caramujos PR albinos os níveis enzimáticos permaneceram constantes durante todo o curso da infecção; estes achados confirmam as diferenças intra e inter específicas observadas quanto ao caráter resistência ou susceptibilidade.

Usando técnicas histoquímicas para a detecção de sete enzimas (fosfatase ácida, fosfatase alcalina, α -naftil-acetato-esterase, ATPase, peroxidase, 5' nucleotidase e cloroacetato esterase), MCKERRON *et al.* (1985) compararam os hemócitos de *B. glabrata*, presentes tanto no órgão produtor de hemócitos (OPH) quanto nas reações de encapsulamento formadas em torno dos esporocistos de *Echinostoma paraensei* (Lie & Basch, 1967), com os macrófagos epitelióides dos granulomas, monócitos circulantes e polimorfonucleares (PMNs) de pacientes com sarcoidose ou tuberculose. Segundo os autores, a marcação para estas enzimas foi mais intensa nos hemócitos envolvidos nas reações de encapsulamento das larvas de *E. paraensei* do que naqueles presentes no OPH. Além disso, os hemócitos demonstraram as mesmas reações positivas e negativas como observado nos macrófagos de granulomas humanos; exceto para a enzima α -naftil-acetato-esterase que foi menos intensa. Em contraste com as similaridades observadas entre os hemócitos e os macrófagos epitelióides, houve diferenças significativas entre os hemócitos e os PMNs; indicando que estas células não representam um híbrido entre macrófagos e os PMNs, mas uma célula macrófago-semelhante altamente diferenciada.

DIKKEBOOM *et al.* (1984) demonstraram que, em *L. stagnalis*, a fosfatase ácida (AcP), a esterase-não-específica (NSE) e a fosfatase alcalina (AiP) estavam presentes em todos os amebócitos de caramujos juvenis e adultos. Entretanto, foram observadas diferenças para a enzima peroxidase (PO). Todos os amebócitos PO - negativos eram arredondados (menos diferenciados). Em todas as células PO - positivas, o produto da reação foi observado em numerosos grandes grânulos. Nos caramujos juvenis uma baixa porcentagem de células foi positiva e os grânulos que continham a atividade para esta enzima foram menos abundantes do que nos amebócitos dos adultos. Segundo os autores, tais resultados poderiam explicar o fato dos caramujos juvenis serem mais susceptíveis às infecções pelo *Trichobilharzia ocellata* (La Valette, 1855) do que os caramujos adultos. É bem sugerido que o baixo nível da atividade PO em certas linhagens de *B. glabrata* pode ser responsável pela alta susceptibilidade ao *S. mansoni* (GRANATH & YOSHINO,

1983). Nos leucócitos de mamíferos, a peroxidase é tóxica para helmintos (BUYS *et al.* 1984).

Quando comparados aos hemócitos de bivalves (HUFFMAN & TRIPP, 1982; PIPE, 1990) e aos de outros pulmonados (SMINIA & BARENSEN, 1980; MONTEIL & MATRICON-GONDRAN, 1993), os hemócitos de *B. glabrata* demonstram pouca atividade enzimática; sendo o produto estocado em grânulos discretos. ADEMA *et al.* (1992); SMINIA *et al.* (1992) e MONTEIL & MATRICON-GONDRAN (1993) demonstram que a atividade para peroxidase foi extremamente baixa e esta situação estava contrária àquela observada em *L. stagnalis*, *Bulinus natalensis* (Kuester, 1841), *Achatina achatina* (Linnaeus, 1758) e *L. truncatulata*. A ausência de grânulos e do baixo conteúdo enzimático levantou, então, a questão de que os hemócitos de *B. glabrata* possuíam outros mecanismos para suprimir e internalizar organismos e materiais estranhos. É conhecido que os granulócitos e macrófagos de vertebrados produzem radicais tóxicos de oxigênio (ROS). Entretanto, nestes animais a morte do parasito pode ocorrer sem a presença desses metabólitos ou em cooperação com outros mecanismos, sendo mais eficiente (ROSS, 1980; YASDANBAKSH *et al.*, 1987; CAVACINI *et al.*, 1989; KLEBANOFF, 1992).

Embora o oxigênio seja fundamental para os organismos vivos, espécies intermediárias reativas que se formam em suas reações são extremamente prejudiciais aos componentes celulares como lipídios, ácidos nucléicos, proteínas, carboidratos, etc. De acordo com BAYNE *et al.* (2001), a explosão respiratória pelas células fagocíticas e a conseqüente produção de ROS são o resultado da ativação e reunião do complexo NADPH oxidase na membrana plasmática do fagócito. Este complexo enzimático catalisa a produção do ânion superóxido (O_2^-), que serve como primeiro radical na cadeia de produção adicional de espécies reativas do oxigênio: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\bullet), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio molecular (O_2). Devido ao caráter altamente tóxico do radical hidroxila (OH^\bullet), as células utilizam mecanismos para evitar sua formação, eliminando o íon superóxido e o composto peróxido de hidrogênio, sendo que a primeira linha de defesa é enzimática envolvendo as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidases (PO). A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação

que detoxifica o superóxido e a catalase e peroxidase detoxificam H_2O_2 (FELTON & SUMMERS, 1995; ROSEN *et al.*, 1995). Adicionalmente, a maioria dos tipos celulares fagocíticos possui um óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que gera óxido nítrico (NO) a partir de oxigênio molecular e arginina. Embora o NO tenha atividade citotóxica por si só, ele rapidamente reage com o O_2^- para formar uma molécula muito mais reativa, o peroxinitrito ($ONOO^-$).

Nos neutrófilos de mamíferos a maioria do O_2^- produzido é convertido em H_2O_2 (MAKINO *et al.*, 1986) e a maior parte deste, é consumida pela mieloperoxidase (MPO), uma enzima que usa H_2O_2 e o íon cloreto para produzir HOCl, o mais potente antibiótico produzido pelas células de defesa. Assim como nos mamíferos, os hemócitos dos moluscos geram HOCl (SCHLENK, MARTINEZ & LIVINGSTONE, 1991; TORREILLES, GUERIN & ROCH, 1997) e NO (CONTE & OTTAVIANI 1995; TORREILLES & GUERIN, 1999; ARUMUGAM *et al.*, 2000). Desta forma, os hemócitos têm o potencial de produzir tanto moléculas altamente reativas (O_2^- , OH, O_2 , HOCl e $ONOO^-$) quanto de vida relativamente longa (NO e H_2O_2); que diferem em suas propriedades (e.g. habilidade de causar dano ao DNA, peroxidação lipídica, inativação enzimática, etc.). Entretanto, o papel específico de cada uma dessas formas de oxigênio reativo na morte de um patógeno não está muito claro. Em populações humanas, a deficiência na MPO (mieloperoxidase) é um defeito congênito muito comum em crianças e que pode resultar em infecções bacterianas oportunistas e recorrentes. Um aumento na susceptibilidade a infecções fúngicas também foi descrito em estudos desenvolvidos em camundongo MPO-deficientes (ARATANI *et al.*, 1999, 2000). Em *B. glabrata*, a deficiência nesta enzima promove a resistência ao *S. mansoni*. Os hemócitos de *B. glabrata* utilizam H_2O_2 (e não HOCl) para matar os esporocistos. Estudos *in vitro* têm demonstrado que este composto é um agente oxidante muito potente. Enquanto que 300 μ M de HOCl são requeridos para alcançar 100% de mortalidade dos esporocistos, apenas 150 μ M de H_2O_2 são necessários para atingir a mesma porcentagem. Então, em termos de toxicidade, a mieloperoxidase (MPO) tem um papel essencial como enzima detoxicante. Em contrapartida, nos caramujos susceptíveis a atividade da

mieloperoxidase (MPO) impede a morte dos esporocistos porque baixa a quantidade de H_2O_2 .

Estudos *in vitro* têm demonstrado que os parasitos são capazes de modular (KEMP *et al.*, 1980) ou imunossuprimir (CAPRON & CAMUS, 1979) o sistema interno de defesa de seus hospedeiros intermediários. E, em alguns casos, esta interferência parasitária pode atuar tanto contra a resistência natural como sobre a resistência adquirida. A exposição de exemplares *B. glabrata* a uma variedade de espécies de trematódeos, particularmente do gênero *Echinostoma*, como, por exemplo, o *E. paraensei*, resulta em alterações no comportamento dos granulócitos e altera a susceptibilidade deste caramujo á infecção por outras espécies de digenéticos (LIE *et al.*, 1987). LOKER *et al.* (1992) e DeGAFFÉ & LOKER (1998) notaram que os hemócitos de *B. glabrata* expostos aos esporocistos de *E. paraensei* diminuíam sua atividade fagocítica e permaneciam arredondados na presença de produtos excretados por estas larvas. Estudos anteriores já haviam demonstrado que os produtos excretados pelo *S. mansoni* podem estimular os hemócitos a produzirem componentes que inibem outros hemócitos (FRYER & BAYNE, 1990) e que a infecção pelo *Schistosoma* pode estimular o sistema nervoso do caramujo a liberar fatores que suprimem os hemócitos (AMEN & de JONG-BRINK, 1992; DUVAUX-MIRET *et al.*, 1992). Os dados obtidos por CONNORS & YOSHINO (1990) já haviam confirmado a hipótese de que os produtos excretados/secretados pelas larvas do *S. mansoni* tinham uma atividade antioxidante; sendo capazes de reduzir os níveis de O_2^- em hemócitos ativos de *B. glabrata* da linhagem M-line. Em *Staphylococcus aureus* Rosenbach, 1884, por exemplo, a catalase produzida por este microorganismo degrada o H_2O_2 produzido pelo sistema peróxido de hidrogênio – MPO – hialide e impede a formação de pontes dissulfetos entre os aminoácidos cisteína de diversas proteínas estruturais, o que levaria à morte da bactéria.

1.2.3 Fatores Humorais

A morte ou sobrevivência das larvas do *S. mansoni* em seu hospedeiro intermediário, a *B. glabrata*, envolve uma associação dinâmica e complicada entre

este parasito e o sistema interno do molusco. Em caramujos de linhagens resistentes, os hemócitos atuam juntamente com os fatores solúveis da hemolinfa no processo de encapsulamento e destruição das larvas por fagocitose. Entretanto, os mecanismos pelos quais hemócitos e fatores solúveis destroem o parasito ainda não foram completamente elucidados. BAYNE *et al.* (1980a,b) foram os primeiros a desenvolver métodos *in vitro* para avaliar o efeito da hemolinfa de *B. glabrata* sobre o esporocisto primário de *S. mansoni* transformado axenicamente. Nestes estudos, os autores demonstraram que lectinas presentes na hemolinfa destes gastrópodes poderiam mediar o reconhecimento dos parasitos pelas células de defesa.

As lectinas são proteínas complexas multiméricas que possuem vários sítios de ligação; que se ligam especificamente a certos carboidratos presentes na superfície do parasito e que requerem a presença de cátions bivalentes, especialmente o cálcio, para exercer sua função. Uma vez presentes estes cátions servem para estabilizar a conformação destas proteínas e/ou de seus sítios de ligação.

Nos moluscos, as lectinas são sintetizadas pelos hemócitos fagocíticos (=granulócitos) localizando-se na superfície externa da membrana e distribuídas irregularmente. Quando lançadas no plasma imobilizam, através da aglutinação “materiais estranhos” ou podem servir como ponte para diferentes tipos celulares. Em alguns moluscos funcionam também como opsoninas, iniciando e facilitando o processo de fagocitose.

Nos bivalves, as lectinas são compostas por subunidades diferentes capazes de se ligarem a um determinado monossacarídeo ou a um grupo de monossacarídeos com estruturas similares. Como exemplo, temos a lectina da ostra *Pinctada fucata martensii* (Dunker, 1872) que se liga à galactose e a n-acetilgalactosamina com equivalente eficiência. Entretanto, apesar do plasma dos bivalves conter lectinas polireativas, ele também contém lectinas com uma estreita afinidade. No plasma de *Anadara granosa* (Linnaeus, 1758), por exemplo, foi identificada uma lectina que reage especificamente com o ácido idurônico. De modo diferente, as lectinas dos gastrópodes estão constituídas por subunidades de um

único tipo e são fortemente específicas para um certo monossacarídeo. A lectina “achatinia H”, isolada da hemolinfa de *Achatina fulica* Bowdich, 1822, um caramujo africano gigante, se liga especificamente ao ácido 9-0-acetilsialíco. Esta lectina de alta especificidade está sendo usada como marcador de linfoblastos “transformados” na leucemia linfoblástica aguda da infância. Além disso, foi também demonstrado que a concentração de lectinas é maior na hemolinfa dos bivalves. Entretanto, a despeito das diferenças observadas em ambos os grupos, os sistemas de aglutinação são igualmente eficientes (FINSTAD *et al.*, 1974; LOKER *et al.*, 1984; FRYER & BAYNE, 1989; RICHARDS & RENWRANTZ, 1991; YAKOVLEVA *et al.*, 2001).

Estudos desenvolvidos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que o pré - tratamento de esporocistos por lectinas exógenas pode provocar a morte destas formas larvais pelos hemócitos de caramujos susceptíveis (BOSWELL & BAYNE, 1986). Segundo BAYNE (1990), após a ligação das lectinas com “o não - próprio”, ocorre uma mudança conformacional das mesmas, levando à ativação dos hemócitos. Tal mecanismo de reconhecimento do “não - próprio” foi descrito em *L. stagnalis*, *B. glabrata* e *Helix pomatia* (Linnaeus, 1758). Posteriormente, FRYER & BAYNE (1996) confirmaram estes achados demonstrando que partículas de poliestireno tratadas com fatores solúveis da hemolinfa de linhagens resistentes de *B. glabrata* eram significativamente mais fagocitadas pelos hemócitos de linhagens susceptíveis do que as partículas não-tratadas.

JOHNSTON & YOSHINO (1996) demonstraram que, lectinas similares às da *Conavalia ensiformis* (ConA), *Erythrina corallodendrom* (ECA), *Glycine Max* (SBA), *Tetragonolobus purpureas* (TPA) e *Triticum vulgare* (WGA), estavam presentes na hemolinfa de *B. glabrata* e ligavam-se às proteínas presentes na superfície do esporocisto do *S. mansoni*. Vários autores têm demonstrado a presença de carboidratos, especialmente glicoproteínas e glicolipídios, como os principais componentes do tegumento de miracidios e esporocistos de *S. mansoni* (ZELCK & BECKER, 1990; UCHIKAWA & LOKER, 1991). ZELCK & BECKER (1990) sugerem que diferenças na susceptibilidade de espécies ou linhagens de *Biomphalaria* à infecção por *S. mansoni* podem estar relacionadas a variações

quantitativas e/ou qualitativas de determinadas lectinas. Mais recentemente, um grupo de proteínas, com homologia ao fibrinogênio e atividade de lectina, foi identificado na hemolinfa de *B. glabrata*, sendo que sua expressão aumenta após a infecção do molusco com *E. paraensei*. Esta proteína tem a capacidade de precipitar antígenos de excreção/secreção do parasito e os autores sugerem que, além de participar do reconhecimento, estas proteínas poderiam ser importantes inibidores de mecanismo de evasão do parasito.

Além das lectinas, outras proteínas, com função homóloga aos mediadores celulares já descritos em vertebrados, têm sido identificadas na hemolinfa de muitos invertebrados, podendo estar envolvidas na ativação dos hemócitos durante todo o período da infecção por trematódeos digenéticos.

OTTAVIANI *et al.* (1993) relataram a presença de uma variedade de proteínas semelhantes às citocinas pró - inflamatórias, como a interleucina-1 alfa (IL-1 α), a interleucina-1 beta (IL-1 β), a interleucina-2 (IL-2), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), em hemócitos de duas espécies de moluscos - *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758) e *Viviparus ater* (Cristofori & Jan, 1832), estando estas presentes somente nos hemócitos com atividade fagocitária. Nestes animais, a resposta inflamatória também parece desempenhar um papel importante no sistema interno de defesa (ROWLEY, 1996).

Moléculas semelhantes à IL-1, ou com atividade imunológica, funcional e/ou biológica semelhantes à IL-1 dos vertebrados, também já foram detectadas ou isoladas em hemócitos de camarões de água doce (BECK & HABICHT, 1986), insetos (SCHARRER *et al.*, 1996), mexilhões (HUGHES *et al.*, 1990), caramujos (OTTAVIANI *et al.*, 1993, 1995) e tunicados (BECK *et al.*, 1989). CHERBAS (1973), por exemplo, já havia descrito em larvas de *Samia cynthia* (Butler, 1878), *Antheraea polyphemus* (Cramer, 1775), e *Hyalophora cecropia* (Linnaeus, 1758) a haemoquinina: uma proteína de 50 Ka que quando injetada em insetos adultos interfere no comportamento dos hemócitos que começam a se tornar amebóides e adesivos. BECK *et al.* (1986, 1989) demonstraram que o plasma ou extratos de

células provenientes de equinodermos e tunicados estimulam a proliferação de timócitos em camundongos. Esta atividade estimulatória foi atribuída às moléculas de aproximadamente 20 kDa, que eram secretadas em três formas isoelétricas (pIs 4,8, 5,4 e 7,5). Moléculas de IL-1-símile também foram capazes de estimular a proliferação de fibroblastos em mamíferos, aumentar a síntese protéica, induzir a produção de prostaglandina E₂, aumentar a permeabilidade vascular em coelhos e tiveram atividade citotóxica para células humanas da linhagem A375 (BECK *et al.*, 1989; 1991).

Em moluscos, a presença de proteínas semelhantes à IL-1 têm sido associada à ativação e proliferação celular (HUGHES *et al.*, 1991; RAFTOS *et al.*, 1991, 1992), ao aumento da fagocitose (BURKE & WATKINS, 1991; BECK *et al.*, 1993) e da produção de superóxido (GRANATH *et al.*, 1994). Em *B. glabrata*, a infecção pelo *S. mansoni* afeta seletivamente os níveis plasmáticos desta molécula. Caramujos resistentes apresentam níveis de IL-1 significativamente mais elevados do que aqueles de linhagens susceptíveis (GRANATH *et al.*, 1994). Posteriormente, foi verificado que a inoculação do recombinante humano da interleucina-1 (rhIL-1) em exemplares de *B. glabrata* susceptíveis, resultava em uma rápida ativação dos hemócitos e produção de superóxido equivalentes aos níveis encontrados em caramujos resistentes e conseqüentemente, resultando em uma redução altamente significativa do número de cercárias produzidas por estes caramujos (CONNORS *et al.*, 1995). Mais tarde, estes autores (CONNORS *et al.*, 1998) demonstraram que a diminuição na produção de cercárias, observada em *B. glabrata* susceptíveis inoculados com rhIL-1 é conseqüência da elevada mortalidade observada em esporocistos primários. Embora a hemolinfa livre de células recolhida de caramujos tratados com rhIL-1 tenha sido capaz de matar esporocistos de *S. mansoni*, testes *in vitro* mostram que rhIL-1 não apresenta efeito tóxico, sugerindo que no processo de destruição do parasito possa ocorrer a produção de fatores citotóxicos solúveis que atuem independentemente do contato celular.

OTTAVIANI *et al.* (1995) já haviam relatado uma profunda inter - relação entre proteínas homólogas à citocina e à resposta imune de invertebrados, principalmente nos moluscos. Segundo estes autores, diferentes citocinas (IL-1 α , IL-2 e TNF- α)

estimulam significativamente a mobilidade, aumentam a atividade fagocitária dos hemócitos, e além disso provocam a indução da óxido nítrico sintetase. Estes resultados sugerem que citocinas podem ser importantes moléculas ancestrais, funcionalmente conservadas, que também mantiveram a sua pleiotropicidade redundante no modo de ação, e a alta promiscuidade dos seus receptores durante evolução. Apesar destas proteínas apresentarem semelhanças funcionais com citocinas de vertebrados, fazem-se necessários estudos mais sofisticados, para estabelecer o grau de homologia entre estas proteínas.

Especificamente em *B. glabrata*, BOYER *et al.* (1994) detectaram a presença de proteína com imunoreatividade de TNF- α humana em grânulos citoplasmáticos de alguns hemócitos. Na hemolinfa destes caramujos também foi identificada por "Western Blot", a presença de uma proteína de 53 kDa imunoreativa a anticorpos anti-TNF- α , sendo que, sua quantificação através da técnica de ELISA, demonstra que a quantidade desta proteína diminui durante a infecção por *S. mansoni*. Apesar da homologia desta molécula com TNF- α humana, seu papel na regulação da resposta funcional e na relação parasito hospedeiro ainda não foi esclarecido.

1.2.4 Reações Teciduais e Hemolinfa Periférica

Como descrito anteriormente, o sistema interno de defesa dos gastrópodes (SIDG), assim como o dos bivalves, é constituído por componentes presentes na hemolinfa, equivalente ao sangue dos vertebrados. Esta hemolinfa é constituída por elementos celulares (hemócitos ou amebócitos) e humorais (o plasma: fluido rico em lisinas, fatores antimicrobianos e substâncias com ação semelhante as linfocinas). Como os moluscos possuem um sistema semi-aberto, a hemolinfa é bombeada pelo coração chegando aos espaços intersticiais de vários órgãos; onde os hemócitos podem ser observados movendo-se livremente.

Em gastrópodes, os hemócitos são produzidos no OPH (Órgão Produtor de Hemócitos), localizado entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto. Em repouso, o órgão se caracteriza como uma estrutura pequena, pouco espessa ou conspícua. Entretanto, em caramujos infectados pelo *Echinostoma*, o OPH apresenta-se hiperplasiado e/ou hipertrofiado; observando-se um aumento da atividade mitótica. Respostas similares ocorrem após infecção com *Ribeiroia marini* (Faust & Hoffman, 1934) (SULLIVAN *et al.*, 1982) ou *S. mansoni* (SULLIVAN *et al.*, 1984). Estudos recentes (SULLIVAN *et al.*, 2004) mostraram um aumento de mitoses nas células desta região, entre 24 - 72 h após inoculação de antígenos de miracídeos ou cercárias de *S. mansoni*.

O OPH lança, na circulação tanto hemócitos maduros, quanto ameboblastos secundários promovendo, conseqüentemente, um aumento de células totais na hemolinfa periférica. Contudo, o incremento no número de mitoses nem sempre está associado ao encapsulamento de parasitos. Moluscos de linhagens susceptíveis também são capazes de produzir hemócitos na presença do estímulo parasitário. Contudo, estas células muitas vezes são afetadas por produtos excretados - secretados pelos esporocistos que interferem com a síntese e secreção de proteínas; bem como a capacidade de migração destas células através dos tecidos (LODES & YOSHINO, 1990). Nestes animais, as respostas teciduais estão ausentes, discretas e/ou moderadas e a destruição do parasito não ocorre de maneira eficiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar os mecanismos envolvidos na resistência ao *S. mansoni* apresentados pela *B. glabrata* (Linhagem: Feira de Santana, Bahia – Brasil), visando uma melhor caracterização, morfológica e funcional, dos hemócitos presentes nos tecidos e na hemolinfa circulante e investigando a correlação entre estes dois setores.

2.2 Manuscrito I

Correlacionar o número e o grau de atividade dos hemócitos periféricos, com a intensidade e o tipo de reação histopatológica presente em *B. glabrata* submetida à infecção experimental pelo *S. mansoni*.

2.2.1 Objetivos Específicos

- Acompanhar as alterações ocorridas na hemolinfa através da contagem total e diferencial de hemócitos periféricos em caramujos normais, normais-irradiados (4.000 rads/Césio 137) e infectados pelo *S. mansoni*;
- Estudar em cada grupo acima a capacidade fagocítica dos hemócitos periféricos após estimulação pelo Zymozan A (*Saccharomyces cerevisiae*) ou pela tinta nanquim;
- Analisar através de cortes histológicos as reações teciduais, estimuladas pelo *S. mansoni*, em exemplares de *B. glabrata* da linhagem Feira de Santana.

2.3 Manuscrito II

Analisar a ultraestrutura e histoquímica dos hemócitos teciduais após infecção pelo *S. mansoni*.

2.3.1 Objetivos Específicos

- Comparar as características ultraestruturais e histoquímicas de hemócitos em repouso e nas suas várias fases de atividade.

3 MANUSCRITO I

32

Patologia da Infecção pelo *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria glabrata*.

(Tentativa de correlação entre as alterações nos tecidos e na hemolinfa)

Claudia Maria da Cunha Borges, Carine Machado Azevedo, Zilton A. Andrade.

Laboratório de Patologia Experimental (Lapex), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
– FIOCRUZ. Rua Waldemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, BA, Brasil.

RESUMO

A *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), um dos principais hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, apresenta uma patologia variada face a este trematódeo, na dependência de diversos fatores que levam à maior ou menor reatividade de sua principal célula de defesa – o hemócito. Esta célula está presente no interior dos tecidos e na hemolinfa circulante, mas pouco se sabe como os hemócitos circulantes refletem o que se passa no interior dos tecidos.

Na presente pesquisa foram utilizados caramujos jovens e adultos, muito susceptíveis ao *S. mansoni* e se fez à correlação dos achados histopatológicos e a eliminação de cercárias, com o número de hemócitos circulantes e a sua capacidade de incorporar o Zimozan A (fagocitose). Verificou-se que, os caramujos com muitos parasitos nos tecidos, exibindo discreta a moderada reatividade celular, não revelam modificações significativas no número ou no grau de atividade (capacidade fagocítica) dos hemócitos circulantes, nem na relação granulócitos/hialinócitos, quando comparados aos controles intactos ou após serem submetidos à radiação ionizante. Estes dados, embora necessitando serem repetidos em caramujos menos susceptíveis ao *S. mansoni*, sugerem que os elementos celulares da hemolinfa refletem pobremente a patologia da esquistossomose nos tecidos da *B. glabrata*.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria glabrata*; hemócitos; atividade fagocítica; histopatologia.

ABSTRACT

Biomphalaria glabrata is one of the most important intermediate hosts for *Schistosoma mansoni*. It exhibits variable responses when infected by that trematoda, depending upon several factors that may induce different degrees of reactivity of the hemocytes, which are the principal cells of defence. The hemocytes are present in two compartments: the interior of the tissues, and the circulating hemolymph, but little is known about how circulating peripheral hemocytes reflect the changes going on within the tissues. The present research used young snails, highly susceptible to *S. mansoni*, and correlated histological changes and cercarial emission, with the number of circulating hemocytes and their phagocytic activity toward Zymosan. Snails with numerous multiplying parasitic forms in the tissues, accompanied by mild to moderate cellular response, failed to show significative differences in the number and functional degree of activity of the hemolymph hemocytes, when compared with intact or ionizing-irradiated controls. Also, there occurred no modification of the granulocyte/hyalinocyte rate. These data, although needing confirmation in snails presenting different degrees of susceptibility/resistance, suggest that hemocytes in circulating hemolymph do not adequately reflect the changes going on within the tissues of *S. mansoni*-infected *B. glabrata*.

Key Words: *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria glabrata*; hemocytes; phagocytic activity; histopathology

INTRODUÇÃO

As células de defesa dos caramujos são coletivamente denominadas de hemócitos. Em *B. glabrata*, por exemplo, que está entre os principais hospedeiros intermediários do *S. mansoni*, os hemócitos são encontrados em duas áreas distintas: na hemolinfa circulante e nos espaços intersticiais. Estas duas áreas se comunicam, mas ainda não existem informações disponíveis suficientes de como as alterações de defesa envolvendo os hemócitos no interior dos tecidos se refletem, não só na hemolinfa como um todo, mas particularmente na população de hemócitos circulantes. Esta informação seria desejável para que se tenham dados de patologia comparada, bem como um melhor conhecimento da origem, função e destino dos hemócitos e a possibilidade de monitoramento dos processos de defesa através de estudos da hemolinfa, com finalidades experimentais.

Em alguns exemplares de *B. glabrata*, por exemplo, há uma grande proliferação de hemócitos nos espaços intersticiais dos túbulos renais, glândula digestiva e ovoteste, órgãos mais freqüentemente parasitados durante a infecção pelo *S. mansoni*. Em contrapartida, as formas larvais deste trematódeo podem proliferar livremente nos exemplares altamente susceptíveis (tolerantes). Um estudo prévio realizado no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ (BA) demonstrou que, em alguns casos, esta aparente tolerância inicial poderia ser revertida em fases mais tardias da infecção. Animais que estavam eliminando um grande número de cercárias demonstraram intensa proliferação de hemócitos, com formação de lesões encapsulantes em torno de esporocistos e cercárias degenerados, quando sacrificados 142 dias pós-infecção; sugerindo a existência de um tipo de imunidade adaptativa ou adquirida. Na maior parte destes casos não se sabe como estas mudanças de reatividade poderiam repercutir na hemolinfa (LEMOS & ANDRADE, 2001).

Estudos desenvolvidos por ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980) demonstraram um aumento no número de hemócitos circulantes em exemplares de *B. glabrata* com 4 e 6 semanas de infecção pelo *S. mansoni*. Similarmente, MOUNKASSA & JOURDANE (1990) demonstraram que, em exemplares *B. glabrata*

infectados pelo *Echinostoma liei* (= *Echinostoma caproni*), este aumento no número de hemócitos circulantes era ainda mais significativo. Estes autores obtiveram, através de contagens individuais, uma média de 300 hemócitos/mm³ em exemplares com 20 dias de infecção, enquanto nos controles a média era de 199 hemócitos/mm³.

Outros tipos de estresse também têm sido identificados como estimulantes e/ou inibidores para os hemócitos. Contudo, estes estudos não envolveram o monitoramento da resposta hemocítica durante as diferentes fases da parasitose, nem uma correlação com os aspectos histopatológicos. STUMP & GILBERTSON (1978) demonstraram que a densidade de hemócitos circulantes em duas linhagens distintas de *B. glabrata* estava correlacionada positivamente com a idade. DIKKEBOOM *et al.* (1984) obtiveram os mesmos resultados em *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). Do mesmo modo, MICHELSON & DUBOIS (1975) verificaram haver uma associação positiva entre certos parâmetros químicos da hemolinfa e o tamanho e a linhagem do molusco. Em seus estudos, estes autores foram capazes de verificar um aumento de proteínas plasmáticas em caramujos de maior tamanho. Entretanto, FENG (1965) demonstrou não haver uma associação entre o número de hemócitos e o tamanho em *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). Contudo, uma correlação positiva foi demonstrada, pelo mesmo autor, entre o número de hemócitos e a temperatura da água na qual os animais eram mantidos. FENG (1965) estabeleceu que o número de hemócitos era afetado pelo calor. Um aumento no número de hemócitos também pode estar associado ao decréscimo de tensão do oxigênio, à extração da hemolinfa e, em alguns casos, à lesão da concha.

O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de correlacionar o número e o grau de atividade dos hemócitos periféricos, com a intensidade e tipo de reação histopatológica presente em *B. glabrata* submetida à infecção experimental pelo *S. mansoni*. As mesmas técnicas foram também aplicadas a dois grupos controles: (1) exemplares normais, não infectados; (2) exemplares normais, submetidos à radiação ionizante.

MATERIAIS E MÉTODOS

A. Caramujos e Parasitos

Foram utilizados exemplares juvenis e adultos da espécie *B. glabrata* provenientes de Feira de Santana (FS), BA. Esta é uma colônia mantida há 20 anos no moluscário do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM-FIOCRUZ) e utilizada na rotina de manutenção do ciclo *S. mansoni*. Esses moluscos foram colocados em frascos individuais contendo 180 mL de água desclorada e alimentados com alface e ração *ad libitum*.

Nos experimentos foram utilizados miracídios da cepa FS (Feira de Santana, Andrade & Sadigursky, 1985), a qual é mantida há 20 anos no Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) por passagens sucessivas em camundongos suíços e/ou hamsters.

Os seguintes grupos, cada um com dez exemplares, foram considerados:

1. Caramujos normais – medindo entre 8 mm e 14 mm;
2. Caramujos normais e irradiados pelo Césio 137(4.000 rads) – com 12 a 13 mm;
3. Caramujos infectados – de 12 a 13 mm.

B. Infecção

Cada caramujo (grupo 3) foi exposto individualmente a 20 miracídios de *S. mansoni* obtidos a partir de ovos colhidos do fígado de camundongos e/ou hamsters com no mínimo 50 dias da exposição cercariana. Um total de 10 animais foi utilizado para este grupo experimental.

Depois de comprovada a infecção, foi feita a retirada do fígado, o qual foi homogeneizado em um tamis (GRANUTEST – USBS 40), com abertura de 0,42 mm – número 35, na presença de pequena quantidade de salina à 0,85%. O material foi colocado em um cálice de sedimentação e levado a geladeira por 50 minutos (2 x). Decorrido este tempo desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se água destilada ao recipiente, despejando-se 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 alumínio, 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 (24 poços); onde foi acrescentado um pequeno volume de água, o suficiente para que cada animal ficasse totalmente submerso.

C. Verificação da Taxa de Infecção

A taxa de exemplares positivos foi determinada através da quantificação de cercárias eliminadas por cada caramujo (grupo 3); entre o período de 30 a 63 dias pós-infecção. Os animais foram colocados individualmente em frascos contendo 5mL de água desclorada e expostos a um foco de luz (3 lâmpadas de 60W), por 2 horas. Após exposição, os caramujos foram removidos do frasco e as cercárias presentes em 1mL de água foram coradas em lugol, colocadas em placas escavadas e contadas em lupa (LEICA ZOOM 2000). Os animais positivos foram transferidos para novos frascos de vidro e mantidos no escuro até o próximo exame ou até o momento do sacrifício.

