



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
MESTRADO EM BIOFÍSICA

SILVANA DE FÁTIMA FERREIRA DA SILVA

ESTUDO DAS CÉLULAS DA HEMOLINFA DE *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907).

RECIFE-PE
1995

SILVANA DE FÁTIMA FERREIRA DA SILVA

ESTUDO DAS CÉLULAS DA HEMOLINFA DE *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848)
DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907).

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biofísica e Radiobiologia do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, para obtenção do título de
Mestre em Biofísica

Área de concentração: Biofísica celular.

Orientador:
Prof. Dr. José Valfrido de Santana

Coorientação:
Prof^ª. Dra. Elizabeth Malagueño de Santana

RECIFE-PE
1995

Silva, Silvana de Fátima Ferreira da

Estudos das células da hemolinfa de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) durante o curso da infecção pelo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) / Silvana de Fátima Ferreira da Silva. – Recife, 1995.

45 f.: il.

**Orientadores: José Valfrido de Santana, Elisabeth Malagueño de Santana
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Bióciências. Programa de Pós-graduação em Biofísica e Radiobiologia,
1995.**

Inclui referências

1. Biomphalaria 2. Schistosoma mansoni I. Santana, José Valfrido de (orient.)
II. Santana, Elisabeth Malagueño (coorient.) III. Título.

SILVANA DE FÁTIMA FERREIRA DA SILVA

ESTUDO DAS CÉLULAS DA HEMOLINFA DE *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848)
DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO PELO *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907).

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biofísica do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco, para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 02/05/1995

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho / UFPE

Profa. Dra. Isaíras Padovan / UFPE

Profa. Dra. Verônica Sierpe Jeraldo / UFPE

Aos meus pais, Antonio e Helena e ao meu irmão Sandro, que, apesar de leigos no assunto, sempre me apoiaram.

Aos meus mestres, Elizabeth e Santana, pela dedicação, carinho e paciência, que sempre tiveram comigo: na iniciação científica até hoje, não só no aspecto profissional, como no pessoal. Espero contar sempre com a amizade de vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, tão presente na minha caminhada.

À Prof^a Isaíras Padovan, Prof. Paulo Padovan e a todos do Setor de Microscopia Eletrônica do LIKA: Rafael, Luciana e Alberto, meu muito obrigado pela dedicação e paciência, que tiveram para realização desse trabalho.

Ao Prof. Luiz Bezerra de Carvalho Junior, Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pelo exemplo de incentivo a pesquisa e apoio no desenvolvimento dessa dissertação.

À Carmelita e Paulina do setor de Patologia do LIKA, que me ajudaram na realização dos testes citoquímicos, presentes neste trabalho.

Aos amigos Filipe Gonçalves, Paulo e Luiz do Setor de Esquistossomose Experimental do CPqAM, da Fundação Oswaldo Cruz, por tantas ajudas.

As minhas grandes amigas Vláudia, Verônica, Ana Paula, Andréa Dórea e Terezinha, pela paciência, ajuda e apoio na realização desse trabalho.

Aos minhas colegas de trabalho da Disciplina de Parasitologia da Universidade de Pernambuco: Prof^a Olga Resende e Prof^a Célia, pela ajuda na conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos do Hospital Getúlio Vargas e em especial a minha amiga Mônica Montenegro, pelo apoio e ajuda na conclusão desta dissertação

Ao Chefe do laboratório de Patologia Clínica do Hospital Getúlio Vargas, Dr. Jacks Cosme de Souza, pela compreensão e tolerância.

A todos os colegas do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE.

Ao FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos, pelo apoio financeiro no desenvolvimento desse trabalho.

A CAPES, pela bolsa concedida durante o curso de Mestrado.

RESUMO

Estudo das células da hemolinfa de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) durante o curso da infecção pelo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907).

Células da hemolinfa de molusco da espécie *Biomphalaria straminea* (*B. straminea*), não infectados (controle) e infectados (amostra) com miracídio de *Schistosoma mansoni* da linhagem SLM (São Lourenço da Mata – Pernambuco, Brasil), foram analisadas pela sua morfologia e composição química. Moluscos *B. straminea* foram submetidos à punção céfalopodal para coleta da hemolinfa, e o número de células circulantes foi avaliado. Em *Biomphalaria straminea* não infectado foram encontradas $141 \pm 56,19$ células/mm³, enquanto em moluscos submetidos à infecção foi verificado um aumento para $357 \pm 170,05$ células/mm³ duas horas após exposição aos miracídios, número este significativamente superior ao controle, conforme testes estatísticos realizados. A morfologia celular foi analisada pela microscopia ótica e eletrônica de transmissão, e foram encontrados dois tipos celulares: tipo I – hialinócitos e tipo II – granulócitos. A composição química da célula para detectar a presença de glicogênio foi revelada pela técnica do PAS (*Periodic acid-Schiff*) e microscopia eletrônica de transmissão, apresentando resultado positivo. As substâncias secretadas foram analisadas pela técnica do *Alcian Blue*, apresentando resultado negativo.

Palavras-chaves: *Biomphalaria straminea*. Células da hemolinfa. Hialinócitos. Granulócitos.

ABSTRACT

A Study of Hemolymph Cells of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) During the Course of *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) Infection

Hemolymph cells of the mollusk of the *Biomphalaria straminea* (*B. straminea*) species, uninfected (control) and infected (sample) with *Schistosoma mansoni* miracidium of the SLM lineage (São Lourenço da Mata – Pernambuco, Brazil), were analyzed for their morphology and chemical composition. *B. straminea* mollusks were submitted to a cephalopodal puncture to collect hemolymph, and the number of circulating cells was evaluated. In uninfected *Biomphalaria straminea* $141 \pm 56,19$ cells/ mm^3 were found, while in mollusks submitted to infection an increase to $357 \pm 170,05$ cells/ mm^3 was observed two hours after exposure to miracidia, a number significantly higher than the control number, according to statistical tests. Cell morphology was analyzed by optical and transmission electron microscopy, and two cell types were found: type I – hyalinocytes, and type II – granulocytes. The chemical composition of the cell to detect the presence of glycogen was revealed by the Periodic acid-Schiff (PAS) method and transmission electron microscopy, presenting a positive result. The secreted substances were analyzed using the Alcian Blue method, presenting a negative result.

Keywords: *Biomphalaria straminea*. Hemolymph cells. Hyalinocytes. Granulocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia de hialinócitos da hemolinfa de <i>B.straminea</i> normal.....	25
Figura 2: Fomicrografia de granulócitos da hemolinfa de <i>B.straminea</i> , normal.....	26
Figura 3: Eletromicrografia de hialinócitos de <i>B. straminea</i> , normal a, b e c.	28
Figura 4: Eletrmicrografia de granulócitos de <i>B. straminea</i> , normal a e b:	30
Figura 5: Contagem de células da hemolinfa de <i>B. straminea</i> infectadas com <i>S. mansoni</i>	31
Figura 6: Fotomicrografia de hialinócitos e granulócitos de <i>B. straminea</i> , normal corados com PAS.....	33
Figura 7: Fotomicrografia de granulócitos de <i>B. straminea</i> , infectados com <i>S. mansoni</i> corados com PAS.....	33
Figura 8: Eletromicrografia de granulócitos de <i>B. straminea</i> não infectado apresentando vários grânulos de glicogênio(G).....	34
Figura 9: Eletromicrografia de granulócito de <i>B. straminea</i> , infectados pelo <i>S. mansoni</i> apresentando pequena quantidade dos grânulos de glicogênio (G).....	34
Figura 10: Fotomicrografia de granulócito de <i>B.straminea</i> corado pelo Alcian Blue pH 1,0.....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Número de células/mm ³ , da hemolinfa de <i>B.straminea</i> , durante o curso da infecção pelo <i>S.mansoni</i>	31
TABELA 2: Percentagem de Células Tipo: I (hialinócitos) e Tipo: II (granulócitos) encontradas na hemolinfa de <i>B.straminea</i> durante o curso da infecção pelo <i>S.mansoni</i> ...	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	12
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Geral.....	20
3.2 Específicos.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Obtenção de miracídios e infecção de <i>Biomphalaria straminea</i>	21
4.2 Seleção e manutenção de moluscos.....	21
4.3 Obtenção da hemolinfa.....	22
4.4 Contagem das células da hemolinfa e análises estatísticas dos dados.....	22
4.5 Observações Morfológicas.....	22
4.5.1 Microscopia óptica.....	22
4.5.2 Microscopia eletrônica.....	23
4.6 Testes citoquímicos	23
4.6.1 Detecção de Carboidratos:.....	23
4.6.2 Produtos de secreção (glicosamino glicanas sulfatadas e sulfomucinas, resíduos de ácido siálico e glicosaminoglicanas ácidas).....	24
5 RESULTADOS.....	25
5.1 Avaliação Morfológica das Células da Hemolinfa através da Coloração pelo Leishman.	25
5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	26
5.3 Avaliação do Número de Células da Hemolinfa, pela Microscopia de Contraste de Fase durante o Curso da Infecção pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	30
5.4 Avaliações Citoquímicas.....	32
5.4.1 Detecção de carboidratos.....	32
5.4.2 Detecção de substâncias secretadas	35
6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

Molusco da espécie *Biomphalaria straminea*, são um dos principais hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* em algumas regiões endêmicas do Brasil, apesar de pouco susceptível à infecção natural ou experimental ao parasito (GONÇALVES et al., 1989 e AMÂNCIO et al., 1989).

A resistência a infecção pelo parasito, é determinada por fatores genéticos, e segundo Santana et al., (1978), constitui caráter hereditário e as variações da infectividade são devidas a um único gene dominante (RICHARD e MERRIT, 1975). Entretanto, existem outros fatores que influenciam o grau de infecção desses moluscos, como: a interação fisiológica entre molusco e trematodeo, a dieta, sendo esta importante para a manutenção da infecção, pois, o parasito consome parte dos nutrientes existentes no organismo do hospedeiro, principalmente glicogênio e a idade, já que, moluscos mais jovens são mais susceptíveis a infecção (NIEMANN e LEWIS, 1990).

As reações de defesa observadas nos moluscos do gênero *Biomphalaria* é muito eficiente e apresentam algumas semelhanças com aquelas observadas nos vertebrados, a principal diferença é quanto a presença de imunoglobulinas, presentes nestes últimos e ausentes nos invertebrados. No entanto, mesmo sem a presença das mesmas, o sistema de defesa desses animais é muito eficiente, desempenhando diversas funções, tais como: reconhecem corpos estranhos, fagocitando e encapsulando os mesmos, através de células circulantes; promovem reparo tecidual e induzem reações citotóxicas. Verificou-se também, a existência de fatores humorais que ampliam essa resposta (GRANATH et al., 1984; SANTANA et al., 1990; GADELHA et al., 1996).

A infecção do molusco pelo *S. mansoni*, apresenta mecanismos de natureza celular, ocorrendo formação de reação granulomatosa, destruição e fagocitose dos miracídios por células granulocíticas poucas horas após penetração do mesmo (GUARALDO & Cols., 1981).

Pesquisas efetuadas mostram que *B. glabrata* é o principal hospedeiro intermediário do *S. mansoni* no hemisfério oeste e biologicamente mais eficiente, isto é, mais suscetível e melhor adaptado ao parasito, maior sobrevivência quando infectado e maior número de cercárias eliminadas tanto em condições ambientais quanto experimentais (MALTA, 1994; RICHARD, 1985; BARBOSA, 1959). Enquanto *B. straminea* mostra ser a espécie mais resistente à infecção pelo *S. mansoni*, tanto em condições naturais, quanto experimentais (GONÇALVES & Cols, 1989; AMÂNCIO & cols, 1989), mas, embora se apresente mais resistente ao *Schistosoma mansoni*, ficando difícil explicar a elevada prevalência da

esquistossomose em certas regiões, especialmente na Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, onde *B.straminea* é o vetor predominante na região (GONÇALVES et al., 1989; AMÂNCIO et al., 1989).

Estudos sobre os vetores da Esquistossomose são de grande importância epidemiológica, pois, através deles, podemos estudar: a potencialidade de transmissão pelos moluscos em determinada área (YOSHINO, 1985) assim como o ajuste fisiológico entre hospedeiro e parasito (PARAENSE & CORREA, 1963), além de obter subsídios para adotar medidas de controle da doença.

