



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**ALTERAÇÕES CELULARES E VARIAÇÕES COMPORTAMENTAIS**  
**DE CARAMUJOS DO GÊNERO *Biomphalaria* HOSPEDEIROS**  
**INTERMEDIÁRIOS DO *Schistosoma mansoni*.**

**JOÃO RODRIGUES COELHO**

**FORTALEZA**

**2004**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**ALTERAÇÕES CELULARES E VARIAÇÕES COMPORTAMENTAIS**  
**DE CARAMUJOS DO GÊNERO *Biomphalaria* HOSPEDEIROS**  
**INTERMEDIÁRIOS DO *Schistosoma mansoni*.**

**ORIENTADOR:**  
**PROF. DR. FERNANDO SCHEMELZER DE MORAES BEZERRA**

**MESTRANDO:**  
**JOÃO RODRIGUES COELHO**

**FORTALEZA**  
**2004**

617a

Coelho, João Rodrigues

Alterações celulares e variações comportamentais de caramujos do gênero *Biomphalaria* hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* / João Rodrigues Coelho. – Fortaleza , 2004.

65.:il.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Schemelzer de Moraes Bezerra

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina

1. Biomphalaria 2. Schistosoma mansoni 3. Hemócitos  
4. MTT I. Bezerra, Fernando Schemelzer de Moraes (Orient.)  
II. Título

CDD 616.963

**JOÃO RODRIGUES COELHO**

**ALTERAÇÕES CELULARES E VARIAÇÕES COMPORTAMENTAIS  
DE CARAMUJOS DO GÊNERO *Biomphalaria* HOSPEDEIROS  
INTERMEDIÁRIOS DO *Schistosoma mansoni*.**

Aprovada em 03 de Março de 2004

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Patologia

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Armando de Lemos Ribeiro  
Membro da banca examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Helena Mathews Cascon  
Membro da banca examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Yacy Mendonça de Almeida  
Membro da banca examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre  
Membro da banca examinadora (suplente)

**Dedico esta dissertação aos meus pais Jorge e Joana e ao meu filho Daniel Bruno.**



**AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter possibilitado a conclusão desta dissertação.

A meu filho Daniel Bruno, razão maior da minha vida.

A meus pais e irmãos por tudo que sou.

A FUNCAP pela bolsa a mim concedida, pelo financiamento deste projeto e pelo incentivo a pesquisa no Estado do Ceará.

Ao Prof. Dr. Fernando Schemelzer pela orientação desta dissertação e acima de tudo pela nossa amizade.

Aos professores Dr<sup>s</sup> Armando de Lemos Ribeiro, Helena Mathews Cascon, Yacy Mendonça de Almeida e Arlândia Cristina Lima Nobre por participarem da banca contribuindo assim para uma melhor discussão sobre o assunto em pauta.

À bibliotecária Norma de Carvalho Linhares pela imprescindível ajuda na revisão bibliográfica dessa dissertação.

Aos professores da disciplina de Bioquímica do DACT/UFC: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Goretti Queiroz, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alice Martins e em especial, ao colega Prof. René Duarte, pela valorosa colaboração na análise e elaboração dos gráficos e tabelas.

Ao Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes.

Ao amigo Danúbio Andrade.

Ao amigo Francisco Afrânio Cunha.

Aos farmacêuticos do LACT, em especial ao Manoel Roberto de Lacerda.

Aos colegas servidores do DACT, Lúcia Cutrin, Francisca Maria e Adalgisa Torquato, pela nossa amizade.

À Paula Palácio, secretária do mestrado em Patologia pela sua competência no cumprimento do dever.

A todos os Amigos com quais trabalhei no HUWC, em especial ao Peixoto e ao Jorge.

Um agradecimento final a estas e todas as pessoas por ventura aqui esquecidas, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
1.INTRODUÇÃO .....	02
1.1. Descrição .....	02
1.2. Ciclo evolutivo .....	04
1.3. O molusco .....	05
1.4. Variação na infectividade do molusco .....	08
1.5. Fatores que alteram a susceptibilidade de moluscos ao <i>S. mansoni</i> .....	10
1.5.1. Fatores celulares.....	10
1.5.2. Fatores plasmáticos .....	12
1.5.3. Fatores exógenos.....	13
2. OBJETIVOS .....	16
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivos específicos .....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Caramujos .....	18
3.2. Parasita .....	18
3.3. Camundongos .....	18
3.4. Obtenção dos hemócitos.....	19
3.5. Meio utilizado .....	19
3.6. Contagem das células.....	20
3.7. Avaliação da atividade fagocitária dos hemócitos.....	20

3.8. Transferência de soro .....	21
3.9. Avaliação da influência da temperatura na infectividade dos miracídios .....	22
3.10. Análise estatística .....	22
4. RESULTADOS .....	24
4.1. Atividade fagocitária dos hemócitos em função da temperatura .....	24
4.2. Atividade fagocitária dos hemócitos frente à infecção pelo <i>S. mansoni</i> .....	25
4.3. Transferência de soro .....	27
4.4. Influência da temperatura.....	29
5. DISCUSSÃO .....	32
6. CONCLUSÕES .....	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansoni no Brasil no ano de 1996. ....	04
<b>Figura 2:</b> Distribuição das espécies transmissoras do <i>Schistosoma mansoni</i> no Brasil no ano de 1998. ....	10
<b>Figura 3:</b> Atividade fagocitária de hemócitos de <i>B. glabrata</i> em temperatura ambiente e resfriado.....	30
<b>Figura 4:</b> Atividade fagocitária de hemócitos de <i>B. glabrata</i> infectado e não infectado.....	32
<b>Figura 5:</b> Percentual de infecção de caramujos <i>B. tenagophila</i> (CF) imunizado e não imunizado com 30 e 60 dias pós infecção .....	34
<b>Figura 6:</b> Percentual de infecção de <i>B. glabrata</i> pelo <i>S. mansoni</i> nas temperaturas de 15, 20 e 30 <sup>0</sup> C. ....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Atividade fagocitária de hemócitos de <i>B. glabrata</i> em seu estado basal e ativado pelo zymozan nas temperaturas ambiente e resfriada a 10 <sup>0</sup> C. ....	29
<b>Tabela 2:</b> Atividade fagocitária de hemócitos de <i>B. glabrata</i> infectados e não infectados pelo <i>S. mansoni</i> . ....	31
<b>Tabela 3:</b> Número de caramujos analisados e positivos para <i>S. mansoni</i> com 30 e 60 dias pós infecção, nos grupos imunizados, não imunizados e controle.....	33
<b>Tabela 4:</b> Número de caramujos analisados e positivos para <i>S. mansoni</i> nas temperaturas de 15, 20 e 30 <sup>0</sup> C.....	35

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença que no Brasil ainda é um sério problema de saúde pública. Alterações ambientais, comportamentais e imunológicas ocorridas nos seus hospedeiros intermediários podem predizer o sucesso ou não de uma infecção. As alterações ocorridas durante o desenvolvimento de uma infecção envolvem fatores internos e externos ao molusco. Dentre os internos as alterações celulares (hemócitos) e humorais (soro) têm sido bastante estudadas. Em relação aos externos a temperatura foi um dos fatores por nós escolhido para se avaliar a sua importância na relação molusco-parasito, principalmente porque a quase totalidade dos trabalhos abordando este assunto data da década de 50. Este trabalho teve como objetivo estudar a resistência ou susceptibilidade de moluscos do gênero *Biomphalaria* frente à infecção pelo *S. mansoni* diante de fatores endógenos e exógenos. Hemócitos de *B. glabrata* foram obtidos conforme técnica preconizada e avaliados quanto a sua capacidade fagocitária, utilizando a técnica de redução do MTT, um sal de formazan, sendo seus valores quantificados por absorvância a 570 nm. Caramujos *B. glabrata* foram também infectados nas temperaturas de 15°C, 20°C e 30°C e analisados quanto à eliminação de cercarias aos 30 e 60 dias pós-infecção (DPI). Em outro experimento, um grupo de *B. tenagophila* (CF)- susceptível, recebeu soro de *B. tenagophila* (Taim) - resistente, sendo posteriormente infectados pelo *S. mansoni* e observados quanto à alteração do nível de resistência. Nossos resultados mostram que o comportamento dos hemócitos quanto a sua atividade fagocitária apresentou diferença significativa entre os grupos *B. glabrata* não infectado no seu estado basal comparado com o grupo não infectado e resfriado, como também os mesmos grupos quando ativados pelo zymozan. Um outro dado obtido mostra que a diminuição da temperatura influencia no desenvolvimento da infecção com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre 15°C e 30°C. Observamos também que a transferência de soro conferiu um aumento no número de caramujos resistentes originalmente susceptíveis em torno de 50% em comparação ao grupo não imunizado ( $p < 0,05$ ). A extrapolação destes dados pode levar a um melhor entendimento da esquistossomose sobre o ponto de vista epidemiológico. Os resultados obtidos nos permitem concluir que a atividade fagocitária dos hemócitos de *B. glabrata* é influenciada pela temperatura, e que esta influi diretamente na capacidade de infecção de *B. glabrata* pelo *S. mansoni*. Observamos também que a transferência de soro de *B. tenagophila* resistente para *B. tenagophila* susceptível, aumentou a resistência desta última ao *Schistosoma mansoni*.

**Palavras-chave:** *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, hemócitos, temperatura, MTT.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is one of the illnesses that in Brazil still is a serious problem of public health. Ambient, mannerings and immunological alterations occurred in its intermediate hosts can predict the success or not of one infection. The alterations that occurred during the development of an infection involve internal and external factors on the mollusc. Among the internal factors the cellular alterations (hemocytes) and humoral (serum) have been sufficiently studied. In relation to external factors the temperature was one of the factors chosen for us to evaluate its importance in the relation snail-parasite, mainly because almost the totality of the works approaching this subject dates of the fifty decade. This work had as objective study the resistance and susceptibility of snails of the genus *Biomphalaria* ahead of the *S. Mansoni* infection in front of endogenous and exogenous factors. Hemocytes of *B. glabrata* had been gotten according to a praised technique and evaluated about its fagocitary capacity, using the technique of reduction of the MTT, being its values quantified for absorbance 570nm. *B. glabrata* snails were also infected in the temperatures of 15°C, 20°C and 30°C and analyzed about the elimination of cercariae to the 30 and 60 days after-infection (DAI). In another experiment, a group of *B. tenagophila* (CF) - susceptible, received serum from *B. tenagophila* (Taim) - resistant, being later infected by the *S. mansoni* and observed about the alteration of the resistance level. Our results show that the behavior of the hemocytes about its fagocitary activity presented significant values between *B. glabrata* groups not infected in its compared basal state with the not infected and cooled group, as also the same groups when activated by zymozan. Another gotten data shows that the reduction of the temperature influences in the infection development with significant differences ( $p < 0,05$ ) between 15°C and 30°C. We also observe that the serum transference conferred an increase in the number of resistant snails originally susceptible around 50% in comparison to the group not immunized ( $p < 0,05$ ). The extrapolation of these data can take to one better understanding of schistosomiasis on the epidemiologist point of view. The results gotten allow us to conclude that the fagocitary activity of the hemocytes of *B. glabrata* is influenced by the temperature, as also that the transference of serum of *B. tenagophila* resistant for *B. tenagophila* susceptible, increased the resistance of this last one. Finally, we can also affirm that the temperature influences directly in the capacity of infection of *B. glabrata* by the *S. mansoni*.