Os caramujos infectados foram classificados de acordo com o número de cercárias eliminadas: o grupo que eliminou de 01 a 10 cercárias foi considerado muito pouco susceptível; 50 a 150 cercárias como susceptível e 150,1 a 500, muito susceptível (FRANDSEN, 1979).

D. Irradiação dos Caramujos

Sessenta caramujos normais foram expostos a 4.000 rads obtidos do céσιο 137 (IBL 937C Irradiador, Type H, Cis Bio International, Gif-Sur Yvette, France). Dez animais/grupo foram sacrificados e o número de hemócitos circulantes contados, 24, 48 e 72 horas após a irradiação.

E. Análise dos Hemócitos

- Contagem de Células

A avaliação numérica dos hemócitos foi realizada em todos os grupos experimentais (1,2,3). A hemolinfa de 10 animais/grupo foi individualmente coletada. A concha de cada caramujo foi limpa em álcool a 70%, seca em papel filtro e então lavada três vezes em solução contendo 400 μ L de ourotetra (antibiótico de uso veterinário) diluído em 250 mL de água desclorada. Cada lavagem foi feita por 30 minutos.

A concha foi então perfurada com uma agulha 26-G 1/2 próximo à região das glândulas digestivas e a hemolinfa extravasada foi coletada e transferida para tubos siliconizados de 5mL; sendo mantida a 4°C até o momento do uso para prevenir sua coagulação e aderência dos hemócitos. Exemplares de *B. glabrata* adultos (12 – 14 mm) forneceram aproximadamente 100 μ L de hemolinfa e os jovens com 8 – 11 mm de diâmetro forneceram aproximadamente 30 μ L de hemolinfa. Após sedimentação dos pequenos fragmentos da concha por 10 minutos, a hemolinfa foi transferida para novos tubos siliconizados e usada para quantificação dos hemócitos. A contagem total e diferencial dos hemócitos foi realizada em câmara de Neubauer usando-se 10 μ L do total de hemolinfa coletada de cada caramujo e diluída 1/10 em PBS (solução tampão fosfato) contendo vermelho neutro a 1% (Sigma). Neste estudo, as células coradas em vermelho foram identificadas como granulócitos e as não coradas como hialinócitos (BEZERRA *et al.*, 1997).

- Avaliação da Atividade Fagocítica

A análise da atividade fagocítica dos hemócitos foi também realizada em todos os grupos (1,2,3). Em amostras de hemolinfa, contendo 10⁵ células + fatores solúveis da hemolinfa foram adicionados a 40 μ L de meio RPMI - 1640 na presença do Zimozan A (0,624 mg/mL) (Sigma, lote 092K11240) ou na presença de tinta nanquim diluída em RPMI - 1640 (1/1000) e incubadas por 3 horas em banho-maria a 37°C. Após este período, 20 μ L de MTT [3-(4,5 dimetiltetrazolium bromide) Sigma, lote 66H5033] (5mg/mL de PBS, pH 7.2) foram adicionados e os tubos incubados em banho-maria a 37°C por mais 2 horas. Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução

de isopropanol-HCl 0,04 N, e estes foram homogeneizados em agitador automático individual (Vortex-Genie-cat. 12-812), centrifugados e os sobrenadantes levados ao espectrofotômetro (Hitachi: U-2000) no comprimento de onda 570 nm. Para calibrar o espectrofotômetro foi utilizado como padrão meio RPMI, MTT e isopropanol-HCl 0,04 N.

- Análise Histológica

Para o estudo histológico, os animais foram anestesiados com cristais de mentol por 4 horas antes de serem removidos da concha (BARBOSA et al., 1960). A parte mole foi fixada em líquido de Bouin por 5 horas e transferidas para o álcool a 70%. Os exemplares foram então desidratados em álcool, clarificados em xilol, embebidos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina/eosina, ácido periódico de Schiff e pelo método do sÍrius-vermelho para o tecido conjuntivo.

A análise histopatológica foi realizada aleatoriamente por dois observadores independentes. Os animais foram estudados de acordo com os seguintes critérios: três regiões foram selecionadas para análise em particular, as porções sacular e tubular do rim, as glândulas digestivas e o ovoteste. Dois elementos básicos foram quantificados: a reação celular e os elementos parasitários. As reações teciduais examinadas foram classificadas como:

A) **Difusa**: proliferação de hemócitos pelos espaços intersticiais dos órgãos estudados (figuras 03 e 04);

B) **Focal**: proliferação de hemócitos em torno dos parasitos formando estruturas concêntricas frouxas, às vezes simulando estruturas granulomatosas vista nos tecidos de mamíferos (figuras 05 e 06).

Os resultados obtidos permitiram classificar os animais como:

1) **Tolerantes (-)**: animais com intensa proliferação de parasitos, na ausência quase total de reação histopatológica (figura 01);

2) **Reativos (+)**: animais com proliferação de parasitos e discreta reação tecidual (figura 02);

3) **Reativos (++)**: animais com proliferação de parasitos e moderada reação tecidual (figura 03);

4) **Reativos (+++)**: animais com proliferação de parasitos e intensa reação tecidual (figura 04).

F. Análise Estatística

O método estatístico empregado para a contagem de hemócitos e atividade fagocítica foi à análise One-Way (ANOVA) e como pós-teste o Neuman-Keuls Multiple Comparison Test.

RESULTADOS

A. Taxa de Infecção

A quantificação de cercárias eliminadas demonstrou que os caramujos da linhagem estudada (FS=Feira de Santana) representam um grupo de exemplares que, segundo FRANDSEN (1979), podem ser considerados como susceptíveis (50 - 150 cercárias); onde 80% mostraram-se positivos. Através da análise estatística não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias obtidas nos diferentes dias de sacrifício. Entretanto, observou-se que em alguns exemplares a taxa de eliminação era nula ou inferior à apresentada pelo grupo como um todo; contribuindo para que o desvio padrão fosse alto em cada ponto como observado na figura 07.

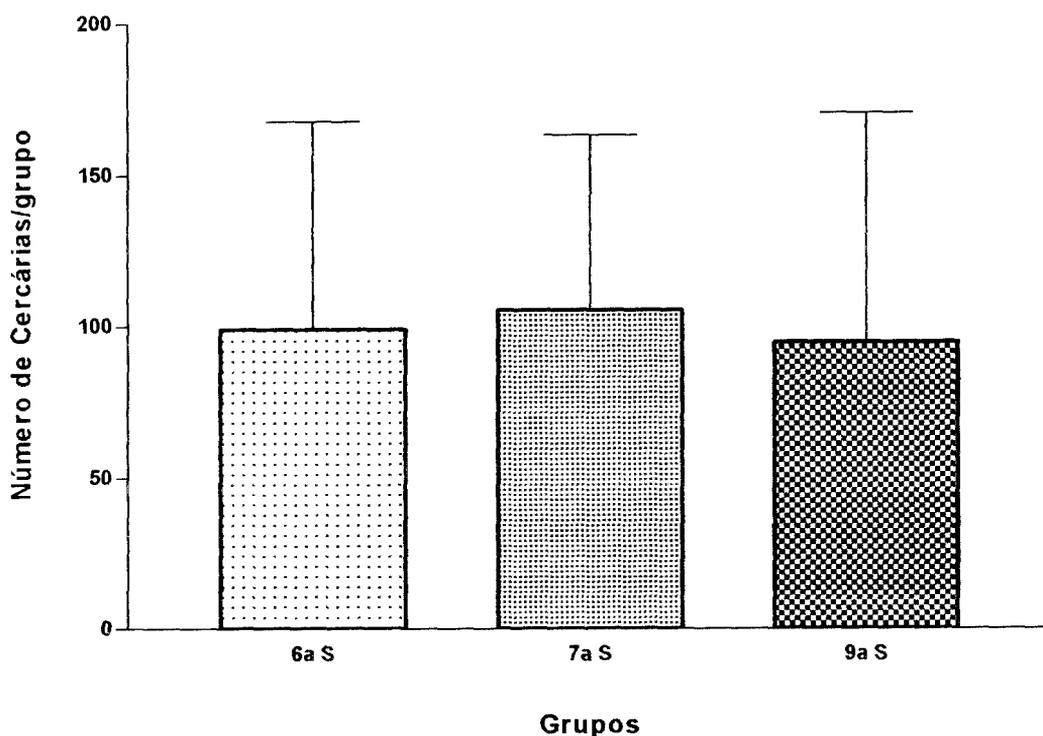


Figura 07: Média de cercárias eliminadas em cada ponto de sacrifício. (n=10 por ponto; S= semana pós-exposição).

B. Análise dos Hemócitos

- Contagem de Células e Atividade Fagocítica

A contagem total de hemócitos periféricos realizada em caramujos normais demonstrou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,001$) entre os exemplares juvenis (8 – 11 mm) e os adultos (12 -14 mm) (tabela 1 e figura 08). Nos caramujos normais de 13 mm, o número total de células obtidas foi maior quando comparado com os demais exemplares. Ao contrário, estas diferenças não foram observadas no grupo 2; que estava constituído por caramujos normais irradiados e sacrificados 24, 48 e 72 h (tabela 2 e figura 09).

A análise estatística realizada no grupo 3 demonstrou que os animais sacrificados na 6ª semana pós-infecção apresentaram um número de hemócitos periféricos totais maior do que os normais, os normais irradiados (24 h) e os sacrificados na 7ª semana ($p < 0,05$). Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a 6ª e 9ª semana pós-infecção (tabela 2 e figura 09).

A avaliação da atividade fagocítica face ao Zimozan A demonstrou um aumento gradual no grupo 2. Em contrapartida, diferenças estatisticamente significantes foram observadas somente entre os animais normais e os sacrificados 24 h após irradiação (4.000 rads) ($p < 0,001$). No grupo 3, os animais de 6ª semana demonstraram menor atividade fagocítica quando comparados aos demais sacrificados na 7ª e 9ª semanas. Estas diferenças foram mantidas entre o grupo normal x 6ª semana e o grupo normal x 9ª semana ($p < 0,001$); sendo menores nestes dois grupos de infectados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a taxa de fagocitose de animais normais e os sacrificados na 7ª semana pós-infecção (figura 10).

TABELA 01: Contagem total e diferencial de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* normais com diferentes tamanhos.

Grupo Experimental	Total de Hemócitos ($10^5/\text{mm}^3$)	Granulócitos	Hialinócitos		
			%	%	
8 mm (n=10)	1,39 +/- 0,07	1,13 +/- 0,11	81,29	0,26 +/- 0,06	18,71
9 mm (n=10)	1,10 +/- 0,08 ^a	0,87 +/- 0,11	79,09	0,23 +/- 0,05	20,91
10 mm (n=10)	0,66 +/- 0,09	0,47 +/- 0,06	71,21	0,19 +/- 0,04	28,79
11 mm (n=10)	1,15 +/- 0,12 ^a	0,89 +/- 0,10	77,39	0,26 +/- 0,04	22,61
12 mm (n=10)	1,81 +/- 0,09 ^b	1,48 +/- 0,06	81,76	0,33 +/- 0,06	18,24
13 mm (n=10)	1,97 +/- 0,06 [*]	1,60 +/- 0,03	81,21	0,37 +/- 0,05	18,79
14 mm (n=10)	1,84 +/- 0,08 ^b	1,46 +/- 0,04	79,34	0,39 +/- 0,06	20,66

Os valores expressos em cada coluna representam a média e o desvio padrão de cada grupo.

* Média de células maior que os demais grupos.

^{a,b} Grupos que não diferem estatisticamente ($p > 0,05$)

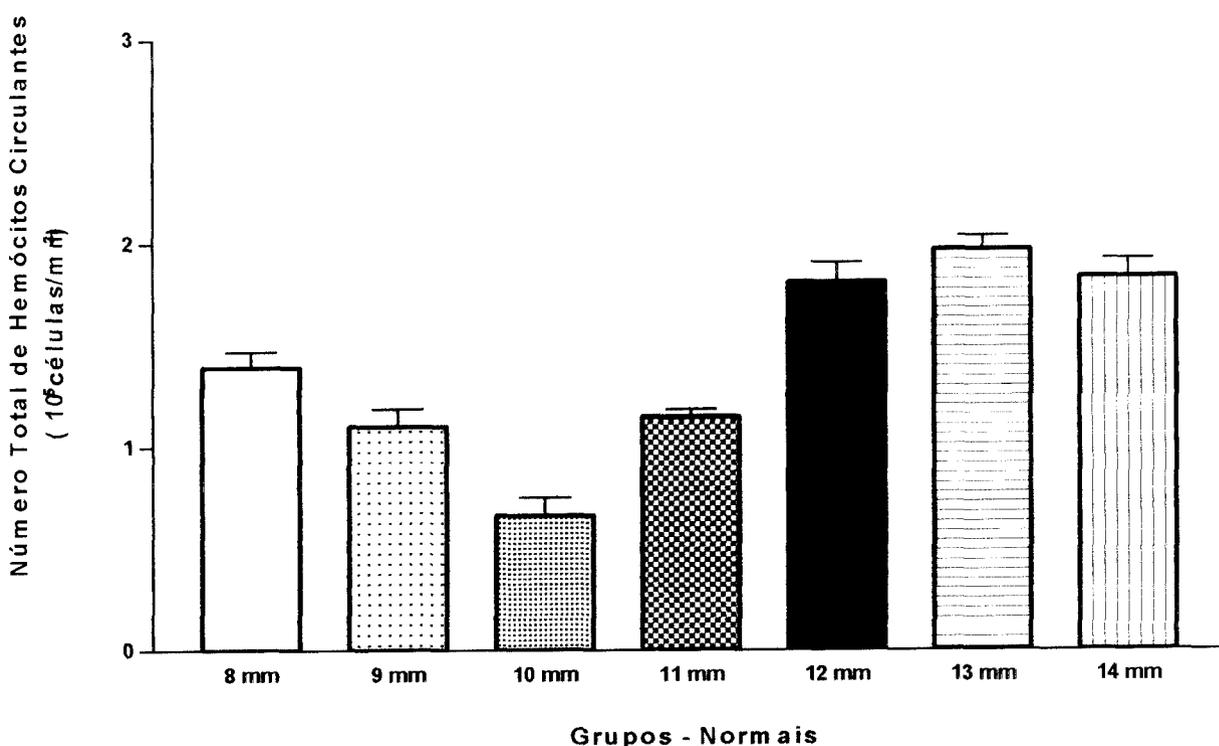


Figura 08: Média de hemócitos totais circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* normais com diferentes tamanhos. $p < 0,001$. (n=10 por ponto; amostra = 10uL).

TABELA 02: Contagem total e diferencial de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* normais, normais irradiados (4.000 rads – césio 137) e infectados pelo *S. mansoni* sacrificados na 6^a, 7^a e 9^a semanas após a exposição a 20 miracídios.

Grupo Experimental	Total de Hemócitos ($10^5/\text{mm}^3$)	Granulócitos	Hialinócitos	
			%	%
Normal (n=10)	1,83 +/- 0,11	1,58 +/- 0,12	86,33	0,25 +/- 0,05
Irradiado (24 h) (n=10)	1,89 +/- 0,07	1,55 +/- 0,08	82,01	0,35 +/- 0,04
Irradiado (48 h) (n=10)	2,12 +/- 0,14	1,69 +/- 0,08	79,71	0,43 +/- 0,06
Irradiado (72 h) (n=10)	2,01 +/- 0,05	1,66 +/- 0,07	82,58	0,35 +/- 0,07
6 ^a Semana (n=10)	2,70 +/- 0,61 ^a	2,07 +/- 0,54	76,66	0,63 +/- 0,11
7 ^a Semana (n=10)	1,69 +/- 0,77	1,30 +/- 0,56	76,92	0,39 +/- 0,22
9 ^a Semana (n=10)	2,12 +/- 1,26	1,54 +/- 0,88	72,64	0,58 +/- 0,38

Os valores expressos em cada coluna representam a média e o desvio padrão de cada grupo.

^a Média de células que difere dos grupos normal ($p < 0,05$), normal irradiado (24 h) ($p < 0,05$) e 7^a semana ($p < 0,01$).

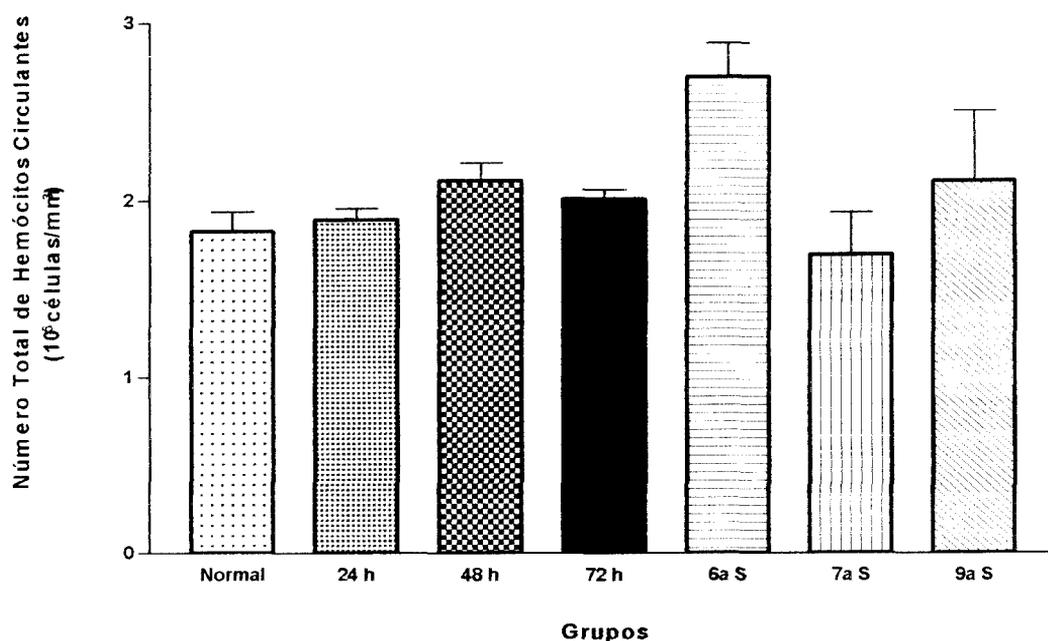


Figura 09: Média de hemócitos totais circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* normais, normais irradiados (4.000 rads – césio 137) (24h, 48h, 72h) e infectados pelo *S. mansoni* (sacrificados na 6^a, 7^a e 9^a semanas após exposição a 20 miracídios); (n=10 para cada ponto; amostra = 10uL); (h = horas; S= semana pós-exposição).

TABELA 03: Avaliação da atividade fagocítica contra o zimozan A e tinta nanquim em hemócitos circulantes de *B. glabrata* normais, normais irradiados com 4.000 rads-césio 137 e infectados pelo *S. mansoni* e sacrificados na 6^a, 7^a e 9^a semanas após exposição a 20 miracídios.

Grupo Experimental	Atividade Fagocítica contra o Zimozan A Absorbância (570 nm)	Atividade Fagocítica contra a Tinta Nanquim Absorbância (570 nm)
Normal (n=10)	0,366 +/- 0,014 ^a	0,191 +/- 0,009
Irradiado (24 h) (n=10)	0,332 +/- 0,016 ^b	0,171 +/- 0,009
Irradiado (48 h) (n=10)	0,350 +/- 0,016 ^a	0,181 +/- 0,007
Irradiado (72 h) (n=10)	0,373 +/- 0,019 ^{a,c}	0,193 +/- 0,013
6 ^a Semana (n=10)	0,276 +/- 0,030	0,148 +/- 0,010
7 ^a Semana (n=10)	0,370 +/- 0,010 ^{a,c}	0,192 +/- 0,010
9 ^a Semana (n=10)	0,324 +/- 0,020 ^b	0,169 +/- 0,010

Os valores expressos em cada coluna representam a média e o desvio padrão de cada grupo.

^{a,b,c} Grupos que não diferem estatisticamente.

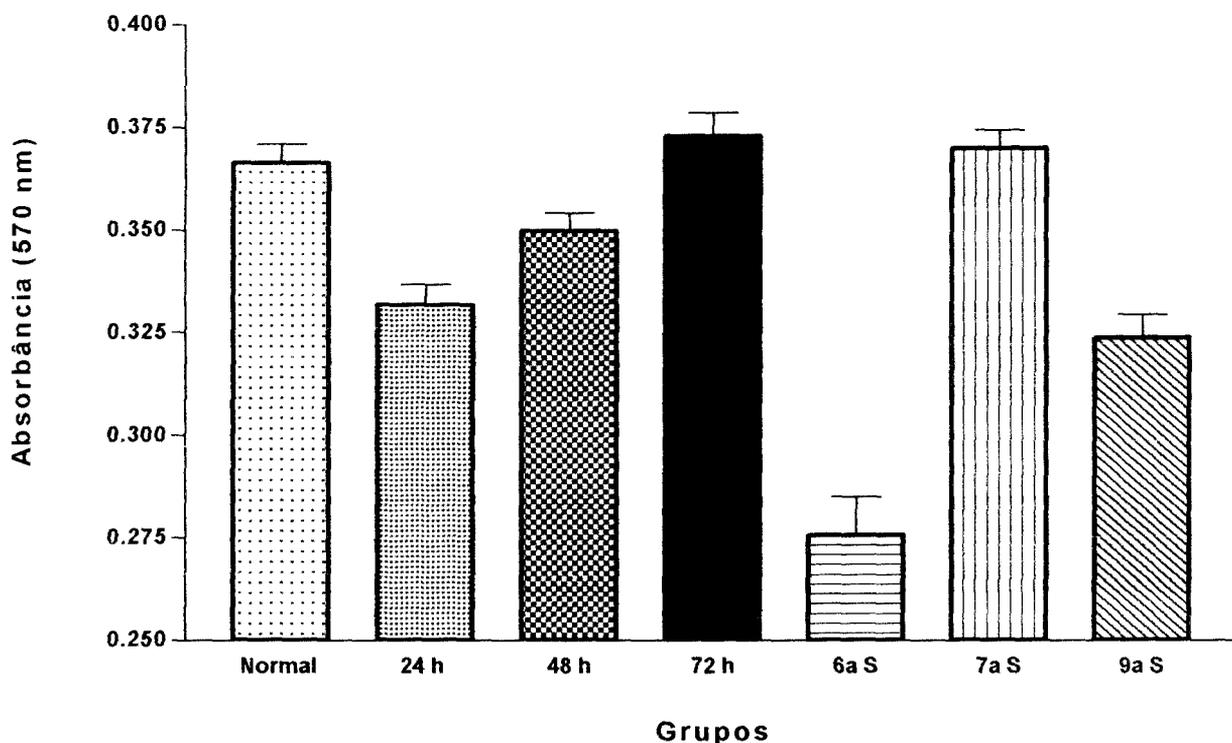


Figura 10: Avaliação da atividade fagocítica contra o zimozan A em hemócitos circulantes de *B. glabrata* normais, normais irradiados (4.000 rads-césio 137) (24h, 48 h, 72 h) e infectados pelo *S. mansoni* (sacrificados na 6^a, 7^a e 9^a semanas após exposição a 20 miracídios); (n=10 por ponto; amostra = 10uL); (h = horas; S= semana pós-exposição).

- Análise histológica

As análises realizadas através da microscopia óptica revelaram que os exemplares normais do grupo 1 (normais não-expostos) apresentavam características histológicas de normalidade; com tecido intersticial rico em espaços lacunares onde se pôde observar acúmulo de hemolinfa.

Nos caramujos infectados, as reações em torno e/ou nas proximidades de esporocistos e cercárias foram particularmente consideradas; sendo observadas predominantemente no ovoteste e na glândula digestiva como já descrito por BORGES (2000). As porções sacular e tubular do rim foram identificadas como um local secundário para a proliferação dos hemócitos. Entretanto, estas reações celulares foram discretas (+) e/ou moderadas (++); confirmando a análise da quantificação de cercárias que demonstrou que os caramujos da linhagem estudada (FS=Feira de Santana) representavam um grupo de animais susceptíveis (figuras 02,03). Nestes animais, estavam presentes focos de proliferação e diferenciação de numerosos esporocistos (figura 11, 12, 13, 14). Estruturas encapsulantes frouxas e/ou compactas ocorreram raramente (figuras 05,06) e, em alguns exemplares, estavam ausentes na glândula digestiva cuja histologia apresentava-se dentro dos padrões de normalidade.

As observações histopatológicas demonstraram não haver uma associação direta entre a hemolinfa periférica e os espaços intersticiais onde os hemócitos estavam presentes. Animais infectados apresentaram um total de células circulantes menor do que os normais; exceto os sacrificados na 6ª semana cuja média foi de $2,70 \times 10^5$ células/mm³. Entretanto, mesmo nestes exemplares as reações teciduais foram discretas e/ou moderadas. Também foi possível observar que, em alguns animais considerados reativos, o número total de hemócitos periféricos não diferiu daqueles considerados tolerantes. Além disso, não foram verificadas diferenças entre a porcentagem de granulócitos e hialinócitos dos animais sacrificados nos diferentes pontos de sacrifício.

DISCUSSÃO

A hipótese que as modificações no número e na atividade funcional dos hemócitos presentes na hemolinfa da *B. glabrata* fornecessem um bom índice do que acontece nos tecidos ao curso da infecção pelo *S. mansoni*, não se confirmou com os resultados do presente estudo. As pequenas variações observadas estiveram dentro dos limites da normalidade. O fato da cepa do parasito e seu hospedeiro intermediário estarem bem adaptados um ao outro constituiu uma desvantagem para o presente estudo, pois a escassa reação celular pode ter também dado uma repercussão periférica difícil de ser detectada. Todavia, os sinais de proliferação celular ocorreram em um ou outro órgão e em alguns poucos casos. Estes sinais se correlacionaram de maneira bem evidente com a redução local dos elementos parasitários e até mesmo com a eliminação de cercárias. Mas, nenhuma repercussão foi notada nos parâmetros pesquisados na hemolinfa que distinguissem estes casos dos demais. Os resultados indicam que a hemolinfa não se constitui um bom espelho das reações de tipo inflamatório ou degenerativo que se passam no interior do molusco infectado pelo *S. mansoni*.

A grande maioria das investigações sobre a esquistossomose mansônica na região neotropical utiliza *B. glabrata* como modelo de agente transmissor, provavelmente porque este molusco ajustou-se muito bem à condição de vetor do *S. mansoni* na América do Sul e no Caribe. Assim, alguns estudos têm demonstrado a sua alta susceptibilidade e compatibilidade à infecção com esse parasito. Entretanto, existem populações dessa espécie pouco susceptíveis onde as larvas do *S. mansoni* são reconhecidas e rapidamente destruídas (GUIMARÃES *et al.*, 1997).

Em gastrópodes, a resposta tecidual é mediada pelos hemócitos e inclui os processos de fagocitose, formação de granulomas, coagulação da hemolinfa e cicatrização. Estas células, por sua vez, podem ser encontradas em duas áreas distintas: na hemolinfa circulante (onde também estão presentes lisinas, fatores antimicrobianos e substâncias com ação semelhante às linfocinas) e nos espaços intersticiais do tecido conjuntivo.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de melhor caracterizar os hemócitos teciduais. Alguns deles têm demonstrado que estas células apresentam heterogeneidade morfológica e bioquímica (HARRIS, 1975; YOSHINO, 1976; CHENG & GUIDA, 1980; LO VERDE *et al.*, 1982; LIE *et al.*, 1987; BORGES & ANDRADE, 2003). Entretanto, ainda não se têm uma noção exata de como os acontecimentos no interior dos tecidos repercutem na população de hemócitos da periferia. Nosso primeiro passo foi a padronização desta população de células em *B. glabrata* não infectadas, uma vez que, estes dados eram inexistentes para a linhagem estudada (FS=Feira de Santana). Desta maneira, a quantificação de hemócitos, bem como sua capacidade fagocitária foi determinada em caramujos normais, normais irradiados (estímulo não biológico) e infectados pelo *S. mansoni* (estímulo biológico).

A contagem total de hemócitos realizada no grupo 1 (normais) demonstrou grandes flutuações durante o crescimento destes animais. O gráfico 2 mostra distintamente que em caramujos juvenis (8 - 11 mm) o total de hemócitos periféricos (granulócitos + hialinócitos) é menor do que nos adultos. Estes resultados diferem dos obtidos por Loker *et al.* (1987) que observaram que *B. glabrata* não-expostos com 12 mm de diâmetro apresentavam densidades hemocíticas menores ($89,1 \pm 13,5$) do que aqueles com 6 mm ($246,5 \pm 59,1$). STUMPF & GILBERTSON (1978) já haviam demonstrado que as variações hemocíticas observadas em *B. glabrata* (linhagem PR=Porto Rico) estavam correlacionadas positivamente com o tamanho da concha. Contudo, estes autores usaram caramujos de 8 mm; como os utilizados em nossos experimentos. DIKKEBOOM *et al.* (1984) obtiveram resultados similares em *L. stagnalis*; mostrando que animais com 25 ± 1 mm tinham 3,5 x mais hemócitos/mm³ do que aqueles com 10 ± 1 mm diâmetro de concha. DEGAFFÉ & LOKER (1998) demonstraram que a diferença no número de hemócitos, observada entre caramujos juvenis e adultos, estava correlacionada ao aumento no número de células que emitiam pseudópodos quando aderidas ao vidro. Ambos os grupos estudados por estes autores, apresentavam quantidades equivalentes de células arredondadas. Nossos resultados refletem portanto possíveis mudanças metabólicas

ocorridas durante a maturidade sexual, uma vez que, os hemócitos também participam ativamente da digestão e transporte de nutrientes (SMINIA *et al.*, 1974).

Nos caramujos irradiados (4.000 rads) – grupo 2, esta variação não foi observada. Dados obtidos por MARTINS-SOUZA *et al.* (2003) demonstraram que a inoculação com sílica feita em duas linhagens de *B. tenagophila* (Taim e Cabo Frio) induz uma redução significativa na subpopulação de granulócitos periféricos. Esta redução foi acompanhada por um aumento do número de células mortas. Entretanto, os dados apresentados na tabela 02 não confirmam estes achados. A porcentagem de granulócitos observada nestes animais variou entre $1,55 - 1,69 \times 10^5$ células/mm³ (82%); não diferindo dos normais ($1,58 \times 10^5$ células/mm³ – 86%). Estudos desenvolvidos por BEZERRA *et al.* (2003) demonstraram que os hemócitos de *B. tenagophila* normais e infectados pelo *S. mansoni* são extremamente resistentes não havendo alteração no número total de células periféricas após irradiação por 10 Krads (Co⁶⁰). Estes autores observaram, também, que a irradiação não afetou a sobrevivência dos moluscos. A taxa de mortalidade dos caramujos, nos três grupos experimentais (irradiado/não-infectado = 13%; irradiado/infectado = 14%; não-irradiado/não-infectado = 11%) foram similares. Em um estudo desenvolvido por Azevedo *et al.* (2004), animais irradiados-infectados demonstraram alterações histológicas na região do ovoteste quando sacrificados logo após irradiação. Entretanto, a taxa de mortalidade permaneceu similar ao grupo controle. Em fases mais tardias estas alterações histológicas não foram observadas. É importante ressaltar que subdoses (0,5 Krads) provocam uma total supressão do sistema imunológico em mamíferos (camundongos e ratos); o que aparentemente não ocorreu nos moluscos.

Os caramujos infectados demonstraram alterações discretas com relação ao número de hemócitos periféricos. Animais sacrificados na 6ª semana apresentaram uma média de $2,70 \times 10^5$ células/mm³. Além disso, a porcentagem de hialinócitos foi de 23%, refletindo a produção de novas células, uma vez que em caramujos normais obteve-se uma porcentagem de 13%. Entretanto, esta média não foi mantida na 7ª e

9ª semanas; apesar de terem sido observadas as mesmas porcentagens (72-76% - granulócitos; 23-27% - hialinócitos). ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980) já haviam observado que caramujos sacrificados entre 4-6 semanas pós-infecção apresentavam diferenças significativas quando comparados aos controles. GRANATH & YOSHINO (1983) já haviam evidenciado uma diminuição rápida no número de hemócitos circulantes de linhagens resistentes de *B. glabrata* expostas ao *S. mansoni*, especulando que tal fato seria decorrente da mobilização de hemócitos para os tecidos em resposta a multiplicação dos parasitos. A hipótese de uma resposta quimiotática dos hemócitos após a infecção tem sido reforçada pelos estudos *in vitro* de LODES & YOSHINO (1990), ao demonstrarem que frações isoladas de esporocistos primários de *S. mansoni* estimulam a mobilidade de hemócitos de linhagens resistentes de *B. glabrata*, mas inibem a mobilidade de hemócitos de linhagens susceptíveis. Contudo, nossas observações histopatológicas não revelaram a presença de reações teciduais de encapsulamento bem constituídas nos caramujos sacrificados na 6ª, 7ª e 9ª semanas. Tal condição indica que, na linhagem estudada, o parasito pode estar interferindo com as propriedades morfológicas e funcionais dos hemócitos.