Com base nestes dados, torna-se importante, estudos que visem avaliar o comportamento deste planorbídeo frente à infecção pelo *Schistosoma mansoni*; os resultados poderão fornecer subsídios para uma melhor avaliação dos mecanismos de defesa e capacidade de transmissão, deste hospedeiro intermediário.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A Esquistossomose é uma doença crônica provocada pelo *Schistosoma mansoni*, que afeta cerca de 200 milhões de pessoas no mundo, número de casos estimado pela Organização Mundial de Saúde, OMS (REY, 1991).

Originária da África, a Esquistossomose chegou às Américas através do tráfico de escravos (Marques, 1990). No Brasil, a doença teve início no Nordeste (Costa, 1978). Atualmente as áreas de importância compreendem uma faixa contínua que se inicia nas regiões orientais do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco (Zona da Mata, Litoral, Agreste e Sertão) e quase totalidade dos Estados de Alagoas e Sergipe, grande parte da Bahia, Minas Gerais e Zona Serrana do Espírito Santo (REY, 1991).

A Esquistossomose possui ciclo heteroxênico, onde o hospedeiro definitivo são mamíferos, incluindo o homem, e o hospedeiro intermediário é um molusco gastrópoda do gênero *Biomphalaria*. As principais espécies transmissoras da esquistossomose nas Américas são: *Biomphalaria glabrata* (*B. glabrata*), *Biomphalaria tenagophila* (*B. tenagophila*) e *Biomphalaria straminea* (*B. straminea*) (REY, 1991).

No Brasil estas espécies estão distribuídas, segundo Carvalho (1991), da seguinte maneira: *B. glabrata*, delimitada pelos paralelos 13° e 21° Q e pelos meridianos 39° e 45° W, área onde é mais dominante (Sudoeste da Bahia, metade oriental de Minas Gerais e Espírito Santo); é também observada ao longo da faixa costeira nos Estados de Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte; a partir daí é encontrada para o sudoeste (Rio São Francisco e Centro-Sul de Minas Gerais); populações isoladas foram observadas noutros Estados e sua presença, está, provavelmente, associada a transmissão da esquistossomose nestas áreas. O *B. tenagophila* estende-se por uma larga faixa costeira que vai do Sul da Bahia (17° 45' S; 39° 15' W) até o Chui, no Rio Grande do Sul (33° 41' S; 53° 27' W). No Estado de São Paulo esta espécie é encontrada principalmente o interior, instituindo um importante transmissor da esquistossomose neste Estado. Populações isoladas, também foram observadas no Distrito Federal e Minas Gerais. *B. straminea* é a espécie melhor adaptada às variações climáticas, com distribuição mais densa no Nordeste (41° W e 11° S), Sul da Bahia e Nordeste de Minas Gerais (15° e 18° S; 40° e 44° W).

Pesquisas efetuadas mostram que *B. glabrata* é o principal hospedeiro intermediário do *S. mansoni* no hemisfério oeste e biologicamente mais eficiente, isto é, mais suscetível e melhor adaptado ao parasito, maior sobrevivência quando infectado e maior número de

cercarias eliminadas tanto em condições normais quanto experimentais (Malta, 1994; Richard, 1985; Barbosa, 1959), e enquanto *B. straminea* e *B. tenagophila* mostra ser a espécie mais resistente frente à infecção pelo *S. mansoni*, tanto em condições naturais, quanto experimentais (GONÇALVES et al, 1989; AMÂNCIO et al, 1989).

Estudos sobre os vetores da Esquistossomose são de grande importância epidemiológica, pois, através deles, podemos estudar: a potencialidade de transmissão pelos moluscos em determinada área (YOSHINO, 1985), assim como, o ajuste fisiológico entre hospedeiro e parasito (PARAENSE e CORREA, 1963), além de obter subsídios para adotar medidas de controle da doença.

O molusco hospedeiro desse trematódeo, apresenta maior suscetibilidade às linhagens simpátricas do parasito, isto é, os moluscos de uma determinada região geográfica apresentam maior suscetibilidade ao *S. mansoni* daquela mesma região (SANTANA et al., 1978; BASCH, 1976; RICHARD e MERRIT, 1972; PARAENSE e CORREA, 1963; BARBOSA, 1960; NEWTON, 1953). Mesmo assim a infecção alopátrica é possível, desde que a carga de miracidios seja elevada; aproximadamente 100 vezes maior (PARAENSE e CORREA, 1963) ou, quando utiliza-se populações de moluscos geneticamente selecionados (ZANOTI, 1991; SANTANA, 1976).

A resistência à infecção pelo *S. mansoni* é determinada por fatores genéticos e segundo Richard (1973) e Richard e Merrit (1975), constitui carácter hereditário. As variações da infectividade são devidas a um único gene dominante, podendo, o carácter de a suscetibilidade estar presentes em moluscos refratários. Outros fatores também influenciam no grau de infecção pelo *S. mansoni*, como a fisiologia, a dieta e a idade dos moluscos. A interação fisiológica entre molusco e trematódeo é necessária para a sobrevivência dos mesmos, a dieta é importante para a manutenção da infecção, pois o parasita consome boa parte dos nutrientes existentes no organismo do hospedeiro, principalmente glicogênio a idade é importante porque moluscos mais jovens são mais suscetíveis a infecção em relação aos mais velhos (NIEMANN e LEWIS, 1990; RICHARD, 1973).

A presença de infecção concomitante, ou seja, aquela que ocorre quando o molusco é parasitado por uma ou mais espécies de trematódeo, também altera a relação parasito-hospedeiro: pela competição de nutrientes, luta por um espaço no corpo do hospedeiro, alterações fisiológicas e imunológicas. Estas alterações poderiam aumentar ou diminuir a suscetibilidade do molusco quando uma segunda espécie de trematódeo entra em contato com o mesmo. (NODA e LOKÉR, 1986). Durante a infecção do molusco pelo *S. mansoni*, observa-se que o fato, é dependente de ambos: a infectividade do parasito e a

susceptibilidade do hospedeiro; isto é, a sobrevivência do parasito pode ocorrer somente na ausência do sucesso da resposta imune e o desenvolvimento continuado é possível se o hospedeiro é fisiologicamente apto. Quando miracidios de *S. mansoni* penetram ativamente em *B. glabrata* resistente, a encapsulação da larva, ocorre dentro de poucas horas da invasão; o que não acontece com linhagens susceptíveis. Geralmente, se aceita que o sucesso do estabelecimento da infecção, pode ser induzida pela evasão da resposta do hospedeiro, através de qualquer imitação molecular ou a aquisição ativa dos componentes do hospedeiro, pela larva (FRYER e BAYNE, 1980 **a e b**).

As reações de defesa observadas nestes invertebrados apresentam algumas semelhanças, com aquelas observadas nos vertebrados, a principal diferença é a quanto à presença de imunoglobulinas, presentes nestes últimos e ausentes nos invertebrados. Entretanto, mesmo sem a presença das mesmas, o sistema de defesa desses animais é muito eficiente. Este sistema desempenha diversas funções: reconhece corpos estranhos fagocitando-os ou encapsulando-os, através de células circulantes; promove o reparo tecidual, induz reações citotóxicas e possuem fatores humorais que ampliam esta resposta (LOKER et al., 1982; GRANATH e YOSHINO, 1984; MCKAY e JENKIN, 1969).

Entre as diversas funções de defesa encontradas em planorbídeos, aquelas desenvolvidas por células, podem ser consideradas a principal linha de defesa dos moluscos. Estas células estão presentes na hemolinfa e fluidos do corpo do molusco e atuam como defensoras fagocitando e encapsulando corpos estranhos que penetram nestes invertebrados. A fagocitose de corpos estranhos é facilitada pela movimentação destas células, que exercem importante papel na relação parasito-hospedeiro (ABDUL SAIAM e MICHELSON, 1980).

Na infecção do caramujo pelo *S. mansoni*, o processo de defesa ativado é aparentemente de caráter celular com formação de reação tipo granulomatosa, ocorrendo destruição e fagocitose das larvas, por células com função semelhante à macrófagos dos vertebrados, poucas horas após a penetração do miracidio (GUARALDO et al., 1981; BAYNE et al., 1980 **a, b**; PAN, 1965).

Estudos realizados por Cheng e Garrabrant (1977), mostraram que o encapsulamento e a fagocitose de esporocistos primários em *B. glabrata* refratária, da linhagem 10-R2, envolve dois estágios: alargamento do granuloma ao redor do esporocisto intacto e desintegração do parasito com aumento do tamanho do granuloma, seguindo-se a eliminação do mesmo. Sabendo-se que o mecanismo de defesa do molusco é basicamente celular, pois suas células são capazes de reconhecer o que é "self" ou "non self". Devido a isto, existe um interesse crescente por parte de pesquisadores em estudar as células desses moluscos vetores

da Esquistossomose, e os mecanismos de defesa dos mesmos.

As células de defesa desses invertebrados são conhecidas como amebócitos, denominados também por alguns autores de hemócitos, são produzidas pelo "órgão produtor de amebócitos (APO)", localizado na região reno-pericárdia do molusco. Este órgão apresenta diferentes reações, dependendo do estímulo a que é submetido. Quando o estímulo é produzido por substância particulada ou solúvel, o APO não apresenta alterações; quando o molusco é submetido à infecção há um aumento deste órgão devido à maior produção de amebócitos (SULLIVAN et al., 1984; SANTANA, 1990).

A classificação destas células apresenta ainda muita controvérsia. Pan (1958) classificou-as em um só tipo, denominado de amebócitos; Sminea (1972), também admitiu tratar-se de um único tipo de célula com diferentes funções; Cheng (1975) classificou-as em dois tipos: granulócitos e hialinócitos. O mesmo Cheng (1980) propôs que granulócitos dos bivalvos, podem ser subcaracterizados com: pró-granulócito, granulócito I e II e "spent" granulócito. Pró-granulócito seriam células jovens que se diferenciam de um granuloblasto hipotético, enquanto granulócito I e II seriam outros estágios ontogenéticos. "spent" granulócitos seriam células maduras desta linhagem em estágio terminal da endocitose. Noda e Loker (1989) colocaram estas células em quatro categorias: granulócitos com grande espraiamento, granulócitos com pouco espraiamento, células redondas e hialinócitos.

Os **hialinócitos**, denominação proposta por Cheng (1975), são células de pequeno tamanho, de contorno esférico ou oval, existindo na hemolinfa na concentração de 10 a 15% do total de células; os hialinócitos possuem certa adesão ao vidro, mas espraiam-se pobremente sobre a superfície dos mesmos; tem uma alta relação nucleocitoplasmática e são especialmente ricos em ribossomos livres, não contendo corpos lisossomais. O papel dos hialinócitos ainda é desconhecido; há evidências que eles representem um tipo primário de células que reagiria contra antígenos solúveis (BARRACCO et al., 1993; CHENG e GARRABRANT, 1977; CHENG, 1975).

Os **granulócitos**, denominação também proposta por Cheng, ao contrário dos hialinócitos, são células grandes que frequentemente aderem à superfície de vidro, espraiando-se. Esta célula representa a maior subpopulação de células circulantes da hemolinfa, perfazendo 90%. Os granulócitos tem grande atividade fagocitária e enzimática, sendo responsáveis pelos mecanismos de defesa do molusco. Ultra-estruturalmente é encontrado um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, dictiossomos e alguns corpos lisossomais densos. Os granulócitos exibem aspecto granular característico e os

grânulos observados no citoplasma apresentam correspondência ao sistema lisossomal (BARRACCO et al., 1993; CHENG e GARRABRAT, 1977; CHENG, 1975).

Sabe-se atualmente, que a fagocitose tem como principal função, a defesa nos vertebrados e invertebrados. Nestes últimos, a fagocitose, juntamente com fatores humorais, a concha e o muco, são responsáveis pelo sistema de defesa desses animais (BAYNE, 1990; RATCLIFF, 1985). O processo fagocítico, tanto nos vertebrados como nos invertebrados, reconhece primeiramente o corpo estranho que penetrou no organismo e depois há o englobamento ou encapsulamento da partícula que foi reconhecida como estranha. Este processo acontece também nos enxertos feitos em moluscos, onde há reconhecimento de tecido do seu próprio corpo e daquele que foi implantado (OTTAVIANI e VIRGINI, 1990; CHENG e JORDANE, 1987; CHERNIN, 1966; MICHELSON, 1963B; TRIPP, 1961).

Estudos morfológicos realizados por Cheng et al., (1978), confirmaram através de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, os achados de Harris (1975), que granulócitos de *B. glabrata* infectado (neste caso com *Angiostrongylus cantonensis*) produzem finos filopódios que espraiam ao longo do substrato de vidro. Em poucos instantes grânulos citoplasmáticos e outras organelas estendem-se para o corpo principal da célula e formam segmentos dilatados ao longo de certos pseudópodes.