**Key-words:** *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni*, hemocytes, temperature, MTT.



## INTRODUÇÃO

# 1.INTRODUÇÃO

## 1.1. Descrição

Na classe Trematoda encontramos a família *Schistomatidae*, que apresenta sexos separados e são parasitas de vasos sangüíneos de aves e mamíferos. Esta família é dividida em duas subfamílias: Bilharzielinae e Schistosomatinae. Na primeira encontramos parasitos de aves e alguns mamíferos, com exceção do homem. A segunda apresenta dimorfismo sexual (subclasse Digenea) e contém espécies parasitas de aves e mamíferos. Podemos relacionar as seguintes espécies de trematodas que, freqüentemente, parasitam o homem em diversas regiões do mundo: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongy*, *Paragominus westermanni*, *Paragominus peruvianus*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciolopsis buski*, *Heterophyes heterophyes*, *Metagominus yokogawy*, *Gastrodiscoidis hominis* e *Fasciola hepática* (COELHO, 1995).

Das espécies citadas, as pertencente ao gênero *Schistosoma* apresentam maior importância, pelo seu inegável peso no contexto da saúde pública mundial. Neste gênero, destacam-se quatro espécies: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni*. Estima-se que existam trezentos milhões de pessoas em risco de infecção, e cerca de duzentos milhões de infectados por uma das formas de esquistossomose em todo o mundo (PUBLIC ..., 1993). Na América do Sul, o *S. mansoni* está distribuído pelo Brasil, Venezuela e Suriname (ROLLINSON; SOUTHGATE, 1987). No Brasil, de acordo com as estimativas oficiais, existem no mínimo 2,5 milhões de portadores de esquistossomose e cerca de 25 milhões de indivíduos expostos ao risco de contraí-la (PASSOS; AMARAL, 1998).

*Schistosoma haematobium* é o agente etiológico da esquistossomose vesical ou “hematúria do Egito” é encontrado no norte da África, especialmente no Delta do Nilo. Também ocorre no Iêmen, Arábia Saudita e no Oeste da Índia. Utiliza como hospedeiros intermediários moluscos do gênero *Bulinus*.

*Schistosoma japonicum*, causador da esquistossomose japônica ou moléstia de Katayama, uma forma de esquistossomose intestinal é encontrado na China, Japão, Filipinas e Sudeste Asiático e tem como hospedeiros intermediários moluscos do gênero *Oncomelania*.

*Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) causador da Xistose ou Doença de Manson e Pirajá da Silva é uma forma de esquistossomose intestinal. Esta espécie originária da África foi introduzida no Brasil na época colonial através do tráfico de escravos. Fatores como a presença de hospedeiros intermediários ideais para a sua adaptação, e migrações internas partindo da zona canavieira do Nordeste, para o interior e litoral fizeram com que a esquistossomose mansônica tivesse uma ampla dispersão por todo território brasileiro e daí se dispersado para América do Sul, Central e Caribe (FILES, 1951 e CAMARGO, 1979) . É um parasita heteroxênico, que requer como hospedeiro intermediário, caramujos do gênero *Biomphalaria*. O homem constitui, em condições naturais, o principal hospedeiro definitivo, onde ocorre o ciclo sexuado. O caramujo hospedeiro intermediário é um molusco aquático da família *Planorbidae*, incluído no gênero *Biomphalaria*, cujo "habitat" natural são cursos de água de pouca ou nenhuma correnteza, lagos de pequeno porte, brejos, valetas de irrigação, hortas e outros (PASSOS *et al.*, 1998).

Ocorre um fenômeno de adaptação dos trematodas da subclasse Digenea aos seus hospedeiros intermediários, onde muitas vezes este hospedeiro intermediário adequado acha-se restrito a uma única espécie ou mesmo a determinadas linhagens geográficas de gastropoda (ABDEL; MALEK, 1950). O estudo sobre a susceptibilidade de linhagens de caramujos frente a cepas geográficas do parasito é fundamental, pois, indica a probabilidade de uma determinada área vir a se tornar endêmica.(BEZERRA, 1998) (Figura 1).



Figura 1: Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansoni no Brasil no ano de 1986. Fonte: Paraense, 1986.

## 1.2 Ciclo evolutivo

O miracídio, que representa a forma infectante do *S. mansoni* para moluscos do gênero *Biomphalaria*, é um organismo muito móvel quando em meio aquático, graças aos numerosos cílios que lhe revestem a delgada cutícula e ao seu sistema muscular. Decorridas 48 horas após penetrar no interior do molusco hospedeiro intermediário, o miracídio perde a mobilidade e se transforma num esporocisto primário ou esporocisto I, contendo de 50 a 100 células germinativas. Cada uma destas células dará origem a quatro esporocistos secundários ou esporocisto II, e este, por um processo de reprodução assexuada, dará origem a milhares de cercárias. Finalmente, após quatro a sete semanas da infecção do molusco, este começa a liberar as cercárias. É sob a forma de cercárias que o *S. mansoni* infecta o hospedeiro definitivo, penetrando ativamente na pele do homem, por meio de ação combinada da secreção lítica das glândulas anteriores e dos

movimentos vibratórios intensos. Uma vez nos tecidos do hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos. Estes caem na circulação sanguínea e/ou linfática, atingem a circulação venosa, vão ao coração e aos pulmões, retornando posteriormente ao coração, de onde são lançados através das artérias aos pontos mais diversos do organismo. O fígado se constitui no órgão preferencial de localização do parasita, onde estas formas jovens se diferenciam sexualmente e crescem, alimentando-se de sangue. Ainda imaturos, os parasitas migram para a veia porta, passando daí às suas tributárias mesentéricas, onde completam a evolução. A partir da terceira semana da penetração das cercárias ocorre a migração dos vermes para as veias mesentéricas. Os vermes adultos se localizam no fígado e nos ramos terminal das veias mesentéricas onde se dará início as posturas. Ainda imaturos, os ovos migram da luz do vaso para a luz intestinal, provocando assim micro hemorragias e áreas de inflamação responsáveis pelo aparecimento da diarreia muco-sanguinolenta e outros distúrbios gastrointestinais. Uma fêmea de *S. mansoni* produz cerca de 300 ovos diários, dos quais apenas 25 a 35% são eliminados pelas fezes. Os ovos que não conseguem atingir a luz intestinal por ficarem retidos nos tecidos, ou porque foram depositados em vasos de outros órgãos, como o fígado, bem como aqueles que refluem passivamente para o parênquima hepático, são os responsáveis pela formação de microgranulomas que posteriormente poderão ocluir, total ou parcialmente, o fluxo sanguíneo, ocasionando toda a sintomatologia da doença em suas formas mais graves. Durante o processo de migração dos ovos (cerca de uma semana) a maturação é ultimada. Organiza-se então em seu interior, o embrião, que é denominado miracídio, iniciando então, novo ciclo (COELHO, 1970).

### **1.3 O molusco**

A classe Gastropoda apresenta interesse em termos de parasitologia humana e animal. Esta se divide em três subclasses, sendo que somente as subclasses Pulmonata e Prosobranchia, contêm espécies que podem infectar o homem. A subclasse Pulmonata difere das demais por apresentar um saco

pulmonar no lugar das brânquias, ausência de opérculo e coração com duas cavidades, uma aurícula e um ventrículo. Três ordens integram esta subclasse, sendo a Basommatophora a ordem que contém os moluscos transmissores da esquistossomose nas Américas. Esta ordem é formada por moluscos dulcícolas, com um único par de tentáculos móveis não retráteis, e com olhos sésseis situados junto à base dos tentáculos (Basom-base, Omathos-olhos). Das famílias que formam esta ordem, apresentam maior interesse à família Lymnaeidae, com o gênero *Lymnaea*, hospedeiro intermediário da *Fasciola hepática* e a família Planorbidae, onde é encontrado o gênero *Biomphalaria* (SOUZA; LIMA, 1990).

O gênero *Biomphalaria* apresenta concha do tipo discóide, com diâmetro variando de 7 a 40 mm, com uma zona central profunda, chamado umbigo, em ambos os lados da concha (*Bis-duplo*, *Omphalos-umbigo*). Apresentam a hemolinfa vermelha, devido a hemoglobina solúvel e tubo renal em J. São hermafroditas podendo autofecundar-se, mas preferencialmente realizam fecundação cruzada o que possibilita maior troca de material genético (VIANEY-LIAUD; DUSSART, 1994).

Dez espécies do gênero *Biomphalaria* já foram descritas no Brasil. São elas: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea*, *Biomphalaria amazônica*, *Biomphalaria peregrina*, *Biomphalaria occidentalis*, *Biomphalaria intermedia*, *Biomphalaria schrammi*, *Biomphalaria oligoza* e *Biomphalaria kuhniiana* (PARAENSE, 1972). Destas, apenas as espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* foram encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni* sendo, portanto, as transmissoras da esquistossomose mansoni nas Américas (SOUZA; LIMA, 1990).

A *Biomphalaria glabrata* apresenta concha de até 40 mm de diâmetro por 11 mm de largura, seis a sete giros arredondados; periferia arredondada, tendendo para direita, sendo considerado o maior molusco da família planorbidae. É encontrado numa faixa contínua em todos os Estados brasileiros situados entre o Rio Grande do Norte e o Paraná, tendo sido descrito focos no Pará, Maranhão e Piauí. Constitui-se no mais eficaz vetor da esquistossomose, com taxas de positividade de até 70% (PARAENSE, 1972).

Giovanelli *et al.* (2001) estudaram a densidade populacional de *Biomphalaria glabrata* no Estado do Rio de Janeiro, bem como a variação sazonal

na sua taxa de infecção pelo *S. mansoni*. Foi observado que o regime de chuvas influencia negativamente a população de moluscos, e que durante o período de estiagem, parece haver uma maior ocorrência da infecção dos mesmos.

A *Biomphalaria tenagophila* apresenta concha com até 35 mm de diâmetro e 11 de largura, sete a oito giros com carena em ambos os lados, porém mais acentuada à esquerda. Está mais restrita ao sul do país, mas também é encontrada no oeste do Mato Grosso do Sul, sul da Bahia e leste do Rio de Janeiro até Rio Grande do Sul (SOUSA; LIMA, 1990).

*Biomphalaria straminea* possui concha com até 16,5 mm de diâmetro e 6 mm de largura, cinco giros arredondados, crescendo mais rapidamente em diâmetro; lado direito tendendo a aplanar-se. É encontrado em quase todas as bacias hidrográficas do Brasil. É a espécie predominante no nordeste do Brasil, principalmente na região do semi-árido, sendo a única das espécies transmissoras da esquistossomose encontrada no Estado do Ceará. (PARAENSE, 1977).