Nos caramujos infectados, a atividade fagocítica contra o Zimozan A não demonstrou diferenças com relação ao grupo normal. Vários estudos desenvolvidos em *B. glabrata* mostram que, em combinações susceptíveis, o parasito não gera uma resposta imune adequada por parte do hospedeiro. LOKER *et al.* (1984) já haviam demonstrado a presença de substâncias plasmáticas denominadas aglutininas. Estas opsoninas promovem a adesão dos hemócitos ao parasito facilitando o processo de endocitose. *B. glabrata* de diversas linhagens podem expressar de modo diferenciado estas aglutininas; que estão ausentes em algumas delas. Na linhagem estudada, o fenômeno de ativação celular não foi detectado. Estes resultados reforçam a hipótese de que o contato, a habilidade de encapsulação e a destruição do parasito não foram eficientes.

Ao término desta pesquisa ficou evidente que, se alguns dos moluscos infectados tivessem apresentado uma exuberante reação tecidual, com fortes

acúmulos ou infiltrações difusas de hemócitos, com freqüentes formação de lesões encapsulantes, os resultados da hemolinfa, caso persistissem os mesmos de agora, poderiam ser tomados com maior grau de confiabilidade.

17/07/2011

REFERÊNCIAS

- ABDUL-SALAM, J. M.; MICHELSON, E. H. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes: Effect of *Schistosoma mansoni* infection on in vitro phagocytosis. **J. Invertebr. Pathol.**, **35**: 241 - 248, 1980.
- 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**, **80**: 37 - 40, 1985.
- AZEVEDO, C. M.; BORGES, C. C.; ANDRADE, Z. A. Behavior of *Schistosoma mansoni*-induced histopathological lesions in *Biomphalaria glabrata* submitted to ionizing radiation. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **37(3)**: 218 - 221, 2004.
- BARBOSA, F. S.; CARNEIRO, E.; BARBOSA, I. Manual de Malacologia Médica (trabalhos práticos). Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ, 1960. p. 36 - 44.
- BEZERRA, F. S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M.; MARTINS, R. L.; COELHO, P. M. Z. Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **39**: 197 - 201, 1997.
- BEZERRA, F. S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; MARTINS-SOUZA, R. L.; CHAVES, M. M.; CORREA, R. F.; COELHO, P. M. Z. Effect of Gamma Radiation on the Activity of Hemocytes and on the Course of *Schistosoma mansoni* Infection in Resistant *Biomphalaria tenagophila* Snails. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98(1)**: 73 - 75, 2003.

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

BORGES, C.M.C.; ANDRADE, Z. A. Extra-cellular Matrix Changes in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98**: 135 - 139, 2003.

CHENG, T. C.; GUIDA, V. G. Hemocytes of *Bulinus truncatus rohffsi* (Mollusca: Gastropoda). **J. Invertebr. Pathol.**, **35**: 158 - 167, 1980.

DeGAFFÉ, G.; LOKER, E. S. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Echinostoma paraensei*: correlation with the effect of parasite secretory-excretory products on host hemocyte spreading. **J. Invertebr. Pathol.**, **71**: 64 - 72, 1998.

DIKKEBOOM, R.; van der KNAAP, W. P. W.; MEULEMAN, E.; SMINIA, T. Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell Tiss. Res.**, **238**: 43 - 47, 1984.

FRANDBSEN, 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.**, **548**: 275 - 96, 1979.

FENG, S. Y. Heart rate and leucocyte circulation in *Cassostrea virginica* (Gmelin, 1791). **Biol. Bull.**, **128**: 198 - 210, 1965.

GRANATH, W. O. Jr.; YOSHINO, T. P. Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. **J. Exp. Zool.**, **226**: 205 - 210, 1983.

GUIMARÃES, C. T.; SOARES, D. M.; ANDRADE, Z. A.; SOUZA, C. P. Resistência de *Biomphalaria glabrata* à infecção pelo *Schistosoma mansoni*: variações no período pré-patente e na compatibilidade. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30(4)**: 273 - 278, 1997.

HARRIS, K. R. The Fine Structure of Encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 446 - 463, 1975.

LEMOS, Q. T.; ANDRADE, Z. A. Sequential histological changes in *Biomphalaria glabrata* during the course of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **96**: 719 - 721, 2001.

LIE, K. J.; JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. Molluscan Host Reactions to Helminthic Infection. In: *Immune Responses in Parasitic Infections.*, **4**: 211 - 261, 1987.

Lo VERDE, P. T.; GHERSON, J.; RICHARDS, C. S. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: fine structure. **Dev. Comp. Immunol.**, **31**: 999, 1982.

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

LOKER, E. S.; YUI M. A.; BAYNE, C. J. *Schistosoma mansoni*: agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasit.**, **58**: 56 - 62, 1984.

LOKER, E. S.; CIMINIO, D. F.; STRYKER, G. A.; HERTEL, L. A. The effect of M line *Biomphalaria glabrata* on the course of development of *Echinostoma paraensei*. **J. Parasitol.**, **73**: 1090 - 1098, 1987.

MARTINS-SOUZA, R.L.; PEREIRA, C.A.; COELHO, P. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria*

tenagophila to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. **Parasitol. Res.**, **91**: 500 - 507, 2003.

MICHELSON, E. H.; DUBOIS, L. Intraspecific variations in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata*, a snail host of *Schistosoma mansoni*. **Malacologia**, **15**: 105 - 111, 1975.

MOUNKASSA, J. B.; JOURDANE, J. Dynamics of the Leukocytic of *Biomphalaria glabrata* during the Larval Development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma liei*. **J. Invertebr. Pathol.**, **55**: 306 - 311, 1990.

SMINIA, T.; BORGHART, R.; van der LINDE, A. N. Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell Tiss. Res.**, **153**: 307 - 326, 1974.

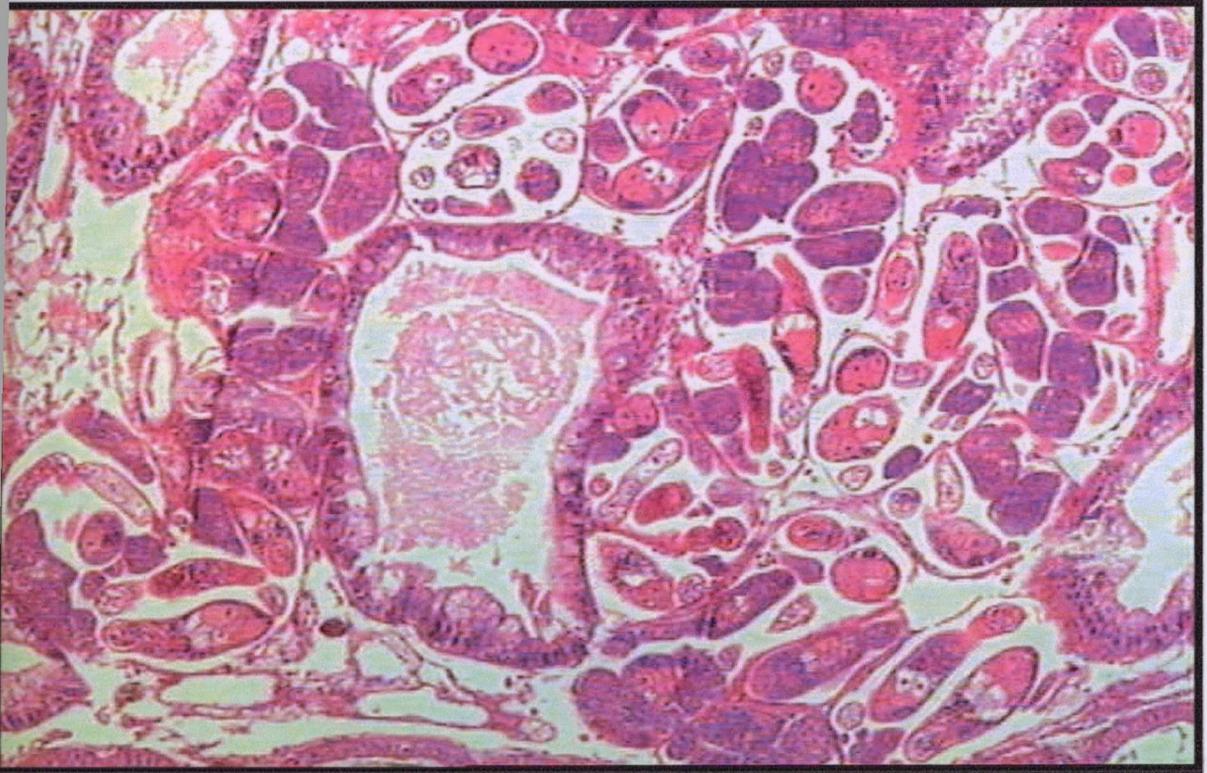
STUMPF, J. L.; GILBERTSON, D. E. Hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: Factors Affecting Variability. **J. Invertebr. Pathol.**, **32**: 177 - 181, 1978.

YOSHINO, T. P. Encapsulation Response of the Marine Prosobranch *Cerithidea californica* to natural Infection of *Renicola buchanaeni* Sporocysts (Trematoda: Renicolidae). **Int. J. Parasitol.**, **6**: 423 - 431, 1976.

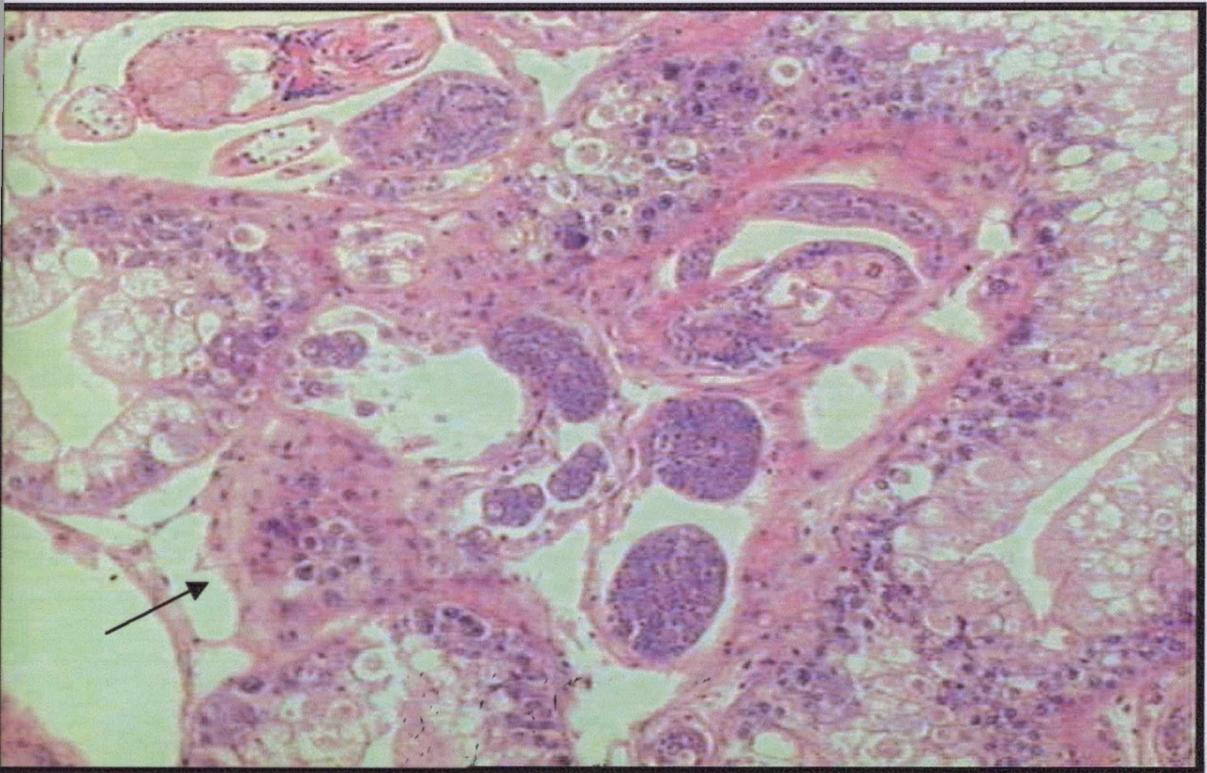
PRANCHA 01

10/10/2023

Classificação Histopatológica (Reações Teciduais)



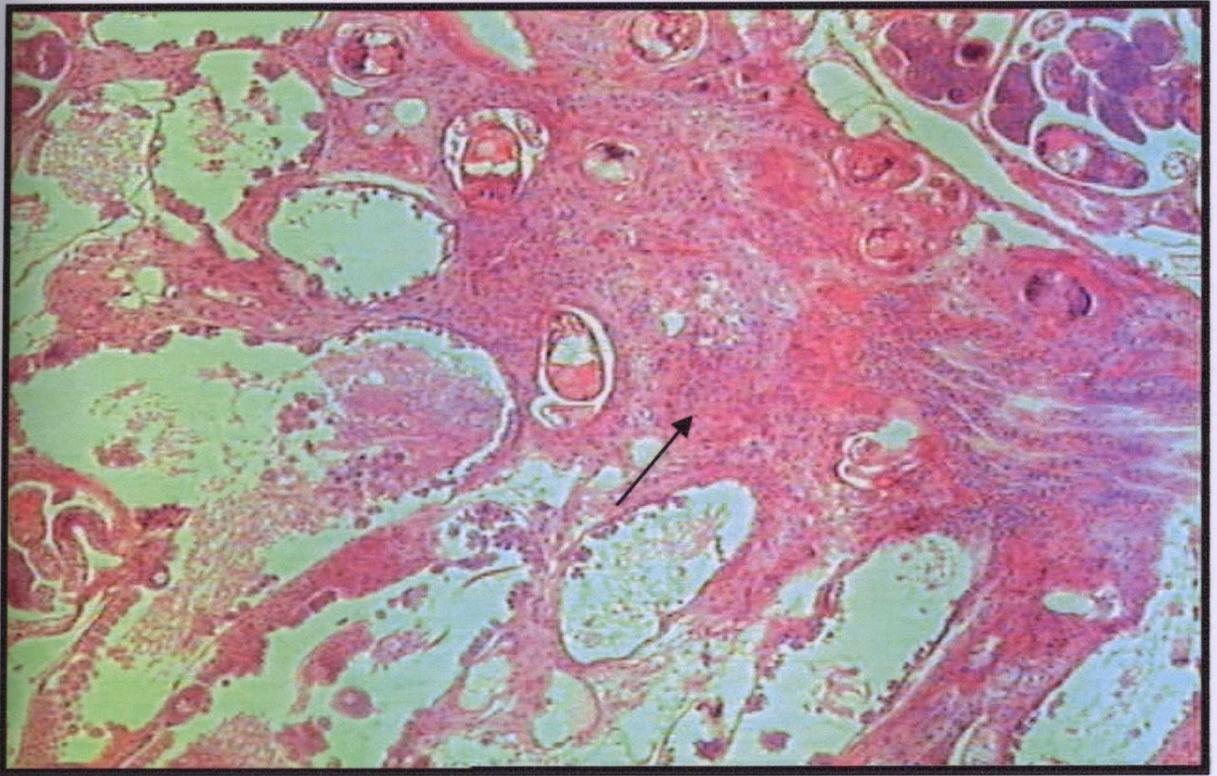
**Figura 01: Tolerante (-) Proliferação de parasitos sem reação tecidual.
Glândula digestiva; hematoxilina/eosina. Aumento 200 x.**



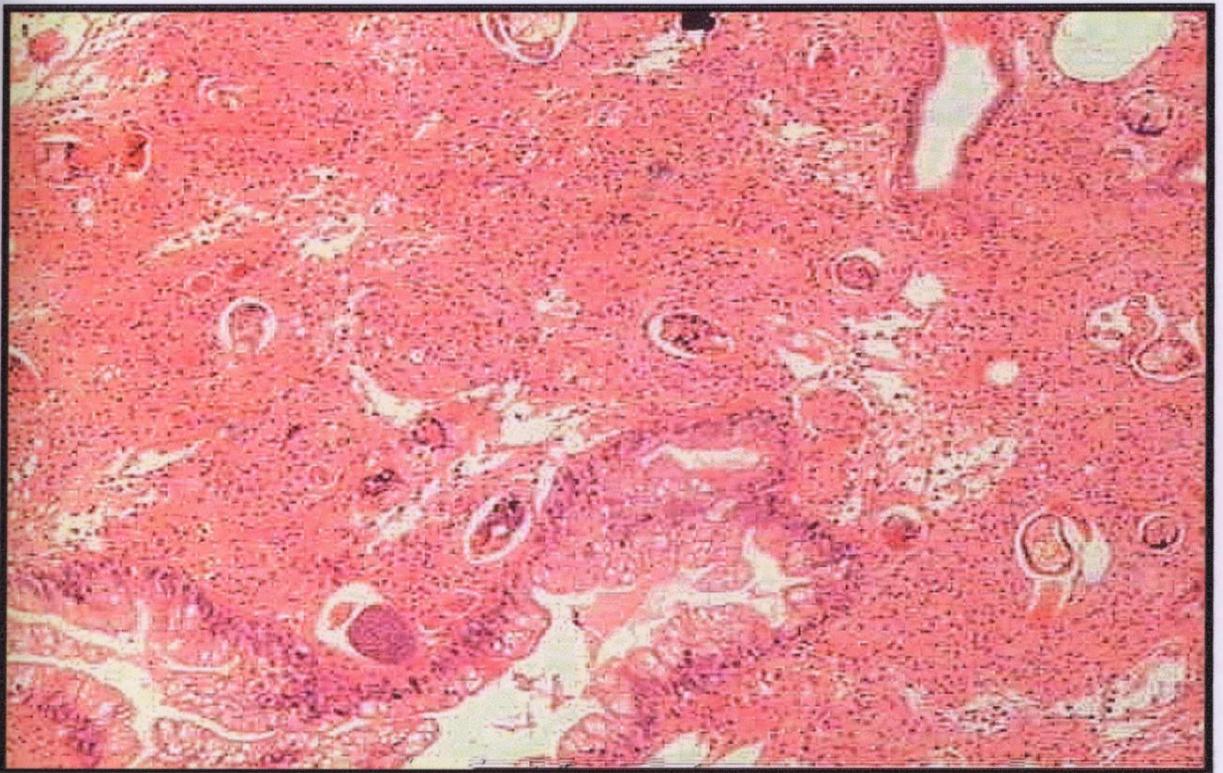
**Figura 02: Reativo (+) Reação tecidual discreta (seta).
Glândula digestiva; hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.**

PRANCHA 02

17/11/2017



**Figura 03: Reativo(++) Reação tecidual moderada do tipo difusa (seta).
Ovoteste; hematoxilina/eosina. Aumento 100 x.**



**Figura 04 Reativo(+++); Reação tecidual intensa do tipo difusa.
Glândula digestiva; hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.**

PRANCHA 03

12/12/2012

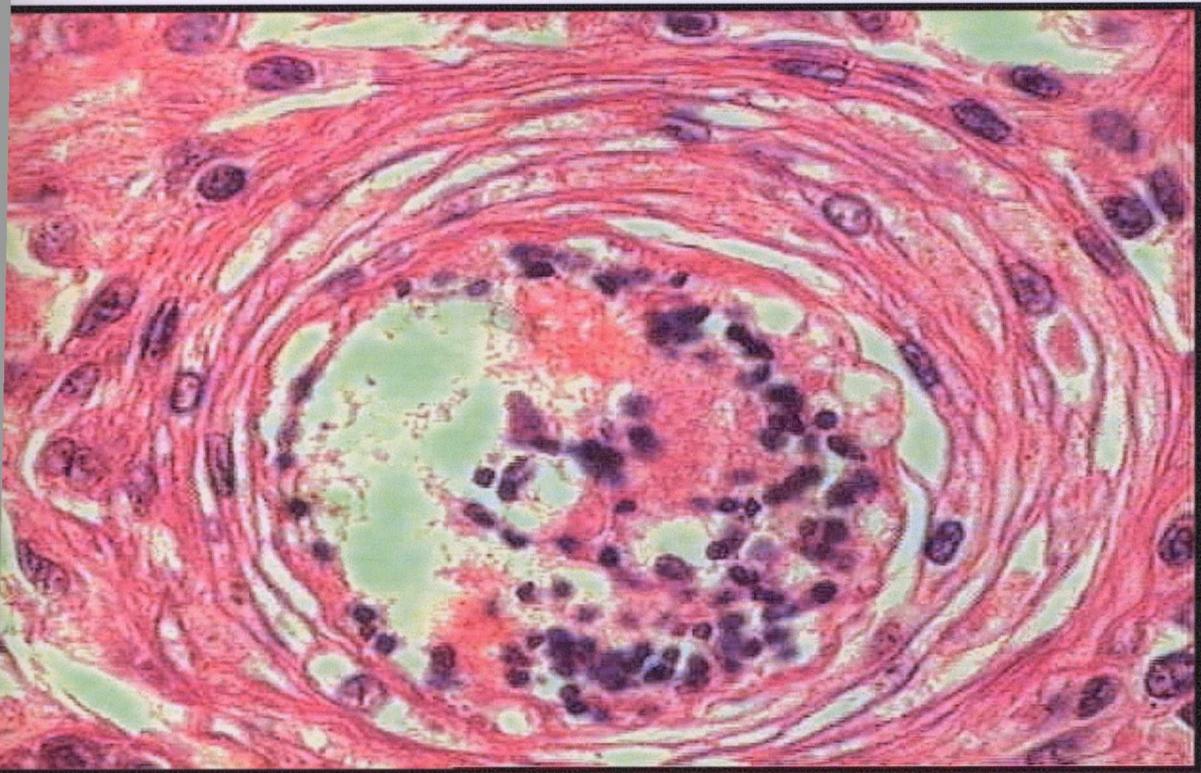


Figura 05: Reação tecidual encapsulante; observar a formação de camadas concêntricas em torno do parasito em degeneração. Glândula digestiva; hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

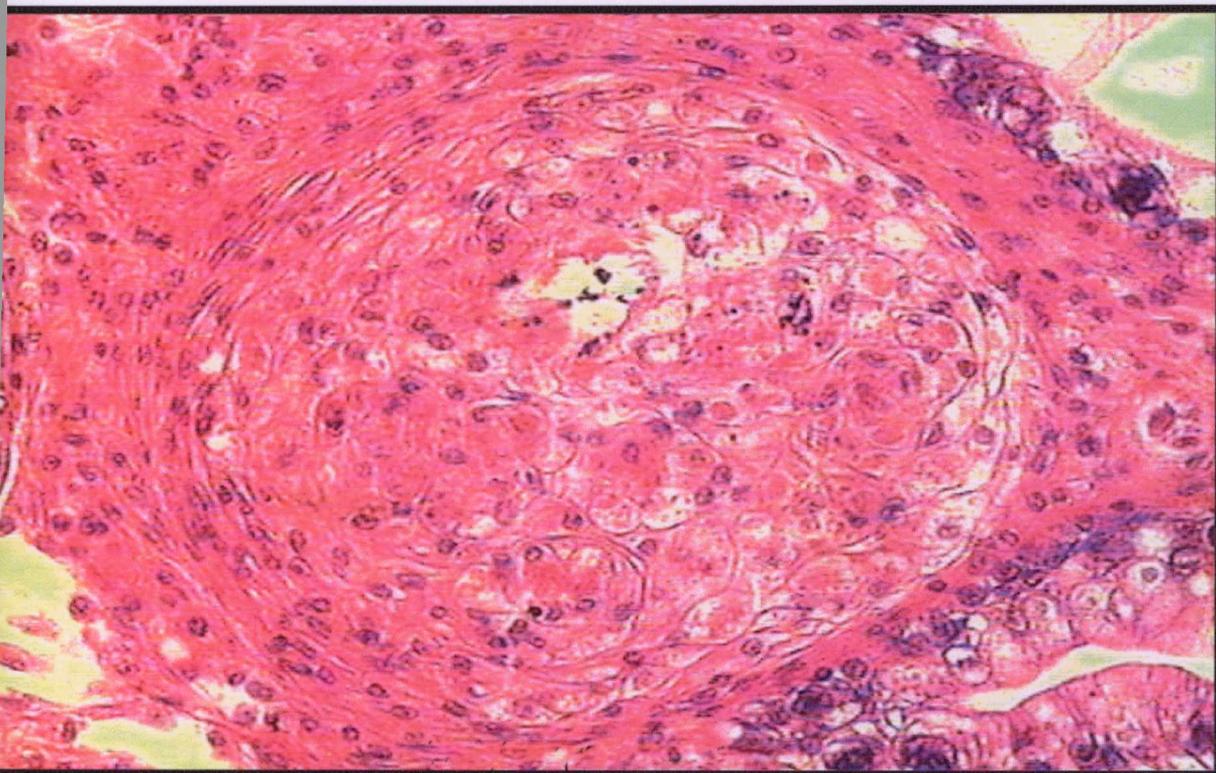


Figura 06: Reação tecidual do tipo granulomatosa. Glândula digestiva; hematoxilina/eosina. Aumento 400 x.

PRANCHA 04

17/10/2017

Classificação Histopatológica (Parasitismo)

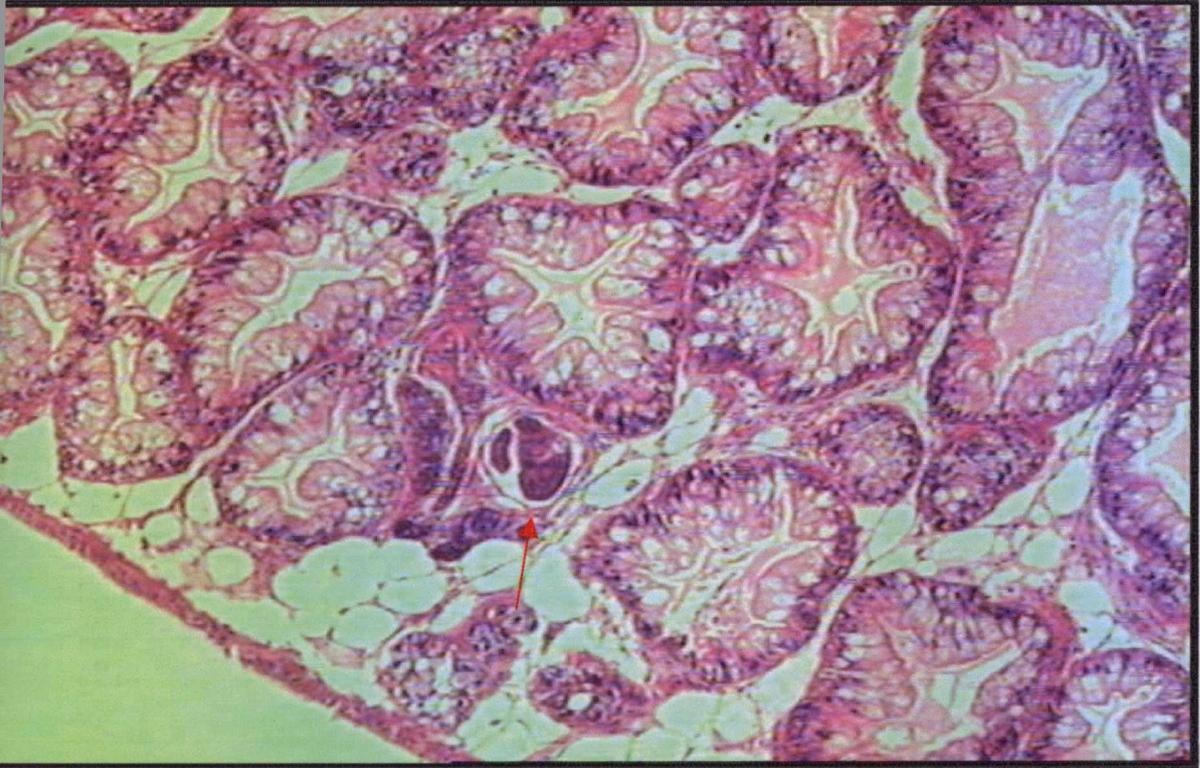


Figura 07: Proliferação discreta de parasitos na glândula digestiva (seta); hematoxilina/eosina. Aumento 100 x.

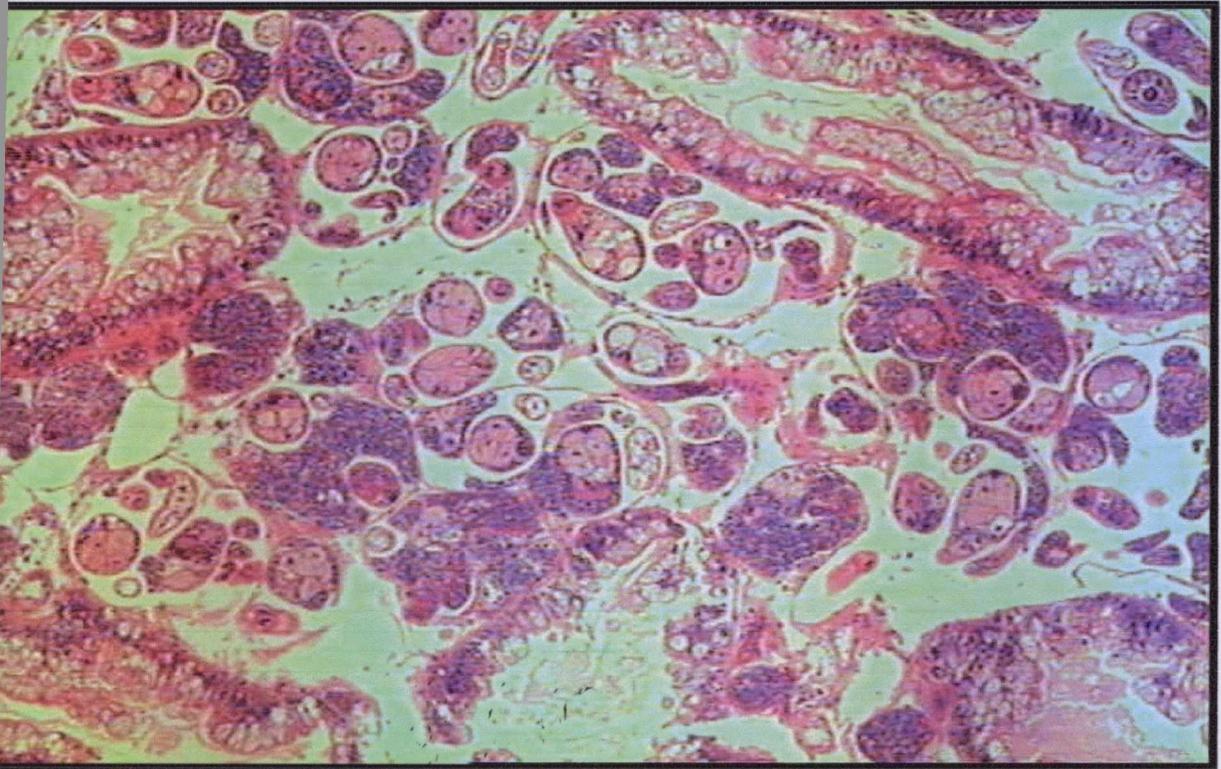
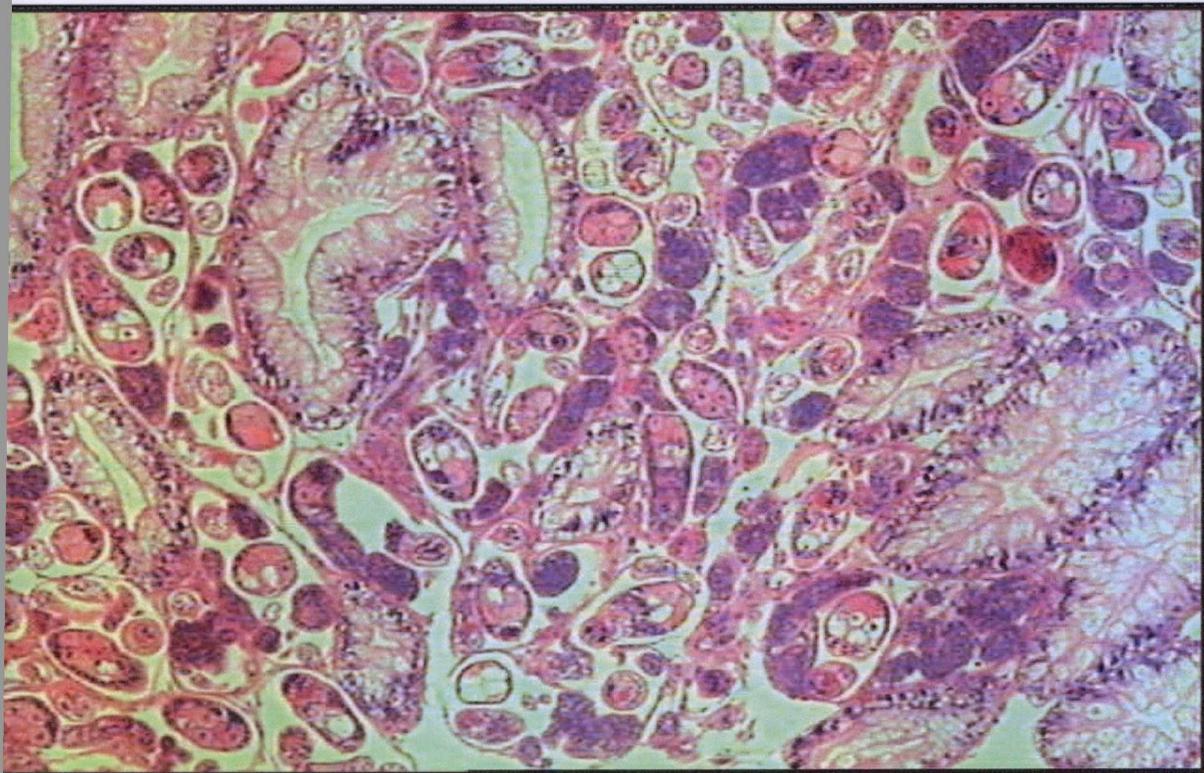


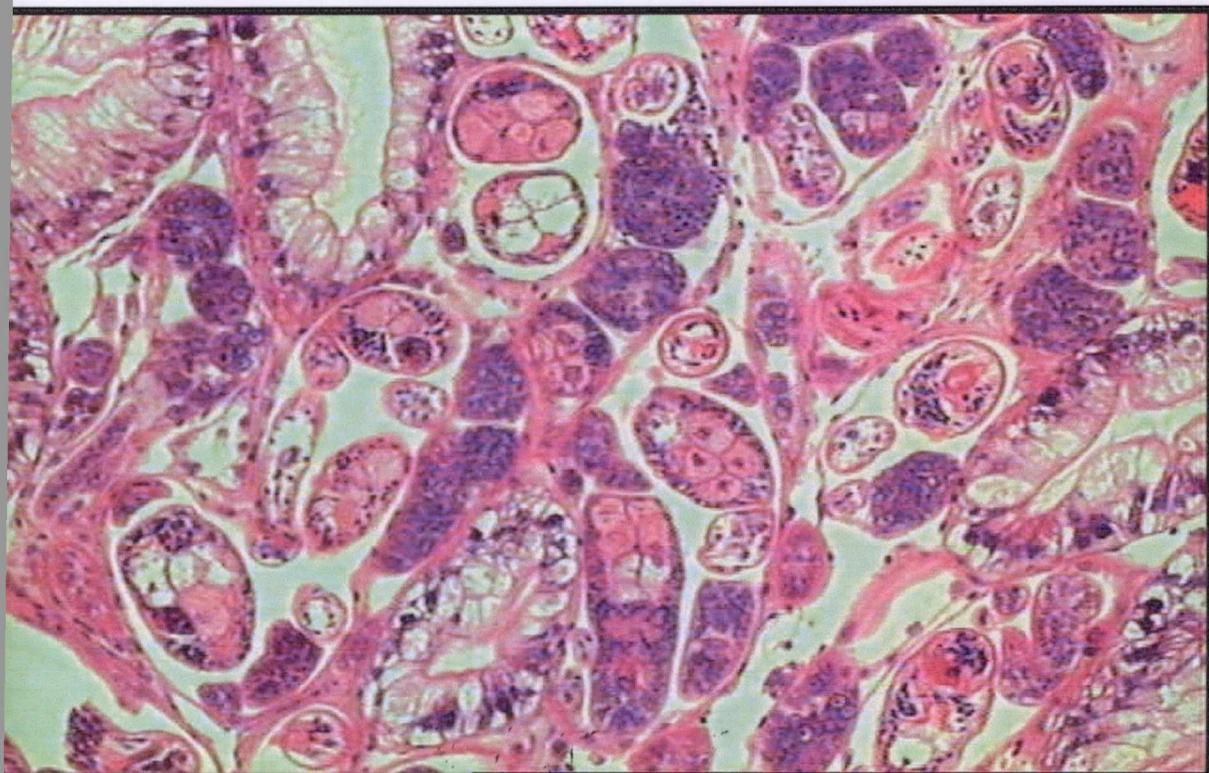
Figura 08: Proliferação moderada de parasitos na glândula digestiva; hematoxilina/eosina. Aumento 100 x.