Seta (1990) verificou em *B. glabrata* e *B. tenagophila* comportamento amebocitário diferente, frente a diversos estímulos. Parece ter havido mobilização dos amebócitos (granulócitos) quando o estímulo foi pela infecção por *S. mansoni*, sugerindo uma resposta "específica" ao parasito.

Allegretti (1991) verificou diferenças de comportamento entre as variantes albina e melânica de *B. glabrata* em relação ao *S. mansoni*. Foi observado um maior número de moluscos melânicos eliminando cercárias por um período mais longo do que nos moluscos albinos. Houve interrupção precoce de eliminação de cercárias com cura da infecção em alguns moluscos albinos. A taxa de mortalidade também foi maior nos moluscos melânicos. A contagem das células da hemolinfa mostrou um maior número de granulócitos para a variante albina, com existência de picos em diferentes horários para as duas variantes, sendo de 12 horas para a variante albina e 24 horas para a variante melânica. O estudo histológico mostrou um maior número de esporocistos íntegros para a variante melânica e um maior número de esporocistos degenerados para a variante albina.

Estudos utilizando microscopia óptica, eletrônica e reações citoquímicas em moluscos transmissores da esquistossomose, tem sido realizados, com o objetivo de elucidar o mecanismo de defesa desses animais. Jeong e Heyneman (1976), estudando, principalmente,

granulócitos de *B. glabrata*, identificaram, utilizando microscopia eletrônica e testes citoquímicos, a presença de vários tipos de inclusões no citoplasma destas células, principalmente, lipídios, proteínas e glicogênio. Foi observado, que estas células são altamente fagocíticas, embora pareça ser uma resposta de caráter inespecífico.

Cheng (1979) observou a existência de grânulos e organelas citoplasmáticas, que ao entrar em contato com o material estranho, movimentavam-se em direção aos filopódios, que se tomavam numerosos na presença desse material. Os lisossomos eram as organelas que mais se encontrava ao longo desses filopódios, podendo indicar realmente o caráter fagocítico dessas células.

Enquanto pesquisas com *B. tenagophila* e *B. straminea* caminham lentamente, com *B. glabrata*, os estudos já estão mais adiantados, devido talvez a sua potencialidade em transmitir a esquistossomose em várias regiões do país. Yoshino e Granath (1984) relataram que os aspectos morfológicos e citoquímicos não são suficientes para uma classificação completa dessas células. Estudos de receptores de superfície celular (lecitinas) e propriedades de formação de rosetas (E-rosetting), sugerem que essas populações de células circulantes de *B. glabrata*, podem ser compostas de subpopulações, molecularmente distintas, potencialmente capazes de algum grau de compartimentalização funcional. A aplicação de anticorpos monoclonais como sonda molecular de antígenos de superfície de amebócitos de caramujo, tem entretanto revelado que as células aderentes da circulação de *B. glabrata*, constitui populações heterogênicas, que confirma a existência de algumas subpopulações celulares baseada na expressão de epítomos de superfície distintos.

Embora estudos relatem que não exista formação de imunoglobulinas; isso não significa que outra forma de expressão imune, humoral, possa existir, desta forma numerosas substâncias têm sido apresentadas com atividade antibiótica (TRIPP, 1970). Tyler (1946), catalogou a ocorrência de várias hemaglutininas encontradas no corpo e fluidos de numerosos invertebrados, incluindo os moluscos. Michelson (1964) encontrou, no extrato tecidual de *B. glabrata* infectado com *S. mansoni* substâncias imobilizadoras de miracidios. Substâncias com atividade similar foram, também, encontradas em extrato tecidual de *Bulinus truncatus* e em *Helisoma caribaeum*.

Achava-se que a imunidade nos moluscos era produto de interações não específicas das células fagocíticas com parasitos invasores, juntamente com um número de fatores humorais não relatados, mas, sabe-se hoje, que os moluscos têm reações celulares imunes específicas com um curto período de memória (RATCLIFFE, 1985; TRIPP, 1970).

Outras pesquisas relatam a existência de vários fatores humorais que estão presentes na hemolinfa de moluscos como lecitinas, aglutininas, linfoquinas (KNAAP e LOKER, 1990; LIE et al., 1980; MULLAINNADHAN e RENWRANTZ, 1986; RENWRANTZ e STAMER, 1983). Foi observado que, lecitinas podem atuar como moléculas opsônicas, analogamente às imunoglobulinas dos vertebrados (KOCH e NIELSEN, 1984).

Couch et al., (1990), demonstraram a nível molecular, que a hemolinfa de *Echinostoma paraensei* contém polipeptídeos de 80 - 120 K.Da, envolvidos no aumento da capacidade aglutinante da hemolinfa destes moluscos.

Experimentos realizados por Yoshino (1981,1977), utilizando *B. glabrata*, demonstram que a Concanavalina A (ConA), liga amebócitos de moluscos e esporocistos de *S. mansoni*. Com base nestes resultados, Boswell e Bayne (1986) mostraram que amebócitos destroem esporocistos tratados com ConA e que esta resposta é dose dependente, com valores máximos aproximados daqueles registrados para hemócitos de caramujos resistentes.

Avaliando ainda a capacidade citotóxica mediada por granulócitos, foram realizados experimentos "in vitro" para demonstrar que a destruição das larvas de *Schistosoma* em molusco resistente da cêpa 10-R2, deveria estar associada a mecanismos citotóxicos. Para isto, utilizaram-se esporocistos de cultura, verificando encapsulamento e destruição destas larvas quando incubados com hemolinfa total de 10-R2 (hemolinfa livre de células, hemolinfa total ou apenas amebócitos). A viabilidade dos esporocistos não se alterava na presença apenas de soro (BAYNE e COLS, 1980 **b**).

Por outro lado, tem sido relatado que amebócitos de moluscos suscetíveis PR- albino, quando incubados com hemolinfa livre de células de 10-R2, adquirem a capacidade de encapsular e destruir esporocistos de *S. mansoni* (BAYNE e COLS, 1980 **a e b**).

Esporocistos de *S. mansoni* pré-incubados durante seis horas com hemolinfa livre de células de molusco suscetível, eram destruídos quando posteriormente incubados com granulócitos de moluscos resistentes em plasma de molusco suscetível. Quando a pré-incubação era feita com plasma de molusco resistente, os esporocistos se mantinham intatos, mesmo quando a incubação posterior era realizada com plasma e amebócitos de moluscos suscetíveis (BAYNE et al., 1980 **a e b**). Tendo em vista estes experimentos foi sugerido que os esporocistos incorporam em sua superfície, substâncias do plasma do hospedeiro (LOKER et al., 1982), com isto, haveria um mascaramento do parasito, não sendo este reconhecido pelo mecanismo de defesa do hospedeiro (STEIN e BASCH, 1979).

Inúmeras pesquisas ao apresentar dados sobre a relação parasito-hospedeiro, na esquistossomose, utilizaram, na maioria das vezes, o modelo *B.glabrata*- parasito. Isto se

prende ao fato dos moluscos desta espécie, serem hospedeiros mais difundidos e mais adaptados as cêpas do *S. mansoni* (RICHARD, 1985; BARBOSA, 1959).

No Brasil, existem outros vetores da esquistossomose mansônica; no sul e sudeste o caramujo *B. tenagophila* tem uma grande importância epidemiológica (PARAENSE, 1975), entretanto ele é pouco suscetível para a infecção pelo *S. mansoni* em relação a *B. glabrata* (DIAS et al., 1987). Em Santa Catarina o *B. tenagophila* é o único caramujo que mantém os focos de transmissão da doença (BERNADINI e MACHADO, 1981), embora *B. straminea* seja, também, encontrado nesta região (FERRARI e HOFTNANN, 1992).

No Nordeste a importância epidemiológica de *B. straminea* é bem conhecida (FIGUEREDO et al., 1978; BARBOSA e FIGUEREDO, 1970; ALENCAR, 1940); em particular, a Zona da Mata do Estado de Pernambuco, área endêmica, onde a prevalência da doença é alta na população humana e os focos de transmissão são mantidos por esta espécie. Também *B. glabrata* é encontrado neste Estado, ocorrendo mais frequentemente no litoral, (GONÇALVES et al., 1989; AMÂNCIO et al., 1989). Focos de *B. straminea*, foram também, detectados nos Estados do Pará (MAJORA, 1953); Goiás (CUNHA NETO et al., 1981) e Minas Gerais (SOMA et al., 1981), embora haja presença, também, de *B. glabrata* nestas regiões.

Sabe-se, que *B. straminea* apresenta-se mais resistente ao *S. mansoni*, ficando difícil explicar a elevada prevalência da esquistossomose em certas regiões, especialmente na Zona da Mata do estado de Pernambuco, (GONÇALVES et al., 1989; AMÂNCIO et al., 1989). Com base nestes dados, tornam-se importantes estudos que visem avaliar o comportamento deste planorbideo frente à infecção pelo *S. mansoni*. Os resultados poderão fornecer subsídios para uma melhor avaliação dos mecanismos de defesa e capacidade de transmissão, deste hospedeiro intermediário.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar os tipos celulares da hemolinfa de *Biomphalaria straminea* normal (livres de infecção) e infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

3.2 Específicos

- Avaliar o número de células da hemolinfa de *B.straminea*, através da microscopia de contraste de fase (MCF)
- Avaliar a morfologia celular através da microscopia óptica.
- Estudar ultra-estruturalmente as células da hemolinfa de *B. straminea* a nível da microscopia eletrônica de transmissão (MET).
- Verificar a presença de carboidratos e grânulos de secreção, nas células da hemolinfa, através de análises citoquímicas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de Miracídeos e Infecção de *Biomphalaria Straminea*

Fezes de camundongo, previamente infectados com *Schistosoma mansoni*, cepa SLM (São Lourenço da Mata) foram coletadas em bandejas revestidas com papel absorvente. Em seguida, as fezes eram maceradas em borrel, diluídas em água destilada e filtradas em gaze, deixadas em repouso por 24 horas a temperatura de 8°C na ausência de luz; após este procedimento, o sedimento era colocado em placas de petri sob a luz artificial, para eclosão dos miracídeos. Cada molusco era colocado individualmente, na presença de 5 a 6 miracídeos e deixados por duas horas sob luminosidade e temperatura para que ocorra a infecção.

4.2 Seleção e Manutenção de Moluscos

Os moluscos foram selecionados ao acaso, entre aqueles criados no moluscário do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE). Estes animais eram descendentes de planorbídeos oriundos do município de São Lourenço da Mata, Estado de Pernambuco, Brasil. Nesta localidade esta é a única espécie existente. Os animais foram mantidos em aquários, com água declorada e alimentados com alface “ad libitum”.

Foram estudados oito grupos de 10 moluscos cada, distribuídos de acordo com o tempo de infecção, agrupados conforme esquema a seguir, para todas as avaliações citoquímicas e morfológicas e contagens, exceto para observações morfológicas através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

- * Grupo 1 - Caramujos normais;
- * Grupo 2 - Caramujos 2 horas após infecção
- * Grupo 3 - Caramujos 24 horas após infecção
- * Grupo 4 - Caramujos 48 horas após infecção
- * Grupo 5 - Caramujos 72 horas após infecção
- * Grupo 6 - Caramujos 7 dias após infecção
- * Grupo 7 - Caramujos 15 dias após infecção
- * Grupo 8 - Caramujos 30 dias após infecção

4.3 Obtenção da Hemolinfa

A hemolinfa dos caramujos foi obtida através da punção céfalo-podal e coletada com pipeta Pasteur, conforme técnica padronizada por Chernnin (1963). Os moluscos antes de serem puncionados, foram deixados por 30 minutos em água destilada, após a lavagem, eram secos em papel absorvente e a abertura da concha, limpa com algodão, em seguida, foi realizada a punção. O volume de hemolinfa coletada variou de 5 μ l à 10 μ l, por animal.

A hemolinfa coletada, de cada um dos moluscos, foi colocada em lâminas demarcadas, contendo cada uma 10 poços para facilitar a concentração e fixação das células. Com este procedimento, foi possível analisar um grupo de moluscos em uma única lâmina.