Gazin *et al.* (2000) fizeram um registro sobre a ocorrência de vetores da esquistossomose em açudes do sertão Pernambucano, tendo sido registrada a ocorrência de *Biomphalaria straminea* em águas que possuem características físico-químicas favoráveis a proliferação de tal molusco, abrindo a possibilidade da introdução da esquistossomose naquela região.

Marchiori (1999) relatou a ocorrência de *Biomphalaria straminea* no sul do Estado de Goiás onde foram analisados 30 exemplares coletados em Cachoeira Dourada de Goiás, não tendo sido encontrado nenhum exemplar eliminando cercárias.

Barbosa *et al.* (2000) realizaram um estudo sobre a ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá- PE, sendo a *Biomphalaria straminea* a única espécie encontrada na região.

A distribuição destas espécies no Brasil, varia de acordo com a região, conforme mostra a figura 2.

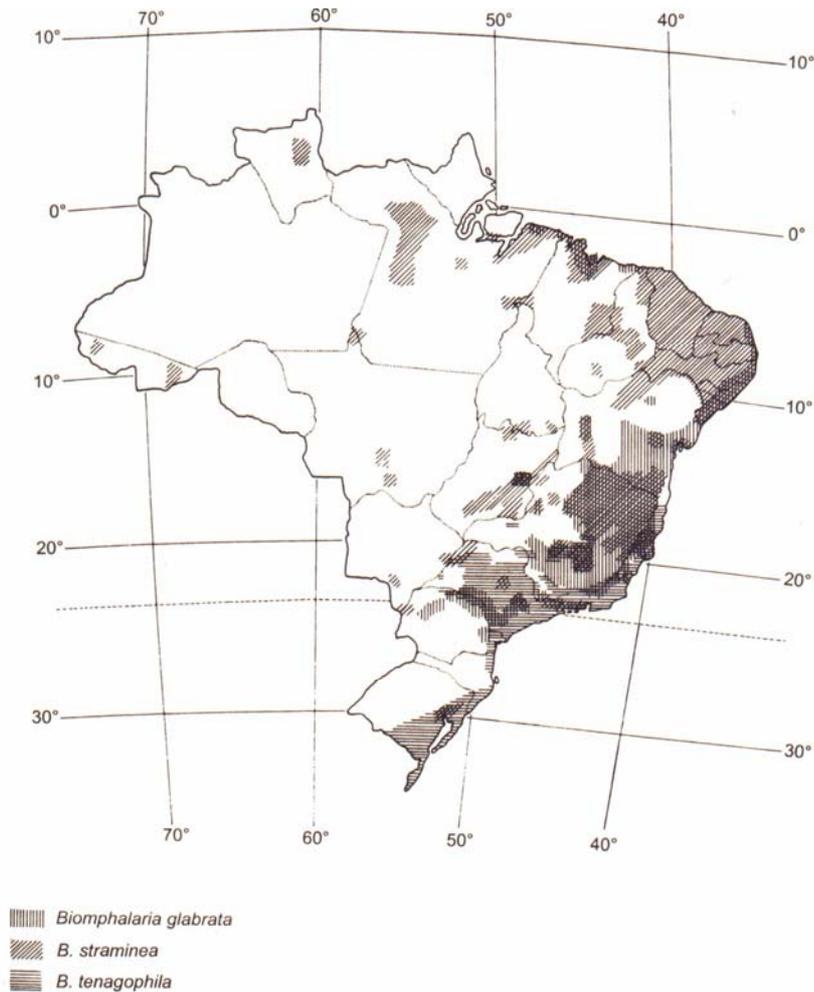


Figura 2: Distribuição das espécies transmissoras do *S. mansoni* no Brasil no ano de 1998. Fonte: NEVES, D.P, 2000.

#### 1.4 Variação na infectividade do molusco

A existência de uma imunidade natural à infecção por Trematoda foi observada por alguns autores (PORTER, 1938; COLBERTSON, 1941 e FILES, 1951) em diversas espécies de moluscos. Mesmo em espécies que comumente se infectam, observa-se grande variação na susceptibilidade, indicando ser este não apenas um caráter de espécie, mas também racial.

Paraense e Correa (1963) trabalhando com uma cepa de *S. mansoni* e utilizando a infecção individual, conseguiram elevados índices de infecção (66 a 100%) com *B. tenagophila* originários da mesma população onde Piza *et al.* (1959)

havia encontrado apenas 48% de infecção natural. Supõe-se que as diferenças observadas entre os índices de infecção experimental e natural, se devem ao fato de que na infecção natural ocorre um ajuste fisiológico prévio entre o molusco e a cepa local do parasito.

Borda e Pellegrino (1976) estudaram a susceptibilidade de *B. tenagophila* oriundas de distintas áreas geográficas, a duas cepas de *S. mansoni*, encontrando variações no número de caramujos susceptíveis de 0 a 93,3%.

Souza *et al.* (1995) estudaram o desenvolvimento do *S. mansoni* cepa AL em *B. tenagophila* (Belo Horizonte-MG) em *B. straminea* (Paracatu-MG) e *B. glabrata* (Belo Horizonte-MG) encontrando índices de infecção de 11,3% para *B. straminea*, 32,6% para *B. tenagophila* e 75,3% para *B. glabrata*.

Guimarães *et al.* (1997) estudaram a susceptibilidade de *B. glabrata* (BH) a infecção pelo *S. mansoni* cepa LE (Belo Horizonte-MG) avaliando as variações no período pré-patente e na compatibilidade. Foi observada, trinta dias após a infecção experimental, uma forte reação tecidual de encapsulamento de larvas nos moluscos que eliminavam menos de 10 cercárias diariamente. Nos exemplares eliminando mais de cem cercárias por dia, aparentemente não foram observadas reações teciduais. Esses estudos mostraram a possibilidade do molusco *B. glabrata*, parcialmente resistente, manter o parasita por vários meses sem eliminar cercárias e sem dano aparente para ambos, devido a reduzida emergência de cercárias no molusco parcialmente resistente, causando menor lesão tecidual. Este grupo apresentou maior sobrevivência que o grupo altamente susceptível.

Ocorre um interessante fenômeno de parada do desenvolvimento parasitário intramolusco quando o molusco, por desidratação entra em anidrobiose (estivação). Este estado de anidrobiose ocorre de forma lenta e progressiva na natureza, ocorrendo nos períodos de estiagem prolongada. O *S. mansoni*, na fase de esporocisto I nestes caramujos, acompanha o metabolismo do hospedeiro, gastando o mínimo de energia vital. Quando a infecção está mais adiantada na fase de esporocisto II (acima de 21 dias) ocorre cura parasitológica. Ao retornarem às condições ideais de sobrevivência dos moluscos, isto é, com a chegada de água nos criadouros no período das chuvas, os caramujos retornam rapidamente à sua condição biológica normal, sendo acompanhados pela retomada da evolução daqueles esporocistos na fase inicial da infecção (BARBOSA, 1962).

Souza *et al.* (1998) realizaram um estudo sobre moluscos límnicos da microrregião de Belo Horizonte MG, com ênfase em vetores de parasitoses. Do total de moluscos capturados 61,3 % pertenciam ao gênero *Biomphalaria* (*B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*) com taxa de infecção de 0.7%.

Pino *et al.* (1999) estudaram a compatibilidade entre nove cepas de *B. glabrata* de áreas endêmicas e não endêmicas na Venezuela a uma cepa local de *S. mansoni* tendo encontrado variações no período pré-patente intramolusco bem como na quantidade de cercárias eliminadas.

## **1.5 Fatores que alteram a susceptibilidade de moluscos ao *Schistosoma mansoni*.**

### **1.5.1 Fatores Celulares**

A manutenção do ciclo vital do *S. mansoni* em seus hospedeiros, comportamento biológico do miracídio e dos moluscos hospedeiros, dos intermediários sofre influências do ambiente natural onde ele ocorre, dos mecanismos de defesa dos caramujos potencialmente transmissores e, também, dos mecanismos de adaptação do parasito aos seus hospedeiros intermediários (COELHO, 1995).

Entre os fatores endógenos envolvidos na interação molusco-trematódio, o mais importante, está relacionado ao sistema de defesa dos gastrópodes. Este difere do sistema imune dos vertebrados, devido à ausência de linfócitos, imunoglobulinas e resposta a antígeno específico, porém, mantém a capacidade de discriminar entre o “próprio” e o “não próprio” (BAYNE, 1980). O sistema de defesa é formado por elementos celulares e humorais. O componente celular do sistema de defesa é formado por células móveis, com capacidade fagocitária, chamadas hemócitos. Alguns autores reconhecem a existência de diversas subpopulações de hemócitos, dependendo da sua idade (DIKKEBOOM *et al.*, 1984), do seu conteúdo enzimático (GRANATH; YOSHINO, 1983) ou dos seus determinantes de

superfícies (YOSHINO; GRANATH, 1985). Em um trabalho prévio (JOKY *et al.*, 1983) definiram quatro tipos de hemócitos caracterizados pela sua morfologia associada a sua capacidade de ligação a diferentes lectinas de superfície ou por anticorpos monoclonais.

Hemócitos de moluscos são altamente eficientes no reconhecimento e encapsulamento de partículas invasoras, tendo sido observado a formação de uma grande massa fagocítica, em resposta a injeção de partículas de material estranho. Quando o miracídio do *S. mansoni* penetra ativamente um caramujo resistente, o encapsulamento ocorre dentro de poucas horas após a invasão, em contraste com a muito débil ou indetectável resposta em indivíduos susceptíveis (FRYER; BAYNE, 1990).

Estas células fagocíticas representam a principal arma eferente da imunidade. Sua identificação e caracterização formam a base do entendimento do seu papel na sobrevivência e proteção de moluscos hospedeiros intermediários (LIE *et al.*, 1987).

A fagocitose por células circulantes é o mais comum mecanismo imune celular em invertebrados, já tendo sido realizados diversos estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” em uma variedade de microorganismos. Estudos de fagocitose realizados com hemócitos de moluscos indicam que os fatores plasmáticos são importantes no reconhecimento de partículas estranhas (FRYER; BAYNE, 1989).

Os hemócitos constituem um bom modelo para estudo “*in vitro*” da fagocitose, devido a capacidade destes de fagocitar e encapsular material estranho. (MATRICON-GONDRAM; LETOCARD, 1999).

A determinação da atividade fagocitária destas células frente a variados fatores é de grande importância sob o ponto de vista da relação Parasito-Hospedeiro. A quantificação dos hemócitos e a sua atividade fagocitária é feita utilizando-se respectivamente o vermelho neutro e a redução do MTT, um sal de tetrazole (Bezerra *et al.*, 1997). Esta é uma técnica alternativa, que não utiliza radioisótopos, já de uso consagrado para medir a mitogênese em linfócitos (DALY *et al.*; 1995) e a citotoxicidade em células de mamíferos. Trata-se de um método colorimétrico, inicialmente descrito por Mosmann, (1983) baseado na medida da redução do 3-[4-5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium brometo (MTT) por

células viáveis e a sua leitura é feita em espectrofotômetro. Este ensaio é versátil e quantitativo e representa um significativo avanço sobre técnicas comumente utilizadas de ensaios de proliferação e citotoxicidade.