PRANCHA 05

17/10/2017



**Figura 09: Proliferação intensa de parasitos na glândula digestiva (seta);
hematoxilina/eosina. Aumento 100 x.**



**Figura 10: Proliferação intensa de parasitos na glândula digestiva;
hematoxilina/eosina. Aumento 200 x.**

4 MANUSCRITO II

17/10/2017

Contribuição ao Estudo dos Hemócitos da *Biomphalaria glabrata*.

Dados ultraestruturais e histoquímicos observados em *Biomphalaria glabrata* Infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

Claudia Maria da Cunha Borges, Rafael Valente Veiga,
Carine Machado Azevedo, Zilton A. Andrade.

Laboratório de Patologia Experimental (Lapex), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz –
FIOCRUZ. Rua Waldemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, BA, Brasil.

RESUMO

Os hemócitos são células móveis, fagocíticas e secretoras, que têm sido comparados aos macrófagos dos vertebrados. Durante a infecção da *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 o comportamento dos hemócitos teciduais é fundamental para determinar a evolução e o destino da interação hospedeiro-parasito que então se estabelece.

Os dados ultraestruturais obtidos no presente estudo revelaram evidências de alterações induzidas pela infecção, tanto sob a forma de sinais de ativação do retículo endoplasmático e de modificações no conteúdo de glicogênio, ao lado de freqüentes sinais degenerativos como a presença de lisossomas secundários e auto-fagossomas, tumefação e cristólise nas mitocôndrias, dispersão de ribossomos no citoplasma. Os dados obtidos com métodos histoquímicos para fosfatase ácida e succino desidrogenase mostraram que os hemócitos, além de conterem enzimas hidrolíticas que refletem seu estado de ativação, também liberam aparentemente tais enzimas ao seu redor.

O estudo representa uma tentativa de trazer novos aportes para o entendimento da estrutura e função dos hemócitos da *B. glabrata*, uma célula tão importante e ainda pouco conhecida.

Palavras-chaves: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; hemócitos; ultraestrutura; fosfatase ácida; succino-desidrogenase.

ABSTRACT

Contribution to the study of *Biomphalaria glabrata* hemocytes Ultrastructural and histochemical data on *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*

Snail hemocytes are mobile, phagocytic, and secretory cells that have been compared with vertebrate macrophages. During the infection of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) with *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), the behavior of the tissue hemocytes is the main factor determining the evolution and fate of the host-parasite interaction.

The present investigation describes ultrastructural features that reflect changes induced by the parasitic infection. That include not only signs of cell activation going on in granular endoplasmic reticulum and in cytoplasmic dispersion of ribosomes, but also degenerative features, such as the presence of frequent secondary lysosomes, and auto-phagosomes, as well as swelling and cristolysis of mitochondria. Data obtained with histochemical methods for acid phosphatase and succinate-dehydrogenase indicated that the presence of such enzymes in hemocytes varies with their state of activity. Moreover, the presence of the enzyme can be detected in close proximity to the hemocytes while their interior may be negative, an indication of secretion.

This study represents an attempt at disclosing new data for the understanding of structure and function of hemocytes, an important and still incompletely known cell of *B. glabrata*

Key Words: *Biomphalaria glabrata*; *Schistosoma mansoni*; hemocytes; acid phosphatase; succinate dehydrogenase.

INTRODUÇÃO

Os hemócitos dos gastrópodes em geral e da *B. glabrata* em particular constituem a principal linha de defesa dos mesmos contra os organismos invasores. Nesta função eles se assemelham aos macrófagos dos vertebrados, funcionando ao mesmo tempo como células secretoras e fagocíticas. Como uma célula mesenquimal primitiva, ele pode vir a assumir também características fibroblásticas, influenciando modificações na matriz extracelular (PAN, 1958).

Em *B. glabrata*, os hemócitos representam uma população celular de morfologia e conteúdo enzimáticos variáveis. Estas células também apresentam subpopulações com capacidade de adesão e fagocitose diferenciadas que correspondem a diferentes estágios fisiológicos (KNAAP & LOKER, 1990; MATRICON-GORDAN & LETOCARD, 1999b).

Vários autores sugerem, após estudos ultraestruturais, a existência de duas subpopulações celulares: os hialinócitos (que são pequenos, redondos e não fagocitam partículas) e os granulócitos (que são grandes, aderem ao vidro, emitem pseudópodos e são ativamente fagocíticos) (LIE *et al.*, 1987; BARRACO *et al.*, 1993). Outros, entretanto, acham que os gastrópodes, bem como os cefalópodes, possuem apenas um tipo celular, o qual desempenha várias funções (SMINIA, 1972; SMINIA *et al.*, 1973). O emprego de técnicas histoquímicas tem facilitado o estudo da atividade funcional dos hemócitos, bem como fornecido dados para o estudo comparativo destas células com os macrófagos humanos (CHENG & GARRABRANT, 1977; MCKERRON *et al.*, 1985; SMINIA & BARENSEN, 1980; MONTEIL & MATRICON-GONDRAN, 1993).

Embora muito se tenha investigado, a biologia dos hemócitos ainda permanece com muitos pontos obscuros. Visando a busca de novos dados, o presente estudo se concentrou em analisar alguns aspectos histológicos, ultraestruturais e histoquímicos dos hemócitos da *B. glabrata* em condições normais e durante a infecção pelo *S. mansoni*.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Moluscos Utilizados e Parasitos

Os exemplares de *B. glabrata* utilizados neste estudo provieram da linhagem designada como Feira de Santana (FS), Salvador – Bahia; mantida há 20 anos no moluscário do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ) e utilizada na rotina de manutenção do ciclo do *S. mansoni*.

Todos os moluscos foram expostos a 20 miracídios do *S. mansoni* (cepa FS – Andrade & Sadigursky, 1985) e sacrificados em diferentes intervalos de tempo; sendo divididos em dois grupos distintos:

- a. **Grupo Controle:** caramujos (12 - 13 mm) normais, não infectados.
- b. **Grupo Infectado:** caramujos (12 - 13 mm) subdivididos em 3 subgrupos, após verificação de positividade e de acordo com a média quinzenal de eliminação de cercárias; de acordo com a classificação de Frandsen (1979):

Subgrupo I: caramujos muito pouco compatíveis (classe 2), eliminando até no máximo 10 cercárias.

Subgrupo II: caramujos compatíveis (classe 4), eliminando entre 50 a 150 cercárias.

Subgrupo III: caramujos muito compatíveis (classe 5), eliminando entre 151 a 500 cercárias.

B. Infecção

Cada caramujo (grupo b) foi exposto individualmente a 20 miracídios de *S. mansoni* obtidos a partir de ovos colhidos do fígado de camundongos e/ou hamsters com no mínimo 50 dias de infectados. Um total de 25 animais foi utilizado para este grupo experimental.

O fígado retirado destes animais doadores foi homogeneizado em um tamis (Granutest – USBS 40) com abertura de 0,42 mm – número 35 na presença de pequena quantidade de salina à 0,85%, colocado em um cálice de sedimentação e levado à geladeira (4° C) por 50 minutos (2 x). Decorrido este tempo desprezou-se o

sobrenadante, 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 (24 poços); onde foi acrescentado um pequeno volume de água, suficiente para que cada animal ficasse totalmente submerso.

C. Teste de Positividade

A partir da 4ª 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 frascos contendo 5 mL de água desclorada e expostos à luz (3 lâmpadas de 60 w), durante duas horas. Decorrido este tempo de exposição, o caramujo foi removido dos frascos e as cercárias presentes em 1 mL de água foram mortas e coradas com lugol e em seguida contadas em microscópio estereoscópico (LEICA ZOOM 2000). Os animais positivos foram transferidos para novos frascos de vidro e mantidos no escuro até o próximo exame ou até o momento do sacrifício (30 a 63 dias pós-infecção).

Os caramujos infectados foram agrupados como descritos no item A.

D. Processamento Histológico

D.1 Técnica de Fixação e Contrastação para a Microscopia Eletrônica

Animais de cada grupo foram anestesiados com cristais de mentol por quatro horas e retirados da concha com o auxílio de pinças oftálmicas (BARBOSA *et al.*, 1960). Os fragmentos obtidos foram fixados em glutaraldeído a 2% + tampão cacodilato a 0,2M (1:1 – por 1 hora a 4°C) e pós-fixados em uma mistura de tetróxido de ósmio a 2% + tampão cacodilato a 0,3M, na proporção de 1:1, por mais 1 hora em temperatura de

4°C. Decorrido esse tempo, o material foi lavado em tampão cacodilato à temperatura ambiente e desidratado em acetona no vácuo. O material foi colocado em uma mistura de resina Polybed 812 (Polysciences, INC) e acetona pura no vácuo 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. A polimerização da resina foi realizada à 60°C por 2 - 3 dias. Após polimerização, os blocos foram levados ao ultramicrotomo da marca Reichert (Ultratome Supernova Leica) onde foram feitos cortes semifinos de 0,5 µm. Selecionados os melhores cortes, foram feitos cortes ultrafinos de 450 Å, os quais foram montados em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila e depois em citrato de chumbo para análise ao microscópio eletrônico da marca Zeiss, EM-109 sob uma voltagem de 50kV.

D.2 Técnicas Utilizadas para Histoquímica Enzimática

Em todas as reações enzimáticas foram utilizados caramujos adultos (12 - 13 mm) da espécie *B. glabrata* (linhagem FS) infectados individualmente com 20 miracídios do *S. mansoni* (cepa FS) e sacrificados 42, 49 e 63 dias pós-infecção.

Todos os animais foram anestesiados como descrito anteriormente; sendo as porções da glândula digestiva e ovoteste colocadas imediatamente em TISSUE – TEK (Sakura) e congelados em nitrogênio líquido e criopreservados a – 70°C até o momento do uso.

Os blocos foram cortados á – 21°C em criostato da marca Reichert-Jung (2.800 Frigocut) obtendo-se cortes de 5 µm que foram montados em lâminas previamente tratadas com Poli-L-lisina a 10% (Sigma St. Louis, Mo. USA) e fixadas em acetona (100%) gelada por 10 minutos.

D.2.1 Desidrogenase

O método descrito por PEARSE (1960) foi usado para demonstrar a presença da desidrogenase. Os cortes obtidos foram incubados na solução substrato formado pela mistura do tampão (fosfato de sódio monobásico a 0,2 M) + succinato de sódio dibásico hexahidratado (Sigma, S2378-100G – 123KO148) em uma proporção de 1:1 e NITRO BT (nitro blue tetrazolium – Sigma, No. N-6876); por 30 minutos a 37°C. Nos controles o substrato foi utilizado mas, a enzima foi inativada a 90°C por 10 minutos. Após incubação, as lâminas foram lavadas em salina a 0,85%, contracoradas em safranina a 1% por 2 minutos, fixadas em formol a 10% (10 minutos), desidratadas em álcool (30 – 100%), clarificadas e montadas em bálsamo do Canadá sintético (Biotec – Reagentes Analíticos).

D.2.2 Fosfatase Ácida

Para demonstrar a fosfatase ácida o método Naphthol AS-BI (BARKA, 1960) foi aplicado. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas por 60 minutos na solução substrato que continha pararosanilina, nitrato de sódio a 4%, acetato de sódio e Naphthol AS-BI (BioChemika – 70491). Os controles também foram incubados no mesmo substrato. Entretanto, nestes a enzima foi inativada a 90°C por 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas em água destilada por 3 minutos, contracoradas com verde metila (Sigma, M-8884, lot. 90K3641) por 10 minutos, desidratadas (95 – 100%), clarificadas e montadas permanentemente em bálsamo do Canadá.

Em ambas as técnicas, as lâminas foram fotografadas em microscópio Zeiss (Axioskop 2).

RESULTADOS

A. Análise Histoquímica

A análise histoquímica realizada nos caramujos da linhagem estudada demonstrou que a desidrogenase e a fosfatase ácida estavam presentes em todos os exemplares infectados. Entretanto, a atividade da desidrogenase foi relativamente mais fraca; sendo positiva apenas para as formas larvais que se encontravam em diferentes fases de desenvolvimento (figura 01). Não foram observados hemócitos positivos (figura 02). Nos caramujos normais esta enzima foi detectada em alguns locais, como a moela e a região cefalopodal; em ambos os casos apenas as fibras musculares apareceram marcadas.

Para a fosfatase ácida, a reação positiva também foi observada em alguns hemócitos que se acumulavam ao redor do parasito ou naqueles que estavam dispersos no tecido conjuntivo (figura 04). Estas células, por sua vez, apresentaram a região citoplasmática marcada uniformemente (figura 03A). Além disso, a presença desta enzima foi detectada na hemolinfa em zonas adjacentes aos parasitos (figura 03B). Contudo, não foram constatadas diferenças quantitativas entre os animais sacrificados nas semanas pós-exposição (6^a, 7^a, 9^a). Em paralelo, esta enzima pôde ser demonstrada em determinados órgãos como o ovoteste (cauda dos espermatozóides, espermateca) e nos lóbulos da glândula digestiva.

B. Microscopia Eletrônica

B.1 Ultraestrutura

Os hemócitos que foram encontrados nos espaços intersticiais das glândulas digestivas e do ovoteste de animais parasitados, apresentavam características morfológicas variáveis, tanto quanto ao tamanho, densidade do citoplasma, número e disposição dos filopódios, presença de organelas citoplasmáticas e características nucleares.

Os hemócitos observados, são células assimétricas de citoplasma eletrodense no qual estavam presentes filopódios que se distendiam pela matriz extracelular, formando

um aspecto labiríntico característico. Os espaços entre os prolongamentos estavam preenchidos por material amorfo, sob a forma de grumos com fraca eletrodensidade (figura 05). Das organelas, foi relativamente freqüente a presença de numerosas mitocôndrias na região perinuclear. O retículo endoplasmático mostrou-se bem desenvolvido, estando associado aos ribossomos que foram observados espalhados por esta região em particular. Tal organela estava presente em torno do núcleo e próximo ao ectoplasma celular (figura 06). Em algumas micrografias ficaram evidentes a presença do complexo de Golgi, de corpúsculos residuais e finos grumos eletrodensos identificados como grânulos de glicogênio (figuras 07, 08). Os fagossomos (lissosomos secundários) foram freqüentemente observados nos hemócitos dos animais infectados, mesmo na ausência de elementos parasitários (figura 08). Alguns deles continham corpos esféricos, limitados por compartimentos delimitados por duas membranas, contendo no seu interior, detritos remanescentes de componentes do citoplasma como mitocôndrias, retículo endoplasmático e outras (vacúolos autofágicos) (figura 08). Foram notadas também algumas estruturas filamentosas, densas, concêntricas, simulando as chamadas "figuras de mielina" e alguns corpos eletrodensos, irregulares, pequenos, representando lisossomos primários (figuras 08, 10)

Em algumas células foi possível observar a presença de um núcleo grande, excêntrico, rico em grumos de cromatina fortemente condensada (heterocromatina) e nucléolo granular (figura 09).

Nos animais controle, os hemócitos foram escassos, apresentando características de células inativas de aspecto arredondado.



DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de aprofundar o conhecimento das características ultraestruturais e investigar a atividade enzimática dos hemócitos teciduais em caramujos *B. glabrata*, normais e infectados pelo *S. mansoni*; uma vez que este molusco representa o principal hospedeiro intermediário deste trematódeo nas Américas. Além disso, tais informações seriam valiosas para que se acumulem dados básicos de uma patologia primitiva, úteis para os estudos de patologia comparada, já que se relacionam com mecanismos básicos envolvendo as defesas do hospedeiro contra organismos invasores.

Nos moluscos, o hemócito é a principal célula que reage a infecção parasitária. Estudos prévios desenvolvidos por SMINIA *et al.* (1982) e JEONG *et al.* (1983) consideram os hemócitos como protótipos do macrófago de mamíferos na resposta imune. Estudos sobre fagocitose (JEONG & HEYNEMAN, 1976) também revelaram evidências da relação entre estes dois tipos celulares. Nos vertebrados, os macrófagos são células que descartam células mortas e outros debris indesejáveis, os quais estão amplamente distribuídos pelos tecidos. Estas células podem ser identificadas por técnicas histoquímicas ou imunohistoquímicas que detectam enzimas presentes no citoplasma (como por exemplo, fosfatases, esterases, quimiotripsina, alfa-1 antitripsina), ou pela utilização de anticorpos monoclonais (HAM-56, OKM 1-CD11, Leu M1-CD15).

Em nossos testes histoquímicos para detectar a presença de duas enzimas, os hemócitos foram positivos para a fosfatase ácida; a reação foi mais intensa naquelas células envolvidas nos processos de encapsulamento das larvas do *S. mansoni*. Usando a fosfatase ácida como marcador, CHENG & GARRABRANT (1977) detectaram a presença desta enzima nos granulócitos que participavam da destruição dos esporocistos-mãe do *S. mansoni*, em *B. glabrata* da linhagem 10R2 (considerada resistente). Mais tarde, DIKKEBOOM *et al.* (1984) obtiveram os mesmos resultados para os hemócitos de *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758). Entretanto, neste trabalho a atividade da enzima foi mais fraca.

A presença da fosfatase ácida também foi detectada na interface hemócito x parasito e nos hemócitos localizados fora desta zona de destruição; encontrados nos espaços intersticiais da glândula digestiva e ovoteste. FOLEY & CHENG (1977) e Cheng (1983) já haviam demonstrado que as enzimas lisossomais, que atuam na morte dos microorganismos, eram liberadas no plasma (hemolinfa) durante a fagocitose como resultado da degranulação dos granulócitos. Entretanto, nossos achados revelaram, ainda, células que não se mostraram reativas. Tais resultados podem estar refletindo diferentes estágios transicionais e fisiológicos de um mesmo tipo celular. É importante salientar que a linhagem estudada foi considerada susceptível a infecção pelo *S. mansoni*, uma vez que, os dados obtidos no manuscrito I não revelaram uma relação clara entre o número de hemócitos da hemolinfa periférica e as reações celulares observadas nos tecidos. Estes resultados estão, em parte, de acordo com os descritos por alguns autores que demonstraram a interferência exercida por produtos excretados-secretados pelas larvas do *Schistosoma* na mobilidade e capacidade de síntese e secreção de proteínas em hemócitos de *B. glabrata* (YOSHINO & LODES, 1988).

Estudos de eletromicroscopia feitos por CARTER & BOGITSCH (1975) demonstraram que os hemócitos dos caramujos possuem atividade focal para a peroxidase nos lisossomos. Estudos prévios desenvolvidos por BORGES & ANDRADE (2003) identificaram a presença de alguns corpos eletrodensos, irregulares, de diferentes tamanhos representando provavelmente lisossomos primários. Estas estruturas foram observadas mas testes histoquímicos não foram realizados para a detecção desta enzima no presente trabalho.

As observações ultraestruturais, realizadas nos tecidos da glândula digestiva e do ovoteste, revelaram algumas células ricas em pseudópodos, vacúolos fagocíticos e organelas lisossômicas. Estas células, muito provavelmente, podem estar representando aquelas que foram positivas para a fosfatase ácida nas preparações histoquímicas. MATRICON-GONDRAN & LETOCART (1999a) demonstraram que entre os hemócitos há uma variedade de feições; propondo o reconhecimento de três tipos celulares de acordo com o critério morfológico: células assimétricas grandes; células de

tamanho médio pobres em organelas e glicogênio e células pequenas com poucas organelas e poucos grânulos densos. Estas autoras determinaram também que os hemócitos de *B. glabrata* possuem pouca atividade enzimática, estando associada aos poucos grânulos encontrados nos hemócitos grandes e ocasionalmente a rede trans-Golgi.

Em determinadas micrografias foi possível verificar, ainda, a ocorrência de células com retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, onde também foram identificados ribossomos como partículas enegrecidas espalhadas pela superfície desta organela; sugerindo síntese protéica. KRUPA *et al.* (1977) ao descreverem os granulócitos de *Bullus guernei* infectados pelo *Schistosoma haematobium* (Bilanz, 1852), mostraram que nestas células o retículo endoplasmático rugoso foi escasso. Grânulos de glicogênio foram observados dispersos no citoplasma, indicando armazenamento de açúcares. Embora, as gorduras sejam uma forma de armazenamento mais importante do que o glicogênio.

Os dados obtidos neste trabalho apoiam, portanto, a analogia de que os hemócitos partilham similaridades com os macrófagos ativados. E, como tais, possuem enzimas hidrolíticas e capacidade fagocítica; onde englobam e destroem o agente agressor como parte do processo de restabelecimento da função normal do hospedeiro.

12

REFERÊNCIAS

- 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.; CARNEIRO, E.; BARBOSA, I. Manual de Malacologia Médica (trabalhos práticos). Recife: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ, 1960. p. 36 - 44.
- BARKA, T. A Simple Azo-Dye Method for Histochemical Demonstration of Acid Phosphatase. **Nature**, **187**: 248 - 249, 1960.
- BARRACO, M. A.; STEIL, A. A.; GARGIONI, R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **88**: 73 - 83, 1993.
- BORGES, C.M.C.; ANDRADE, Z. A. Extra-cellular Matrix Changes in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98**: 135 - 139, 2003.
- CARTER, O. S.; BOGITSH, B. J. Histologic and cytochemical observations of the effects of *Schistosoma mansoni* on *Biomphalaria glabrata*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **266**: 380, 1975.
- CHENG, T. F. The role of lysosomes in molluscan inflammation. **Amer. Zool.**, **23**: 129 - 144, 1983.
- CHENG, T. C. and 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 - 472, 1977.

DIKKEBOOM, R.; van der KNAAP, 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 - 47, 1984.

FOLEY, D. A.; CHENG, T. C. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. **J. Invertebr. Pathol.**, **25**: 189 - 197, 1977.

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.**, **548**: 275 - 96, 1979.

JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. Leukocytes of *Biomphalaria glabrata*: Morphology and behavior of granulocytic cells *in vitro*. **J. Invest. Pathol.**, **28**: 357, 1976

JEONG, K. H.; LIE, K. J.; HEYNEMAN, D. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Dev. Compl. Immunol.**, **7**: 217, 1983.

KRUPA, P. L.; LEWIS, L. M.; del VECCHIO, P. *Schistosoma haematobium* in *Bulinus guemei*: electron microscopy of hemocytes-sporocyst interactions. **J. Invertebr. Pathol.**, **30**: 35 - 45, 1977.

LIE, K. J.; JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. Molluscan Host Reactions to Helminthic Infection. In: *Immune Responses in Parasitic Infections*, **4**: 211 - 261, 1987.

MATRICON-GONDRAN, M.; LETOCART, M. Internal defense of the snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of Hemocytes and Fixed Phagocytes. **J. Invertebr. Pathol.**, **74**: 224 - 234, 1999a

MATRICON-GONDRAN, M.; LETOCART, M. Internal defense of the snail *Biomphalaria glabrata*. II. *In vivo* responses of hemocytes and fixed phagocytes to injected foreign materials. **J. Invertebr. Pathol.**, **74**: 235 - 247, 1999b

McKERRON, J. H.; JEONG, K. H.; BECKSTEAD, J. H. Enzyme Histochemical Comparison of *Biomphalaria glabrata* Amebocytes with Human Granuloma Macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, **37**: 341 - 347, 1985.

MONTEIL, J. F.; MATRICON-GONDRAN, M. Structural and cytochemical study of hemocytes in normal and trematode infected *Lymnaea truncatula*. **Parasitol. Res.**, **76**: 675 - 682, 1993.

PAN, CHIA-TUNG. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. **Bull. Mus. Comp. Zool.**, **119**: 237 - 299, 1958.

PEARSE, A. G. E. Histochemistry, Theoretical and Applied, 2nd. Ed., Boston, Little Brown and Co., pp. 451 - 910, 1960.

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.; PIETERSMA, K; SCHEERBOOM, J. E. M. Histological and ultrastructural observations on wound healing in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. **Z. Zellforsch.**, **141**: 561 - 573, 1973.

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

SMINIA, T.; VAN DER KNAAP, W. P. W. and BOERRIGTER-BARENSEN, L. H.
Peroxidase-positive blood cells in snails. **J. Reticuloendoth. Soc.**, **31**: 339 - 404, 1982.

VAN DER KNAAP, W.P.W. ; LOKER, E.S. Immune Mechanisms in Trematode - Snail Interactions. **Parasitol. Today**, **6**: 175 – 182, 1990.

YOSHINO, T.P.; LODES, M. J. Secretory protein biosynthesis in snail hemocytes: *In vitro* modulation by larval schistosome excretory-secretory products. **J. Parasitol.**, **74**: 538 - 547, 1988.



PRANCHA 01

12/2

REAÇÕES HISTOQUÍMICAS

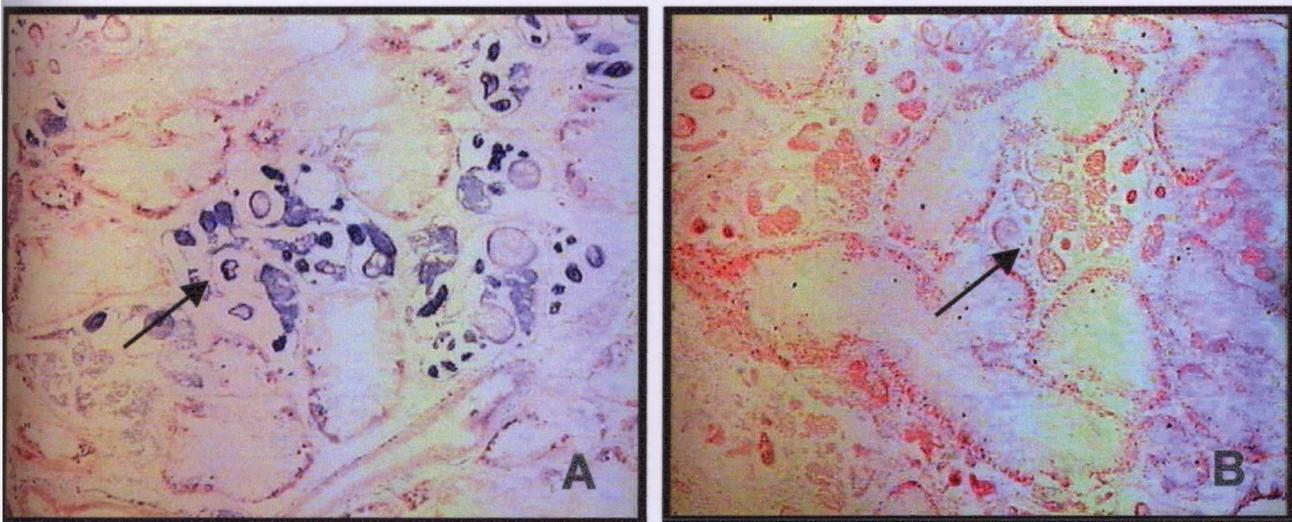


Figura 01: Formas larvais encontradas nos espaços intersticiais da glândula digestiva de um exemplar de *Biomphalaria glabrata* infectado pelo *Schistosoma mansoni* (setas). A, marcação positiva para a desidrogenase. B, controle negativo. Aumento 100 x.

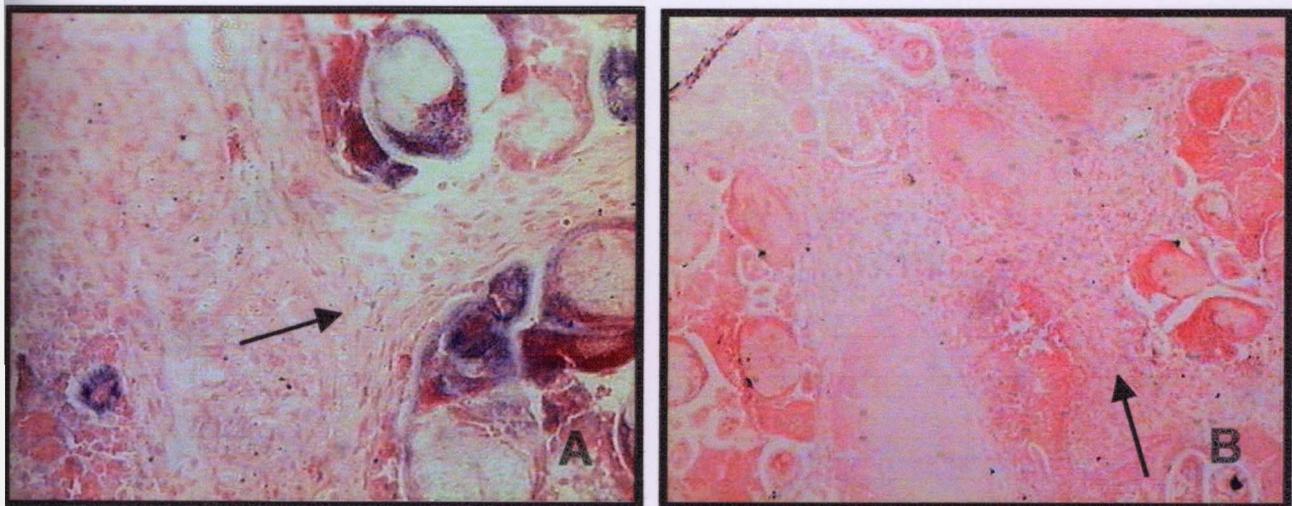


Figura 02: A, marcação negativa dos hemócitos (seta) para desidrogenase. Aumento 400 x. B, Controle negativo. Aumento 200 x.