A hemolinfa colocada nos poços foi incubada em câmara úmida a 25⁰C, por 30 minutos, para adesão das células. Após este período o excesso de hemolinfa foi retirado com papel absorvente e fixada (se necessário), logo em seguida. A fixação foi realizada com formol-cálcio 10%, pH 7,2 por 30 minutos a temperatura ambiente. O excesso de fixador foi retirado após este período, através de lavagem com água corrente durante 1 hora.

4.4 Contagem das Células da Hemolinfa e Análises Estatísticas dos Dados

A contagem das células foi realizada utilizando microscopia de contraste de fase (MCF), com os grupos separados para estudo em diferentes períodos de infecção conforme dito anteriormente, a contagem foi realizada individualmente através de câmara de contagem de leucócitos (câmara de Neubauer) nos quatros quadrados externos, segundo Santana (1976); foi levada em consideração a morfologia de cada tipo celular.

O número final de células foi realizado segundo a expressão abaixo:

$$\text{cél/s/mm}^3 \text{ de hemolinfa} = \text{cél. Contadas} \times 10/4$$

A análises estatísticas dos dados foi realizada, empregando-se a análise de variância (ANOVA), com um critério de classificação e teste do χ^2 .

4.5 Observações Morfológicas

4.5.1 Microscopia óptica:

As lâminas com hemolinfa em diferentes períodos de infecção, após fixação, foram coradas com Leishman, segundo técnica descrita por Carvalho (1986). Após a coloração as

lâminas foram observadas ao microscópio óptico com a objetiva de imersão (100X), para análise das células.

4.5.2 Microscopia eletrônica:

Células da hemolinfa de *B.straminea* normais (grupo 1) e infectados (grupo 2), foram observados a luz da microscopia eletrônica. O grupo 2 foi escolhido para análise a nível de microscopia eletrônica de transmissão, por apresentar uma concentração maior de células na hemolinfa de *B.straminea*.

Um “pool” de hemolinfa, de cada grupo foi colocado em tubos “ependorf” siliconizados, contendo glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 e incubado a temperatura de 4^oC; após este período, o material foi centrifugado a 1500 r.p.m, por 5 minutos, com 3 lavagens em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2; pós-fixado em tretóxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2; deixando incubar por agitação, durante 1 hora e 30 minutos, a temperatura ambiente, protegido da luminosidade; decorrido este tempo, foi centrifugado a 1500 r.p.m, durante 10 minutos, e lavado 3 vezes em tampão cacodilato; em seguida procedemos a desidratação em banhos de acetona de 10 minutos cada, em ordem crescente de 50%, 70%, 90% e absoluta; posteriormente, o material foi embebido em resina pura, por um período de 18 horas à temperatura ambiente, logo após, foi emblocado em resina pura e deixado na estufa a 70^oC por 72 horas.

Para escolha da área apropriada para estudo, cortes de 0,5 µm foram feitos com navalha de vidro em ultramicrótomo ULTRACUTE (Reichert), montadas em lâminas de vidro e coradas com azul de metileno a 1%, diluído em tampão fosfato a 0,1M.

Cortes ultra-finos foram efetuados com navalha de diamante e posteriormente, contrastadas com citrato de Chumbo (Reynolds, 1963), por 30 a 40 minutos, em acetato de Uranila a 5% (Watson, 1958), por 30 minutos.

Exame das preparações e a obtenção das eletromicrografias foram realizados ao microscópio eletrônico - JOEL 100CX-II, operando de 60 a 80 KV. Aproximadamente 50 células foram analisadas por cada grupo.

4.6 Testes Citoquímicos

4.6.1 Detecção de carboidratos:

As lâminas contendo hemolinfa foram fixadas e coradas pelo PAS (ácido periódico de Schiff) a 0,5% por 15 minutos, conforme VACCA, 1985.

4.6.2 Produtos de secreção (glicosaminoglicanas sulfatadas e sulfomucinas, resíduos de ácido siálico e glicosaminoglicanas ácidas):

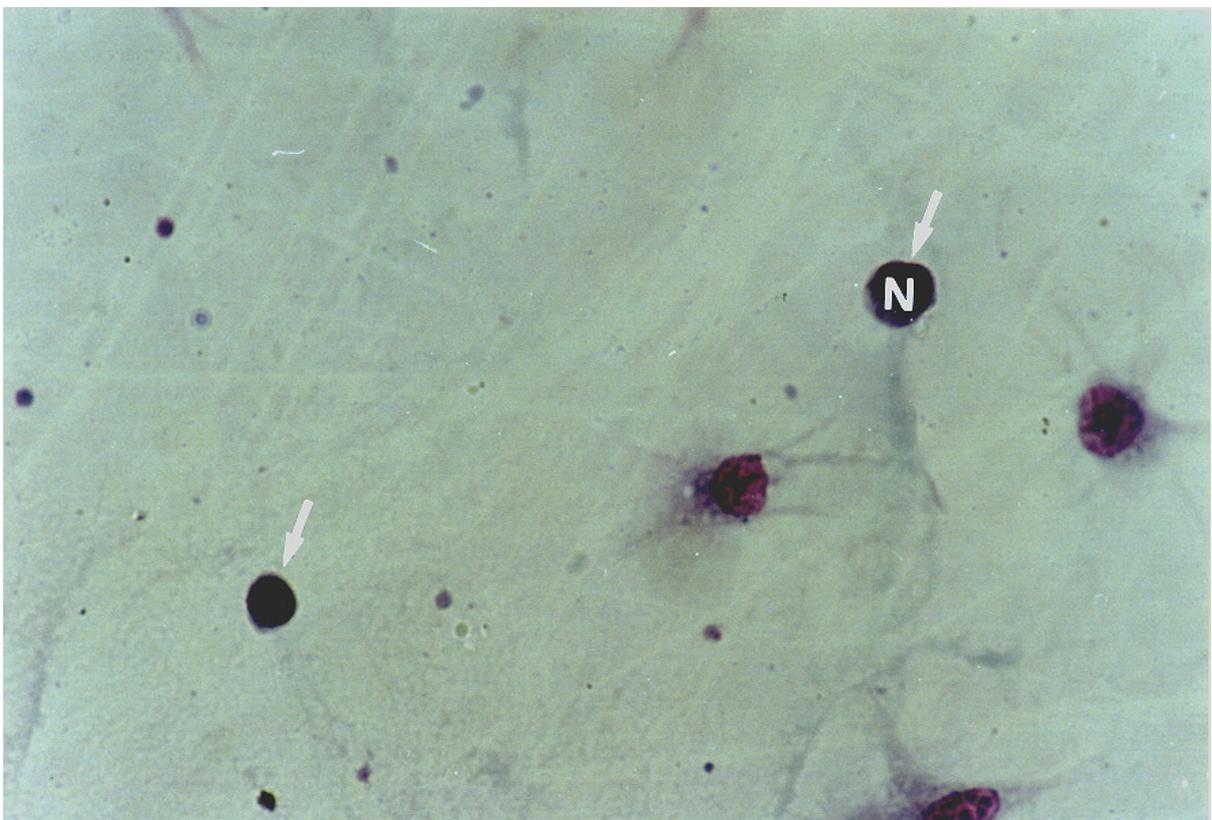
A detecção foi realizada pela técnica do Alcian Blue pH 1,0 e pH 2,5 respectivamente. As lâminas contendo hemolinfa em diferentes períodos de infecção e fixadas, foram coradas com 1% de Alcian Blue em ácido acético 3% à pH 1,0 e pH 2,5 por 18 horas a temperatura ambiente e contracoradas com vermelho de Kernechtrot, conforme Vacca (1985).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação Morfológica das Células da Hemolinfa através da Coloração pelo Leishman.

Foi caracterizado um primeiro tipo celular, que apresentou contorno esférico ou oval, núcleo grande e basófilo ocupando quase totalmente o volume celular, acompanhando o formato da célula, e possuindo uma alta relação núcleo-citoplasmática (Fig. 1). O citoplasma mostrou-se claro e hialino sem a presença de granulações; estas células são aparentemente pouco aderentes ao vidro e ao entrar em contato com superfície vítrea elas não se espriam ou emitem raros e curtos filopódios. Estas células possuem a mesma morfologia encontrada por Cheng (1975) e denominada de **hialinócitos** e presentes, tanto em caramujos normais, quanto em infectados.

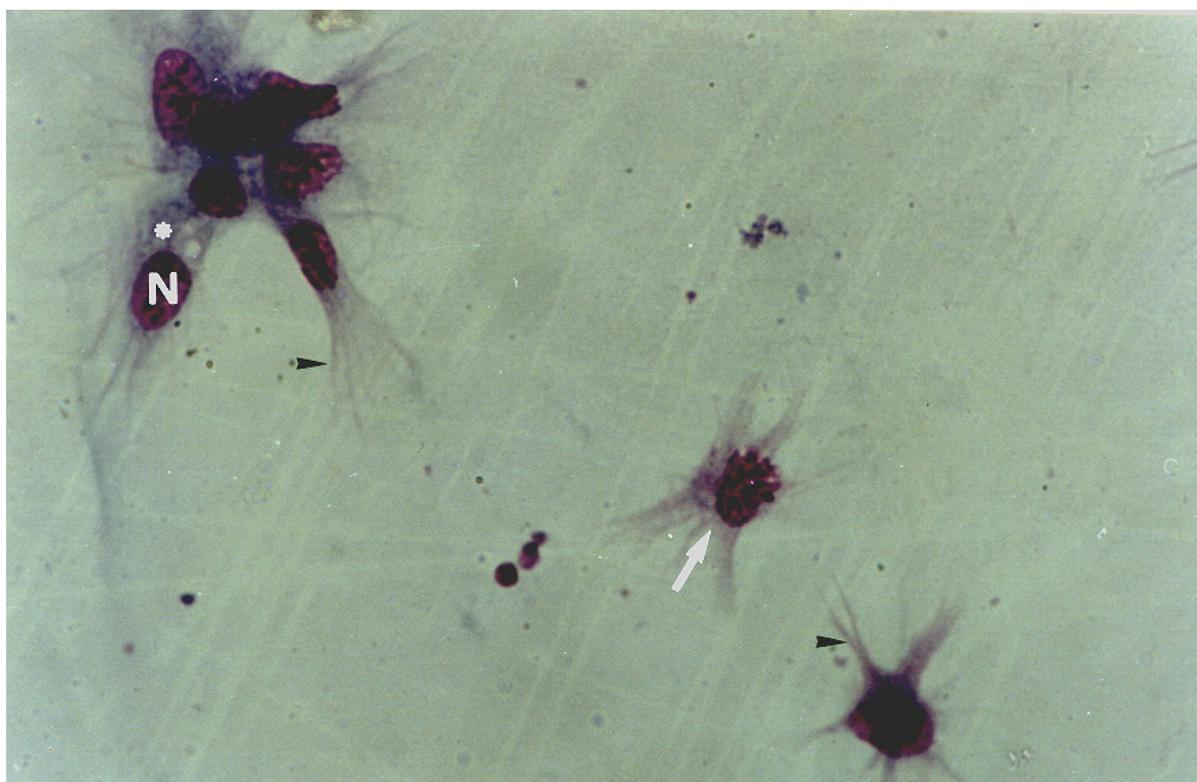
FIGURA 1: Fotomicrografia de hialinócitos de *B.straminea* normal. Observa-se um núcleo grande esférico (N), circundado por um delgado halo citoplasmático. Leishman, 1200X.



Fonte: O Autor (1995).

O segundo tipo celular apresentou características amebóides, com presença de finos e longos filopódios. Estas células parecem apresentar uma forte aderência a superfície de vidro e ao entrar em contato com esta, espriavam, emitindo numerosos e longos filopódios. O núcleo basófilo apresentou-se polimorfo, com a relação núcleo-citoplasmática baixa; no seu interior, observou-se a presença de grânulos de cromatina dispersos no nucleoplasma, o citoplasma acidófilo, mostra-se pouco granuloso. Morfologicamente, estas células possuem as mesmas características encontradas por Cheng (1975) em *B. glabrata* e foram denominadas de **granulócitos**. Em nível de microscopia óptica não apresentam alterações, tanto em caramujos normais, quanto em infectados (Fig. 2).

Figura 2: Fomicrografia de granulócitos de *B.straminea*, normal. Nela visualizamos núcleo (N), citoplasma (*) e filopódios (→). Leishman, 900 X.