### 1.5.2 Fatores Plasmáticos

A resposta humoral também ocorre nos moluscos. Geralmente, quando um Trematoda penetra no tegumento de um molusco, este entra em um ambiente hostil e a menos que o perfil genético do molusco e Trematoda sejam precisamente concordantes, o invasor será morto em minutos a poucas horas (SAPP; LOKER, 2000). Os vários fatores solúveis encontradas na hemolinfa de moluscos foram revisados em detalhe por Ey e Jenkins.(1982). Estes fatores incluem: Aglutininas e opsoninas, enzimas e inibidores enzimáticos, substâncias reativas de grupos sanguíneos e substâncias imobilizadoras de miracídios. Diferentemente dos vertebrados a imunidade humoral nos moluscos é mediada por lectinas, que são proteínas sintetizadas por hemócitos, com afinidade específica a carboidratos (ZELK *et al.*,1995).

Bayne *et al.* (1980) ao estudarem o efeito do soro de *B. glabrata* resistentes sobre a capacidade fagocitária de hemócitos de susceptíveis, observaram que existe uma interação entre fatores plasmáticos (aglutininas) e os hemócitos no processo de encapsulamento e fagocitose.

Loker *et al.* (1984) detectaram a presença de aglutininas na hemolinfa de duas linhagens de *B. glabrata* resistentes, entretanto, estas estavam ausentes em três linhagens de *B. glabrata* susceptíveis.

Loker *et al.*(1986) estudando a ação da inoculação da hemolinfa no mecanismo de defesa de *B. glabrata*, observaram que ocorria a destruição “in vitro” de esporocistos deste, quando colocado em contato com hemolinfa de *B. glabrata* previamente infectado com *Echinostoma paraensei*, devido a presença de fatores humorais na hemolinfa do caramujo previamente infectado. Observaram também a ocorrência de uma reação predominantemente celular, quando se inoculou

hemolinfa de moluscos previamente infectados com *S. mansoni* em *B. glabrata* não infectados, que posteriormente seriam infectados por este trematódeo.

Zelck *et al.*(1995) ao analisarem as macromoléculas da hemolinfa de gastrópodes por eletroforese e western blot, observaram a predominância do componente hemoglobina, constituindo 70% das proteínas plasmáticas. Esta hemoglobina plasmática de *B. glabrata* pode oxidar-se gerando peróxido de hidrogênio que age no esporocisto causando grandes lesões ou até a sua morte (BENDER *et al.*, 2001). Outras proteínas com peso molecular entre 10 a 450 KDa e pequenas frações de lectinas com peso molecular entre 40 e 300 kDa foram confirmadas. No plasma de *B. glabrata* susceptíveis e resistentes, ocorrem tanto aglutininas como opsoninas, no entanto, mudanças no título de hemaglutininas em caramujos susceptíveis foram observadas no oitavo dia após infecção pelo *S. mansoni*. Todos os caramujos foram investigados quanto a posse de glicoproteínas e lectinas em seu plasma. Nessas glicoproteínas, a parte glicídica é composta por carboidratos capazes de ligar-se a lectinas da superfície do *Schistosoma* (LOKER *et al*, 1984).

### 1.5.3 Fatores exógenos

Apesar da grande importância de fatores tanto celulares como humorais no desenvolvimento da infecção no molusco pelo *S. mansoni*, fatores exógenos também exercem uma enorme influência neste processo, sendo muitas das vezes responsáveis pelo sucesso ou não de uma infecção.

Entre os fatores exógenos, a temperatura e a luminosidade são certamente os que exercem uma maior influência na relação molusco-Trematoda. Lutz (1919) observou que a emergência cercariana pode ser nitidamente influenciada por estímulos externos como luminosidade e temperatura. Valle *et al.* (1971) observaram que a emergência segue um ritmo circadiano. Estes autores, variando e alternando as variáveis temperatura e luminosidade, verificaram que a emergência cercariana é regida por fatores exógenos, cujos elementos sincronizadores são a luz e a temperatura, bastando, porém, a ação isolada de um

destes fatores para a manutenção do ritmo circadiano. A luz parece exercer um papel mais marcante na manutenção do controle deste ritmo.

A eclosão do miracídio no meio aquático é fortemente influenciada pela luminosidade e temperatura e conforme observações feitas por Standem (1951), esta eclosão é quase inibida na obscuridade e só ocorre na faixa de temperatura entre 10<sup>o</sup>C a 37<sup>o</sup>C.

O miracídio assim como os planorbídeos apresentam fototaxia positiva o que favorece o encontro dos dois organismos no ambiente aquático (MALDONADO e ACOSTA-MATIENZO, 1947; WILLIANS e COELHO, 1975).

Maldonado e Acosta-Matienzo (1947).realizaram estudos sobre o efeito da temperatura na infecção de *B. glabrata* pelo *S. mansoni*. Estes autores observaram que a redução de 1<sup>o</sup>C na temperatura ambiente fez cair em 50% a taxa de infecção de *B. glabrata* pelo *S. mansoni*. Posteriormente, Standem (1949) observou que a redução da temperatura influi diretamente na eclosão dos miracídios e na capacidade destes em infectarem moluscos. Stirewallt (1954) estudando a influência da temperatura no desenvolvimento do *S. mansoni* intramolusco, observou que a redução da temperatura ambiente causa um retardo no desenvolvimento do esporocisto com conseqüente redução na quantidade de cercárias liberadas.



## OBJETIVOS

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar resistência e susceptibilidade de moluscos do gênero *Biomphalaria* frente a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, diante de fatores endógenos e exógenos.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Estudar a atividade fagocitária dos hemócitos de caramujos do gênero *Biomphalaria* infectados e não infectados, em função da temperatura.
2. Avaliar as alterações ocorridas em caramujos *B. tenagophila* susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni* após receberem soro de *B. tenagophila* resistente.
3. Avaliar a influência da temperatura na infecção de *Biomphalaria glabrata* pelo *Schistosoma mansoni*.



## MATERIAIS E MÉTODOS

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Caramujos**

Foram utilizadas duas espécies de caramujos, *Biomphalaria glabrata* de Belo Horizonte-MG e *Biomphalaria tenagophila*, sendo que, para a última espécie utilizou-se duas linhagens geográficas, uma da região do Taim - RS e outro da região de Cabo Frio- RJ.

#### **3.2 Parasito**

Utilizou-se a cepa LE de *S. mansoni* isolada de fezes de um paciente de Belo Horizonte e mantida no Laboratório de Parasitologia e Biologia de Moluscos/DACT/UFC, com passagens sucessivas em *B. glabrata* e camundongos por mais de 5 anos.

#### **3.3 Camundongos**

Foram utilizados camundongos da espécie swiss (*Mus musculus*). Estes animais são mantidos em nosso biotério para a manutenção do ciclo vital do *S. mansoni* e para a obtenção de miracídios.

### **3.4 Obtenção dos hemócitos**

A obtenção dos hemócitos seguiu a técnica descrita por Bezerra et al. (1997). Os caramujos foram colocados uma hora antes do início do experimento em becker com água filtrada. Antes de ser feita a retirada da hemolinfa, as conchas dos moluscos eram limpas com álcool à 70° GL, água destilada e seca em papel absorvente, onde também se retirava o excesso de água contida na abertura da mesma. A concha foi perfurada perto do hepatopâncreas e a hemolinfa que extravasava era imediatamente coletada. Foram feitos “pool” de cinco caramujos para cada espécie, de tamanho variando entre 12 a 15 mm para *B. tenagophila* e 15 a 20 mm para *B. glabrata*. A hemolinfa coletada era colocada em tubos de microcentrífuga por cinco minutos, para que houvesse a deposição de fragmentos de concha no fundo do tubo. Em seguida 500 µL desta hemolinfa eram transferidas para tubos de hemólise e centrifugada a 80xg por 10 minutos. O plasma (sobrenadante) era desprezado e as células re-suspensas em 1000 µL de meio de cultura.

Todo o material utilizado na estocagem e manuseio da hemolinfa era previamente siliconizado.

### **3.5 Meio utilizado**

O meio utilizado para a manutenção dos hemócitos foi o CBSS (Chernin Balanced Salt Solution), com pH entre 7,2 e 7,4. (CHERNIN, 1963).

### **3.6 Contagem das células**

Foi feita uma diluição de 1/10 utilizando uma alíquota das células que se encontravam no meio de cultura e acrescentado 10 µL de vermelho neutro a 0.1% (Catálogo Sigma N 4639). A contagem foi realizada em Câmara de Neubauer, diferenciando-se as células fagocitárias (coradas de vermelho) das não fagocitárias. A viabilidade das células foi determinada pela incorporação do azul de tripan à 0.1%.

### **3.7 Avaliação da atividade fagocitária dos hemócitos**

Em tubos de hemólise contendo as células foram adicionados 20 µL de Zymozan de uma suspensão a 13,5 mg/mL e o volume era completado com CBSS para um total de 600 µl. Em seguida os tubos foram incubados em banho-maria à 37°C por 30 min. Após esse período foram acrescentados 20 µL de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2.5-diphenyltetrazolium bromide, catálogo Sigma M-2128) na concentração de 5 mg/ml diluído em PBS pH 7,3 a 7,4. Os tubos permaneceram por de duas horas em banho Maria a 37°C. Quando o MTT, que é um sal de tetrazole é reduzido, produz cristais de formazan de cor púrpura, que podem ser solubilizados. Para que isso ocorra, acrescentamos 1 mL de Isopropanol-HCl 0,04M (PLUMB et al.;1989). A intensidade da coloração está diretamente relacionada com a atividade metabólica das células. A leitura é feita por espectrofotometria com comprimento de onda de 570 nm. Em todos os experimentos foi conduzido um grupo controle, com a

célula no seu estado basal (sem Zymozan). A concentração final dos hemócitos em todos os protocolos foi de  $10^5$  hemócitos/ 100  $\mu$ L.

### **3.8 Transferência de soro**

Para este experimento, utilizamos 80 caramujos *B. tenagophila* CF e 40 *B. tenagophila* TAIM de tamanho médio entre 15 a 18 mm. Os moluscos foram lavados com água destilada e colocados em uma solução de NEMBUTAL 0.4 mg/mL, por aproximadamente 6 horas para que houvesse o relaxamento da musculatura. (SOUSA et al., 2001)

Em um grupo de 10 caramujos *B. tenagophila* (TAIM) de diâmetro médio entre 15 a 18 mm foi feita a assepsia de maneira idêntica à descrita anteriormente e em seguida, utilizando-se uma seringa descartável de 1 mL com agulha 25x7, coletou-se a hemolinfa por punção pericárdica. Este material foi centrifugado a 80xg por 10 minutos e o sobrenadante (soro) foi diluído na proporção de 1  $\mu$ L para 4 $\mu$ L de PBS estéril.

Inoculou-se 5  $\mu$ l do soro diluído, individualmente, em 40 caramujos *B. tenagophila* CF (GI). Outro grupo de *B. tenagophila* CF (GII) e de *B. tenagophila* TAIM (GIII) receberam apenas PBS estéril em igual volume. As inoculações foram feitas utilizando-se seringa HAMILTON® de 25  $\mu$ L.