PRANCHA 02

10/10/2023

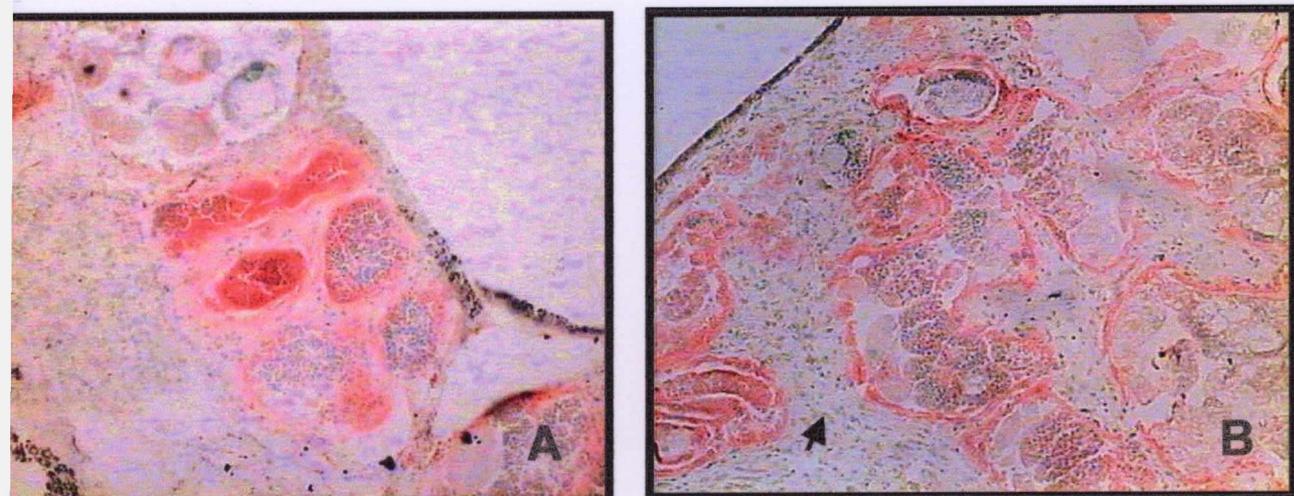


Figura 03: Ovoteste de um animal parasitado pelo *Schistosoma mansoni*. A, marcação positiva dos hemócitos localizados ao redor dos parasitos. B, marcação positiva na hemolinfa em zonas adjacentes ao parasito (interface hemócito x parasito). Hemócitos não marcados (cabeça de seta); fosfatase ácida. Aumento 200 x.

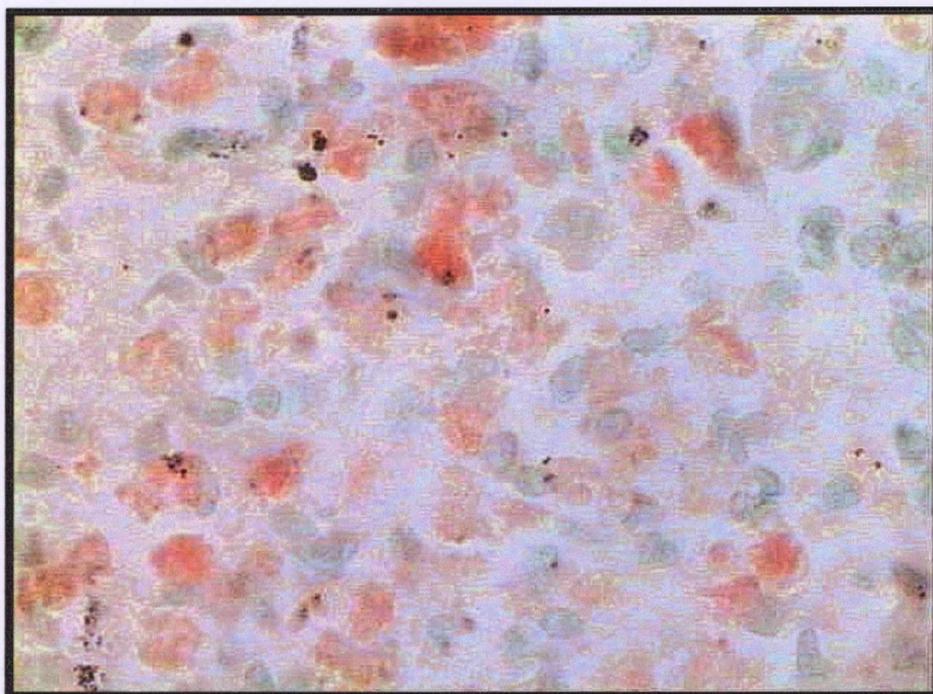


Figura 04: Marcação positiva em hemócitos observados nos espaços intersticiais do ovoteste; fosfatase ácida. Aumento 1000 x.

PRANCHA 03

MICROSCOPIA ELETRÔNICA



Figura 05: Visão geral dos hemócitos mostrando a presença de material amorfo nos espaços entre os pseudópodos. Aumento 3.000 x.

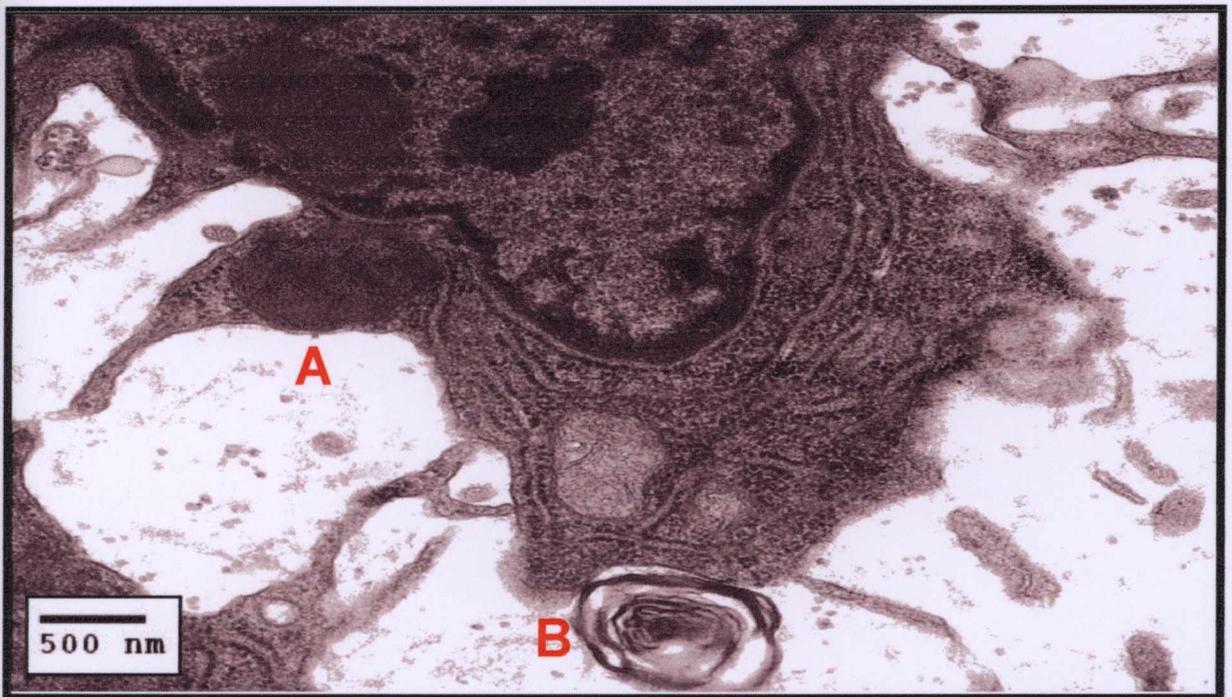


Figura 06: Detalhe de um hemócito com retículo endoplasmático bem desenvolvido. Observar no citoplasma inclusão citoplasmática, provavelmente de natureza lipídica (A). Figura de mielina extracelular (B). Aumento 30.000 x.

PRANCHA 04

12/12/2012

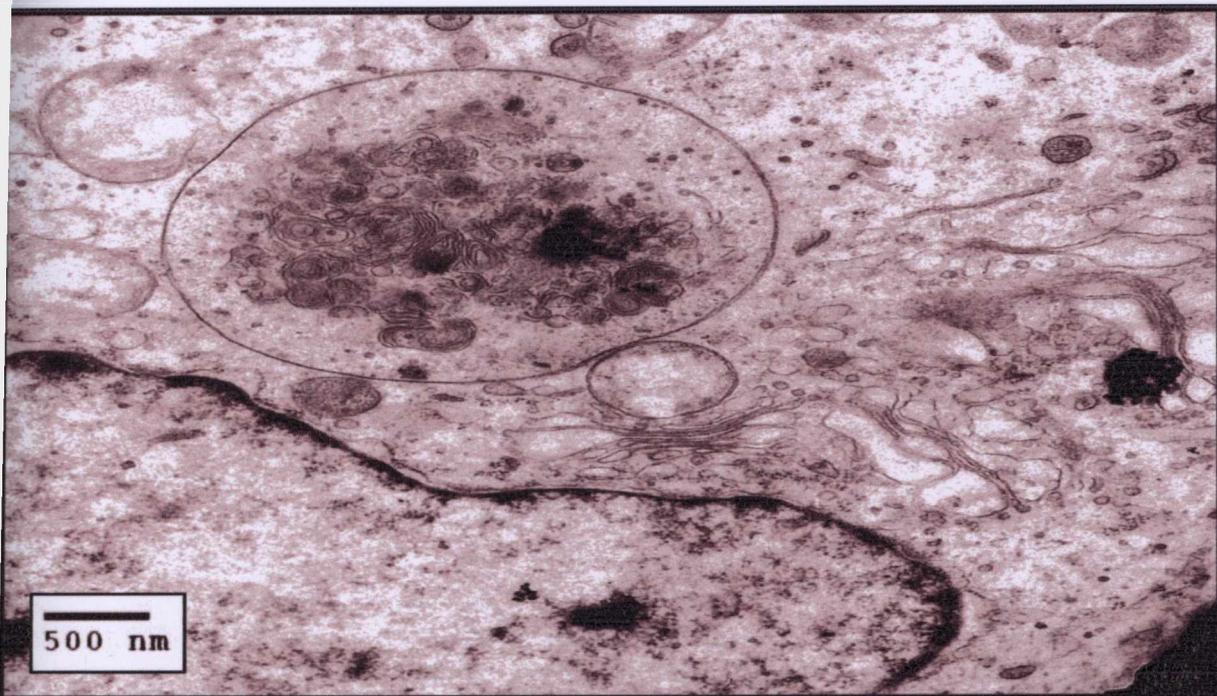


Figura 07: Detalhe de uma célula sem pseudópodos e com vacúolo autofágico (onde se vê material em degradação) presente no citoplasma. Também é possível observar o Complexo de Golgi. Aumento 12.000 X.

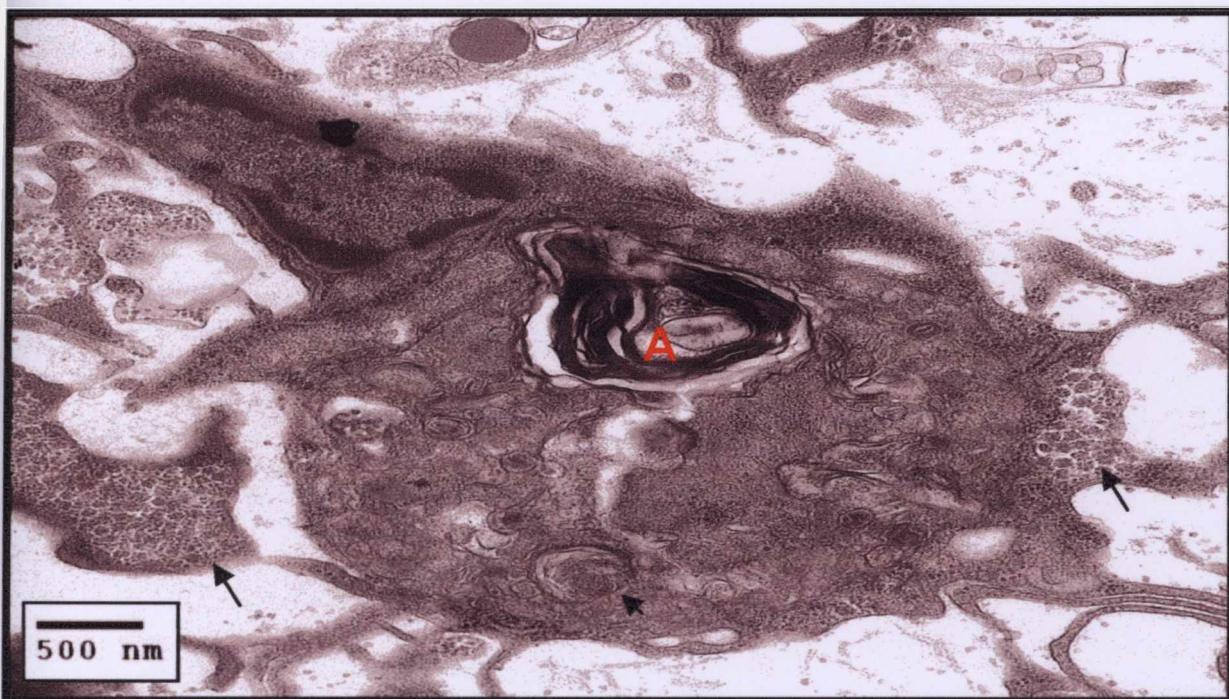


Figura 08: Hemócito de citoplasma distendido onde é possível observar a presença de (A) estruturas filamentosas, densas e concêntricas (figura de mielina), (Cabeça de seta) fagossomas e (Seta) grânulos de glicogênio. Aumento 20.000 x.

PRANCHA 05

370
140

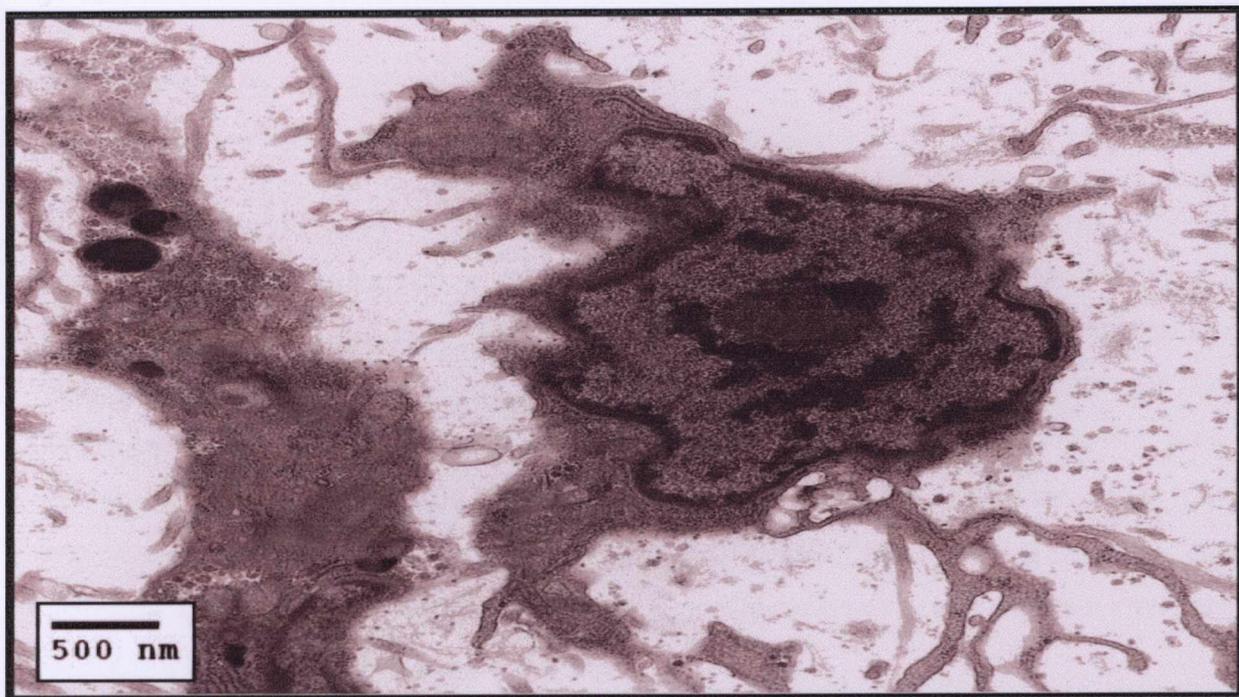


Figura 09: Detalhe de um hemócito de núcleo grande excêntrico e nucléolo granular.
Aumento 15.000 x.

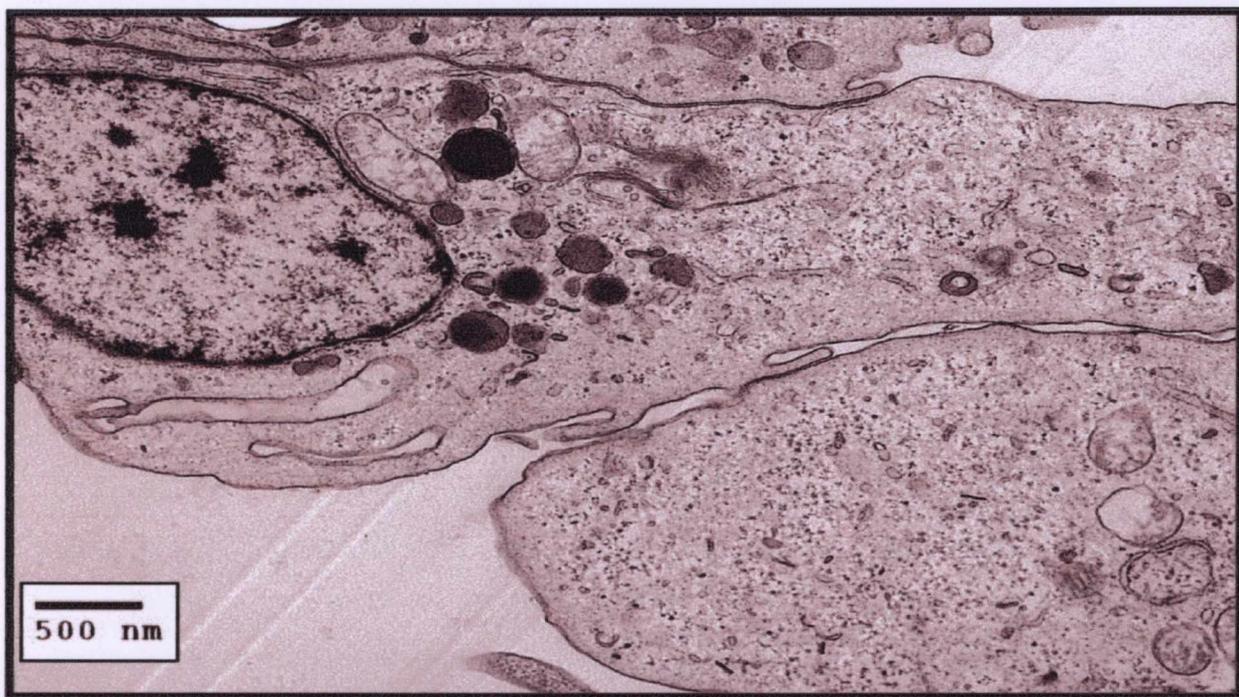


Figura 10: Hemócito encontrado em um exemplar de *Biomphalaria glabrata* infectado pelo *Schistosoma mansoni* sacrificado na 7ª semana.
Observar a presença de corpos eletrodensos de diâmetros diferentes no citoplasma da célula e mitocôndrias com cristólise. Aumento 10.000 x.

5 DISCUSSÃO

Inicialmente, este estudo teve como objetivo aprofundar os conhecimentos ultraestruturais e investigar a atividade enzimática dos hemócitos teciduais. Neste trabalho fez-se, ainda, uma tentativa para verificar se o número e a atividade dos hemócitos periféricos estavam correlacionados com a quantidade e o tipo de reação tecidual presente em *B. glabrata* submetidos à infecção experimental pelo *S. mansoni*. Quando infectados pelas larvas deste trematódeo, estes moluscos podem mostrar-se refratários, resistentes ou susceptíveis, enquanto a reação celular formada pode ser forte nos espécimes mais resistentes, mas menos intensa nos espécimes mais compatíveis.

A contagem total e diferencial de células da hemolinfa e a análise das secções histológicas não demonstraram um aumento significativo no número de hemócitos circulantes em caramujos infectados, exceto em animais sacrificados na 6ª semana pós-infecção. Este aumento brusco no número de hemócitos circulantes, chamado por alguns autores de "leucocitose", é resultante da infecção parasitária. Ele mostrou-se concordante com os achados assinalados por STUMP & GILBERTSON (1980), que observaram que, os granulócitos (células fagociticamente ativas) expressaram aumento em número em exemplares de *B. glabrata* parasitados por *S. mansoni*, em relação aos controles sem infecção. Neste estudo, os experimentos demonstraram nos animais sacrificados na 6ª semana um aumento no número de granulócitos ($2,07 \pm 0,54$ células/mm³) e hialinócitos ($0,63 \pm 0,11$ células/mm³), em relação aos normais não infectados que apresentaram, respectivamente, $1,58 \pm 0,12$ células/mm³ (granulócitos) e $0,25 \pm 0,05$ células/mm³ (hialinócitos). Hipoteticamente, pode-se sugerir que o parasitismo tenha ativado as células fagocíticas, já que se sabe por CHENG & SCHOENBERG (1980), que essas células são dependentes de fatores quimiotáticos ou fatores de reconhecimento, e que o número dessas células participantes na fagocitose de partículas é de 30 a 100% (ANDERSON & GOOD, 1976). Em nossos experimentos, obtivemos para os animais sacrificados na 6ª semana, 76,66% de granulócitos e 23,34% de hialinócitos. Entretanto, estes achados não se repetiram nas demais semanas de sacrifício. Nos

animais superiores, a leucocitose é um fenômeno resultante da infecção aguda que se caracteriza como uma resposta imediata, de curta duração; onde são observadas alterações no calibre vascular levando a um aumento do fluxo sanguíneo local; mudanças estruturais na microvasculatura que permitem a saída de proteínas plasmáticas, formando edema e emigração de leucócitos da microcirculação, principalmente neutrófilos e seu acúmulo no foco da lesão.

Nos gastrópodes, um perfil de variação semelhante à reação inflamatória dos vertebrados foi demonstrado em *B. glabrata* 30 minutos após a infecção pelo *S. mansoni* (FENG, 1965; 1967; SETA et al., 1996). STUMPF & GILBERTSON (1978) observaram um aumento do número de amebócitos circulantes em *B. glabrata* susceptível, 2 h após a infecção pelo *S. mansoni*. GRANATH & YOSHINO (1984) verificaram em *B. glabrata* da linhagem PR Albina, susceptível, um aumento precoce de amebócitos circulantes e, após uma hora de infecção, uma diminuição brusca, atingindo o valor inicial por volta das 24 h. Em *B. glabrata* infectados pelo *Echinostoma*, o aumento no número de hemócitos circulantes ocorreu após o 7º dia e permaneceu estável até o 20º dia; sendo observada em vários exemplares uma contagem de 1.300 hemócitos/mm³ (superior ao grupo controle – 199 hemócitos/mm³). Este período representa a fase maciça de colonização dos tecidos do hospedeiro por rédias-mães e rédias-filhas, as quais têm alta capacidade de mobilidade. As análises histológicas mostraram que neste modelo de parasitismo, o decréscimo no número de hemócitos circulantes estava associado a uma mobilização destas células para os tecidos, que foram lesados durante o período de produção de cercárias (isto é, na fase pré-patente da infecção).

Comparando os perfis de variação cinética dos hemócitos circulantes com a avaliação histopatológica pôde-se destacar alguns aspectos interessantes:

1. As pequenas variações observadas estiveram dentro dos limites da normalidade. É importante ressaltar que, estes animais mostraram-se muito susceptíveis à cepa do parasito; apresentando reações teciduais discretas e moderadas, com focos de proliferação e diferenciação de numerosos esporocistos e cercárias em diferentes órgãos como ovoteste, glândulas digestivas e túbulos renais.

Todavia, os sinais de proliferação celular ocorreram em alguns poucos casos. Estes sinais se relacionaram de maneira bem evidente com a redução local dos elementos parasitários e até mesmo com a eliminação de cercárias. Mas, nenhum reflexo foi notado na hemolinfa periférica, que distinguíssem estes casos dos demais. Desta forma, considerando-se os resultados aqui observados, a hemolinfa não constitui um bom espelho das reações teciduais que se passam no interior do molusco infectado pelo *S. mansoni*. Segundo LEWIS *et al.* (1993), algumas combinações genéticas de populações de *B. glabrata* e *S. mansoni* ajudam o parasito a se desenvolver e a proliferar nos tecidos, porque o molusco não o reconhece como corpo estranho. Em outras combinações o parasito é reconhecido e rapidamente encapsulado pelos hemócitos e fagocitado em poucos dias.

2. Em nosso modelo experimental, os exemplares infectados foram sacrificados entre a 6ª e a 9ª semana; quando já estavam eliminando cercárias (período pós-patente). ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980) já haviam indicado um aumento significativo no número de hemócitos entre a 4ª e 6ª semana pós-infecção. Usando o modelo *L. stagnalis* – *T. ocellata*, van der KNAAP *et al.* (1987) observaram um incremento tardio dos hemócitos circulantes entre a 5ª e a 14ª semana pós-exposição. REIS (1995), não observou aumento significativo do número de células estreladas em moluscos inoculados com hemolinfa e posteriormente infectados pelo *S. mansoni*. BORGES (2000) observou uma correlação entre o número de hemócitos e a resposta tecidual quando sacrificou caramujos *B. glabrata* com infecção tardia (12 semanas).

Nos caramujos infectados, a atividade fagocítica contra o Zimozan A não demonstrou diferenças com relação ao grupo normal, exceto na 6ª semana. É possível que neste período da infecção, a presença de substâncias provenientes do parasito tenham diminuído a ação fagocitária dos hemócitos. NODA & LOKER (1989) já haviam demonstrado que hemócitos, removidos de caramujos infectados por 5 semanas, tinham sua atividade fagocítica reduzida. O trabalho de FRYER & BAYNE (1990) mostrou que a incubação de miracídios de *S. mansoni* em hemolinfa de caramujos resistentes e susceptíveis modifica a capacidade fagocitária dos hemócitos. Entretanto, outra hipótese poderia ser levantada. A contagem diferencial

dos hemócitos, realizada neste ponto de sacrifício, demonstrou um aumento no número de células não-estreladas e não coradas pelo vermelho neutro (hialinócitos = 23%). Diversos estudos têm determinado que os hialinócitos representam um subtipo celular com características de células menos diferenciadas: alta taxa de mitose, baixo conteúdo enzimático, baixa capacidade fagocítica e pequena tendência de aderir ao vidro. Apresentam-se, ainda, como células "imaturas": ricas em ribossomos livres, tendo um retículo endoplasmático rugoso (RER) pouco desenvolvido, além de raras mitocôndrias (SMINIA & BARENSEN, 1980; BARRACO et al., 1993). Entretanto, nossos resultados não demonstram evidências de que os hialinócitos periféricos se transformem nos granulócitos teciduais; representando assim diferentes estágios ontogenéticos de um mesmo tipo celular. Nos animais superiores, todos os tipos celulares sanguíneos são derivados 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.

Em um trabalho prévio desenvolvido por nossa equipe, os hemócitos observados nas glândulas digestivas e no ovoteste revelaram apenas a presença de células ricas em pseudópodos, vacúolos digestivos e numerosas organelas lisossomais; indicando que este tipo celular predominava nos tecidos. Em nossas observações atuais, o mesmo tipo celular foi descrito. Entretanto, novas informações foram coletadas. Verificou-se, por exemplo, a ocorrência de células com retículo endoplasmático rugoso (RER) bem desenvolvido, sugerindo síntese protéica. E, acúmulo exacerbado de glicogênio no citoplasma indicando reserva energética.

Os macrófagos são capazes de aderir fortemente ao vidro, o que permite separá-los de populações heterogêneas de células. Diversos estudos têm sugerido que os hemócitos, em especial a subpopulação de granulócitos, são protótipos do macrófago de mamíferos na resposta imune. Caramujos resistentes formam reações multicelulares encapsulantes em torno dos organismos estranhos, tanto esporocistos do *Echinostoma*, como do *Schistosoma*, que se assemelham morfológicamente aos granulomas formados nos mamíferos (SMINIA et al., 1982; JEONG et al., 1983). Estudos sobre fagocitose também revelaram evidências da relação entre estes dois

tipos celulares. BEZERRA et al. (1997), demonstraram que cerca de 80% dos hemócitos, tanto de *B. glabrata* quanto de *B. tenagophila*, têm capacidade de incorporar partículas de vermelho neutro, de maneira semelhante aos macrófagos. MARTINS-SOUZA et al. (2003), demonstraram que a inoculação de sílica em *B. tenagophila* da linhagem de Taim elimina parcialmente a população de granulócitos na hemolinfa, mas não altera a capacidade fagocítica dessas células e não altera a resistência desses caramujos à infecção pelo *S. mansoni*. Em mamíferos, o tratamento com sílica também produz a destruição dos macrófagos porque interage com a membrana dos lisossomas primários ocasionando a liberação de enzimas proteolíticas para o citoplasma resultando na lise da célula.

Nos testes histoquímicos, a presença da fosfatase ácida foi observada tanto nos hemócitos das reações de encapsulamento como nos localizados fora desta zona de destruição. Entretanto, algumas células se mostraram negativas provavelmente porque estavam quiescentes ou inativas ou em estágios metabólicos diferenciados. Nos macrófagos e neutrófilos, a fosfatase ácida é uma enzima facilmente associada a grânulos azurófilos. Usando a fosfatase ácida como marcador, CHENG & GARRABRANT (1977) concluíram que as células que participavam da destruição dos esporocistos-mães do *S. mansoni*, em *B. glabrata* (linhagem 10-R2), são exclusivamente os granulócitos, visto que, a presença desta enzima não foi detectada nos hialinócitos. MCKERROW et al. (1985) compararam os hemócitos de *B. glabrata*, presentes tanto no órgão produtor de hemócitos (OPH) quanto nas reações de encapsulamento formadas em torno dos esporocistos de *E. paraensei*, com os macrófagos epitelióides dos granulomas, monócitos circulantes e polimorfonucleares (PMNs) de pacientes com sarcoidose ou tuberculose. Segundo estes autores, os hemócitos demonstraram as mesmas reações positivas e negativas, como observado nos macrófagos de granulomas humanos; exceto para a enzima α -naftil acetato esterase, que foi menos intensa. Entretanto, quando comparados aos hemócitos de bivalves (HUFFMAN & TRIPP, 1982; PIPE 1991) ou aos de outros pulmonados (SMINIA & BARENDSSEN, 1980; MONTEIL & MATRICON-GONDRAN, 1993), os hemócitos de *B. glabrata* demonstram pouca atividade enzimática, sendo o produto de secreção estocado em grânulos discretos. MATRICON-GORDAN & LETOCART (1999), observaram que nos hemócitos de *B.*

glabrata a atividade da fosfatase ácida foi associada a poucos grânulos e ocasionalmente a rede trans-Golgi.

Os dados obtidos neste trabalho apóiam, portanto, a analogia de que os hemócitos partilham similaridades com os macrófagos ativados dos vertebrados. E, como tal, possuem enzimas hidrolíticas e capacidade fagocítica; onde englobam e destroem o agente agressor como parte do processo de restabelecimento da função normal do hospedeiro. Além disso, ficou evidente que, se alguns moluscos infectados tivessem apresentado reações teciduais intensas, com acúmulo ou infiltração difusa dos hemócitos e freqüente formação de lesões encapsulantes, os resultados da hemolinfa, caso persistissem os mesmos de agora, poderiam ser tomados com maior grau de confiabilidade. Os estudos ao longo desta linha devem prosseguir.

6 CONCLUSÕES

1. Em *Biomphalaria glabrata* da linhagem estudada, não foi verificada uma relação positiva entre o número de hemócitos e as reações histopatológicas observadas nos tecidos, principalmente das glândulas digestivas, do ovoteste e dos túbulos renais;
2. A atividade fagocitária dos hemócitos circulantes da *Biomphalaria glabrata*, testada pelo zimozan A, revelou pequena alteração durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni*;
3. As modificações observadas nas células que participam das reações de defesa da *Biomphalaria glabrata* contra o *Schistosoma mansoni* confirmam as semelhanças morfológicas e funcionais de tais células com os macrófagos dos mamíferos;
4. Os dados histoquímicos demonstraram que os hemócitos da *Biomphalaria glabrata* podem exibir características funcionais diferenciadas quando envolvidos na reação contra o *Schistosoma mansoni*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-SALAM, J. M. & MICHELSON, E. H. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes: Effect of *Schistosoma mansoni* infection on in vitro phagocytosis. **J. Invertebr. Pathol.**, **35**: 241 - 248, 1980.
- ADEMA, C. M., van DEUTEKOM-MULDER, E. C., van der KNAAP, W. P., MEULEMAN, E. A. & SMINIA, T. Generation of oxygen radicals in hemocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* in relation to the rate of phagocytosis. **Dev. Comp. Immunol.**, **15**: 17 - 26, 1991.
- ADEMA, C. M.; HARRIS, R. A. & VAN DEUTEKOM-MULDER, E. C. A. Comparative Study of Hemocytes from Six Different Snails: Morphology and Functional Aspects. **J. Invertebr. Pathol.**, **59**: 24 - 32, 1992.
- ADEMA, C.M.; HERTEL, L. A.; MILLER, R. D. & LOKER, E. S. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by invertebrate after infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 8691 - 8696, 1997.
- AMEN, R. I. & JONG-BRINK, M. *Trichobilharzia ocellata* infections in its snail host *Lymnaea stagnalis* – an in vitro study showing direct and indirect effects on the snail defense system, via the host central nervous system. **Parasitol.**, **105**: 409 - 416, 1992.
- ANDERSON, R. S. & GOOD, R. A. Opsonic involvement phagocytosis by mollusk hemocytes. **J. Invertebr. Pathol.**, **27**: 57 - 64, 1976
- ARATANI Y, KOYAMA H, NYUI S, SUZUKI K, KURA F, MAEDA N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. **Infect. Immun.**, **67**:1828 - 36, 1999.