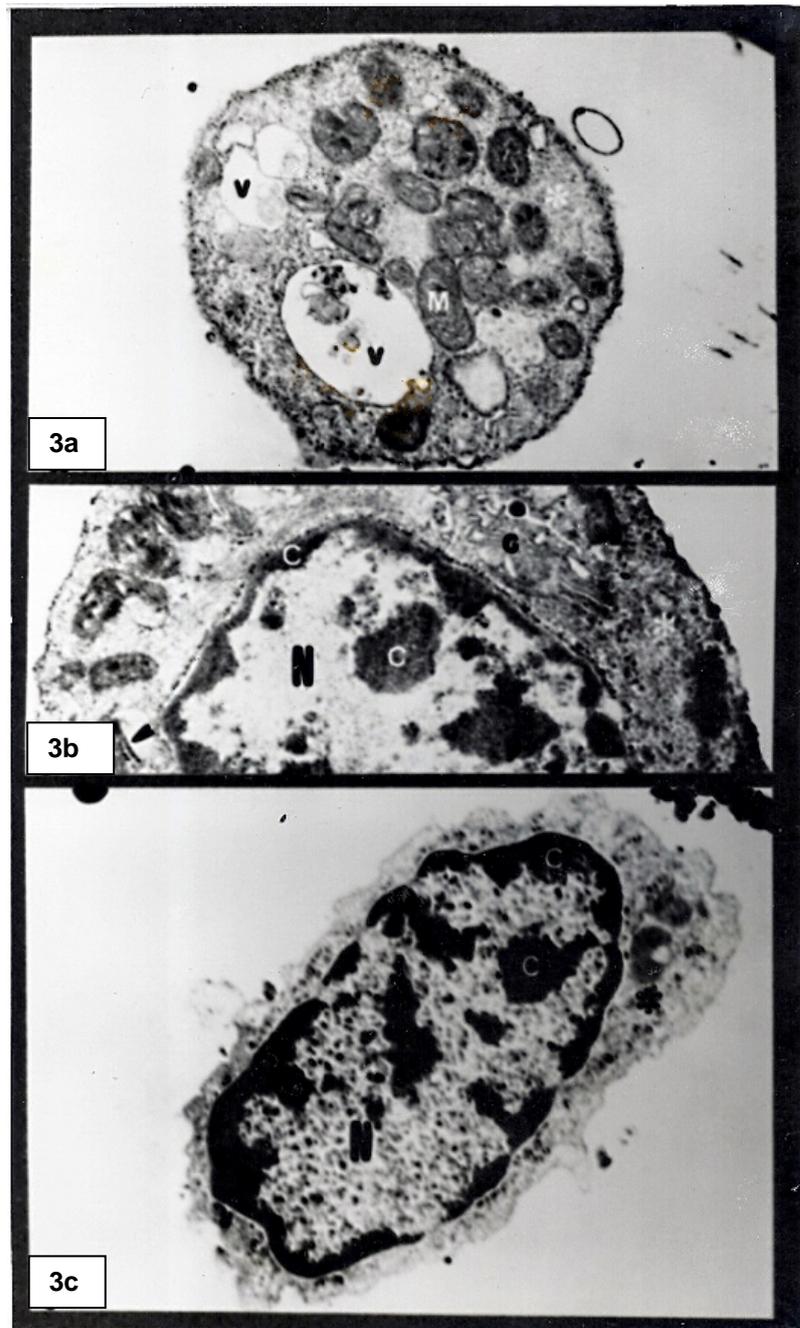
Fonte: O Autor (1995).

5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Ao nível de microscopia eletrônica de transmissão, foi evidenciada na hemolinfa de *B.straminea*, a presença dos dois tipos celulares encontrados na microscopia óptica e descritos a seguir, além de várias massas celulares desprovidas de núcleo, livres na hemolinfa.

Células tipo I (hialinócitos): Estas células apresentaram um contorno esférico ou oval, conformação que permaneceu regular tanto em moluscos normais quanto em moluscos infectados. O núcleo acompanhou o contorno celular, apresentando uma alta relação núcleo-citoplasmática; a cromatina apresentou grumos bastantes eletrondensos, acolados à face interna da membrana nuclear; como também dispersos no nucleoplasma. Estas células mostraram raros e curtos filopódios, raramente foram observados vacúolos citoplasmáticos. As mitocôndrias visualizadas apresentaram-se mais eletrondensas que o citoplasma. Grande quantidade de ribossomos livres também foi observado no citoplasma. Nos moluscos normais, o retículo endoplasmático rugoso, apresentou-se pouco desenvolvido e o conteúdo de suas cisternas mais eletrondensas que o do citoplasma; já nos moluscos infectados o conteúdo das cisternas apresentou-se menos eletrondensas que o do citoplasma (Fig.3 a, b e c).

Figura 3: Eletromicrografia de hialinócitos de *B. straminea*, normal **a, b e c**: **a:** Mitocôndria (M), Citoplasma (*), Vacúolo (V); **b:** Núcleo (N), Cromatina (C); **c:** Núcleo (N), Cromatina (C), Citoplasma (*).



Fonte: O Autor (1995).

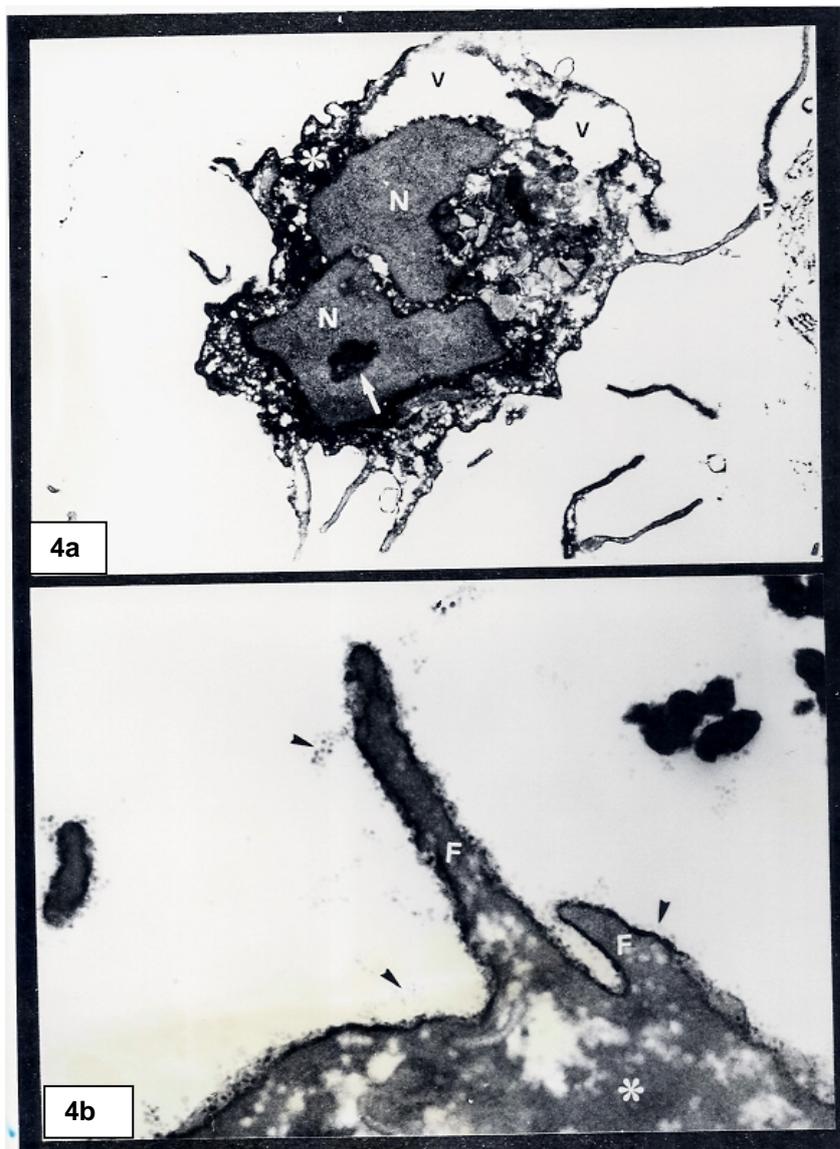
Célula tipo II (granulócitos): Neste tipo celular observa-se aspecto polimórfico, mostrando frequentemente, longos e finos filopódios, que em moluscos normais, são poucos e em infectados, numerosos. Na superfície desses filopódios, detectou-se a presença de um glicocálice, constituído por diversos corpos puntiformes, mostrando agregados mais intensos, em algumas regiões. O núcleo também apresentou-se polimorfo, com inúmeras invaginações, tanto em células de moluscos normais, quanto nos infectados. A

heterocromatina encontra-se acolada à face interna da membrana nuclear e também dispersa em grumos no nucleoplasma. O núcleo apresenta uma baixa relação núcleo-citoplasmática (Fig.4a e b).

O citoplasma apresentou vacúolos no seu interior, que em caramujos normais representam cerca de 30% do volume celular e em caramujos infectados estes vacúolos chegam a, aproximadamente, 60%. Os vacúolos foram visualizados na zona ectoplasmática e também próximos ao núcleo; sendo que, os maiores observam-se principalmente na periferia, podendo ainda ser encontrados, em menor quantidade perto do núcleo (Fig. 5a).

As mitocôndrias foram analisadas diretamente no microscópio eletrônico de transmissão, devido a grande eletrondensidade celular. O retículo endoplasmático rugoso, visualizado apresentou o conteúdo de suas cisternas menos eletrondensos que o do citoplasma. A presença de fagolisossomos, verificada, apresentou-se em maior número nos moluscos infectados que nos normais.

Figura 4: Eletromicrografia de granulócitos de *B. straminea*, normal **a** e **b**: **a:** Núcleo polimorfo (N), Nucleólo (→), Vacúolo (V), Filopódios (F), Citoplasma (*). **b:** Filopódios (F), Glicocálice () Citoplasma (*).



Fonte: O Autor (1995).

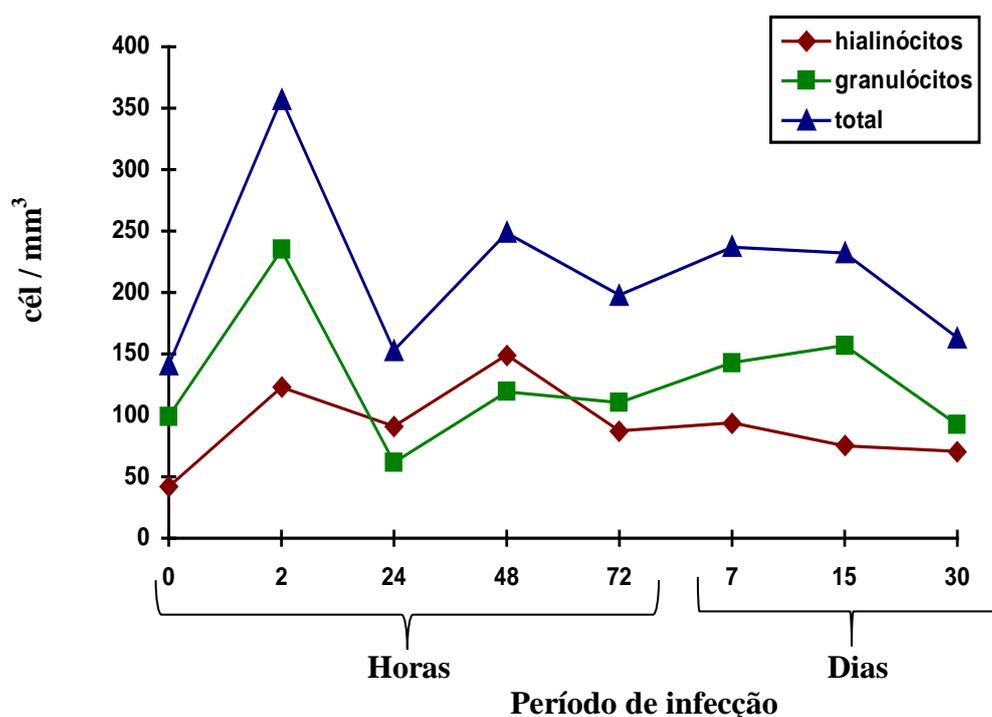
5.3 Avaliação do Número de Células da Hemolinfa, pela Microscopia de Contraste de Fase durante o Curso da Infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

A avaliação do número de células da hemolinfa, de moluscos normais e infectados, foi realizada através da microscopia de contraste de fase, tendo-se utilizado o teste estatístico das análises de variância com um critério de classificação (ANOVA), para proceder ao estudo comparativo entre os grupos.