Os três grupos formados foram recolocados em aquários devidamente identificados, contendo água filtrada e declorada, alimentados com alface "ad libitum" deixados por 24 horas em repouso em local sombreado. Decorrido este período, os caramujos de cada um dos grupos foram colocados em contato com 10

miracídios de *S. mansoni*, individualmente, por aproximadamente 8 horas (overnight). Posteriormente os moluscos retornaram aos seus recipientes de origem, sendo alimentados e analisados periodicamente quanto a eliminação de cercárias a partir do 30<sup>o</sup> dia e mantidos por até 80 dias. Os grupos formados foram:

GI = *B. tenagophila* CF imunizado.

GII = *B. tenagophila* CF não imunizado.

GIII= *B. tenagophila* Taim não imunizado.

### **3.9 Avaliação da influência da temperatura na infectividade dos miracídios**

Caramujos *B. glabrata* (BH) foram submetidos à temperatura de 15°C, 20°C e 30°C por 12 horas em estufa BOD<sup>®</sup>. Em seguida foi feita uma infecção individual, nas condições de temperatura em que cada grupo se encontrava, com 10 miracídios de *S. mansoni*, obtidos conforme técnica descrita por Barbosa e Barreto, (1960). Os caramujos foram mantidos por mais 12 horas nas mesmas condições do experimento. Cada grupo tinha em média 30 caramujos e o procedimento foi feito em triplicata. Decorrido este tempo, os grupos foram recolocados individualmente em aquários à temperatura ambiente, alimentados com alface “ad libitum” e analisados periodicamente quanto à eliminação de cercárias. Os caramujos sobreviventes foram acompanhados até o 80<sup>o</sup> dia pós-infecção (DPI).

### **3.10 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa EPIINFO 6.0 e utilizando os seguintes testes estatísticos: T de student, Kruskal-Wallis e Teste exato de Fischer.



## RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

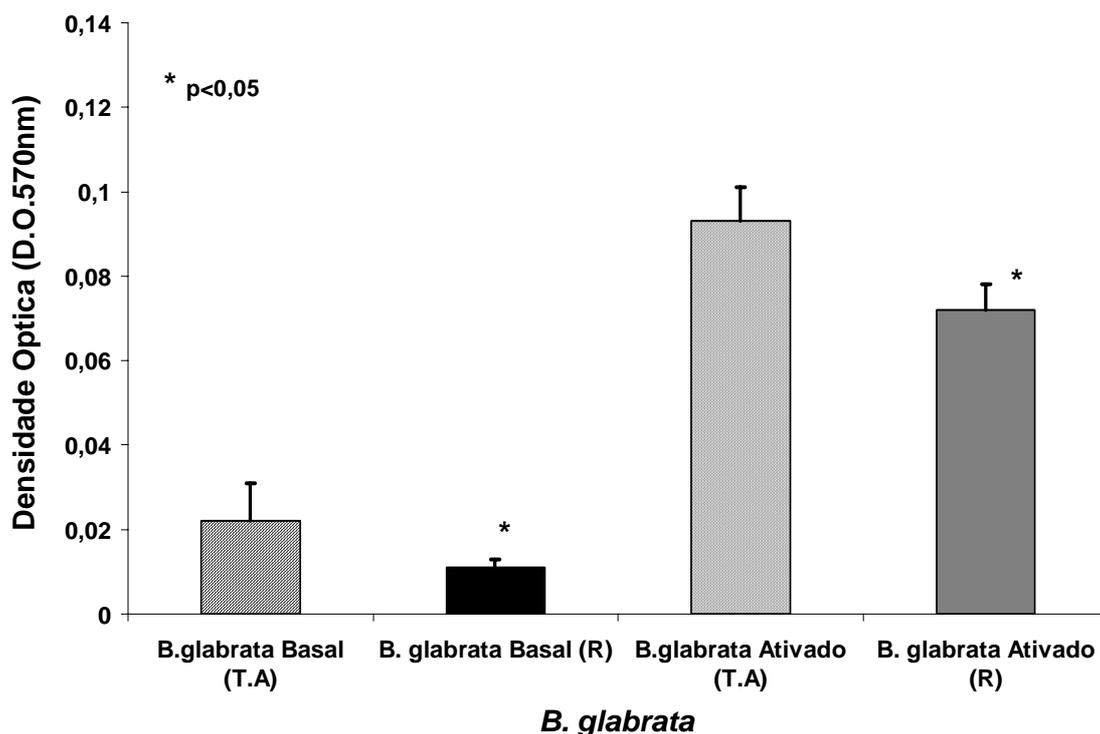
### 4.1 Atividade fagocitária dos hemócitos em função da temperatura

Na análise comparativa do comportamento dos hemócitos quando medida a sua atividade fagocitária, obtivemos valores significativos, tanto entre os grupos *B. glabrata* não infectado no seu estado basal, comparado com o grupo não infectado e resfriado; como também os mesmos grupos quando ativados pelo zymozan, como mostra a tabela 1 e figura 3.

**Tabela 1:** Valores de Média, Desvio Padrão e nível de significância estatística da atividade fagocitária de hemócitos de *B. glabrata* em seu estado basal e ativado pelo zymozan, nas temperaturas ambiente (30<sup>0</sup>C) e resfriado a 10<sup>0</sup>C.

	MÉDIA (X)	D.O	DESVIO PADRÃO(DP)	VALOR DE p
<i>B. glabrata</i> basal (T.A)	0.022		0.009	0.014
<i>B. glabrata</i> basal (R)	0.011		0.002	
<i>B. glabrata</i> ativado (T.A)	0.093		0.008	0.003
<i>B. glabrata</i> ativado (R)	0.072		0.006	

T.A = temperatura ambiente; R = resfriado



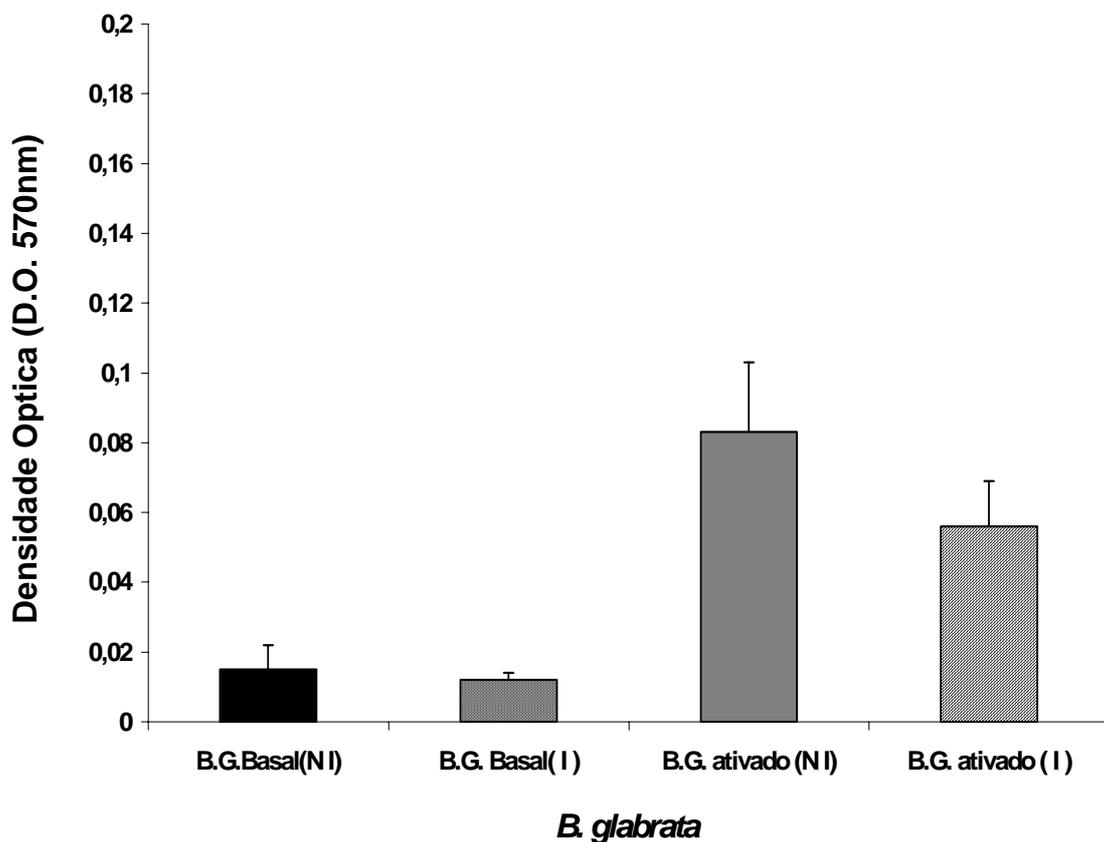
**Figura 3:** Média das leituras obtidas (D.O) nas análises da atividade fagocitária dos hemócitos de *B. glabrata* no estado basal e ativado nas temperaturas ambiente (30°C) e resfriado (10°C).

#### 4.2 Atividade fagocitária dos hemócitos frente à infecção pelo *S. mansoni*

A atividade fagocitária de hemócitos de moluscos *B. glabrata* ativados e não ativados pelo zymozan, quando comparados com os grupos infectados e não infectados pelo *S. mansoni* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, demonstrando que nesta espécie, o desenvolvimento da infecção no molusco não foi um fator de interferência da atividade fagocitária dos hemócitos, como mostra a tabela 2 e figura 4.

**Tabela 2:** Valores de média (X), Desvio Padrão e nível de significância de caramujos *B. glabrata* (BH), em seu estado basal e ativado, não infectados e infectados pelo *S. mansoni*.