ARATANI, Y.; KURA, F.; WATANABE, H.; AKAGAWA, H.; TAKANO, Y.; SUZUKI, K.; MAEDA, N. & KOYAMA, H. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. **J. Infect. Dis.**, **182**: 1276 - 1279, 2000.

ARUMUGAM, M.; ROMESTAND, B.; TORREILLES, J & ROCH, P. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. **Eur. J. Cell. Biol.**, **79(7)**: 513 - 519, 2000.

BARRACCO, M. A.; STEIL, A. A. & GARGIONI, R. Morphological Characterization of the Hemocytes of the Pulmonate Snail, *Biomphalaria tenagophila*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **88**: 73 - 83, 1993.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P.M. & DEWAN, P.C. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Biomphalaria glabrata* *in vitro*. **J. Parasitol.**, **66**: 413 - 419, 1980a.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P.M. & DEWAN, P.C. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail host for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, **50**: 409 - 416, 1980b.

BAYNE, C. & YOSHINO, T. P. Determinants of Compatibility in Mollusc - Trematode Parasitism. **Amer. Zool.**, **29**: 399 - 407, 1989.

BAYNE, C. J. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. **BioScience**, **40**: 723 - 731, 1990.

BAYNE, C.J. & FRYER, S. E. Phagocytosis and invertebrate opsonins in relation to parasitism. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **712**: 162 - 177, 1994.

BAYNE, C.J.; HAHN, U.K. & BENDER, R. C. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. **Parasitol.**, **123**: S159 - S167, 2001.

BECK, G. & HABICHT, G.S. Isolation and characterization of a primitive interleukin-1-like protein from invertebrate, *Asterias forbesi*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, **83**: 7429 - 7433, 1986.

BECK, G.; VASTA, G. R.; MARCHALONIS, J. J. & HABICHT, G.S. Characterization of interleukin-1 activity in tunicatus. **Comp. Biochem. Physiol.**, **92B**: 93 - 98, 1989.

BECK, G. & HABICHT, G. S. Purification and biochemical characterization of an invertebrate interleukin 1. **Mol. Immunol.**, **28**: 577 - 584, 1991.

BECK, G.; O'BRIEN R. F.; HABICHT, G.S.; STILLMAN, D. L.; COOPER, E. L. & RAFTOS, D. A. Invertebrate cytokines III: Invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. **Cell Immunol.**, **146**: 284 - 299, 1993.

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

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

BORGES, C.M.C. & ANDRADE, Z. A. Extra-cellular Matrix Changes in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98**: 135 - 139, 2003.

BOSWELL, C.A. & BAYNE, C.T. Lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity in an invertebrate model: Con A does not act as a bridge. **Immunol.**, **57**: 261 - 264, 1986.

BOYER, O.O.M.; PORCHET, E.; CAPRON, A. & DISSOUS, C. Characterization of immunoreactive TNF- α molecules in the gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Dev. Comp. Immunol.**, **18**: 211 - 218, 1994.

BUYS, J.; WEVER, R. & RUITENBERG, E. J. Myeloperoxidase is more efficient than eosinophil peroxidase in the in vitro killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. **Immunol.**, **51**: 601 - 607, 1984.

BURKE, R. D. & WATKINS, R.F. Stimulation of starfish coelomocytes by interleukin-1. **Bioch. Bioph. Res. Commun.**, **180**: 579 - 584, 1991.

CAPRON A. & CAMUS, D. Immunoregulation of parasite extracts. **Springer Semin. Immunopathol.**, **2**: 69, 1979.

CAVACINI, L. A.; GUIDOTTI, M.; PARKE, L. A.; MELANCON-KAPLAN, J. M. & WEIDANZ, W. P. Reassessment of the role of splenic leucocyte oxidative activity and macrophage activation in expression of immunity to malaria. **Infect. Immun.**, **57**: 3677 - 3682, 1989.

CHENG, T. F. Functional Morphology and Biochemistry of molluscan Phagocytes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **266**: 343 - 379, 1975.

CHENG, T. F. The role of lysosomes in molluscan inflammation. **Amer. Zool.**, **23**: 129 - 144, 1983.

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 - 472, 1977.

CHENG, T. C. & GUIDA, V. G. Hemocytes of *Bulinus truncatus rohffsi* (Mollusca: Gastropoda). **J. Invertebr. Pathol.**, **35**: 158 - 167, 1980.

- CHENG, T. C. & SCHOENBERG, D. A. Phagocytic funnel-like pseudopodia in lectin-treated gastropod hemocytes. **J. Invertebr. Pathol.**, **36**: 141 - 144, 1980.
- CHERBAS, L. The induction of na injury reaction in cultured haemocytes from saturniid pupae. **J. Insect Physiol.**, **19**: 2011 - 2023, 1973.
- CONNORS, V.A. & YOSHINO, T.P. *In vitro* effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, **76**: 895 - 902, 1990.
- CONNORS, V. A.; BURON, I. & GRANATH, W. O. *Schistosoma mansoni*: interleukin-1 increases phagocytosis and superoxide production by hemocytes and decreases output of cercariae in schistosome-susceptible *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, **80**: 139 - 148, 1995.
- CONNORS, V. A.; de BURON, I.; JOURDANE, J.; THÉRON, A.; AGNER, A. & GRANATH JR., W.O. Recombinant Human Interleukin-1 Mediated Killing of *Schistosoma mansoni* Primary Sporocysts in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, **84**: 920 - 926, 1998.
- CONTE A. & OTTAVIANI E. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. **FEBS Lett.**, **365**: 120 - 124, 1995.
- DeGAFFÉ, G. & LOKER, E. S. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Echinostoma paraensei*: correlation with the effect of parasite secretory-excretory products on host hemocyte spreading. **J. Invertebr. Pathol.**, **71**: 64 - 72, 1998.
- DIKKEBOOM, R.; Van Der KNAPP, 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 - 47, 1984.

DIKKEBOOM, R.; TIJNAGEL, J.M.G.H.; MULDER, E.C. & Van Der KNAAP, W.P.W. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* generate reactive forms of oxygen. **J. Invert. Pathol.**, **49**: 321 - 331, 1987.

DUVAUX-MIRET, O.; STEFANO, G. B.; SMITH, E. M.; DISSOUS, C. & CAPRON, A. Immunosuppression in the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoactive neuropeptides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **89**: 778 - 781, 1992.

FELTON, G.W. & SUMMERS, C.B. Antioxidant systems in insects. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, **29**: 187 - 197, 1995.

FENG, S. Y. Heart rate and leucocyte circulation in *Cassostrea virginica* (Gmelin). **Biol. Bull.**, **128**: 198 - 210, 1965.

FENG, S. Y. Responses of molluscs to foreign bodies with special reference to the oyster. **Fed. Proc.**, **26**: 1685 - 1692, 1967.

FINSTAD, C. L.; GOOD, R. A. & LITMAN, C. M. The erythrocyte agglutinin from *Limulus polyphemus* hemolymph: molecular structure and biological function. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **234**: 170 - 182, 1974.

FOLEY, D.A. & CHENG, T.C. Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis. **J. Invertebr. Pathol.**, **29**: 321 - 325, 1977.

FRYER, S. E. & BAYNE, C. J. Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): A strain-specific, time-dependent process. **Parasite Immunol.**, **11**: 269 - 278, 1989.

FRYER, S.E. & BAYNE, C. J. Opsonization of yeast by the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): a strain-specific, time-dependent process. **Parasite Immunol.**, **11**: 269 - 278, 1990.

FRYER, S.E. & BAYNE, C. J. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, **76**: 45 - 52, 1990.

FRYER, S.E. & BAYNE, C. J. Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in strain-specific manner by adsorbed plasma components. **Dev. Comp. Immunol.**, **20**: 23 - 57, 1996.

GUARALDO, A. M. A.; MAGALHÃES, L. A.; RANGEL, H. A. & PAREJA, G. Evolução dos Esporoístos de *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) em *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1918) e *Biomphalaria tenagophila* (D'ORBIGNY, 1835). **Rev. Saúde Pública de São Paulo**, **5**: 436 - 448, 1981.

GRANATH, W.O., Jr. & YOSHINO, T.P. Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. **J. Exp. Zool.**, **226**: 205 – 210, 1983.

GRANATH, W.O., Jr. & YOSHINO, T.P. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, **58**: 188 - 193, 1984.

GRANATH JR., W. O.; CONNORS, V.A. & TARLETON, R. L. Interleukin-1 activity in haemolymph 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 - 27, 1994.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C. & BAYNE, C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. **J. Parasitol.**, **87**: 292 - 299, 2001.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C. & BAYNE, C. J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, **87**: 778 - 785, 2001a.

HARRIS, K. R. The Fine Structure of Encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 446 - 463, 1975.

HARRIS, K. R. & CHENG, T. C. The Encapsulation Process in *Biomphalaria glabrata* Experimentally Infected with Metastrongylide *Angiostrongylus cantonensis*: Enzyme Histochemistry. **J. Invertebr. Pathol.**, **26**: 367 - 374, 1975.

HUFFMAN, J. E. & TRIPP, M. R. Cell types and hydrolytic enzymes of the soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes. **J. Invert. Pathol.**, **40**: 68 - 74, 1982.

HUGHES, T.K. Jr.; SMITH, E. M.; CHIN, R.; CADET, P.; SINISTERRA, J.; LEUNG, M. K.; SHIPP, M. A.; SCHARRER, B. & STEFANO, G. B. Interactions of immunoactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusk *Mytilus edulis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 4426 - 4429, 1990.

HUGHES, T.K. Jr.; SMITH, E.M. & STEFANO, G.B. Detection of immunoreactive interleukin 6 in invertebrate hemolymph and nervous tissue. **Prog. Neuro. Endocrin. Immunol.**, **4**: 234 - 239, 1991.

JEONG, K. H.; LIE, K. J. & HEYNEMAN, D. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Dev. Compl. Immunol.**, **7**: 217, 1983.

JOHNSTON, L. A. & YOSHINO, P. Analysis of lectin and snail plasma binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol.**, **112**: 469 - 479, 1996.

JOKY, A.; MATRICON-GONDRAN, M. & BENEX, J. Fine structural differences in the amoebocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Dev. Comp. Immunol.**, **7**: 669 - 672, 1983.

KEMP, W.M.; BROWN, P. R.; MERRITT, S. C. & MILLER R. E. Tegument-associated antigen modulation by adult male *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, **124**: 806, 1980.

KINOTI G. K. Observation on the infection of bulinid snails with *Schistosoma matheii*. II. The mechanism of resistance to infection. **Parasitol.**, **62**: 161 - 170, 1971.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen-dependent cytotoxic mechanisms of phagocytes. In: 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**: 56 - 62, 1992.

KLEIN, J. Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? **Scand. J. Immunol.**, **29**: 499 - 505, 1989.

KROSCHINSKI, J. & RENWRANTZ, L. Determination of pH values inside the digestive vacuoles of hemocytes from *Mytilus edulis*. **J. Invert. Pathol.**, **51**: 73 - 79, 1988.

LEWIS, F. A.; RICHARDS, C. S.; KNIGHT, M.; COOPER, L. A. & CLARK, B. *Schistosoma mansoni*: Analysis of an unusual infection phenotype in the intermediate host snail *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, **77**: 349 - 361, 1993.

LIE, K. J.; JEONG, K. H. & HEYNEMAN, D. Molluscan Host Reactions to Helminthic Infection. In: Immune Responses in **Parasitic Infections**. **4**: 211 - 261, 1987.

LODES, M. J. & YOSHINO, T. P. The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. **J. Invertebr. Pathol.**, **56**(1):75 - 85, 1990

Lo VERDE, P. T.; GHERSON, J. & RICHARDS, C. S. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: fine structure. **Dev. Comp. Immunol.**, **31**: 999, 1982.

LOKER, E. S.; YUI, M. A. & BAYNE, C. J. *Schistosoma mansoni*: Agglutination of Sporocysts and Formation of Gels on Miracidia Transforming in Plasma of *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, **58**: 56 - 62, 1984.

LOKER, E. S.; CIMINO, D. F. & HERTEL, L. A. Excretory-Secretory Products of *Echinostoma paraensi* Sporocysts Mediate Interference with *Biomphalaria glabrata* Hemocyte Functions. **J. Parasitol.**, **78**: 104 - 115, 1992.

MAKINO, R.; TANAKA, T.; IIZUKA, T.; ISHIMURA, Y. & KANEGASAKI, S. Stoichiometric conversion of oxygen to superoxide anion during the respiratory burst in neutrophils. Direct evidence by a new method for measurement of superoxide anion with diacetyldeuteroheme-substituted horseradish peroxidase. **J. Biol. Chem.**, **261**: 11444 - 11447, 1986.

MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A. J.; COELHO, P. M. Z. & NEGRÃO-CORRÊA, D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. **Parasitol Res.**, **91(6)**: 500 -7, 2003.

MATRICON-GONDRAN, M. & LETOCART, M. Internal defense of the snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of Hemocytes and Fixed Phagocytes. **J. Invertebr. Pathol.**, **74**: 224 - 234, 1999.

MCKERROW, J. H.; JEONG, K.H. & BECKSTEAD, J. H. Enzyme histochemical comparison of *Biomphalaria glabrata* amebocytes with human granuloma macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, **37**: 341 - 347, 1985.

MILLAR, D. A. & RATCLIFFE, N. A. Invertebrates. In: TURNER, R. J. (ed). Immunology: a comparative approach, England: John Wiley & Sons, 1994. Cap. 2, p.29 - 68.

MONTEIL, J. F. & MATRICON-GONDRAN, M. Structural and cytochemical study of hemocytes in normal and trematode infected *Lymnaea truncatula*. **Parasitol. Res.**, **76**: 675 - 682, 1993.

MOORE, M.N. & LOWE, P.M. The cytology and cytochemistry of hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally infected 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, 1952.

NODA, S. & LOKER, E. S. Phagocytic activity of hemocytes of M-line *Biomphalaria glabrata* snails: Effects of exposure to the trematode *Echinostoma paraensei*. **J. Parasitol.**, **72**: 261 - 269, 1989.

OTTAVIANI E.; FRANCHINI A. & FRANCESCHI C. Presence of several cytokine-like molecules in molluscan hemocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **195**: 984 - 988, 1993.

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

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

PAN, CHIA-TUNG. Studies on the Host – Parasite Relationship Between *Schistosoma mansoni* and Snail *Australorbis glabratus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **14**: 931 - 976, 1965.

PIPE, R. K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. **Histochem. J.**, **22**: 595 - 603, 1990.

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 - 9522, 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 - 240, 1992.
- REIS, S. M.; MAGALHÃES, L. A. & de CARVALHO, J. F. The effect of hemolymph inoculation on the mechanism of defense of *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) **Rev. Saúde Pública**, 29(4): 259 - 64, 1995.
- RICHARDS, E. H. & RENWRANTZ, L. 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., B**. **161**: 43 - 54, 1991.
- ROOS, D. The metabolic response to phagocytosis. (1980) In: ADEMA, C.M.; HARRIS, R. A. & Van DEUTEKOM-MULDER, E. C. A comparative study of hemocytes from six different snails: Morphology and Functional aspects. **J. Invertebr. Pathol.**, **59**: 24 - 32, 1992.
- ROSEN, G.M.; POU, S.; RAMOS, C.L.; COHEN, M.S. & BRITIGAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. **Faseb J.**, **9**: 200 - 209, 1995.
- ROWLEY, A. F. The evolution of inflammatory mediators. **Mediat. Inflamm.**, **5**: 3 - 13, 1996.
- SCHARRER, B.; LIESBET, P.; SMITH, E. M.; HUGHES, T.K.; YIU, L.; POPE, M. & STEFANO, G. B. The presence and effects of mammalian signal molecules in immunocytes of the insect *Leucophaea maderae*. **Cell Tissue Res.**, **283**: 93 - 97, 1996.
- SCHLENK, D.; MARTINEZ, P. G. & LIVINGSTONE, D. R. Studies on myeloperoxidase activity in common mussel, *Mytilus edulis* L. **Comp. Biochem. Physiol.**, **99C**: 63 - 68, 1991.

SETA, L.; MAGALHÃES, L. A. & CARVALHO, J. F. Comportamento dos amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni*, inoculação de tinta nanquim e fratura da concha. **Rev. Saúde Pública**, **30(4)**: 332 - 340, 1996.

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

SMINIA, T.; Van Der KNAAP, W. P. W. & BOERRIGTER-BARENSEN, L. H. Peroxidase-positive blood cells in snails. **J. Reticuloendoth. Soc.**, **31**: 339 - 404, 1992.

SMINIA, T. & Van Der KNAAP, W. P. W. Cell and Molecules in molluscan immunity. **Dev. Comp. Immunol.**, **11**: 17 - 28, 1987.

STUMPF, J. L. & GILBERTSON, D. E. Hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: Factors Affecting Variability. **J. Invertebr. Pathol.**, **32**: 177 - 181, 1978.

STUMP, J. L. & GILBERTSON, D. E. Differential leukocytic responses of *Biomphalaria glabrata* to infection with *S. mansoni*. **J. Invert. Pathol.**, **35**: 217 - 18, 1980.

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

SULLIVAN, J. T.; CHENG, T. C. & HOWLAND, K. H. Mitotic responses of anterior pericardial wall of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) subjected to challenge. **J. Invert. Pathol.**, **44**: 114 - 116, 1984.

- SULLIVAN, J. T.; PIKLOS, S. S. & ALONZO, A. Q. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte – producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, **90(1)**: 92 - 96, 2004.
- SUN, S. C.; LINDSTROM, I.; BOMANAN, H. G.; FAYE, I. & SCHMIDT, O. Hemolin: an insect immune protein belonging to the immunoglobulin super family. **Science**, **250**: 1729 - 1732, 1990.
- TORREILLES, J.; GUERIN, M.C. & ROCH, P. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. **Dev. Comp. Immunol.**, **21 (3)**: 267 - 275, 1997.
- TORREILLES, J. & GUERIN, M.C. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes *in vitro*. **Fish and Shellfish Immunol.**, **9 (7)**: 509 - 518, 1999.
- UCHIKAWA, R. & LOKER, E. S. Lectin-binding properties of the surfaces of in vitro-transformed *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* sporozoites. **J. Parasitol.**, **77**: 742 - 748, 1991.
- Van Der KNAAP, W. P. W.; MEULEMAN, E. A. & SMINIA, T. Alterations in the internal defense system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. **Parasitol. Res.**, **73**: 57 - 65, 1987.
- VAN DER KNAAP, W.P.W. & LOKER, E.S. Immune Mechanisms in Trematode - Snail Interactions. **Parasitol. Today**, **6**: 175 – 182, 1990.
- YASDANBAKSH, M.; TAI, P.; SPRY, C. J. F.; GLEICH, C.J. & ROSS, D. Synergism between eosinophil cationic protein and oxygen metabolites in killing of Schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.**, **138**: 3443 - 3447, 1987.

YAKOVLEVA, N. V.; SAMOILOVICH, M. P. & GORBUSHIN, A. M. The diversity of strategies of defense from pathogens in mollusks. **J. Evol. Bioch. Physiol.**; **37**: 358 - 367, 2001.

YOSHINO, T. P. Encapsulation Response of the Marine Prosobranch *Cerithidea californica* to natural Infection of *Renicola buchanani* Sporocysts (Trematoda: Renicolidae). **Int. J. Parasitol.**, **6**: 423 - 431, 1976.

YOSHINO, T.P.; BOYLE J.P. & HUMPHRIES, J. E. Receptor-ligand interactions and cellular signaling at the host-parasite interface. **Parasitol.**, **123**: S143 - S157, 2001.

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

8 ANEXOS

116

Comparative Histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with Variable Degrees of Resistance to *Schistosoma mansoni* Miracidia

Cecilia Pereira de Souza, Claudia Cunha Borges/⁺, Andréa Guimarães Santana*, Zilton A Andrade*/⁺⁺

Laboratório de Malacologia, Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil *Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ, Rua Valdemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, BA, Brasil

A comparative histopathological study of three snails species - Biomphalaria glabrata, B. tenagophila and B. straminea - which had been infected with Schistosoma mansoni miracidia revealed similar qualitative features, consisting of areas of sporocyst proliferation and differentiation associated with reactive host reaction, at the time they were actively eliminating great number of cercariae. However, in specimens that were exposed to miracidia but failed to eliminate cercariae later on, different histopathological pictures were observed in different snail species.

While B. glabrata exhibited frequent focal (granulomatous) proliferation of amebocytes in several organs, B. tenagophila and B. straminea only rarely showed such reactive changes, suggesting that the mechanism of resistance to miracidial infection probably follows different pathways in the snail species studied.

Key words: *Biomphalaria* histopathology - *Schistosoma mansoni* - differential susceptibility

Biomphalaria glabrata is highly susceptible to infection with *Schistosoma mansoni* miracidia and represents the main intermediate host for that trematode in the large endemic area of northeastern and southeastern Brazil (Paraense 1970). However, susceptibility to infection is variable among different specimens, a high degree of resistance being sometimes exhibited by some of them (Pan 1965). Recently, Godoy et al. (1997) reported that *B. glabrata*, which completely failed to emit cercariae after a relatively prolonged time following exposition to *S. mansoni* miracidia, exhibited focal inflammatory and granulomatous lesions in several organs in the absence of demonstrable parasites, histopathologically.

Such lesions were interpreted as the aftermath of a successful clearance reaction against invading sporocysts, suggestive of high degree of resistance.

There are two other important *S. mansoni* intermediate host snails in Brazil: *B. tenagophila* and *B. straminea*. Several studies have attempted to comparatively evaluate the behavior of those susceptible snails regarding their interaction with *S.*

mansoni (Barbosa 1975, Paraense & Correa 1978, Souza et al. 1995a, b) but whether the peculiar tissue reactivity described by Godoy et al. (1997) in resistant *B. glabrata* does ever occur in these other two species, and to which extent and frequency, has hitherto not been reported.

Present investigation is concerned with a comparative study of the tissue reactions in three *S. mansoni* intermediate hosts: *B. glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea*. The purpose is to comparatively describe the histopathologic findings and attempt to correlate them with previous malacological data indicative of different degrees of susceptibility among the three snail species.

MATERIALS AND METHODS

Laboratory bred *B. glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* from the State of Minas Gerais, Brazil, were individually exposed to 50 miracidia of *S. mansoni*. The strain used was the SJ-strain which is better adapted to *B. tenagophila* snails (Paraense & Correa 1981). The exposed snails were divided into two groups according to whether they were or not emitting cercariae. Emission of cercariae occurred after the first month from exposure. Those snails that did not emit cercariae were observed during three months and were then selected for study. Randomly chosen snails, representative of the two groups and belonging to the three species were submitted to histological exami-

⁺ CNPq Research Fellow

⁺⁺ Corresponding author. Fax: +55-71-356.4292

Received 19 February 1997

Accepted 12 May 1997

nation. Since *B. glabrata* presented high mortality rate, the cases for histological study was complemented with previously obtained material. As controls, non-exposed snails belonging to the same three species were also used. The snails were removed from the shell under menthol anesthesia, fixed *in totum* in Bouin's fluid for 6 hr and then transferred to 70% alcohol. Further procedures included dehydration in 100% alcohol, clearing in xylol and paraffin embedding. Five µm paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin and eosin, and eventually with the sirius-red method for collagen and the Periodic-acid Schiff (PAS) with and without previous diastase treatment. Slides stained with sirius-red were also microscopically examined under polarized light.

RESULTS

Table I shows the general comparative malacological results obtained with the infection of the three snail species. *B. glabrata* was the most susceptible, followed by *B. tenagophila* and *B. straminea* in that order. Table II summarizes the main histological results. Quantitative histological findings were different for each snail species. Description will consider the qualitative changes which were common to all snails belonging to each group, according to cercarial elimination.

Snails shedding cercariae - Developing sporocysts were found in large numbers in all snails which were eliminating cercariae, but not in those that did not. The secondary sporocysts found appeared larger and more numerous in *B. glabrata*, and slightly more frequent in *B. tenagophila* than in *B. straminea*, but the general microscopical appearance was similar regardless snail species. Sporocysts were usually formed as a space-occupying lesion, without any visible changes in the neighboring snail tissues. However, sporocysts were also found in several locations, side by side with variable degree of tissue reactions (Fig. 1). These latter consisted of either focal and diffuse proliferation of amebocytes, frequently forming encapsulating or granulomatous structures centered by sporocyst and cercaria remnants, and limited peripherally by concentric laminations of thin fibers.

Sometimes an encapsulating, ring-like, cellular reaction was formed around a collection of viable cercariae, which exhibited different degrees of maturation (Fig. 2). Cells involved in these reactions were mainly macrophage-like amebocytes. They varied in shape from round to fusiform, with little variation in size. The stroma of the inflammatory foci was represented by an increased amount of the amorphous and fibrillar components of the extracellular matrix, sometimes mimicking the pro-

TABLE I

Comparative results on the infection of three *Biomphalaria* species by 50 miracidia of *Schistosoma mansoni*

Species	Exposed snails	No. of positives ^a	Infection rate ^a	Mortality rate ^a
<i>B. glabrata</i>	50	26	96.3%	46%
<i>B. tenagophila</i>	50	17	68 %	50%
<i>B. straminea</i>	50	6	18.7%	36%

a: 37 days after exposition

TABLE II

Comparative histopathological study of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* exposed to *Schistosoma mansoni* miracidia, emitting (Positives) or not cercariae (Negatives) after three months from exposure, regarding the presence of sporocysts (Sp.) and inflammatory lesions (L.)

Organs	Snail species											
	<i>B. glabrata</i>				<i>B. tenagophila</i>				<i>B. straminea</i>			
	Positive		Negative		Positive		Negative		Positive		Negative	
Sp.	L.	Sp.	L.	Sp.	L.	Sp.	L.	Sp.	L.	Sp.	L.	
Kidney	+++	++	-	++	+	++	-	+	+	+	-	-
Dig. Gl.	+	++	-	+	++	++	-	-	++	++	-	-
Ovotestis	+++	+	-	++	++	+++	-	+	+++	++	-	+
Album. Gl.	++	+	-	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
Others	++	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+: few (sporocysts and/or lesions); ++: moderate; +++: intense; -: absence



Fig. 1: aspect of *Biomphalaria glabrata* digestive glands showing both parasites and tissue reaction. Parasites are seen above left, with sporocysts and cercariae at several stages of development. At lower right there is dense amebocyte proliferation forming three nodular (granulomatous) reactions. Structures of the digestive glands can be seen at upper right. Hematoxylin & eosin, 200X.

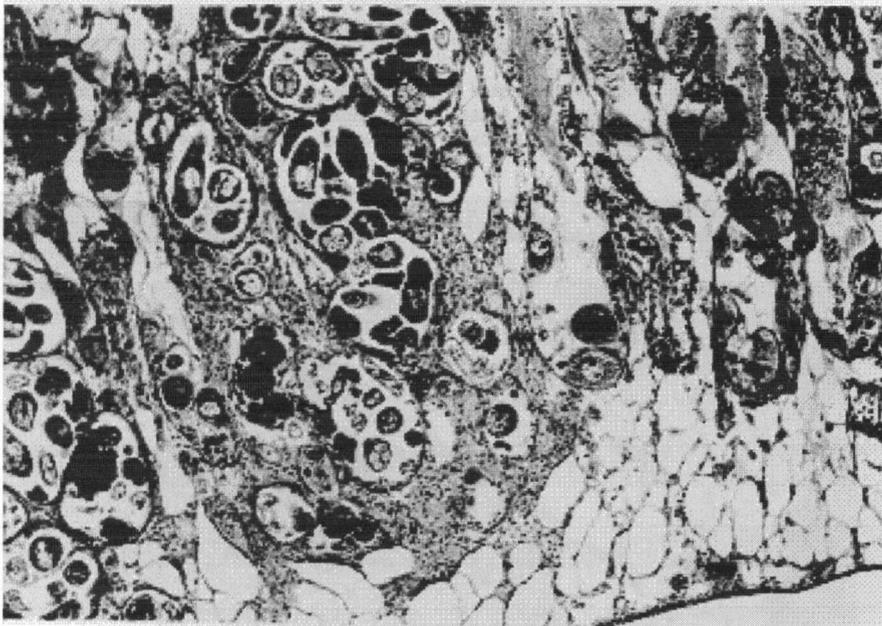


Fig. 2: region of the ovotestis of *Biomphalaria straminea* showing foci of proliferation of *Schistosoma mansoni* sporocysts and differentiation of cercariae encircled by a strong stromal reaction, represented by diffuse amebocyte infiltration and thickening of the extracellular matrix. Hematoxylin & eosin, 150X.

cess of fibrosis seen in vertebrates. However, the newly formed "fibrous" tissue, both within and at the periphery of the inflammatory lesions, did not stain with sirius-red as does vertebrate collagen. In a few instances it did stain, but without the charac-

teristic polarization-light refringence. It should be mentioned here that some normal fibers of the extracellular matrix of the snail (especially in the foot) do stain like vertebrate collagen and exhibit birefringence under polarized light.

Exposed snails that failed to eliminate cercariae
- No viable sporocysts were found in histological sections taken from any of the three snail species. However, focal inflammatory tissue reactions were found in several organs in *B. glabrata* and only

rarely in the two other species. In the ovotestis and renal tubular region in the case of *B. tenagophila* (Fig. 3) and only once, in the region of an atrophic ovo-testis of *B. straminea* (Fig. 4). These reactions were entirely similar to those seen in snails shed-

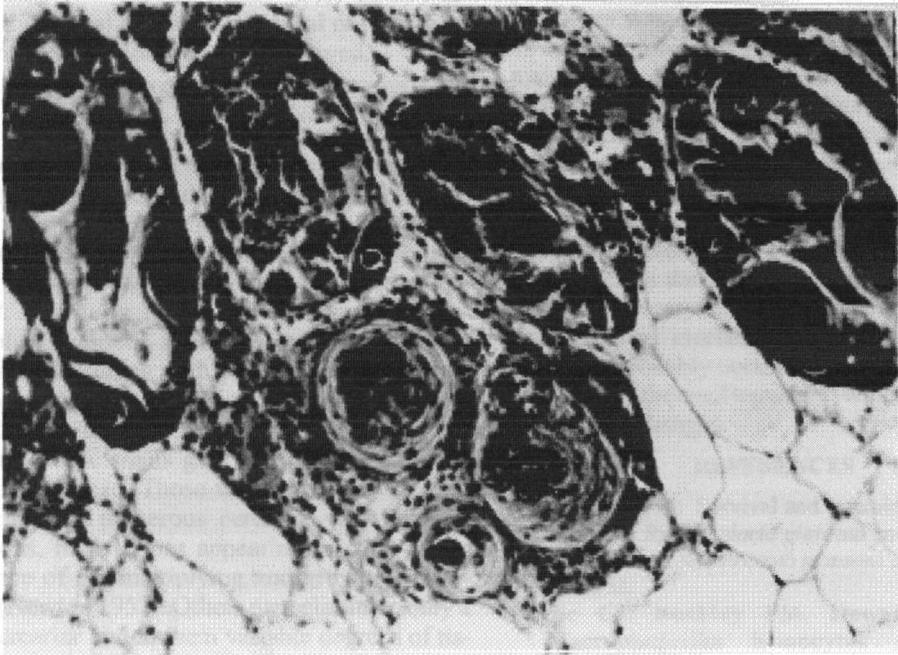


Fig. 3: region of the ovotestis of *Biomphalaria straminea* which had been infected, but did not eliminate cercariae. It shows infiltration and proliferation of amebocytes and the formation of three nodular lesions, some of them containing dark irregular non-identified material. The possibility of this latter being sporocyst remnants has not been excluded. Hematoxylin & eosin, 200X.

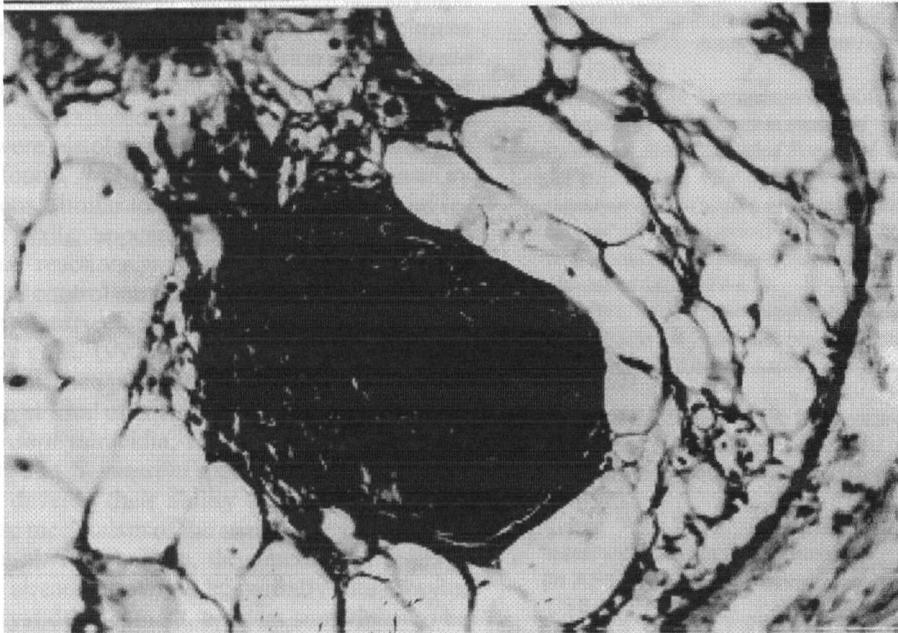


Fig. 4: focal, nodular and dense sporocyst infiltration observed in region of the ovotestis of *Biomphalaria tenagophila* that did not eliminate cercariae although being exposed to *Schistosoma mansoni* miracidia 32 days previously. Again, presence of a dark structureless inclusion (arrow) surrounded by reactive cells. Hematoxylin & eosin, 400X.

ding many cercariae, and which were found encircling or in close vicinity of proliferating sporocysts. However, no evident sporocystic structures were identified in any of the foci or in any other part of the snail tissues.