Observa-se pelo teste de TUKEY, que houve diferença significativa ($p < 0,01$), quanto ao número de células em relação ao curso da infecção. Estes dados podem ser observados na Fig. 5 e Tab. 1, onde se verifica um aumento significativo na produção de células da

hemolinfa, 2 horas após infecção, passando de $141 \pm 56,19$ para $357 \pm 170,05$ células/mm³ de hemolinfa. Esta alta produção de células, não foi significativa, tornando-se praticamente estacionária. No 30^o dia após infecção, o número de células diminuem significativamente, aproximando-se do grupo controle (não infectado).

Figura 5: Contagem de células da hemolinfa de *B. straminea* infectadas com *S. mansoni*.



Fonte: O Autor (1995).

TABELA 1: Número de células/mm³, da hemolinfa de *B.straminea*, durante o curso da infecção pelo *S.mansoni*.

PERÍODO DE INFECCÃO	CÉLULAS TOTAIS n ^o /mm	TIPO I n ^o /mm	TIPO II n ^o /mm
0 (normal)	141 ± 56,19	42 ± 13,91	99 ± 46,45
2 horas	357 ± 170,05	123 ± 52,28	234 ± 126,01
24 horas	153 ± 48,16	91 ± 39,8	62 ± 16,77
48 horas	248 ± 118,26	149 ± 54,08	119 ± 66,18
72 horas	198 ± 113,60	87 ± 34,40	110 ± 89,53
7 dias	237 ± 134,00	94 ± 35,03	143 ± 116,90
15 dias	232 ± 88,18	75 ± 28,51	157 ± 69,68
30 dias	163 ± 49,52	71 ± 31,38	92 ± 28,51

Fonte: O Autor (1995).

A proporção entre os dois tipos celulares, detectado neste trabalho, também foi analisada, através do teste do χ^2 ; os dados são apresentados na Tab. 2, onde se observa que este aumento torna-se significativo, 24 horas após infecção, mantendo-se assim 72 horas após infecção.

TABELA 2: Percentagem de Células Tipo: I (hialinócitos) e Tipo: II (granulócitos) encontradas na hemolinfa de *B.straminea* durante o curso da infecção pelo *S.mansoni*.

PERÍODO DE INFECÇÃO	HIALINÓCITOS n ^o /mm	GRANULÓCITOS n ^o /mm
0 (normal)	32 ± 8,64	68 ± 8,64
2 horas	36 ± 9,00	64 ± 9,01
24 horas	58 ± 8,40	42 ± 8,40
48 horas	58 ± 13,52	42 ± 13,52
72 horas	51 ± 18,50	49 ± 18,51
7 dias	47 ± 18,10	53 ± 18,10
15 dias	34 ± 11,50	66 ± 11,51
30 dias	42 ± 10,44	58 ± 10,43

Fonte: O Autor (1995).

5.4 Avaliações Citoquímicas

5.4.1 Detecção de carboidratos

A presença de carboidratos no interior celular foi evidenciada pela técnica de coloração do PAS e também, demonstrada por meio da microscopia eletrônica de transmissão, pelo seu aspecto morfológico e pela sua distribuição citoplasmática.

A análise revelou que estes grânulos estavam presentes em maior quantidade, nos granulócitos (tipo II) com aproximadamente 90% dessas células, apresentando-se positivas ao PAS. Nos hialinócitos (tipo I) a percentagem de células reativas ao PAS, foi aproximadamente 1%.

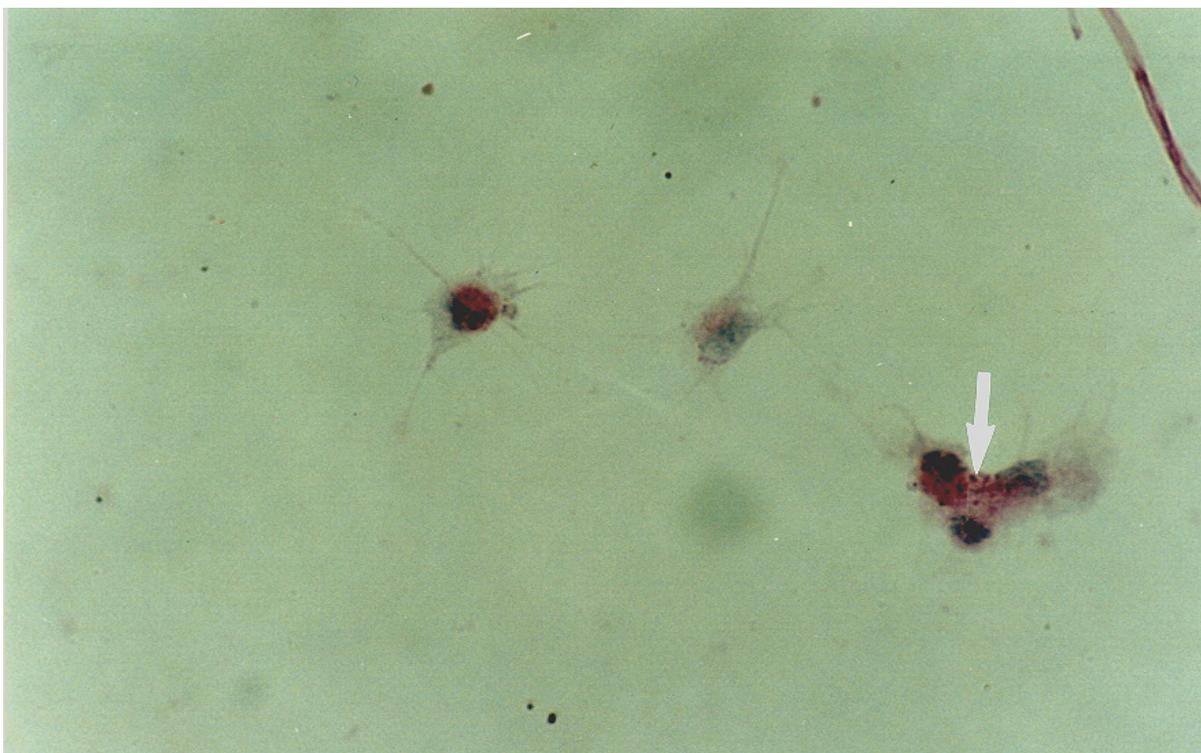
Quantitativamente, observou-se que nos granulócitos há um decréscimo de 50% entre moluscos normais e infectados. Este fenômeno foi observado na microscopia óptica e eletrônica de transmissão (Fig. 6, 7, 8 e 9).

Figura 6: Fotomicrografia de hialinócitos e granulócitos de *B. straminea*, normal corados com PAS. Observa-se grande quantidade de glicogênio (→) nos granulócitos e ausência nos hialinócitos.



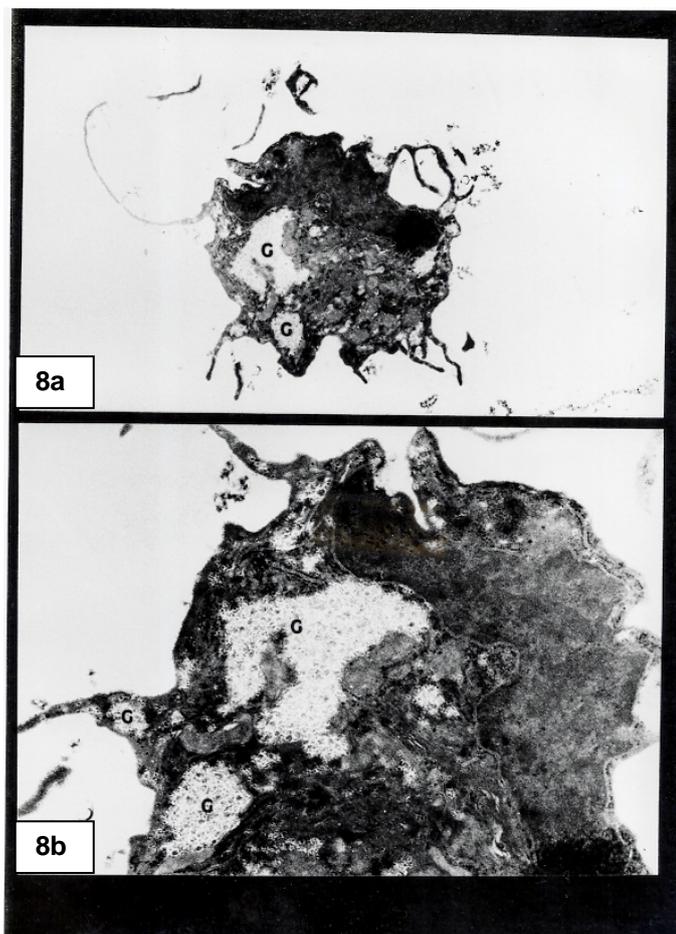
Fonte: O Autor (1995).

Figura 7: Fotomicrografia de granulócitos de *B. straminea*, infectados com *S. mansoni* corados com PAS. Observa-se nesta reação uma pequena quantidade de grânulos de glicogênio(→).



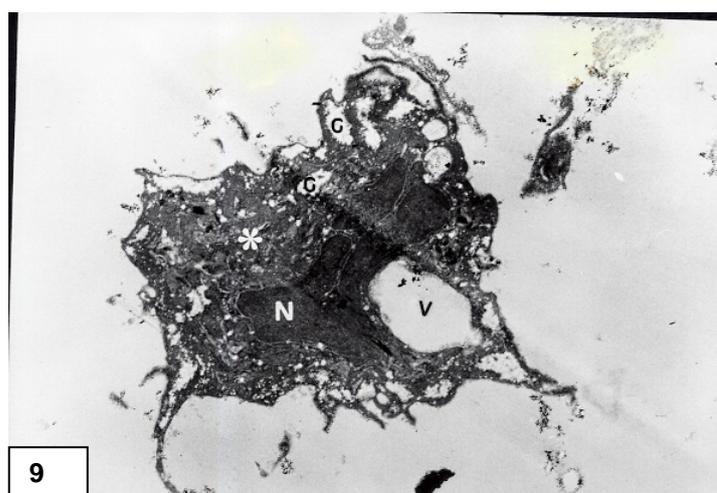
Fonte: O Autor (1995).

Figura 8 a e b: Eletromicrografia de granulócitos de *B. straminea* não infectado apresentando vários grânulos de glicogênio (G).



Fonte: O Autor (1995).

Figura 9: Eletromicrografia de granulócito de *B. straminea*, infectados pelo *S. mansoni* apresentando pequena quantidade dos grânulos de glicogênio (G).

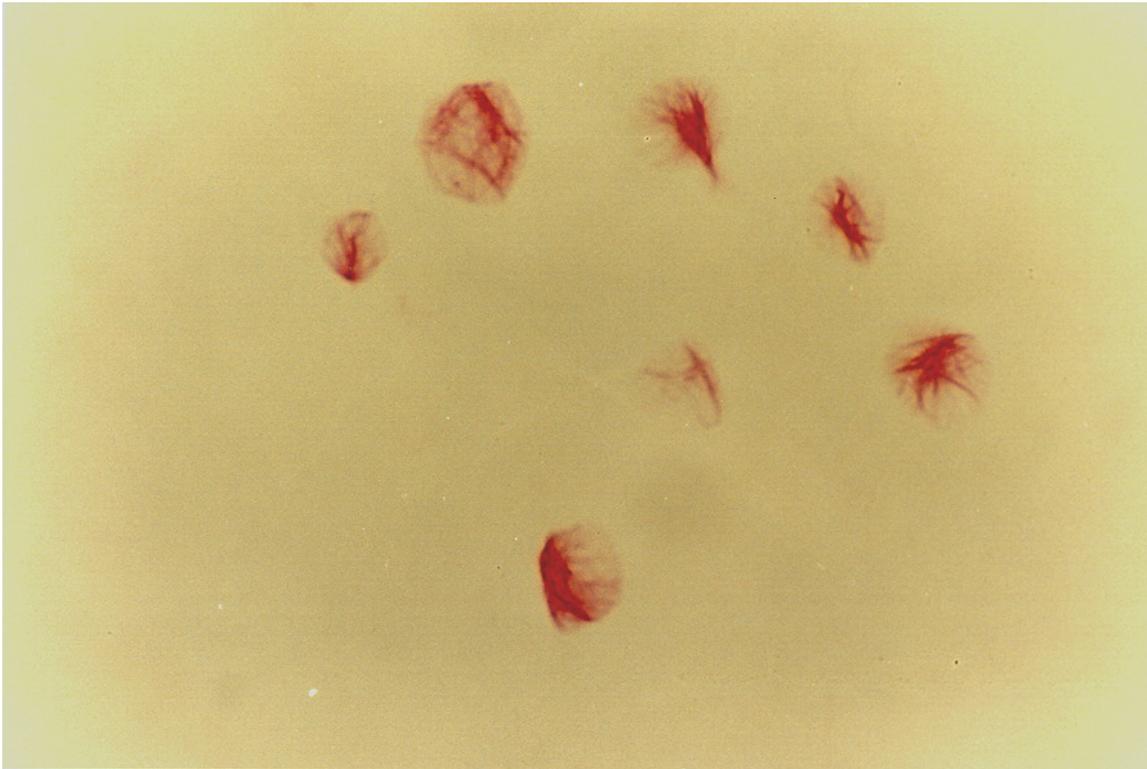


Fonte: O Autor (1995).