	MÉDIA / DO	DESVIO PADRÃO	VALOR DE p
<i>B.glabrata</i> Basal (N.I.)	0.015	0.007	0.54
<i>B.glabrata</i> basal ( I )	0.012	0.002	
<i>B.glabrata</i> Ativado (N.I.)	0.083	0.020	0.11
<i>B.glabrata</i> ativado ( I )	0.056	0.013	



.I = Não infectado

I = Infectado

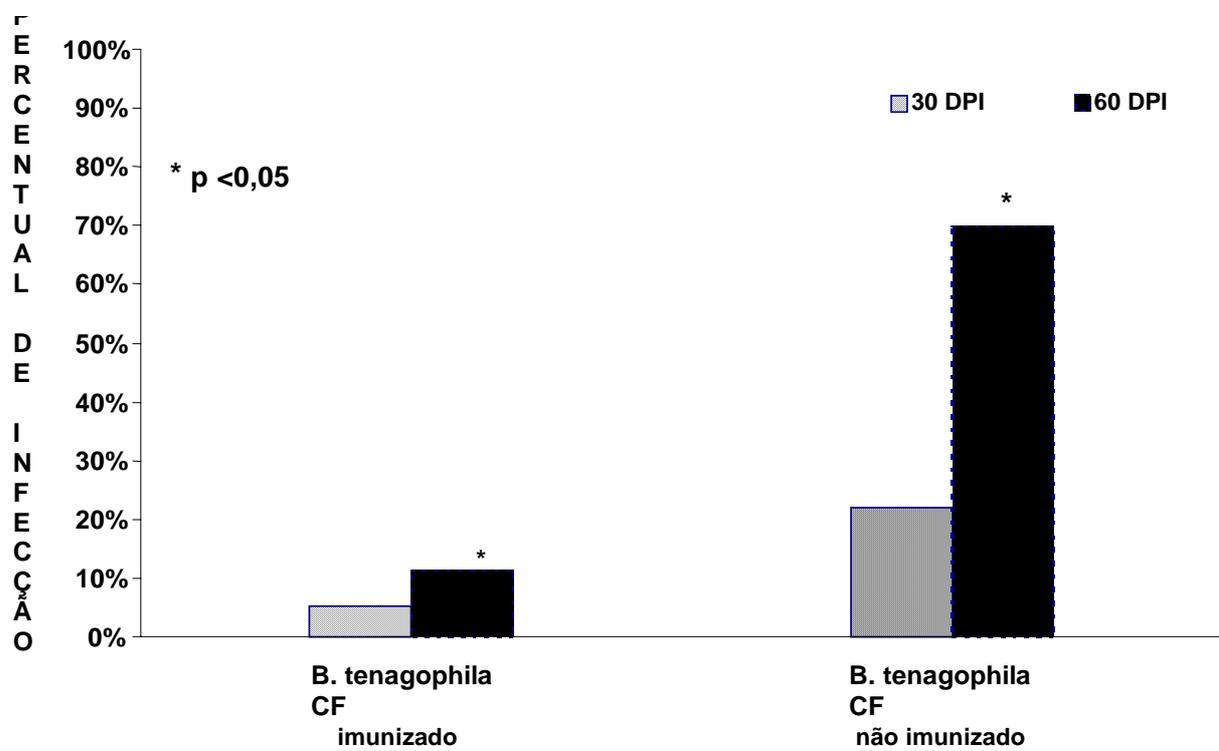
**Figura 4:** Média das leituras obtidas (D.O) nas análises da atividade fagocitária dos hemócitos de *B. glabrata* no estado basal e ativado, não infectados (N.I.) e infectados ( I ) pelo *S. mansoni*.

### 4.3 Transferência de soro

A transferência de soro de espécies resistentes para susceptíveis aumentou a resistência desta última (GI) quando analisados com 30 e 60 dias pós-infecção (DPI). Este aumento foi significativo com 60 DPI. Neste grupo 88% dos caramujos não se infectaram, o que representa um aumento no número de caramujos resistentes ao *S. mansoni* de mais de 50%, quando comparado ao grupo não imunizado ( $p < 0.05$ , Fisher). O grupo GIII - *B. tenagophila* TAIM não apresentou nenhum caramujo positivo (Tabela 3, Figura 5).

**Tabela 3:** Número de caramujos analisados e positivos quanto a eliminação de cercarias, com 30 e 60 DPI (dias pós-infecção) para os grupos imunizado, não imunizado e controle.

		<i>B. tenagophila</i> CF Imunizado (GI)	<i>B. tenagophila</i> CF Não imunizado (GII)	<i>B. tenagophila</i> TAIM (GIII)
30 DPI	ANALISADOS	57	49	51
	POSITIVOS	03	09	00
60 DPI	ANALISADOS	54	42	44
	POSITIVOS	07	31	00



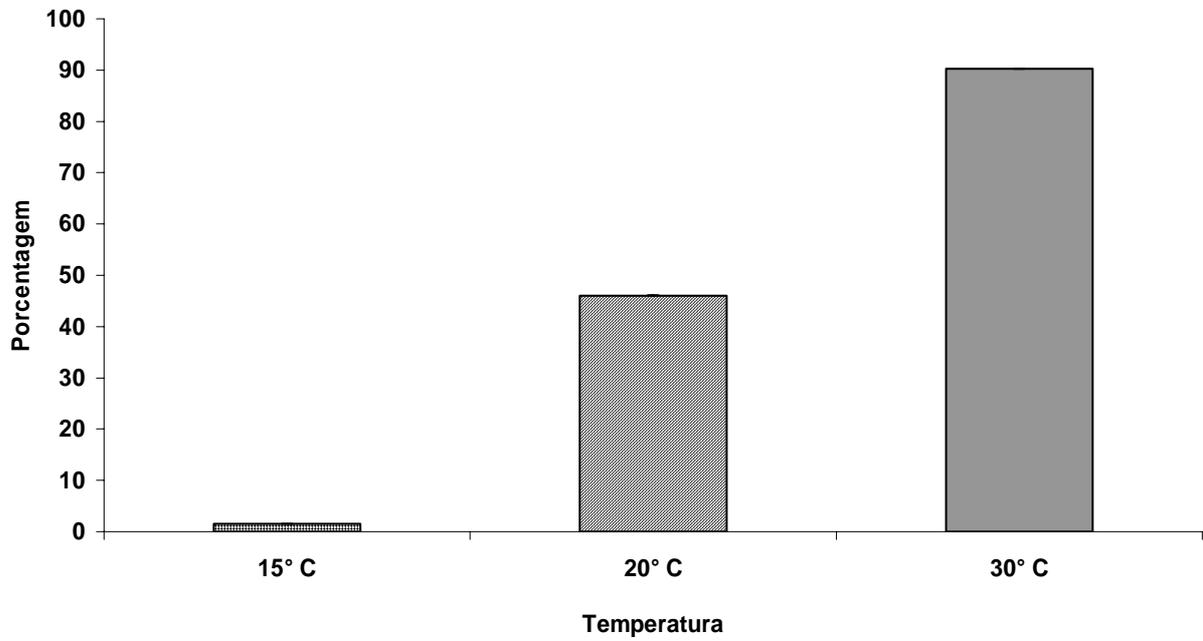
**Figura 5:** Percentual de infecção de caramujos *B. tenagophila* (CF) imunizado (GI) e não imunizado (GII) com 30 e 60 dias pós-infecção.

#### 4.4 Influência da Temperatura

Nossos resultados mostram existir uma relação direta entre temperatura e infectividade. As diferenças entre as temperaturas de 15°C e 20°C e 15°C e 30°C foram significativas ( $p < 0.05$ ). Usando um intervalo de confiança de 95%, obtemos a 15°C,  $0 < \Pi_1 < 0.03$ , a 20°C,  $0.35 < \Pi_2 < 0.57$  e a 30°C,  $0.81 < \Pi_3 < 0.97$ . Nossos dados mostram claramente que quanto mais baixa a temperatura menor é o índice de infecção. A 15°C somente 1,3% dos *B. glabrata* submetidos à infecção pelo *S. mansoni* positivaram, enquanto que a 20°C este índice foi de 46% e de 89% a 30°C. Tabela 4 e Figura 6.

**Tabela 4:** Número de Caramujos ( $X \pm DP$ ) analisados e positivos para o *S. mansoni*, nas temperaturas de 15, 20 e 30°C.

TEMPERATURA	CARAMUJOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
15°C	Analisados	26	4
	Positivos	0.33	0.57
20°C	Analisados	26.6	5.77
	Positivos	12.3	5.77
30°C	Analisados	19.6	5.03
	Positivos	17.6	4.04



**Figura 6:** Percentual de infecção de caramujos *B. glabrata* (BH) pelo *S. mansoni* nas temperaturas de 15, 20 e 30°C.



**DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

O sucesso do estabelecimento da infecção por larva de trematoda é dependente da susceptibilidade do hospedeiro e da infectividade do parasita. Alguns dos fenômenos observados quando trematoda (miracídio) penetra o tegumento do caramujo são: Inadequação, susceptibilidade, resistência, interferência, aumento da resistência e autocura. (LOKER & BAYNE, 1986).

Cram & Files (1946) e Files (1951) observaram que *Australorbis glabratus* pode mostrar grande diferença na susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, quando são colocados caramujos de áreas endêmicas diferentes em presença de determinada cepa de trematoda.

Porter (1938), Cram & Files (1946) e Colbertson (1941) observaram que a infecção por uma espécie de trematoda parece conferir certa resistência contra as futuras infecções por outras espécies. Desta forma se explicaria a extrema raridade com que são observadas infecções múltiplas, em espécies de moluscos susceptíveis a várias espécies de trematodas, existentes em uma mesma região. No entanto, o mesmo não se observa quando infecção primária e reinfecção ocorrem pela mesma espécie. Barbosa e Coelho (1955) ao infectarem previamente *Australorbis glabratus* com *S. mansoni*, verificaram que era possível reinfecá-los não só quando a primeira infecção estava extinta, como também quando ela ainda estava ativa, na fase de eliminação de cercárias.

Reis et al. (1995) realizaram estudos de infecções concomitantes de diferentes espécies de trematoda em *B. tenagophila*, observando que a infecção natural é freqüentemente mono-específico. Entretanto, houve eventual concomitância de equinostomocercárias com furcocercárias dotadas de ocelos. Observaram também no mesmo experimento que moluscos naturalmente infectados com estes parasitos apresentaram elevados índices de resistência ao *S. mansoni* nas tentativas de infecção experimental.

Chernin & Antolics (1975) estudando a capacidade penetrativa do *S. mansoni*, observaram que apenas 50% dos miracídios que penetram o molusco hospedeiro intermediário susceptível, evoluem. Uma vez que o miracídio penetra a barreira protetora do epitélio do molusco, mecanismos de defesa interna são

ativados para destruir o parasito. A despeito da aparente simplicidade do sistema de defesa interna dos moluscos, este é capaz de encapsular e destruir os miracídios logo após estes terem penetrado. A diferença primária entre cepas de *Biomphalaria* susceptíveis e resistentes está na habilidade destas em destruir esporocistos de *S. mansoni* "in vitro". Esta capacidade pode ser atribuída mais aos hemócitos do que aos fatores plasmáticos. Isto se torna evidente porque hemócitos de caramujos resistentes ainda destroem esporocistos de *S. mansoni* em total ausência de plasma (LOKER & BAYNE, 1982). Os hemócitos são encontrados circulando na hemolinfa e devido ao sistema vascular do tipo aberto dos moluscos, estes se movem livremente para dentro e fora dos tecidos. Apresentam heterogeneidade morfológica e bioquímica. Alguns são denominados de "round cells" ou "hialinócitos" e tem um núcleo proporcionalmente grande para o tamanho do citoplasma, possuem poucas estruturas lisossomais e mostram baixa tendência a escandirem-se no vidro, formar pseudópodes ou fagocitar partículas. Outros hemócitos chamados de "granulócitos" têm relativamente mais citoplasma e lisossomo, formam pseudópodes e são ativos em fagocitose (KNAAP & LOKER, 1990).

A iniciação e subsequente estabelecimento da infecção de moluscos hospedeiros intermediários por trematoda é um processo complexo que envolve um grande número de interações moleculares, iniciada quando o miracídio entra em contato com o hospedeiro. Transcorre desde sua transformação em esporocisto primário, o desenvolvimento dos esporocistos secundários e prossegue até durante a produção de cercarias.