Normal non-infected snails - They showed essentially normal histology. No focal or diffuse inflammatory reaction was ever observed.

DISCUSSION

A tentative histological grading of susceptibility for the three snail species was attempted by considering sporocyst distribution in different organs, their size and number, as well as the tissue reaction elicited by them. In the present investigation this would place *B. glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea*, in that order, as the most susceptible *S. mansoni* intermediate hosts. These results are in keeping with previous ones obtained by a combination of malacological techniques (Souza et al. 1995b).

Susceptible snails give rise to variable numbers of cercariae. Those which are very susceptible can shed numerous cercariae, with no overt reactions, their tissues appearing tolerant to the presence of the multiplying and growing sporocysts (Newton 1952). Others may eliminate only a few cercariae and in them variable degrees of tissue reactions take place (Pan 1965). These reactions usually consist of massive proliferation of amoebocytes, with encapsulation and destruction of sporocysts, the cells probably acting in concert with soluble factors in the molluscan hemolymph (Bayne et al. 1980). Recently, some specimens taken from a resistant F15 generation of *B. glabrata* completely failed to emit cercariae several months after being exposed to numerous miracidia. When they were histologically examined, no sporocysts were found, but focal and diffuse inflammatory reactions, similar to those seen in infected and resistant snails, appeared at several locations. Such peculiar reactions were not found in normal, non-exposed control snails. They were thought to represent cicatrices left by destroyed sporocysts (Godoy et al. 1997). This kind of delayed-developed resistance probably represents an alternative and novel kind of host defense mechanism against *S. mansoni* miracidia, in spite of evidences suggesting that *S. mansoni* sporocysts can sometimes better develop their ability to interfere with the defense mechanism of the snail as they grow older (Lie et al. 1980). Thus, the amoebocytic reaction that is already known to be partially inhibitory of sporocyst development, appears sometimes to be totally effective.

Therefore, protection against miracidial invasion could be provided by at least two mechanisms.

One being represented by the already known example of direct miracidium destruction which occurs soon after penetration. Locker et al. (1986) found miracidium-amoebocyte contact within 3 hr and phagocytosis of sporocysts microvilli and pieces of tegument within 7.5 hr, while extensive pathology was demonstrated within 24 hr and by 48 hr only scattered remnants of sporocysts remained. The other mechanism would be represented by the one here postulated, that is, a successful mounting of a destructive reaction when several sporocysts have already disseminated throughout the snail tissues.

This second mechanism appeared frequently and widespread in *B. glabrata*, but it was only rarely seen in the other two species. Strongly resistant *B. tenagophila* and *B. straminea* rather utilize the second mechanism, the killing of invading miracidia probably occurring soon after their penetration into the snail tegument, which would leave no residual changes.

REFERENCES

- Barbosa FS 1975. Survival and cercaria production of Brazilian *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* infected with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 61: 151-152.
- Bayne CJ, Buckley PM, Dewan PC 1980. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *J Parasitol* 66: 413-419.
- Godoy A, Souza CP, Guimarães CT, Andrade ZA 1997. Unusual histological findings in *Biomphalaria glabrata* with high degree of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 121-122.
- Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D 1980. Tissue reaction induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Ann Trop Med Parasitol* 78: 157-166.
- Loker ES, Bayne CJ, Yui MA 1986. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of *Echinostoma* mediate interference with host snails resistance to *Schistosoma mansoni*. *Exper Parasitol* 62: 149-154.
- Newton WL 1952. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 38: 362-366.
- Pan C-T 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am J Trop Med Hyg* 14: 931-975.
- Paraense WL 1970. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*, p. 13-20. In AS Cunha, *Esquistossomose mansoni*. Sarvier & USP, São Paulo.
- Paraense WL, Correa LR 1978. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 64: 822-826.

- Paraense WL, Correa LR 1981. Observations of two biological races of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 287-291.
- Souza CP, Janotti-Passos LK, Freitas JR 1995a. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 5-10.
- Souza CP, Cunha RCP, Andrade ZA 1995b. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 201-206.

Histopathologic Features Associated with Susceptibility and Resistance of *Biomphalaria* Snails to Infection with *Schistosoma mansoni*

Claudia Maria C Borges, Cecília Pereira de Souza*, Zilton A Andrade/+

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz, Rua Valdemar Falcão 121, 40295-001, Salvador, BA, Brasil

*Centro de Pesquisas René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1517, 31190-002, Belo Horizonte, MG, Brasil

Resistance and susceptibility of *Biomphalaria* snails to *Schistosoma mansoni* sporocysts occur in different degrees. Histopathology reflects these differences. In a state of tolerance numerous sporocysts in different stages of differentiation are seen in the absence of host tissue reaction. However extensive diffuse and focal proliferation of amoebocytes with sequestration and destruction of many parasitic structures appear in resistant snails. Some snails are totally resistant and when exposed to infecting miracidia may never eliminate cercariae. Sequential histopathological examination has revealed that in such cases the infected miracidia are destroyed a few minutes to 24 hr after penetration in the snail. However, *B. glabrata* that were exposed to *S. mansoni* miracidia and three months later failed to shed cercariae, exhibited focal and diffuse proliferation of amoebocytes in many organs in the absence of parasitic structures. These lesions were similar to those observed in resistant snails that were still eliminating a few cercariae, with the difference that no recognizable sporocystic structures or remnants were present. Histological investigation carried out in similarly resistant *B. tenagophila* and *B. straminea* presented essentially normal histologic structures. Only occasionally a few focal proliferative (granulomatous) amoebocytic reactions were seen in ovotestis and in the tubular portion of the kidney.

Probably, there are two types of reactions to miracidium presented by totally resistant snails: one would implicate the immediate destruction of the miracidium leaving no traces in the tissues; the other involving late reactions that seem to completely destroy invading sporocysts and leave histological changes.

Key words: snails - *Schistosoma mansoni* - susceptibility - resistance - histopathology

Morphological features of host/parasite relationship have been specially studied in *Biomphalaria glabrata* submitted to infection with *Schistosoma mansoni* miracidia (Newton 1952, Barbosa & Barreto 1960, Pan 1965). It has been demonstrated that miracidia penetrate in susceptible snail and differentiate into sporocysts. These forms exhibit extensive proliferation, remaining viable and active, producing great number of cercariae. However, in highly resistant specimens, penetrating miracidia are quickly recognized and destroyed by means of amoebocytes. In some cases, miracidia succeed in invading and developing sporocysts, but some of them are surrounded by amoebocytes, forming encapsulating reactions, apparently destroying the parasites. The occurrence of this focal, proliferative, inflammatory reactions vary in number and

intensity from case to case, according to the degree of susceptibility or resistance present, and being reflected in the number of cercariae emitted by the infected snail. Amoebocytes are primitive macrophages that circulate freely within the hemolymph and can accumulate in specific sites around sporocysts forming focal, granulomatous structures. Bayne et al. (1980) demonstrated that amoebocytes from highly resistant snails are capable to damage the miracidium tegument and to seriously compromise its viability. However, such amoebocyte capacity is variable among several individuals. Several intrinsic and extrinsic factors are able to interfere with the degree of snail susceptibility and/or resistance. Probably, genetic-derived factors play a key role (Richards et al. 1992). It has been demonstrated that the degree of histocompatibility between sporocysts and snails, which sometimes appears to be acquired, can be an important factor (Yoshino & Bayne 1983, Damiani 1987).

Differences in susceptibility/resistance occur not only intraspecifically (Souza et al. 1995b), but have been demonstrated between different snail

+Corresponding author. Fax: +55-71- 356.4292. E-mail: zilton@server01.cpqgm.fiocruz.br

Received 4 May 1998

Accepted 31 August 1998

species, such as *B. glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* (Barbosa 1975, Souza et al. 1995a).

Our studies refer to a histopathological investigation of resistant snails, that although submitted to an infection to numerous *S. mansoni* miracidia completely failed to emit cercariae after a three month period (Godoy et al. 1997, Souza et al. 1997).

STUDIES WITH *B. GLABRATA*

Histological observation was first concerned with *B. glabrata*. Strongly resistant *B. glabrata* were observed through successive generations during an investigation on genetic influences in resistance. Snails from an F-15 generation experimentally exposed to *S. mansoni* miracidia failed to shed cercariae three months after being exposed to miracidia. When submitted to histological examination these snails did not exhibit *S. mansoni* sporocysts, but instead presented an unusual and striking picture of amebocyte reactivity (Godoy et al. 1997). This basically consisted of focal and diffuse proliferation of amebocytes, accompanied by an expansion of the extracellular matrix, which sometimes simulated the process of fibrosis seen in vertebrate tissues. The diffuse amebocyte reaction was conspicuously seen in the albumen gland of all the five cases examined and also appeared associated with thickening and increased basophilia (calcification) of the amorphous secretion material accumulated in the ducts and acini of the albumen gland, which were lined by disintegrating epi-

thelial cells. A collar of amebocyte proliferation and matrix thickening was frequently seen around the ducts and tubes, especially at the external coat of the digestive tube (esophagus and intestines) and around the acini of the nidamental gland. A few scattered areas of focal thickening of the stroma appeared amongst the digestive glands and in the ovotestis (Fig. 1). Focal reaction frequently assumed a granuloma-like appearance. Encapsulating lesions were especially observed at the tubular and sacular portions of the kidneys. They were also seen within the connective tissue bordering the mantle cavity, but were rare in the foot and other areas of the anterior portion of the snail. These reactions were formed by amebocytes, fibrils and fibers concentrically disposed around a center area in which a few small irregular basophilic granules were sometimes seen (Fig. 2). The possibility that such granules represented sporocysts remnants could not be ruled out. Of course the lesions just described could be caused by an associated infection, unrelated to *S. mansoni*. An attempt was made to rule out this possibility. Normal snails of the same age and maintained under the same conditions as the exposed ones were submitted to histological examination. No similar changes were seen in them.

Although the possibility of auto-cure has been mentioned in *S. mansoni*-infected snails (Lie et al. 1980), no similar histological picture of amebocyte reactivity was described in snails exposed to miracidia and that subsequently failed to eliminate cercariae.

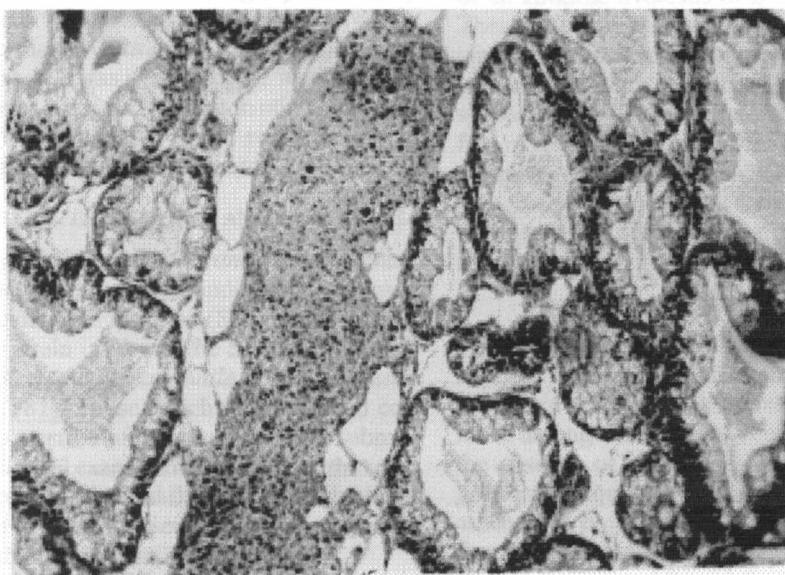


Fig. 1: a large band of proliferating amebocytes appears in between digestive glands of *Biomphalaria glabrata* submitted to miracidial exposure but that did not shed cercariae after a three month period. Hematoxylin and Eosin, 100 X.

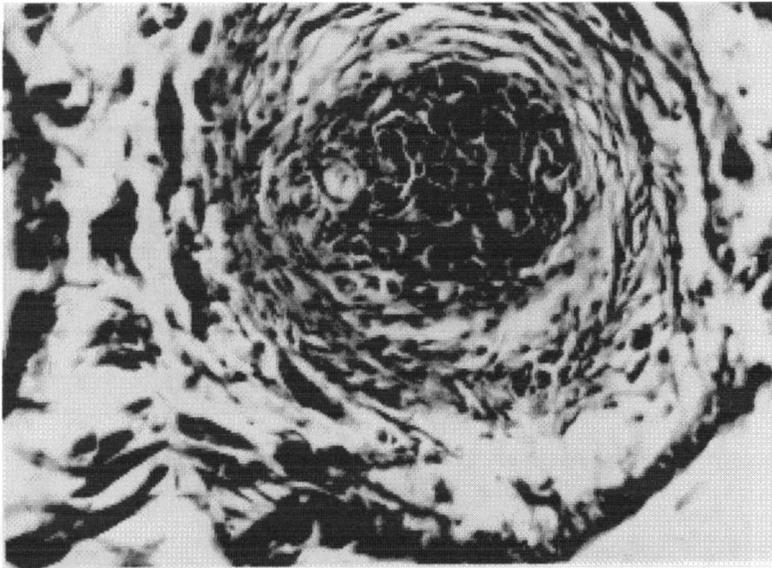


Fig. 2: an encapsulated focal reaction in the region of the mantle collar, seen in *Biomphalaria glabrata* that failed to eliminate cercariae after being exposed to *Schistosoma mansoni* miracidia. There is a concentric lamination of fibers at the periphery of the granulomatous lesions and dark stained cellular debris at the center. Hematoxylin and Eosin, 200 X.

The histological changes were thus suggestive of sequelae left by the apparently complete destruction of sporocysts. Therefore, strong snail immunity can be raised during the course of infection to eliminate the parasite. This would also place present findings as one pole of snail reactivity toward *S. mansoni* invasion, the other being represented by the complete tolerance seen in some extremely susceptible snails (Guimarães et al. 1997).

The next step was to investigate whether such tissue changes were also present in other snail species, which are naturally more resistance to *S. mansoni* invasion than *B. glabrata*.

STUDIES WITH *B. TENAGOPHILA* AND *B. STRAMINEA*

B. tenagophila and *B. straminea* from the State of Minas Gerais, Brazil, were individually exposed to 50 miracidia of *S. mansoni* (Souza et al. 1995b, 1997). The strain used was the SJ-strain which is better adapted to *B. tenagophila* snails (Paraense & Correa 1981). Those which failed to shed cercariae up to a period of three months were submitted to histological examination. As before, the same technique of Bouin's fluid fixation and embedding in paraffin was used. Sections were routinely stained with hematoxylin and eosin.

Although numerous sporocysts and foci of amebocyte proliferation were detected in those snails shedding great number of cercariae, no viable sporocysts were found in histological sections

taken from any of the exposed snails that failed to eliminate cercariae. Focal inflammatory tissue reactions were found rarely and in only two specimens each to *B. tenagophila* and *B. straminea*. In ovotestis and renal tubular region in the case of *B. tenagophila* (Fig. 3) and only once, in the region of an atrophic ovotestis of *B. straminea* (Fig. 4). These reactions were similar to those found encircling or in close vicinity of proliferating sporocysts in snails shedding cercariae. However, no evident sporocystic structures were identified in any of the foci or in any other part of the snails that failed to eliminate cercariae. Normal non-infected snails of the two species examined showed essentially normal histology. No focal or diffuse inflammatory reaction was ever observed.

DISCUSSION

By observing tissue changes in snails that were exposed to miracidial infection but that failed later on to shed cercariae, considerable differences were noted among snail species. A common finding was the absence of parasitic structures, but while *B. glabrata* frequently exhibited focal and diffuse amebocyte proliferation in several organs, only a few and occasional focal amebocyte reactions were seen in *B. tenagophila* and *B. straminea*. The amebocyte reactions seen probably represented the aftermath of sporocyst destruction (Godoy et al. 1997).

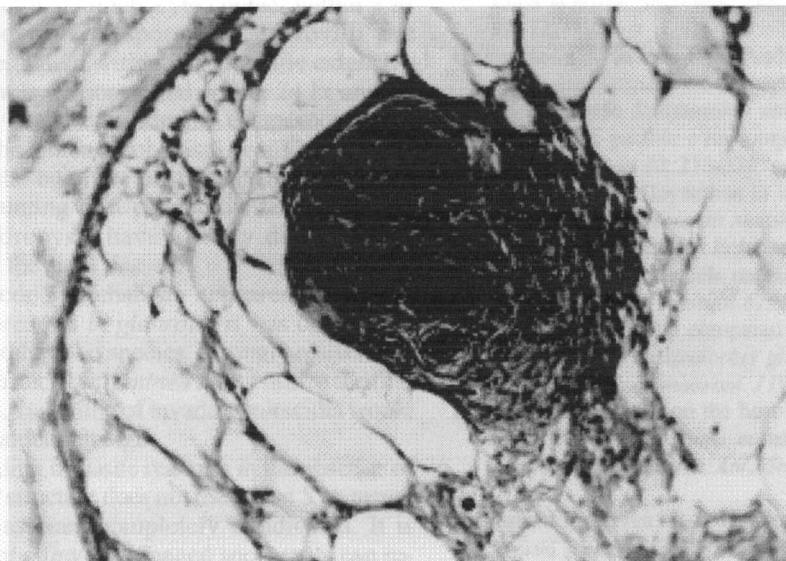


Fig. 3: focal collection of amebocytes found in an atrophic ovotestis of *Biomphalaria tenagophila* that failed to shed cercariae. Hematoxylin and Eosin, 160 X.

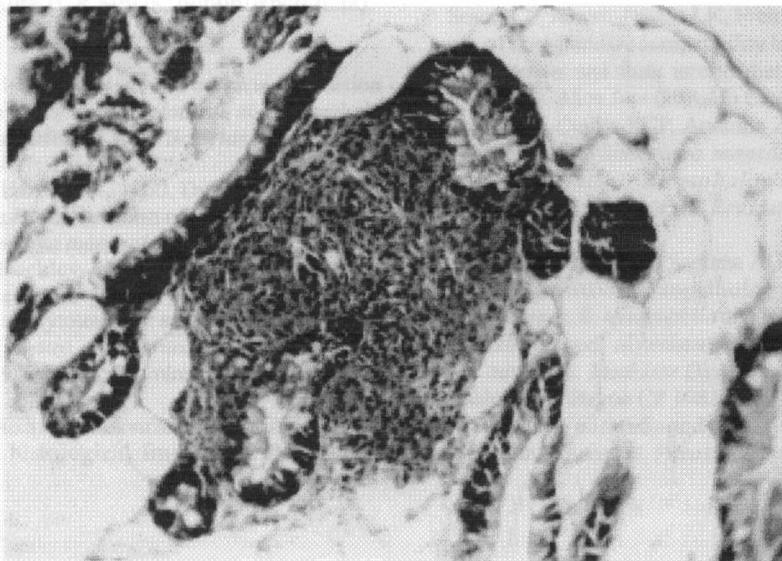


Fig. 4: a collection of amebocytes, similar to that seen in Fig. 3, but found in the region of the digestive glands of *Biomphalaria straminea* resistant to *Schistosoma mansoni* miracidia. Hematoxylin and Eosin, 160 X.

This kind of delayed-developed resistance probably represents an alternative and novel kind of host defense mechanism against *S. mansoni* miracidia, in spite of evidences suggesting that *S. mansoni* sporocysts can sometimes better develop their ability to interfere with the defense mechanism of the snail as they grow older (Lie et al. 1980). Thus, the

amebocytic reaction that is already known to be partially inhibitory of sporocyst development, appears sometimes to be totally effective.

Therefore, protection against miracidial invasion could be provided by at least two mechanisms. One being represented by the already known example of direct miracidium destruction which oc-

curs soon after penetration. Loker et al. (1982) found miracidium ameboocyte contact within 3 hr and phagocytosis of sporocysts microvilli and pieces of tegument within 7.5 hr, while extensive pathology was demonstrated within 24 hr and by 48 hr only scattered remnants of sporocysts remained. The other mechanism would be represented by the one here postulated, that is, a successful mounting of a destructive reaction when several sporocysts have already disseminated throughout the snail tissues.

This second mechanism appeared frequently and widespread in *B. glabrata*; it was only rarely seen in the other two species. Strongly resistant *B. tenagophila* and *B. straminea* rather utilize the first mechanism, the killing of invading miracidia would leave no residual changes.

The finding of tissue reaction in the absence of sporocystic structure does not mean that *S. mansoni* infection has been completely eradicated. It is possible that a few undamaged sporocysts can remain viable in some remote location within the snails. That such situation exists is indicated by the emergency of cercariae from highly resistant snails up to nine month interval following miracidial exposure (CP Souza, unpublished data).

REFERENCES

- Barbosa FS 1975. Survival and cercaria production of Brazilian *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* infected with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 61: 151-152.
- Barbosa FS, Barreto AC 1960. Differences in susceptibility of a Brazilian strain of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 9: 137-140.
- Bayne CJ, Buckley PM, Dewan PC 1980. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro. *J Parasitol* 66: 413-419.
- Damian RT 1987. Molecular mimicry revisited. *Parasitol Today* 3: 263-266.
- Godoy A, Souza CP, Guimarães CT, Andrade ZA 1997. Unusual histological findings in *Biomphalaria glabrata* with high degree of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 121-122.
- Guimarães CT, Soares DM, Andrade ZA, Souza CP 1997. Resistência de *Biomphalaria glabrata* à infecção pelo *Schistosoma mansoni*: variações no período pré-patente e na compatibilidade. *Rev Soc Bras Med Trop* 30: 273-278.
- Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D 1980. Tissue reaction induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* as targets of *Echinostoma* mediate interference with host snails resistance to *Schistosoma mansoni*. *Exper Parasitol* 62: 149-154.
- Newton WL 1952. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 38: 362-366.
- Pan CT 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am J Trop Med Hyg* 14: 931-975.
- Paraense WL, Correa LR 1981. Observations of two biological races of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 287-291.
- Richards CS, Knight M, Lewis FA 1992. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its role on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Today* 8: 171-174.
- Souza CP, Janotti-Passos LK, Freitas JR 1995a. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan host in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 5-10.
- Souza CP, Cunha RCP, Andrade ZA 1995b. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 201-206.
- Souza CP, Borges CC, Santana AG, Andrade ZA 1997. Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 517-522.
- Yoshino TP, Bayne CP 1983. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 8: 317-328.

Extra-cellular Matrix Changes in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*

Claudia Maria da Cunha Borges, Zilton A Andrade[†]

Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz, Rua Valdemar Falcão 121, 40295-001 Salvador BA, Brasil

Reactivity of snails against parasites exhibits a primitive focal reaction, with encapsulation, phagocytosis and destruction of parasite larvae by macrophage-like cells – the hemocytes. This reaction mimics granulomatous inflammation seen in higher animals. However, different from the latter, little is known about the participation of extra-cellular matrix in such snail defense reactions. Normal and Schistosoma mansoni-infected Biomphalaria glabrata of different strains were submitted to cytological, histological, ultrastructural and biochemical methods in order to investigate the behavior of extra-cellular tissues at the site of anti-parasite reactions. In spite of the presence of two cell-types in peripheral hemolymph, only one cell-type was present at the sites of tissue reactions. Although pre-existent collagen and elastic fibers and microfibrils sometimes appeared slightly compressed around focal reactions, no evidences of duplication, synthesis or deposition of connective-tissue extra-cellular components were observed within or around the zones of reactive cell accumulations. Thus, tissue reactions against S. mansoni in the snail B. glabrata appeared exclusively dependent on one specific population of hemocytes.

Key words: *Biomphalaria glabrata* - *Schistosoma mansoni* - hemocytes - encapsulating complexes - extra-cellular matrix

Many parasites, including several species of medical and veterinary significance, have life cycles that require development, reproduction or both in invertebrate hosts. These hosts also vigorously defend their self-integrity (Loker 1994). In common with other invertebrate groups, mollusks lack an adaptative immune system, with specific antibodies and memory cells of vertebrates. Their internal defense system comprises humoral and cellular elements cooperating in the recognition and destruction of invading organisms (Ouwe et al. 1994). Several authors have recognized the existence of subpopulations of hemocytes, depending on their age (Dikkeboom et al. 1984), their enzyme content (Granath & Yoshino 1983), or their surface determinants (Dikkeboom et al. 1985, Yoshino & Granath 1985). Resistant *Biomphalaria glabrata* specimens typically encapsulate larval stages of nonadapted invading parasites, such as the sporocysts of schistosomes, in a structure that morphologically resembles a primitive granuloma, the encapsulating complexes (Pan 1965, Lie & Heyneman 1980, Jeong & Heyneman 1984). Since the participation of connective-tissue cells and matrix is so prominent in the granulomas of higher animals, one wonders whether a primitive form of participation of these elements would be expressed in mollusks. As noted by the same authors just mentioned, extracellular fibrils were observed in association with the molluscan granuloma-like structures. Lie and Heyneman (1980) did observe fibrils with a periodicity of 80 nm in the outermost layer of capsules containing daughter sporocysts in snails undergoing self-

cure. Sminia et al. (1974) reported deposition of collagen-like fibrils at the periphery of encapsulating reactions to *Lymnaea stagnalis*, by showing that the flattened cells of the outer capsule layers were involved in the synthesis of these fibrils. Also, Rifkin et al. (1969), Yoshino (1976), and Krupa et al. (1977) noted the presence of extracellular fibrils in association with molluscan cellular responses, but Harris (1975) found no extracellular elements contributing to the formation of capsules.

The present paper extends these observations by documenting aspects of hemocytes and extracellular matrix and connective-tissue cells in normal and in *Schistosoma mansoni*-infected *B. glabrata*, representative of strains with variable degrees of resistance/susceptibility to the parasite.

MATERIALS AND METHODS

Snails and exposure to S. mansoni miracidia - Susceptible (Feira de Santana-FS, BA, Brazil) and resistant *B. glabrata* (Barreiro de Cima, Belo Horizonte-BH, MG, Brazil) to *S. mansoni* were maintained in aerated water at 28°C and fed on lettuce ad libitum. The snails measured from 8 to 16 mm in shell diameter. A total of 30 snails (FS) were submitted to infection with 20 miracidia, during 1 h with a Feira de Santana strain of *S. mansoni* (Andrade & Sadigurky 1985). Ten specimens from Minas Gerais were exposed individually to 50 miracidia with a BH strain of *S. mansoni*. Following exposure to miracidia, all snails were maintained in a dark room for 35 days, the water being changed twice weekly.

Cercarial shedding - Emission of cercariae occurred at the first month following exposure. Cercarial release was monitored by placing the snails, individually, in 100 ml beakers containing 10 ml of dechlorinated tap water. Each specimen was exposed to bright light during 1 h, for cercarial shedding and counting. The exposed snails were classified according to whether they were emitting cer-

[†]Corresponding author. Fax: 155-71-356.4155. E-mail: zilton@cpqgm.fiocruz.br

Received 9 May 2002

Accepted 30 October 2002

cariae: a group eliminating from zero to 10 cercariae was considered as poorly susceptible; from 50 to 150: as susceptible, and from 151 to 500, extremely susceptible. Non-exposed snails were used as controls.

Histology - Snails were examined at different days post-infection (24 h up to 100 days). They were submitted to anesthesia with menthol crystals for 4 h before being removed from the shells. The entire snail was placed in Bouin's fluid during 5 h for fixation and then transferred to 70% alcohol. Further procedures included dehydration in 100% alcohol, clearing in xylol and embedding in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin, sirius-red method for collagen, orcein and Weigert's resorcin-fuchsin for elastic fibers. Sirius-red stained slides were microscopically examined with and without polarizing filters (Junqueira et al. 1979).

Electron microscopy - After removal from the shell, the snail was cut in small pieces and immediately fixed in iced 2% glutaraldehyde in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2) for 2 h and post fixed in 2% osmium tetroxide in 0.2 M phosphate buffer. Specimens were dehydrated in acetone and embedded for 12 h in Poly-bed 812 resin. Ultra thin sections from selected blocks were made with a diamond knife in a Reichert-Supernova ultra-microtome. Sections were mounted on copper grids, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Zeiss Electron Microscope at 50 Kv.

Collagen measurements - The method of Bergman and Loxley (1963) was used to determine collagen concentration by the measurement of hydroxyproline content. Briefly, after fixation in neutral 10% formalin the snails were hydrolyzed for 9 to 18 h in hydrochloric acid at 110°C, neutralized in NaOH (10N) and HCl (6N). Samples of 100 µl were treated in mixture of chloramine T and Erlich's reagent and read in a Hitachi 200 spectrophotometer (558 nm). As positive controls, fragments of a fibrotic mouse liver (*S. mansoni*-infected) were used.

Cytology - The examination of circulating hemocytes was made from a fresh hemolymph sample. To obtain hemocytes, four snails were selected for each group. Snails were first swabbed with 70% ethanol to remove debris from the external surface and then the shell was perforated with a needle (13 x 4 mm). The iced-samples were collected and placed into a 500 µl siliconized microcentrifuge tube for 5 min to allow shell debris or mucus to sediment. After sedimentation, slides with 10 ml of hemolymph were incubated at 22-28°C for 30 min, fixed in methanol for 5 min and stained with Giemsa or Neutral red.

RESULTS

Sections from infected snails invariably presented focal collections of sporocysts and cercariae in several developmental stages, as well as in several degrees of disintegration, usually surrounded by focal and diffuse accumulations of hemocytes. The number of parasite collections and the extent of hemocyte proliferation appeared to be inversely proportional to the degree of snail susceptibility or resistance of the strains, as can be appreciate in Fig. 1A, B. Apart from that, the type of tissue reaction was the same for all parasitized snails. Location of the lesions did not differ, either. The sites mostly parasitized were the digestive glands, ovo-testis and the renal regions. The capsular reactions exhibited distinct slightly flattened hemocytes, many of which contained phagocytosed material from sporocysts and cercariae. Focal hemocyte concentrations around groups of proliferating as well as disintegrating parasites assumed the arrangement of a granuloma, appearing at the routinely stained slides as a mixture of cells and fibers (Fig. 2A, B, C). Although special staining for collagen and elastic tissue failed to reveal specific fibers in these granuloma-like lesions, collagen and rare elastic fibers seemed to form an outer, thin and incomplete capsule around the focal en-

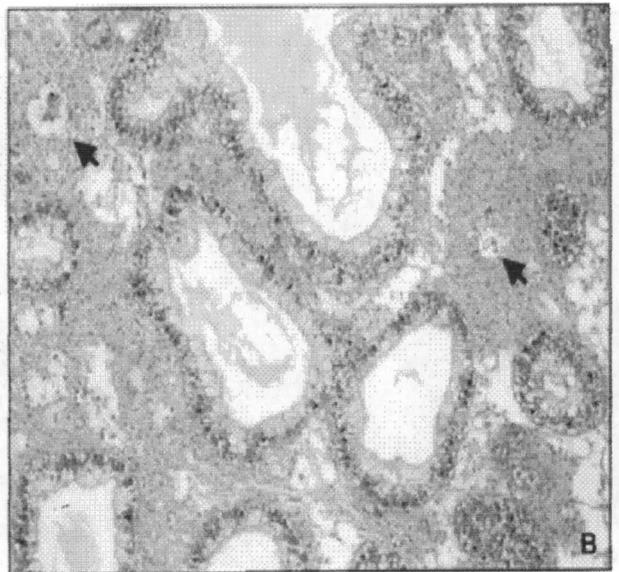
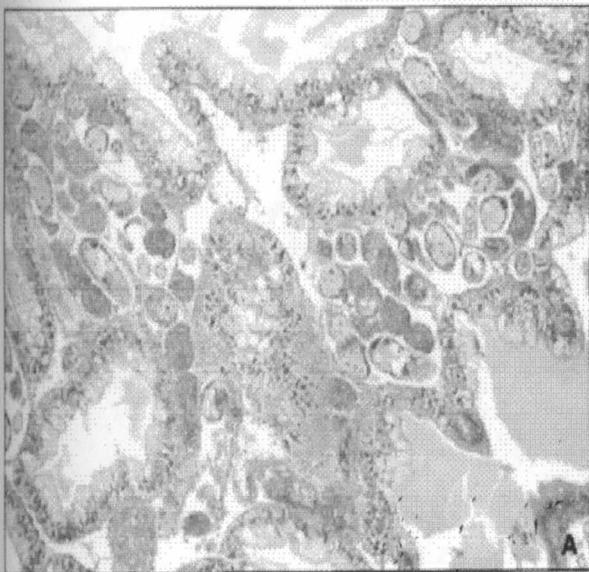


Fig. 1A: section from the digestive glands, of a highly susceptible *Biomphalaria glabrata* showing numerous developing forms of *Schistosoma mansoni* and the almost total absence of cellular reaction; B: extensive and diffuse cellular reaction within the connective tissue, and concentrically arranged around a few disintegrating portions of the parasite (arrow) in the digestive glands of a *S. mansoni* resistant snail. Hematoxylin & Eosin, 100X

capsulated lesions. In effect, closer examination detected some rather slightly compressed pre-formed fibers (Fig. 2D). Sometimes hemocyte proliferation resulted in diffuse collections of such cells, devoid of any fibers.