5.4.2 Detecção de substâncias secretadas

A detecção de substâncias secretadas (glicosaminoglicanas sulfatadas, sulfomucinas, resíduos de ácido siálico e glicosaminoglicanas ácidas) nas células circulantes da hemolinfa de *B.straminea* foi testada, pela técnica do Alcian Blue pH 1,0 e pH 2,5; tanto em caramujos não infectados quanto em infectados e mostraram-se não reativas frente a coloração (Fig. 10).

Figura 10: Fotomicrografia de granulócito de *B.straminea* corado pelo Alcian Blue pH 1,0. Observa-se a não reatividade dessas células à coloração.



Fonte: O Autor (1995).

6 DISCUSSÃO

O número limitado de publicações, que tentam explicar os mecanismos de defesa de moluscos da espécie *B. straminea*, bem como, sua importância na manutenção do ciclo do *S. mansoni*, na região Nordeste do Brasil, levaram à realização do presente estudo. Neste trabalho, procurou-se correlacionar aspectos morfológicos e citoquímicos das células circulantes da hemolinfa destes planorbídeos, com dados obtidos por outros pesquisadores que utilizaram moluscos das espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

Nos moluscos sem infecção, o número relativo de hialinócitos e granulócitos na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila* é aproximadamente 10% e 90% respectivamente (BARRACO, 1993; NODA e LOKER, 1989; SCHOENBERG e CHENG, 1980, 1981). Esta proporção para *B. straminea* é de 32% para hialinócitos, é de 68% nos granulócitos de caramujos normais.

Acompanhando a infecção a percentagem de granulócitos tende a cair por certo período, enquanto a de hialinócitos tende a crescer à nível de significância de 1%, segundo teste de TUKEY. Observa-se um aumento considerável após 2 horas de infecção de toda população celular, que após 24 horas decresce, principalmente nos granulócitos, para 24 adiante repetir este ciclo de aumento. Hipótese sobre tal comportamento, talvez possa ser explicada, comparando ao que ocorre em *B. tenagophila* e *B. glabrata* de linhagem resistente 10-R2, onde, o número de granulócitos diminui na circulação periférica, devido a migração dos mesmos, da hemolinfa para o local onde houve a penetração do miracídio, para então, exercer sua atividade fagocítica (MOUKASSA e JOURDANE, 1990; LOKER et al., 1982).

Outra hipótese que se pode levar em consideração, é a de que os hialinócitos de *B. straminea*, possuam um papel de apoio, auxiliar, na defesa do caramujo, frente a infecção pelo *S. mansoni* ou defendendo o molusco contra ataques estranhos, aumentando sua quantidade na hemolinfa, já que os granulócitos se deslocam da circulação periférica, para o tecido, na tentativa de controlar a infecção.

Características morfológicas através da microscopia ótica e eletrônica: As células da hemolinfa de *B. straminea* são morfológicamente idênticas às células encontradas por Cheng (1975), em *B. glabrata* e Barraco (1993), em *B. tenagophila*. Em seus trabalhos com *B. glabrata*, Cheng (1975), classificou as células da hemolinfa desse molusco em dois tipos: hialinócitos e granulócitos, classificação que continua sendo, ainda, a mais aceita. O presente estudo, também, identificou os mesmos tipos celulares na hemolinfa de *B. straminea*, ao nível de microscopia ótica e eletrônica de transmissão. Os hialinócitos possuem um contorno

esférico ou oval, uma alta relação núcleo-citoplasmática, citoplasma pouco granuloso e ribossomos livres. A presença de um retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido indica uma baixa atividade protéica. Sua quantidade na hemolinfa é baixa, em relação aos granulócitos, mas comparados com dados da literatura, observa-se que a concentração deste tipo, na hemolinfa de *B. straminea* é maior que na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, aumentando significativamente frente à infecção pelo *S. mansoni*.

Fazendo uma analogia com os vertebrados, observa-se que esta célula, possui grande semelhança, morfológica, com os linfócitos humanos. Embora seu papel de defesa ainda não tenha sido elucidado, a presença de raros filopódios parece indicar que este tipo, não apresenta grande atividade fagocítica, apesar de seu aumento na hemolinfa frente à infecção pelo *S. mansoni*. Estes estudos não foram suficientes para demonstrar uma atividade, funcional, desta célula, o que deverá ser mais investigado futuramente.

Os granulócitos de *B. straminea* possuem características de células com grande atividade fagocitária com um núcleo altamente polimórfico, facilitando a movimentação celular, seu citoplasma abundante produz movimentos amebóides, com emissão de longos e finos filopódios. No citoplasma, verificam-se numerosos ribossomos e retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, mostrando que esta célula possui uma grande atividade protéica. Numerosas mitocôndrias, grânulos de glicogênio, vacúolo fagocitário e corpos lisossomais e o aumento imediato, desta célula, logo após infecção pelo *S. mansoni*, aumentam a idéia de uma grande atividade fagocítica.

A atividade fagocítica dessa célula, já foi demonstrada na literatura. Tripp (1961), injetando leveduras e bactérias em *B. glabrata*, relatou que estas partículas eram fagocitadas e removidas do tecido do molusco por migração de células através do epitélio ou por digestão intracelular.

Com os dados obtidos, observa-se por analogia a semelhança existente entre os granulócitos de *B. straminea* e os macrófagos humanos, principalmente, no aspecto morfológico. Embora a atividade fagocítica desta célula, não foi realizada, neste trabalho, não significa que a idéia de “célula fagocitária”, seja rejeitada.

Aspectos citoquímicos: As reações citoquímicas empregadas nesse trabalho, foram realizadas devido a sua importância, na elucidação da atividade funcional das células da hemolinfa de *B. straminea*.

Glicogênio: Sabe-se que a célula, para exercer suas atividades, necessita de energia. As mitocôndrias são as organelas responsáveis por esta produção, que está na dependência de certas substâncias no interior celular para que possam ser metabolizadas pelas mitocôndrias,

na produção de energia. As substâncias utilizadas para tal finalidade são em primeiro lugar, os carboidratos, depois os lipídios e em último as proteínas. O glicogênio, é o carboidrato mais abundante no interior celular e a célula fagocíticas, são as que mais possuem grânulos de glicogênio, devido à necessidade energética para realizar suas funções (HOLTZMAN e NOVIKOFF, 1985).

Os granulócitos de *B. straminea*, parecem possuir uma grande atividade fagocítica, isto, talvez seja devido a presença de uma grande quantidade de grânulos de glicogênio no seu citoplasma, detectados através da reação do PAS e microscopia eletrônica de transmissão. Observa-se também que estes grânulos são mais abundantes em células de caramujos normais, que em caramujos infectados, isso pode ser explicado, devido ao esforço que as células imprimem na tentativa de defesa do organismo. Pesquisas realizadas por Cheng (1962), nas células do hepatopâncrea de *Helisoma trivolvis*, observou que havia um decréscimo de glicogênio no citoplasma celular, quando infectado com esporocistos de *Glythelmins pennsylvaniensis*, mostrando a utilização do glicogênio.

Em comparação com estudos realizados por Barraco (1993), em *B. tenagophila*, mostrou-se que *B. straminea* se comporta de maneira semelhante, isto é, reage fortemente ao PAS, embora o aspecto quantitativo não tenha sido verificado. Os hialinócitos de *B. straminea*, se comportaram de maneira semelhante aos de *B. tenagophila*, estudados por Barraco (1993), isto é, possuem pouca quantidade de grânulos de glicogênio, respondendo fracamente a reação de PAS, o que parece reforçar a sua pouca “atividade fagocítica”.

Produtos de secreção (glicosaminoglicanas sulfatadas, sulfomucinas, resíduos de ácido siálico e glicosaminoglicanas ácidas): A identificação de células produtoras de grânulos de secreção, são de interesse, devido a importância dessas substâncias no mecanismo de defesa dos animais de uma maneira geral. Em moluscos foi observado que, o muco produzido, também é responsável pela eficiência do sistema de defesa dos mesmos (RATCLIFFE, 1985; BAYNE, 1990).

A técnica do Alcian Blue (pH 1,0 e pH 2,5) empregada para detecção das substâncias secretadas (glicosaminoglicanas sulfatadas, sulfomucinas, resíduos de ácido siálico e glicosaminoglicanas ácidas), neste trabalho, nas células da hemolinfa de *B. straminea*, durante o curso da infecção pelo *S. mansoni*, foram negativas frente a reação, o que foi contrariamente o encontrado por Barraco (1993), utilizando a mesma técnica com *B. tenagophila*, onde identificou uma atividade moderada à pH 2,5 nos granulócitos dessa espécie. Os hialinócitos de *B. straminea*, mostraram o mesmo comportamento, quando comparados com hialinócitos de *B. tenagophila*, isto é, não apresentaram reatividade.

Outra técnica utilizada para detecção de substâncias secretadas, na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, foi realizada por Jeraldo (1993, dados não publicados), utilizando a coloração de Mann, não obtendo, também, sucesso, apesar desse mesmo teste ser válido para células do tecido do molusco.

Estudos mais profundos, com relação a estas substâncias, devem ser realizados, já que existe tantas controvérsias em relação às técnicas empregadas, para detecção das mesmas.

Lipídios: Devido a sua importância em diversos aspectos da fisiologia celular, formação das membranas, transporte de substâncias através das mesmas, atuando como receptores e também como reservatório energético; a detecção de lipídios se torna necessária para o entendimento do metabolismo celular (HOLTZMAN e NOVIKOFF, 1985; DE ROBERTIS et al., 1970).

Em células de *B. tenagophila*, Barraco (1993), demonstrou que elas apresentavam-se negativas para a reação citoquímica do Sudam Black B, usada na detecção de lipídios. Esta demonstração deixa uma dúvida quanto a especificidade da reação para células da hemolinfa, pois, células de *B. straminea*, também se mostraram negativas para esta técnica.

7 CONCLUSÕES:

Pelas observações realizadas no presente estudo, pode-se concluir que:

- Os moluscos não infectados apresentaram em média $141 \pm 56,19$ células/mm³ de hemolinfa.
- Os moluscos infectados apresentaram um número crescente de células que varia de $153 \pm 48,16 - 357 \pm 170,05$ células/mm³ de hemolinfa entre 2 horas até o 15º dia de infecção.
- Através da microscopia ótica e eletrônica de transmissão foram identificados dois tipos celulares de *B. straminea* idênticas àsquelas encontradas em *B. glabrata* e *B. tenagophila*: Hialinócitos e Granulócitos.
- O número de hialinócitos de *B. straminea* é maior aos encontrados na literatura em *B. glabrata* e *B. tenagophila*.
- Através de testes citoquímicos observou-se a presença de glicogênio, identificados pela técnica do PAS, em 90% dos granulócitos de moluscos não infectados, decaindo para 50% dos granulócitos em moluscos infectados e presença de glicogênio em apenas 1% dos hialinócitos de moluscos normais e infectados. Não foram detectadas substâncias secretadas (glicosaminoglicanas sulfatadas, sulfomucinas, resíduos de ácido siálico e glicosaminoglicanas ácidas) através da técnica do Alcian blue pH 1,0 e pH 2,5 empregada neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, J.E. A Schistosomose no Ceará. **Med.** 20: 12 - 20, 1940.
- AMÂNCIO, F. F; GONÇALVES, J. F; KOBAYASHI, S; BERRINO, E; SANTANA, J.V. Natural and experimental infection level in *Biomphalaria straminea* snail on São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Supl. I. 84: 253, 1989.
- BARBOSA, F.S.; FIGUEIREDO, T. Susceptibility of the snail host of Schistosomiasis from northeastern Brazil to the infection with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop.** 12: 198 - 206, 1970.
- BARBOSA, F.S. & BARRETO, A.C. Differences in susceptibility of *Biomphalaria* strains of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol** 9: 137-40, 1960
- BARBOSA, F.S.; BARRETO, A.C. Qualidade do vetor dos hospedeiros de *S. mansoni* no Nordeste do Brasil IV - Eliminação de cercárias de *S. mansoni* por *Australorbis glabratus* de diâmetros diversos. **An Soc Biol Pernambuco**. 16 (1): 13 - 18, 1959.
- BARRACO, M. A; STEIL, A. A.; GARGIONE, R. Morphological Characterization of the hemocytes of the Pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 88 (1): 73 - 83, 1993.
- BASCH, P.F. Parasitological review. Intermediate host specificity in *S. mansoni*. **Exp. Parasitol** 39: 150 - 60, 1976.
- BAYNE, C. J. Molluscan Immunobiology in "The Mollusca" (SALEUDDIN, A. S. M. & WILBUR, K. M. eds.). vol 5 pt.2: 407 - 486. **Academic Press**, New York, 1983.
- BAYNE, C. J. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. **Bion. Science**. 40 (10): 723 - 31, 1990.
- BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M.; DEWAN, P.C. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol** 50: 409 - 16, 1980 a,b.
- BOSWELL, E. A.; BAYNA, E. J. Lectin - dependent cell - mediated cytotoxicity in an invertebrate model: ConA does not act as a bridge. **J. Immunology**. 57 : 261 - 264, 1986.
- CARVALHO, O. S. Aspectos Malacológicos in: Simpósio Internacional de Esquistossomose. III- Reunião Nacional de Esquistossomose, Recife, 1991. Resumos 52.
- CHENG, T. C. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 266: 343 - 74, 1975.
- CHENG, T. C. Bivalves. In "Invertebrate blood cells" (RATCLIFF, N.A. & ROWLEY, EDS). **Acad. Press**, London, in press, 1980.
- CHENG, T. C. & AULD, K. R. Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. **J. Invertebr. Pathol** 30: 119 - 22, 1977
- CHENG, T. C.; CHORNEY, M. J.; YOSHINO, T. P. Lysozymelike activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challenged with bacteria **J. Invertebr. Pathol** 29: 170 - 174, 1977.

- CHENG, T. C.; GUIDA, V. G. & GERHART, P. L. Aminopeptidase and lysozyme activity levels and serum protein concentrations in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacteria. **J. Invertebr. Pathol.** 32: 297 - 302, 1978.
- CHENG, T. C. & GARRABRANT, T. A. Acid Phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasit.** 77: 467 -72, 1977
- CHENG, T. C.; LILLANG, J.W. ; KARADOĞAN, H.; RENWRANTZ, L.R.;
- YOSHINO, T.P. Separation of Oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. **J. Invertebr Pathol** 36: 35 - 40, 1980.
- CHENG, T. C.; JOURDANE, J. Transient cellular reactin in *Biomphalaria glabrata* (mollusca) to heterotropic isografts. **J. Invert. Pathol.** 49: 273-78, 1987.
- CHENG, T. C.; LIE, K. J.; HEYNEMAN, D.; RICHARDS, E. S. Elevation of aminopeptidase activity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) parasitized by *Echinostoma lindoense* (Trematoda) **J. Invertebr. Pathol** 31: 57 - 62, 1978.
- CHENG, T. C.; RANDALL, W. S. Jr. Studies on host-parasite relationships between larval trematodes and their hosts. I. A review. II. The utilization of the hosts glycogen by the intra-molluscan larvae of *Glyphelmis pennsylvaniensis* Cheng, and associated Phenomena. **American Microscopical Society**, 81 (3): 109 -128, 1962.
- CHENG, T. C.; RODRICK, G. E.; FOLEY, D. A.; KOEHLER, S. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. **J. Invertebr. Pathol** 25: p: 261 - 65, 1975.
- CHENG, T. C.; YOSHINO, T. P. Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacterial lipids **J. Invertebr. Pathol.** 28: 143 - 146, 1976.
- COSTA, D. P. P Estudo epidemiológico da esquistossomose em área de irrigação do sertão de Pernambuco. **Rev. Fund. SESP.** 1: 9 - 14, 1978.
- COUCH, L.; HERTEL, L.A. LOKER, E.S. Humoral responses of the snail *Biomphalaria glabrata* to trematode infection: Observation on a circulating hemagglutinin. **J. of Exp. Zoo.** 255: 340 - 49, 1990.
- CUNHA NETO, A. G. ; HONORATO, A. & LIMA, M. Primeiros focos de esquistossomose mansônica em Goiânia, Estado de Goiás, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo.** 9: 357 - 358, 1967.
- DIAS, L.C.; VETA, M.T. & GUARALDO, A. M. A. Susceptibilidade de *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* de diferentes câmpas de *S. mansoni*. **Rev. Inst. Med. S. Paulo.** 29 (4): 205 - 212, 1987.
- FRYER, S. E.; BAYNE, C.J. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. **J. of Parasitol** 76: 45 - 52, 1990.
- GONÇALVES, J. F; SANTANA, J. V; AMÂNCIO, F. F. Susceptibility of *Biomphalaria straminea* to São Lourenço da Mata and Belo Horizonte strains of *Schistosoma mansoni*. **Men. Inst Oswaldo Cruz.** 84 (1): 249, 1989.
- GUARALDO, A. M. A.; MAGALHÃES, L. A.; RANGEL, H. A. & PAREJA, G. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* (SMBON, 1907) em *B. glabrata* (SAY, 1818) e *B. tenagophila* (D'ORBIGNY, 1835). **Revta. Saúde Públ** 15: 436 - 48, 1981.

- HARRIS, K. R. The fine structure of encapsulation in *B. glabrata*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 266: 464-446.
- HOLTZMAN, E.; NOVIKOFF, B.A. Células e Estruturas Celular, 3ª ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara, 1985. p: 194-195.
- JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. Leukocytes of *B. glabrata*: Morphology and behavior of granulocytic cell in vitro. **J. Invertebr. Pathol** 28: 357 - 62, 1976.
- KNAAP, VAN DER W. P. W.; LOKER, E. S. Imune mechanisms in trematode snail interactions. **Parasitology today** 6 (6), 1990.
- KOCH, C.; NIELSEN, H. E. Activation of vertebrate complement by *Helix pomatia* hemolymph. **Dev Comp Immunol** 8: 15 - 22, 1984.
- LACKIB, A. M. Invertebrate immunity. **Parasitology**. 80: 393 - 412, 1980.
- LOKER, E.S.; BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P. M.; KRUSE, K. T. Ultrastructure of encapsulation of *S.mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *B. glabrata*. **J. of Parasitol** 68 (1): 84 - 94, 1982.
- MALTA, J. M Esquistossomose mansônica, Pernambuco. Ed. Universitária, 1994. p:37-35.
- MARQUES, J. R. Esquistossomose Mansônica urbana - alguns aspectos epidemiológicos e clínicos. Ed. Universitária (UFPE), 1990. 128 p.
- MCKAY, D.; JENKIM, C. R. Imunity in the invertebrates.II.Adaptative imunity in the cray fish (*Parachanna bicarinatus*). **J. immunology**. 17, 1969. 127p.
- MICHELSON, E.H. Miracidia - immobilizing substances in extracts prepared from snails infected with *S.mansoni*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 13: 36 - 42, 1964.
- MICHELSON, E. R Plistophora lussey sp, a microsporidian parasite of aquatic pulmonate snail. **J. Insect. Pathol** 5: 28 -38, 1963 b.
- NEWTON, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with *S.mansoni* in *Australorbis glabratus*. **Expl Parasit** 2: 242 - 57, 1953.
- NIEMANN, G.M.; LEWIS, F.A. *Schistosoma mansoni*: Influence of *Biomphalaria glabrata* size on susceptibility to infection and resultant cercarial production. **Exp. Parasitol** 70: 286 - 92, 1990.
- NODA, S.; LOKER, E.S. Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating hemocyte population of the host snail *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology**. 98, 1989.
- OTTAVIANI, E.; VERGINE, C. All-implant in the fresh-water snail *Planorbis comeus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). I. Histological and Histochemical study . **Zool. Jb. Physiol** 94. 261-67, 1990.
- PAN, C. T. Studies on the host – parasite relationship between *S.mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 14: 931 - 76, 1965.
- PAN, C. T. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. **Bull. Mus. Comp. Zool** 119: 237 -99, 1958.
- PARAENSE, W. L. The distribution of the molluscan vectors of Schistosomiasis in the Americas. **Brasil Med.** 11: 11- 14, 1975.
- PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Susceptibility of *Australorbis tenogophila* to infection with *S.mansoni*. **Revta. Inst. Med. Trop.** 5: 23 - 9, 1963.

- RATCLIFFE, M. A. Invertebrate immunity - A primer for the non-specialist (review). **Imunology letters**. 10, 1985.
- RATCLIFFE, M.A.; ROWLEY, A. F. "Invertebrate Blood Cells", Vol 1, Il: 641. **Acad. Press, New York**, 1981.
- RENWRANTZ, L.; STAHLER, A. Opsonizing properties of isolated hemolymph agglutinin and demonstration of hemocytes from *Mytilus edulis*. **J. Comp. Physiol** 149: 535-46, 1983.
- REY, L. **Parasitologia**, 2ª edição. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan: 389 - 409, 1991.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate as high phase an electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.** 17: 208 - 212, 1963.
- SANTANA, J. V.; MAGALHÃES, L. A.; RANGEL, H. A. Seleção de linhagens de *B. tenagophila* e *B. glabrata* visando maior susceptibilidade ao *S.mansoni*. **Revta. Saúde Púb.** 12: 67 -77, 1978.
- SANTANA, J. V. Seleção de população de *B.glabrata* (SAY, 1818) e *B.tenagophila* (D'ORBIGNY, 1835) suscetíveis a diferentes linhagens do *S.mansoni* (SAMBOM, 1907). Campinas, 1976. [Tese de Mestrado, Inst. de Biologia da UNICAMP].
- SANTANA, J.V. Mecanismo de defesa em molusco *B. tenagophila* e *B. glabrata* frente ao *S. mansoni*. Campinas, 1990. [Tese de Doutorado, Inst. de Biologia da UNICAMP].
- SETA, L. Comportamento dos amebócitos circundantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni*, a inoculação de tinta nanquim ou fratura de concha. Campinas, 1990. [Tese de Mestrado, Inst. de Biologia da UNICAMP].
- SMINEA, T. Structure and function of blood and connective tissue cells of the fresh-water pulmonate lymnaea stagnalis studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. **Z. Zellforsch.** 134: 497- 526, 1972.
- STEIN, P. C.; BASCH, P. F. Purification and binding properties of hemagglutinin from *B.glabrata*. **J. Invertebr. Pathol** 33: p:10- 18, 1979.
- TRIPP, M.R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. **J. Parasitol** v. XLV, 1961.
- TRIPP, M. R. Molluscan Immunity. Ann. New York. **Acad. of Sciences**. 234: 23 - 27, 1974.
- TRIPP, M.R. Defense mechanism of molluscs. **J. Ret. Soc.** (7) : 173-82, 1970. •
- TYLER, A. Natural heteroagglutinins in the body fluids and seminal fluids of various invertebrates. **Biol Bull.** 90: 213 - 219, 1946.
- VACCA, L. L. Laboratory Manual of Histochemistry, Raven Press - New York, 1985. 565p.
- YOSHINO, T. P.; GRANATH, Jr. W.O. Surface antigens of *B.glabrata* (Gastropoda) Hemocytes: Functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. **J. Invertebr. Pathol**, 45: 174-86, 1985
- YOSHINO, T. P. Concanavalina-A induced receptor redistribution on *B.glabrata* hemocytes: Characterization of capping and patching responses. **J. Invertebr. Pathol** 38: 102 - 112, 1981.
- YOSHINO, T. P.; CHENG, T. C.; RENWARANTZ, L. Lecitin and human blood group determinants of *S.mansoni* alteration following in vitro transformation of miracidium to mother sporocyst. **J. Parasitology**. 63: 818 - 24, 1977.

YOSHINO, T. P.; CHENG, T.C. Fine structural localization of acid phosphate in granuloma of the pelecypod *Mercenaria mercenaria*. *Tran.Amer. Micros. Soc.* 95: 215 - 220, 1976.

YOSHINO, T. P.; GRANATH, W. O. Jr. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulations in *B. glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. **Cell. Tissue. Res.** 232: 553 - 564, 1983.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **J. Btophys. Btochem. Cytol.** 4: 47 - 478.