O relacionamento entre o parasita e seu hospedeiro intermediário envolve uma interação dinâmica entre a superfície do tegumento do parasita e o sistema de defesa celular e humoral do hospedeiro (SPRAY & GRANATH Jr., 1989).

A composição dos carboidratos na superfície dos parasitas é consideravelmente interessante, pois esta representa um papel potencial como receptores lectina-like nos hemócitos do hospedeiro e mediam o reconhecimento imune e a encapsulação (FRYER et al., 1989). Utilizando-se da técnica lectina-biotina/avidina-peroxidase, Zelck e Becker (1992) mapearam os ligantes das lectinas na superfície do esporocisto mãe e filho de *S. mansoni* e nas células do seu hospedeiro intermediário *B. glabrata*. Observaram também que a lectina *Ulex*

*europaeus* (fucose) liga-se especificamente a receptores no esporocisto filho, porém não se liga às células da glândula digestiva do molusco. Alguns autores têm mostrado que galactose, glucose, manose, N-acetilgalactosamina e N-acetilglucosamina são encontrados no tegumento de várias formas evolutivas do parasito. No miracídio (YOSHINO et al., 1977), na cercária (LINDER, 1985) e na superfície dos vermes adultos (SIMPSON & SMITHERS, 1980). Esses açúcares foram encontrados em esporocistos mãe, oriundos de culturas, estando presentes também no esporocisto secundário. Estes autores, não obtiveram diferenças nas ligações das lectinas testadas às células dos tecidos de *B. glabrata* susceptível e resistente ao esporocisto de *S. mansoni*, sugerindo então que estas diferenças devam ocorrer ou na superfície dos hemócitos de ambas as cepas, ou em componentes solúveis da hemolinfa.

Schoemberg e Cheng (1980) e Yoshino (1981), mostraram a ocorrência de açúcares idênticos nos hemócitos de ambas às cepas susceptíveis e resistentes, levantando a hipótese de que a presença ou ausência de opsoninas solúveis na hemolinfa media a interação hemócito-parasita e determina se uma cepa de *B. glabrata* é resistente a uma determinada cepa de *S. mansoni*.

O sítio onde os sinais moleculares são trocados durante o desenvolvimento intramolusco está localizado na interface parasita-hospedeiro (READ et al., 1963). Este apresenta uma complexidade química, pois neste local são encontrados nutrientes e outros fatores requeridos para o desenvolvimento do parasita e onde os produtos excretórios-secretórios são lançados. Esta interação das células e plasma do hospedeiro com moléculas oriundas do parasita iniciam a resposta imunológica ou patológica no hospedeiro. Diversas etapas distintas estão envolvidas na destruição dos esporocistos pelos hemócitos. A resposta inicial destes logo após a infecção, provavelmente envolve a migração de células em direção ao esporocisto, tendo sido observado um acúmulo de hemócitos ao redor de esporocistos em cortes histológicos, sugerindo quimiotaxia. Lodes e Yoshino (1990) observaram que uma fração isolada de produtos secretórios/excretórios do esporocisto mãe de *S. mansoni* estimulava a motilidade de hemócitos de caramujos resistentes de *B. glabrata*, porém inibiam a motilidade dos hemócitos de *B. glabrata* susceptíveis. A formação desta cápsula não resulta inevitavelmente na morte do parasito. Em caramujos

fisiologicamente adequados, a sorte do miracídio após a penetração é determinada nas primeiras horas (FRYER & BAYNE, 1990).

Bezerra et al. (1997) observaram a ocorrência de uma diminuição dos hemócitos circulantes em *B. glabrata* e *B. tenagophila* 5 horas após a infecção pelo *S. mansoni* e que estes valores retornaram ao normal 24 horas após a infecção e assim permaneceram.

Em nosso experimento, observamos que caramujos infectados na fase de eliminação de cercárias, não apresentaram redução da atividade fagocitária (Tabela 2).

Trabalhando com cepas susceptíveis de *B. glabrata*, comparamos a atividade fagocitária dos hemócitos, pela medida da redução do MTT, em caramujos infectados e não infectados. O valor da densidade ótica referente a essa atividade, tanto em condições basais como ativadas pelo zymozan, não mostrou diferenças estatisticamente significativas quando comparada com os moluscos infectados (Tabela 2).

Bezerra et al. (1998), utilizando cepas de *B. glabrata*, observaram um aumento na atividade celular dos hemócitos, quando estimulados pelo zymozan, sendo mantida esta elevação por até 24 horas e não mais detectada 48 horas após o contato.

O comportamento dos hemócitos também sofre influência da temperatura.

Ao analisarmos a atividade celular em função da temperatura, observamos que para as células no seu estado basal, a diminuição da temperatura reduziu em 50% a sua atividade fagocitária quando comparada com o basal à temperatura ambiente. O mesmo ocorreu com os grupos ativados, onde houve uma redução de 23% na atividade fagocitária dos hemócitos de *B. glabrata*.

Fryer & Bayne (1989) compararam a atividade celular de hemócitos de *B. glabrata*, utilizando uma cepa resistente e outra susceptível. Observaram um aumento no nível de fagocitose (em percentagem) quando as células foram incubadas com zymozan por 30 minutos. Encontraram valores maiores com as células que estavam em CBSS do que com as que se encontravam em plasma homólogo. No entanto, quando a incubação transcorreu no prazo maior ou igual a 1 hora, esta relação se inverte, uma vez que a opsonização é dependente do tempo.

Amen & Brink (1992) estudaram a fagocitose de partículas de zymozan por hemócitos de *Limnaea stagnalis* infectada com *Trichobilharzia ocellata* “in vitro”. Observaram que os hemócitos foram ativados em estágios cedo de infecção (1-6 horas pós-exposição), porém em estágios subseqüentes, esta atividade dos hemócitos foi suprimida e no estágio tardio (72-96 horas pós-exposição) esta atividade retornou a valores normais.

Em um experimento similar, Nuñez et al. (1994) utilizando hemócitos de *Limnaea stagnalis* recém infectados por *T. ocellata* observaram que estas células inicialmente mostraram-se ativados para a fagocitose de bactérias, porém exibiu decaimento desta atividade 24 horas pós-infecção.

Além dos hemócitos, fatores séricos também interferem de maneira decisiva na infecção de moluscos pelo *S. mansoni*.

No estudo relacionado à transferência de soro, nós conseguimos transferir resistência ao *S. mansoni* de cepas de *B. tenagophila* resistentes (Taim) para *B. tenagophila* susceptíveis (CF) através da injeção de soro (hemolinfa livre de células). Com 60 dias pós-infecção 88% das cepas susceptíveis que receberam soro dos resistentes foram completamente protegidas de uma infecção primária pelo parasito. Por outro lado só 26% dos não imunizados susceptíveis não se infectaram e o controle resistente apresentou índice zero de infecção (Figura 5).

Loker e Bayne (1982) conseguiram “in vitro” 57% de proteção, quando colocaram hemócitos de cepas susceptíveis em contato com o soro de resistentes. Granath Jr. & Yoshino (1984) trabalhando com *B. glabrata* albino M-line (susceptível) que recebeu soro de *B. glabrata* 10-R2 (resistente) observaram que mais de 60% dos caramujos susceptíveis que receberam soro de caramujos resistentes ficaram completamente protegidos de uma infecção primária com o *S. mansoni*. Por outro lado, os que receberam soro de homólogos susceptíveis se infectaram.

Bayne et al. (1980) observaram que hemócitos de *B. glabrata* susceptível quando colocadas em contato com o plasma de cepas resistentes, tornam-se citotóxicos. As possíveis explicações são que: **1-**Fatores plasmáticos do caramujo resistente inativariam os fatores líticos ou tóxicos liberados pelos esporocistos. **2-**Fatores plasmáticos tornam os esporocistos incapazes de reconhecer a natureza química das células do hospedeiro e os esporocistos conseqüentemente, falham no

desenvolvimento do ataque. **3-**A habilidade do plasma de cepa resistente em facilitar a destruição dos esporocistos, por hemócitos de caramujos susceptíveis, pode ser devido a algum fator de ligação aos hemócitos presentes no plasma. Segundo os autores, a *B. glabrata* resistente a uma cepa de *S. mansoni* produz fatores com alta afinidade de ligação ao parasita. Estes fatores estão presentes tanto no plasma como na superfície dos hemócitos de caramujos resistentes. Nos caramujos susceptíveis, estes fatores teriam baixa afinidade de ligação ao parasita.

A resistência de caramujos refratários à infecção pelo *S. mansoni*, esta intimamente relacionado com a capacidade dos hemócitos em encapsular e destruir o parasito poucas horas após a penetração do miracídio (BEZERRA et al., 1998). Todo o processo de reconhecimento e fagocitose é dependente de fatores plasmáticos existentes em caramujos resistentes à infecção pelo trematoda. Agindo “in vitro” em hemócitos de caramujos susceptíveis, os fatores plasmáticos de caramujos resistentes favorecerão a destruição, de parasitos por citotoxicidade (Bayne et al., 1980). Loker et al. (1984) estudaram a aglutinação “in vitro” dos esporocistos de *S. mansoni* em contato com soro de caramujos susceptíveis e resistentes. Fryer e Bayne (1989) detectaram a presença de aglutininas (opsoninas) somente no plasma dos caramujos resistentes. Zelck and Becker (1992) observaram que a pré-incubação de células fagocitárias em plasma homólogo de caramujo resistente, resulta em alta atividade fagocitária dos hemócitos, até mesmo na ausência de plasma durante o ensaio padrão. Diante dos nossos resultados, acreditamos, em concordância com outros autores, existir um fator transferível no soro dos resistentes, o qual especificamente ativa os hemócitos, tornando-os capazes de encapsularem e destruírem o parasito. É importante ressaltar que essa transferência de resistência esta sendo pela primeira vez demonstrada em caramujos *B. tenagophila* do Brasil.

Outros fatores que influenciam a infecção do molusco pelo trematoda são: a idade do caramujo, a temperatura da água em que o caramujo e o parasito estão localizados e a nutrição do molusco (SMYTH & HAILTON, 1983). Um fator fundamental no sucesso da infecção de *B. glabrata* pelo *S. mansoni*, diz respeito à temperatura no momento do contato entre hospedeiro e parasita. Usando caramujos da mesma idade e mantidas as condições de alimentação, fizemos infecções à

15°C, 20°C e 30°C. Nossos dados mostram claramente que quanto mais baixa a temperatura menor é o índice de infecção. A 15°C somente 1,3% dos *B. glabrata* submetidos à infecção pelo *S. mansoni* positivaram, enquanto que a 20°C este índice foi de 46% e de 89% a 30°C (Figura 6).

Maldonado e Acosta-Matienzo (1947) demonstraram que a redução de 1°C na temperatura da água (de 26°C para 25°C) causou uma diminuição de 50% na taxa de infecção, que era de 80% à 26°C. Resultados similares foram encontrados por Standen (1952). Stirewallt (1954) estudou o efeito da manutenção da temperatura no desenvolvimento intramolusco do *S. mansoni*. Os resultados obtidos demonstraram que em determinadas fases, o relacionamento entre trematoda e molusco foi marcadamente influenciado pela redução da temperatura, ocorrendo um retardo na liberação e uma acentuada diminuição no número de cercárias eliminadas por unidade de caramujo. Em alguns casos ocorreu parada total no desenvolvimento do esporocisto em caramujos mantidos entre 23°C a 25°C após exposição ao miracídios.