At the ultrastructural level, collections of hemocytes were represented by cells with numerous interdigitating filopodia, forming a complex network of cytoplasmic prolongations, in the presence of an amorphous, poorly dense matrix, but in the absence of cellular or fibrous elements (Fig. 3A, B). Some of these cells showed a large nucleus with the chromatin distributed along the nuclear periphery (Fig. 3B, C). Mitochondria, Golgi apparatus, electron-dense bodies (lysosomes) and myelinoid bodies were regularly found. At the proximity of the hemocyte collections some parallel disposed fibers and fibrils were noted (Fig. 2D). Some of these fibers revealed periodicity, suggesting a collagenous nature.

No significant differences were noted in normal and *S. mansoni*-infected snails submitted to biochemical determination of hydroxyproline.

Two kinds of hemocytes were found in fresh hemolymph samples: small spherical hemocytes with a large nucleus surrounded by a thin cytoplasm layer (they adhered to glass surface, but did not spread appreciably), and larger spreading hemocytes with extending numerous thin filopodia. However, in the capsules observed in the kidney and digestive glands, only spreading hemocytes could be positively identified. The number of spreading cells present in hemolymph of snails at 24 h-35 days after infection did not differ quantitatively after a simple counting on stained slides, but it did diminish at 49-100 days.

The normal non-infected snails showed essentially normal histology. In areas with abundant connective tis-

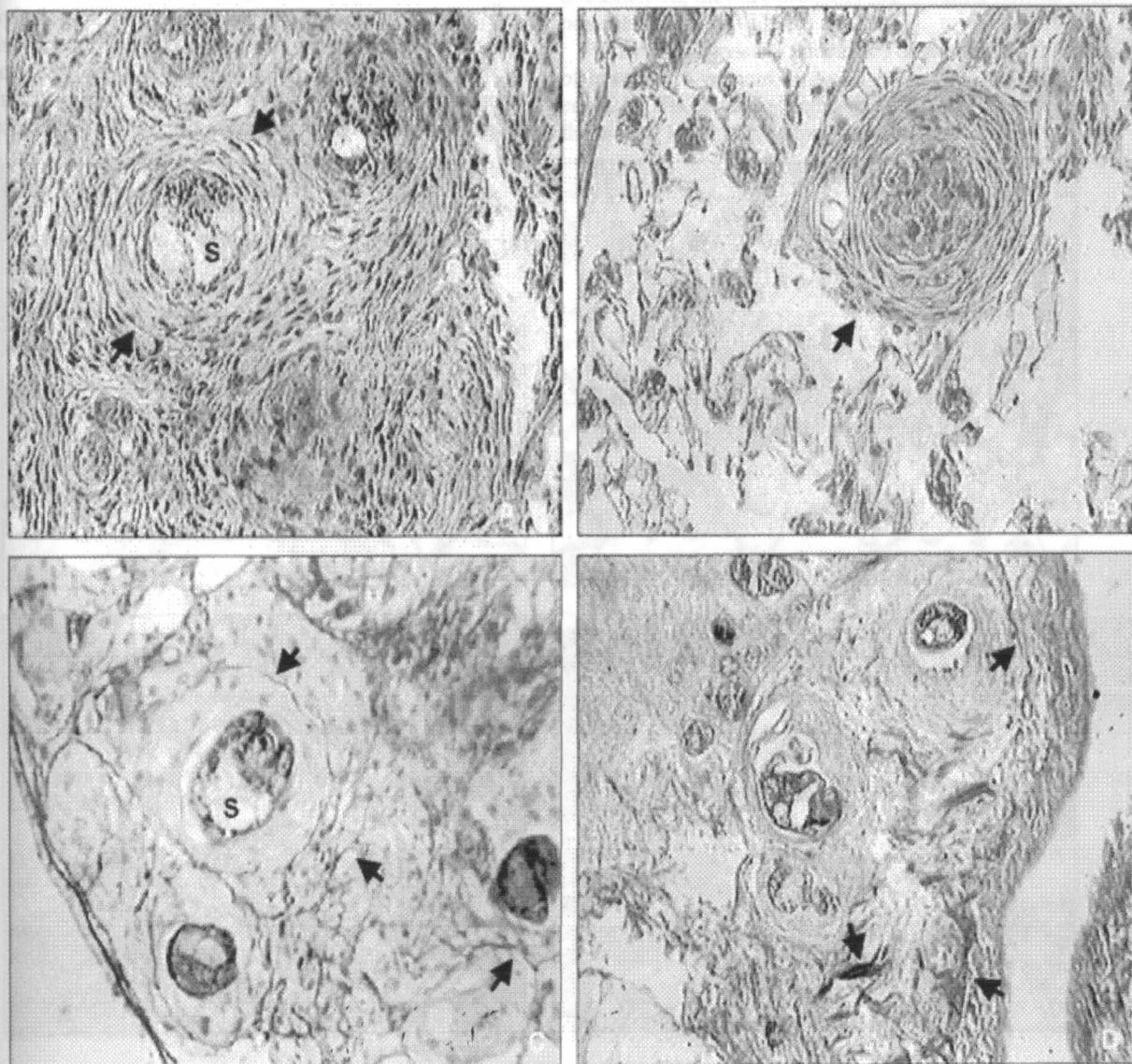


Fig. 2: encapsulating lesions centered by groups of disintegrating sporocysts (S) of *Schistosoma mansoni*. A and B show that concentrically disposed and elongated hemocytes simulating a fibrous granulomatous structure (short arrows); sections stained for elastic fibers (C) and collagen (D) exhibit only a few circular or scattered fibers at the periphery of the encapsulating lesions (short arrows). A, B: Hematoxylin & Eosin, A: 400X and B: 200X; C: Orcein stain for elastic fibers, 400X; D: Sirius-red method for collagen, 200X

sue, such as the foot region and digestive glands, numerous thin and long fibers were seen forming sometimes a criss-crossing pattern. These fibers took a strong red staining with sirius-red and appeared bi-refringent, with striated periodicity, when observed under polarizing light. The color hue varied from red to yellowish. No focal or diffuse inflammatory reaction was observed.

DISCUSSION

Present study was aimed at finding evidences of a primitive participation of the extracellular matrix in defense mechanisms of mollusks. It represents an exercise in comparative pathology, regarding an invertebrate, devoid of lymphocytes, which mounts a defense mechanism by means of a macrophage-like cell that destroys an invading parasite by forming focal encapsulating structures, similar to a vertebrate granuloma, with interactions with humoral factors. (Loker & Bayne 1986, Loker 1994). Such morphological structures are composed by a homogeneous population of cells, with expanded cytoplasmic processes. The presence of cytoplasmic prolongations from numerous cells, appears under the light microscope as containing fibers, sometimes mimicking the process of

fibrosis seen in vertebrates. Fibers with staining characteristics of collagen or elastin have been demonstrated in normal snail tissues (Lemos 1999). However, the presence of elements from the extracellular matrix in the granulomatous lesions of *B. glabrata* against *S. mansoni* has been a controversial issue. Although Yoshino (1976) and Krupa et al. (1977) noted that the presence of extracellular fibrils contributed to the formation of the encapsulating lesions, Harris (1975) did not find extracellular elements associated with the molluskan cellular reactive responses. One probable cause for these divergences could be the presence of true collagen and orcein-positive elastic fibers only at the periphery of the lesions, as noted in the present study. Both at light microscopy and ultra-structurally, collagen-like fibers are noted at the proximity of hemocyte accumulations. Since no active connective-cell was visualized and no real accumulation of such fibers could be documented, they are probably pre-existing normal components of the molluskan tissues.

This study was also concerned at identifying the types of hemocytes present in the lesions. Only one cell type could be disclosed by light and electron microscopy at the tissue level. Only the granulocytes could be posi-

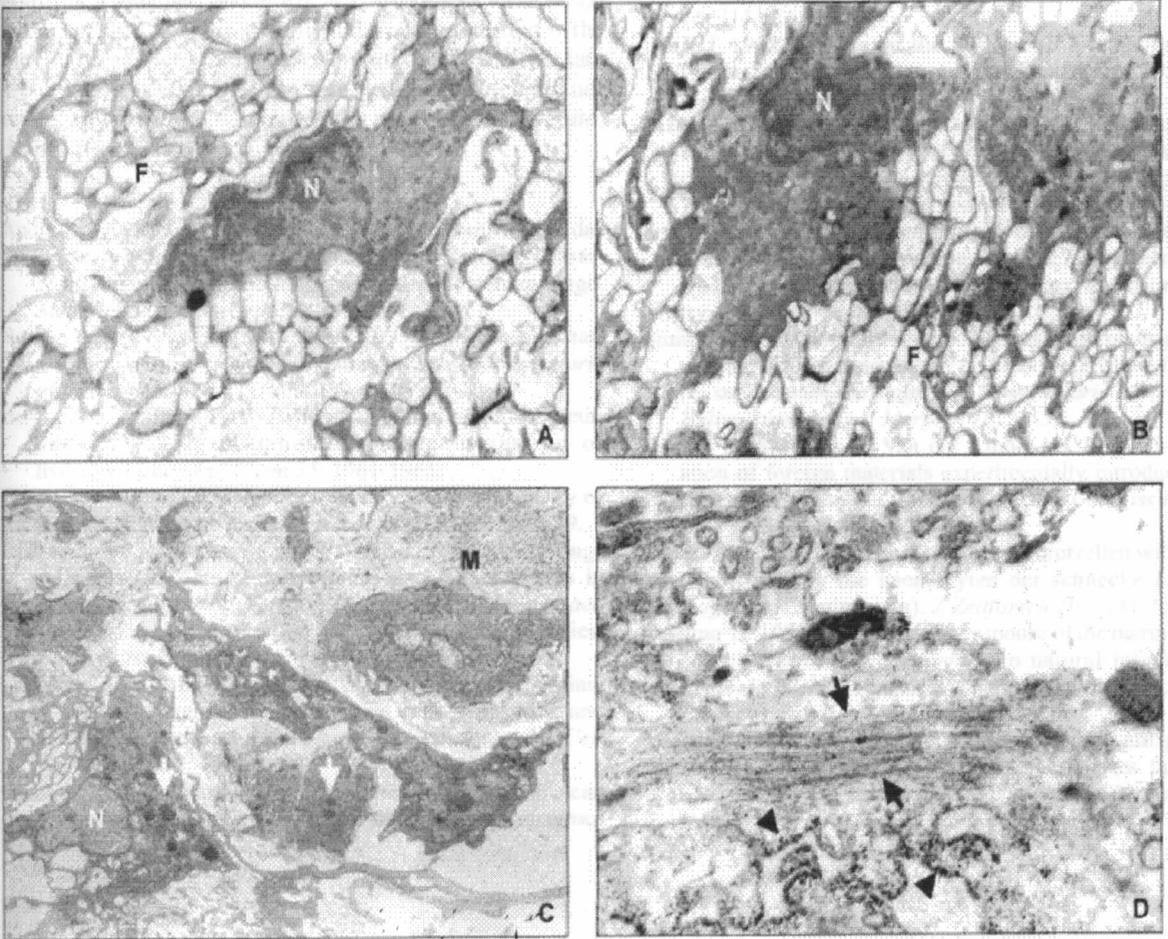


Fig. 3: A and B show hemocytes with their numerous filopodia as part of an encapsulating structure. Besides the filopodia (F), the nucleus (N); C: representative of hemocytes at the periphery of an encapsulating lesion. They appear in the middle of an amorphous and fibrillar extracellular matrix (M). Short arrows are pointing to electron-dense bodies (lysosomes). D: parallel fibrils with periodicity are forming a fiber at the periphery of an encapsulating lesion. Just below there, a part of a connective cell cytoplasm with dilated endoplasmic reticulum (arrow heads) is shown. Electron microscopy, A, B; 7,000X; C: 3,000X; D: 12,000X

tively identified. The present study and those of Lic and Heyneman (1980) revealed that these cells contain numerous primary and secondary lysosome-like structures, extensive pseudopodia processes, sometimes containing sporocyst in phagolysosomes. However, it was confirmed that two types of hemocytes are present in peripheral hemolymph: granulocytes and hyalinocytes. As a matter of fact, not only the present observations, but many others (Stang-Voss 1970, Sminia 1972, Sminia & Barendsen 1980), clearly shown that hemolymph cells of pulmonate gastropods are a group of morphologically heterogeneous cells. Two kinds of hemocytes are found in fresh hemolymph samples of *B. glabrata*. Probably, the round and spreading cells distinguished in stained preparations are the hyalinocytes and granulocytes described by various authors (Cheng 1975, Yoshino 1976). In peripheral lymph preparations, these cells differ greatly with respect to the development of their organelles (pseudopodia, Golgi bodies, lysosomes) (Barracco et al. 1993).

Collagen is very much conserved in the animal kingdom. The present attempt to measure the concentration of hydroxyproline in molluscan tissues was probably made for the first time and the technique may require better controls. However, no significant differences were noted in normal and *S. mansoni*-infected snails submitted to the biochemical determination of hydroxyproline. The data are in keeping with other present findings, which did not reveal any increase of extracellular matrix in *B. glabrata*, during its reaction to *S. mansoni* invasion.

REFERENCES

- Andrade ZA, Sadigursky M 1985. 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* 38: 37-40.
- Barracco MA, Steil AA, Gargioni R 1993. Morphological characterization of hemocytes of pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 73-83.
- Bergman L, Loxley R 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Ann Chem* 35: 1961-1965.
- Cheng TC 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann NY Acad Sci* 266: 343-379.
- Dikkeboom R, van der Knapp WPW, Maaskant JJ, de Jonge AJR 1985. Different subpopulations of haemocytes in juvenile, adult and *Trichobilharzia* infected *Lymnaea stagnalis*: a characterization using monoclonal antibodies. *Z Parasitenkd Parasitol Res* 71: 815-819.
- Dikkeboom R, van der Knapp WPW, Meuleman EA, Sminia T 1984. Differences between blood cells of juvenile and adult specimens of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res* 238: 43-47.
- Granath WO, Yoshino TP 1983. Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzymes markers. *J Exp Zool* 226: 205-210.
- Harris KR 1975. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. *Ann NY Acad Sci* 266: 446-463.
- Jeong KH, Heyneman D 1984. Leukocytes of *Biomphalaria glabrata*: morphology and behaviour of granulocytic cells *in vitro*. *J Invert Pathol* 28: 357-362.
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani R 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection, in tissue section. *Histochem J* 11: 447-455.
- Krupa PL, Lewis LM, Vecchio PD 1977. *Schistosoma haematobium* in *Bulinus guernei*: Electron microscopy of hemocyte-sporocyst Interactions. *J Invert Pathol* 30: 35-45.
- Lemos QT 1999. Contribution to the histology of *Biomphalaria glabrata*. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 343-347.
- Lic KJ, Heyneman D 1980. Tissue reactions induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Ann Trop Med Parasitol* 74: 157-166.
- Loker ES 1994. On being a parasite in an invertebrate host: a short survival course. *J Parasitol* 80: 728-747.
- Loker ES, Bayne CJ 1986. Immunity to trematode larvae in the snail *Biomphalaria*. *Symp Zool Soc Lond* 56: 199-220.
- Ouwe O, Boyer MO, Porchet E, Capron A, Dissous C 1994. Characterization of immunoreactive TNF- α molecules in the gastropod *Biomphalaria glabrata*. *Rev Comp Immunol* 18: 211-218.
- Pan CT 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Amer J Trop Med Hyg* 14: 931-975.
- Ritkin E, Cheng TC, Hohl HR 1969. 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: 211-226.
- Sminia T 1972. 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.
- Sminia T, Barendsen L 1980. 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.
- Sminia E, Borghart R, Van der Linde AN 1974. Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res* 153: 307-326.
- Stang-Voss C 1970. Zur ultrastruktur der blutzellen wirbelloser tiere III. Ober die haemozyten der schnecke *Lymnaea stagnalis* L. (pulmonata). *Z Zellforsch* 107: 141-156.
- Yoshino TP 1976. Encapsulation response of the marine prosobranch *Cerithidea californica* to natural infections of *Renicola buchanani* sporocysts (Trematoda:Renicolidae). *Int J Parasitol* 6: 423-431.
- Yoshino TP, Granath Jr WO 1985. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes. functional heterogeneity in cell populations recognized by a monoclonal antibody. *J Invert Pathol* 45: 174-186.

Behavior of *Schistosoma mansoni*-induced histopathological lesions in *Biomphalaria glabrata* submitted to ionizing radiation

Comportamento das lesões histopatológicas induzidas pelo *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria glabrata* após radiação ionizante

Carine M. Azevedo¹, Claudia Cunha Borges² and Zilton A. Andrade³

ABSTRACT

Present report demonstrates that repeated radiation of *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*, totaling 15,000 rads, caused a sudden, albeit transient, suppression of cercarial shedding. Initially, sporocysts practically disappeared from the snail tissues. The more resistant developing cercariae presented nuclear clumping and vacuolation, before undergoing lysis. No host tissue reaction was evident at any time. Thirty-four days after the last irradiation, the snails resumed cercarial elimination. By that time numerous sporocysts and developing cercariae were detected, disseminated throughout snail tissues in a pattern similar to that of a highly malignant neoplasm, with no signs of host cellular reactions, which on the other hand were present in non-irradiated infected controls. The region of the ovo-testis was apparently destroyed after radiation, but returned to its normal appearance around 40 days after the last radiation. Ionizing radiation affected both host and parasite in *S. mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*, but the resulting impressive changes were soon reversed.

Key-words: *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, Ionizing radiation.

RESUMO

O presente trabalho demonstra que a irradiação repetida, num total de 15.000 rads, resulta numa rápida supressão da eliminação das cercárias em caramujos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. Inicialmente os esporocistos desaparecem dos tecidos. As formas evolutivas das cercárias são mais resistentes e apresentam vacuolização citoplasmática e condensação nuclear antes de desaparecerem. Não foram observadas reações nos tecidos do hospedeiro. Trinta e quatro dias após a última irradiação, os caramujos voltam a eliminar cercárias. Numerosos esporocistos e cercárias em desenvolvimento aparecem infiltrando difusamente os tecidos à maneira de uma neoplasia maligna, sem sinais de oposição da parte do hospedeiro, a qual era visível nos controles infectados e não irradiados. A região do ovo-testis apareceu destruída após a radiação, mas retornou à sua aparência normal em torno de 40 dias mais tarde. A radiação ionizante afeta tanto o hospedeiro como as formas em desenvolvimento do parasito, mas estas alterações impressionantes são logo reversíveis.

Palavras-chaves: *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, Radiação ionizante.

A previous study from this Laboratory had noted that a strain of *Biomphalaria glabrata*, highly susceptible to *Schistosoma mansoni*, were seen to shed less and less cercariae along the time of infection³. It was also observed that such changing pattern of cercarial shedding presented a good histological correlation. An initial picture of non-reaction (tolerance) gradually turned into one of hemocyte

proliferation, with formation of focal encapsulating lesions around disintegrating sporocysts and cercariae. These findings suggested the existence of a primitive form of acquired immunity in invertebrates. In order to explore further along these lines, a plan to eradicate a previous schistosomal snail infection with irradiation was initiated.

1. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Pesquisa da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA. 2. Course of Experimental Pathology, Fiocruz/UFBA. 3. Head, Laboratory of Experimental Pathology, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brasil. Supported by PAPES III (FIOCRUZ).

Address to: Dr. Zilton A. Andrade, Laboratory of Experimental Pathology@CPqCM/FIOCRUZ, R. Valdemar Falcão 121, Brotas 41295-001 Salvador, BA, Brasil.

Recebido para publicação em 25/10/2003

Aceito em 13/4/2004

Ionizing radiation of snails has been used for various purposes. Michelson and Dubois¹ applied low-dose radiation (60 Co) to *Biomphalaria glabrata* and observed an enhancement of resistance to *Schistosoma mansoni* infection. Other workers have used irradiated miracidia to infect *B. glabrata* in an attempt to increase resistance against *S. mansoni*, with apparently good results²⁻⁴. When all irradiated miracidia died within snail tissues, a strong resistance was observed to a further challenge with normal miracidia.

At first, our attempt at irradiating *S. mansoni*-infected snails aimed to eradicate the developing parasite in order to observe whether such a procedure would stimulate the development of an equivalent of acquired immunity in the invertebrate. This proved to be impractical due to the unexpected behavior of the larval forms of *S. mansoni* within the snail tissues following irradiation. However, the data obtained by a subsequent histological study revealed several points of interest on the differential susceptibility of the developing forms of the parasite, and also of the host tissues with their differential degenerative and regenerative capacities toward radiation damage. Thus, the second part of the research was to observe the behavior of the snail tissue changes upon re-infection. Since no similar data were found in the literature reviewed, the publication of these results appeared to be of interest.

MATERIAL AND METHODS

Laboratory raised adult *Biomphalaria glabrata* from Feira de Santana strain⁵ were infected with 20 *S. mansoni* miracidia (FS strain) freshly isolated from eggs extracted from the liver and intestines of experimentally infected mice. When the snails started eliminating cercariae they were irradiated with cesium 137 (IBL 937C Irradiator, type H, Cis Bio International, Gif-sur-Yvette, France) with the objective of eradicating the infection. At first, 24 snails were irradiated with two doses of 4,000 rads, delivered with an interval of one week. A similar second trial was made with another 30 infected snails. These were submitted to 4 doses of 2,000 rads each at weekly intervals, with results comparable to those of the previous group. Then, radiation doses were changed to 4 sessions of 3,000 rads each (24 infected snails) at weekly intervals and 3 doses of 5,000 rads each (36 infected snails), at two-day intervals. In these last two groups cercarial elimination stopped and 30 to 48 days later the snails were killed for microscopic examination. Although they were not yet eliminating cercariae, an extensive dissemination of the multiplying forms of *S. mansoni* in the tissues was observed in these animals, as detailed below.

Each irradiated group was always matched with a control group of about 20 non-irradiated and infected snails. They regularly eliminated cercariae throughout the time of the experiment. Cercarial elimination was monitored by examination of individual snails placed into 100ml beakers containing 10ml of de-chlorinated tap water. Each specimen was exposed to bright light during an hour, for cercarial shedding and counting. The snails were examined at various days post-infection.

For histological examination the snails were submitted to anesthesia with menthol crystals for 4 hours before being removed from the shells. The entire snail was placed in Bouin's fluid during 5 hours for fixation and then transferred to 70% alcohol. Further procedures included dehydration in 100% alcohol, clearing in xylol and embedding in paraffin. Sections were routinely stained with hematoxylin and eosin.

RESULTS

Irradiated infected snails became negative for cercarial elimination one week following the second radiation, regardless of the doses used, but 34 days later they were seen to resume elimination. The number of eliminated cercariae varied from 3 to 118 immediately before radiation, and dropped to 1 (minimum) and 59 (maximum) when examined one week after the first radiation. Histological examination of the infected snails, both controls and irradiated, during the period of cercarial elimination, revealed the presence of numerous sporocysts and several stages of developing cercariae located in several organs and tissues, especially in ovo-testis, digestive glands and the tubular and secular portions of the kidney. (Figures 1 A and B). The presence of hemocytes (amebocytes) was a constant feature. They formed mild to moderate accumulations around the parasitic structures, sometimes assuming a concentric distribution around them and, rarely, differentiating into granuloma-like structures (*encapsulating complexes*).

The snails examined one to two weeks after the end of the irradiation sessions, at a time when cercarial elimination had completely stopped, revealed a different histological picture. Hemocytes were rarely found, usually appearing isolated in only a few places. No discernable sporocysts were detected after a thorough search in various microscopic sections. Developing forms of cercariae, especially the more differentiated ones, presented fragmentation, condensation of nuclear material and the presence of empty vacuoles of different sizes. (Figure 1 C and D). Clumps of eosinophilic debris, probably representing necrotic parasites, were present in several places. There was a mild to moderate degree of edema in several tissues. The ova and spermatozooids completely disappeared from the ovo-testis, which structure assumed a mosaic aspect formed by empty spaces delimited by slender and wavy membranes. The spaces delimited by membranes sometimes contained remnants of cercariae.

When the histological examination was performed in irradiated snails that resumed cercarial elimination, there appeared numerous sporocysts throughout the tissues without any signs of tissue reaction. Also, many cercariae in several stages of development were present. Within the ovo-testis parasitic multiplication and infiltration appeared more evident than the signs of tissue regeneration. The latter were represented by clusters of ova and only a few spermatozooids (Figure 1 D and E). Other snail tissues did not exhibit the radiation-related degenerative and regenerative features observed in the ovo-testis. Snails irradiated four times with 3,000 rads every 7th day or three times with 5,000 rads at two-day intervals stopped

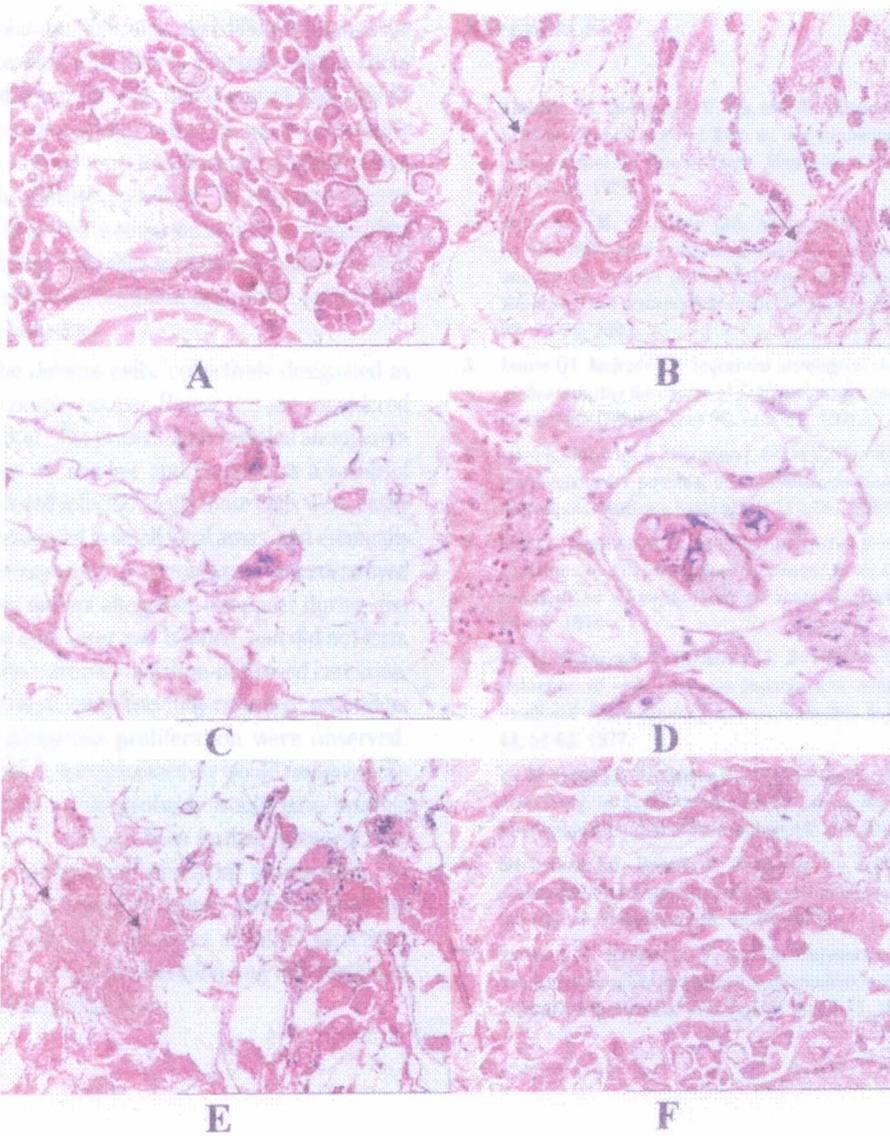


Figure 1 - **A** and **B** - Normal infected snail control; **A** - Presence of numerous sporocysts and developing cercariae within the edematous interstitial tissue of the digestive glands. **B** - Tissue reaction is represented by focal accumulation of amebocytes around almost mature cercariae in the ovo-testis (arrow). **C** and **D** - Irradiation damage to both cercaria and ovo-testis, as observed two weeks after sessions of gamma radiation. Cercariae presenting nuclear clumping and cytoplasmic vacuoles are seen within the empty spaces created by the disappearance of the cellular elements of the snail ovo-testis. **E** and **F** - Infected snails examined 48 days after the last session of radiation. The ovo-testis presents both ovum (arrows) and proliferating parasite forms (**E**). Numerous sporocysts and cercariae are present in the digestive gland interstitial tissue (**F**). All photographs taken from hematoxylin and eosin stained slides. Magnification: X100, except D (X200).

eliminating cercariae. After 30 to 48 days they were killed and microscopically examined. A histological picture was observed entirely similar to that of the snails that were eliminating cercariae after a temporary post-radiation suppression, which indicated that they were about to resume cercarial elimination.

Thus, both the snails and the multiplying parasitic forms presented a high degree of resistance to ionizing radiation. In a separate experiment we submitted 12 adult non-infected *B. glabrata* to radiation and kept 14 as non-irradiated controls. After 48 days, 3 of the irradiated snails and two of the controls had died, showing that irradiation was indeed well tolerated by normal *B. glabrata*. Mortality of infected

snails was high, regardless of radiation. It was difficult to obtain precise comparative figures because many snails were sacrificed during the experiment for microscopic examination.

DISCUSSION

The behavior of the developing stages of *S. mansoni* within its intermediate snail host following irradiation was strikingly reminiscent of that of a highly malignant neoplasm when irradiated. At first the proliferating cells were almost completely destroyed, but this was soon followed by a

recrudescence of cellular multiplication, that diffusely invaded the host tissues. Also in keeping with what is generally known about the pathology of irradiation, the less differentiated and rapidly multiplying forms, the sporocysts, were the most susceptible elements. As expected the ovo-testis was the most susceptible host tissue to be affected by ionizing radiation¹. Its return to normal after radiation damage occurred at about the same time the invading parasites were re-emerging. The other snail tissues appeared more resistant, since they exhibited no evident destructive lesions that could be attributed to radiation.

The situation of the defense cells, collectively designated as hemocytes, is a more complex matter. Hemocytes are considered highly resistant to radiation². The present study revealed an apparent decrease in both hemocyte number and function as a result of radiation. In non-irradiated infected snails these cells were easily found, sometimes accumulated in small focal areas, and eventually forming the so-called *encapsulating complexes* around destroyed parasites. Although they did not altogether disappear during and after radiation, they became fewer and isolated, and did not form *encapsulating complexes* around radiation-destroyed cercariae. Also, when parasite multiplication was fully resumed, no evident histological signs of hemocyte proliferation were observed. However, it is possible that hemocyte reactivity would require more time to be fully established, and probably would have become evident had the time of observation been further extended after the post-radiation resumption of cercarial elimination. As demonstrated by the observations of Lemos and Andrade³ the apparent tolerant behavior of hemocytes at initial infection, progressively turned into one of proliferation and differentiation of granuloma-like structures with time.

REFERENCES

1. Andrade ZA, Sadigursky M. Um estudo comparativo das cepas Feira de Santana (Bahia) e Porto Rico do *Schistosoma mansoni* na infecção experimental do camundongo. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80: 37-40, 1985.
2. Bezerra FSM, Machado JAK, Souza RLM, Chaves MM, Correa RK, Coelho PMZ. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant *Biomphalaria tenagophila* snails. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98: 73-75, 2003.
3. Lemos QT, Andrade ZA. Sequential histological changes in *Biomphalaria glabrata* during the course of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 719-721, 2001.
4. Liard E, Chiriboga J, Pellegrino J, Colon JL, Silva RM. Effect of radiation on the reproductive potential of *Biomphalaria glabrata*. *Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica* 1: 157-162, 1968.
5. Lie KJ, Heyneman D. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reactions to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and re-sensitized *Biomphalaria glabrata*. *Journal of Parasitology* 62: 51-58, 1976.
6. Lie KJ, Heyneman D, Richards CS. *Biomphalaria glabrata*. Temporary reduction of snail's natural resistance to *Schistosoma mansoni* by irradiated *Echinostoma parvum* miracidia. *Experimental Parasitology* 43: 54-62, 1977.
7. Lie KJ, Jeong KB, Heyneman D. Acquired resistance in snails. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *International Journal of Parasitology* 13: 301-304, 1983.
8. Michelson EH, Dubois L. Resistance to schistosome infection in *Biomphalaria glabrata* induced by gamma radiation. *Journal of Invertebrate Pathology* 38: 39-44, 1981.
9. Sullivan JT, Richards CS, Joe LK, Heyneman D. *Ribeiroia marini* irradiated miracidia and induction of acquired resistance in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology* 53: 17-25, 1982.