A extrapolação destes dados sobre o ponto de vista epidemiológico é importante devido às variações de temperaturas ocorridas em algumas regiões do Brasil, o que causaria alternâncias nos índices de prevalência da esquistossomose principalmente em áreas endêmicas onde ocorrem frentes frias constantes.



## CONCLUSÕES

## 6. CONCLUSÕES

1. A atividade fagocitária de hemócitos de *B. glabrata* é influenciada, “in vitro”, pela redução de temperatura.
2. Hemócitos de *B. glabrata* infectados pelo *S. mansoni* não apresentaram alterações na sua atividade fagocitária, quando analisados “in vitro” na fase de eliminação de cercarias.
3. A transferência de soro de uma espécie resistente de *B.tenagophila* para uma susceptível elevou a resistência desta última à infecção pelo *S. mansoni*.
4. Níveis diferentes de temperatura influenciaram significativamente nos índices de infecção de *B. glabrata* pelo *S. mansoni*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MALEK, E. T. Susceptibility of the snail *Biomphalaria bossy* to infection with strains of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med.*, v. 30, p. 887-894, 1950.

AMEN, R. I.; BRINK, J. *Trichobilharzia ocellata* infections in its snail host *Lymnaea stagnalis*: an in vitro study showing direct and indirect effects on the snail internal defense system, via the host central nervous system. *Parasitology*, v. 105, p. 409-416, 1992.

BARBOSA, F.S.; *Aspects of the ecology of the intermediate hosts of Schistosoma mansoni interfering with the transmission of bilharziasis in north-eastern Brazil*. In: *Ciba Foundation Symposium Bilharziasis*, p. 23-35, 1962.

BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F. S.; Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na Ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. *Rev. Saúde Pública*, v. 34, n. 2, p. 337-341, 2000.

BARBOSA, F. S.; BARRETO, A. C. Differences in susceptibility of Brazilian strains of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.*, v. 4, p. 137-140, 1960.

BARBOSA, F. S.; COELHO, M. V. Comportamento das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis glabratus* (MOLLUSCA PLANORBIDAE) sujeitos à estivação. *Pub. Avulsas Inst. Aggeu Magalhães*, v. 4, n. 3, p. 51-60, 1955.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. Macrophagelike Hemocytes of Resistant *Biomphalaria glabrata* are Cytotoxic for Sporocysts of *Schistosoma mansoni* in Vitro. *J. Parasitol.*, v. 66, n. 3, p. 413-419, 1980.

BEZERRA, F. S. M. *Fatores ligados à susceptibilidade e resistência ao Schistosoma mansoni (SAMBON, 1907) de linhagens geográficas de Biomphalaria (SAY, 1818) e Biomphalaria tenagophila (ORBIGNY, 1835)*. Tese (Doutorado)- Departamento de Parasitologia-ICB, Universidade Federal de Minas Gerais. , 91 pgs, 1998.

BENDER, R. C.; BIXLER, L. M.; LERNER, J. P.; BAYNE, C. J. *Schistosoma mansoni* sporocysts in culture: host plasma hemoglobin contributes to in vitro oxidative stress. *J. Parasitol.*, v. 88, n. 1, p. 14-18, 2002.

BEZERRA, F. S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M.; MARTINS, R. L.; COELHO, P. M. Z. Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 39, n. 4, p. 197-201, 1997.

BORDA, C. E.; PELLEGRINO, J. Susceptibilidad de *Biomphalaria tenagophila* y *Biomphalaria glabrata* a dos cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 18, n. 3, p. 157-164, 1976.

CAMARGO, S.; Xistosomose no Brasil; resumo histórico. In: *Situação e perspectivas do controle de doenças infecciosas e parasitárias. Um seminário na Universidade de Brasília*, p. 73-85, 1979.

CHERNIN, E. Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, v. 49, n. 3, p. 353-364, 1963.

CHERNIN, E.; ANTOLICS, V. M. Penetrative capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia. *J. Parasitol.*, v. 63, p. 560-561, 1975.

COELHO, M. V. O Parasito: *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A. S. (Org.) *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, p. 1-9. 1970.

COELHO, P. M. Z. Relação molusco-parasita. In: BARBOSA, F. S. (Org.) *Tópicos em malacologia médica*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995. p. 203.

COLBERTSON, J. T. *Immunity against animal parasites*. Columbia: Columbia University Press, p. 166-167. 1941.

CRAM, E. B.; FILES, V. S. Laboratory studies on the snail host of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med.*, v. 26, n. 5, p. 715-720, 1946.

DALY, J. G.; MOORE, A. R.; OLIVIER, G. A colorimetric assay for the quantification of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) lymphocyte mitogenesis. *Fish & Shellfish*, . (5) 265-273. 1995.

DIKKEBOOM, R.; VAN DER NAP, W. P. W.; MEULEMAN, E. A.; SMINIA, T. A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. *Immunology* 55: 547-553. 1985

EY, P. L.; JENKINS, C. R. Molecular basis of self / non-self discrimination in the Invertebrata. In: *The Reticuloendotelial system*, (3) , 321.Ed. Plenum Press, 1982.

FILES, V. S. A study of the vector-parasite relationships in *S. mansoni*. *Parasitology*, v. 41, p. 264-269, 1951.

FRYER, S. E.; BAYNE, C. J. Opsonization of yeast the plasma of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda): a strain-specific, time-dependent process. *Parasite Immunol.*, v. 11, n. 3, p. 269-278, 1989.

\_\_\_\_\_. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, v. 76, n. 1, p. 45-52, 1990.

FRYER, S. E.; HULL, C. J.; BAYNE, C. J. Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate specificity of hemocyte receptors and a plasma opsonin. *Immunology*, v. 13, p. 9-16, 1989.

GAZIN, P.; BARBOSA, C. S.; BOUVY, M.; AUDRY, P. Registro da ocorrência de vetores de esquistossomose mansônica em açude do sertão de Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, v. 33, n. 4, p. 407-408, 2000.

GIOVANELLI, A.; SOARES, M. S.; D'ANDRÉA P. S.; GONÇALVES, M. M. L.; REY, L. Abundância e infecção do molusco *Biomphalaria glabrata* pelo *Schistosoma mansoni* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 35, n. 6, p. 523-530, 2001.

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

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

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

JOKY, A. Fine structural differences in the amoebocytes of *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 7, p. 669-672, 1983.

KNAAP, V. W. P. W.; LOKER, E. S. Immune mechanism in trematode-snail interaction. *Parasitol. Today*, v. 6, p. 175-182, 1990.

LIE, K. J. Molluscan host reactions to helminth infections. In: SOULSBY, E. J. L. Immune responses in parasitic infections: immunology, immunopathology and immunoprophylaxis. (), CRS Press Inc., 1987. v. 4: Protozoa, Arthropods and Invertebrates.

LINDER, E. *Schistosoma mansoni*: Visualization with fluorescent lectins and surface carbohydrates of living cercariae. *Exp. Parasitol.*, v. 59, p. 307-312, 1985.

LODES, M. J.; YOSHINO, T. P. The effect of *Schistosoma* excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. *J. Invert. Pathol.*, v. 56, p. 75-85, 1990.

LOKER, E. S.; BAYNE, C. J. In vitro encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 31, n. 5, p. 999-1005, 1982.

\_\_\_\_\_. Immunity to trematode larvae in the snail *Biomphalaria*. *Symp. Zool. Soc. Lond.*, v. 56, p. 199-220, 1986.

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.*, v. 58, p. 56-62, 1984.

LOKER, E. S.; BAYNE, C. J.; YUI, M. A. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of Echinostoma mediated interference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.*, v. 62, p. 149-154, 1986.

LUTZ, A.; O *Schistosoma mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.11, p. 121-155, 1919.

MALDONADO, J. F.; MATIENZO, J. A. The development of *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host *Australorbis glabratus* Puerto Rico. *J. Public Health Trop. Med.*, v. 22, n. 4, p. 331-373, 1947.

MARCHIORI, C. H. Primeira ocorrência de *Biomphalaria straminea* no Sul Goiano, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, v. 33, n. 6, p. 622-623, 1999.

MARTINS-SOUSA, R. L.; NEGRÃO-CORRÊA, D.; BEZERRA, F. S. M.; COELHO, P. M. Z. Anesthesia of *Biomphalaria* spp. (Mollusca, Gastropoda): sodium pentobarbital is the drug of choice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 3, p. p. 391-392, 2001.

MATRICON-GONDRAM, M.; LETOCARD, M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 74, n. 3, p. 224-234, 1999.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

NÚÑES, P. E.; ADEMA, C. M.; JONG-BRINK, M. Modulation of the bacterial clearance activity of haemocytes from the freshwater mollusk, *Lymnaea stagnalis*, by the avian schistosome, *Trichobilarzia ocellata*. *Parasitology*, v. 109, p. 299-310, 1994.

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 5, p. 15-22, 1963.

PARAENSE, W. L. Fauna planorbídica do Brasil. In: LACAZ, C. S. et al. *Introdução a geografia médica do Brasil*. São Paulo: Ed Universidade de São Paulo, 1972. cap. 10, p. 213-239.

\_\_\_\_\_. Distribuição geográfica de vetores da xistossomose no Nordeste do Brasil. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 6., 1977, Brasília. Panel: Programa Especial de Controle da Esquistossomose.

PASSOS, A. D. C.; AMARAL, R. S. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 31, supl. 11, P. 61-74, 1998.

PINO, L. A.; MATINELLA, L.; MORALES, G. C. Compatibilidad entre nueve cepas de *Biomphalaria glabrata* de áreas endémicas y una cepa de *Schistosoma mansoni* venezolanas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 32, n. 6, p. 677-682, 1999.

PIZA, J. T.; RAMOS, A. S.; BRANDÃO, C. S. H.; FIGUEIREDO, C. G. A esquistossomose no vale do Paraíba. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 19, p. 97-143, 1959.

PORTER, A. The larval trematoda found in certain South Africa mollusca. *Publ. South Africa Inst. Med. Research*, 8(42): 449-52, 1938.

PLUMB, J. A.; MILROY, R.; KAYE, S. B. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide- formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res.*, v. 49, p. 4435-4440, 1989.

PUBLIC health impact of schistosomiasis: disease and mortality. Expert Committee on the Control of Schistosomiasis. *Bull. World Health Org.*, v. 71, n. 6, p. 657-662, 1993.

READ, C. P.; ROTHMAN, A.; SIMMONS JR, J. Studies on membrane transport, with special reference to host parasite integration. *Ann. N Y Acad. Sci.*, v. 113, p. 154-205, 1963.

REIS, S. M. P. M.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Ação da inoculação de hemolinfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Rev. Saúde Pública*, v. 29, n. 4, p. 259-264, 1995.

ROLLINSON, L. S.; SOUTHGATE, V. R.; The genus *Schistosoma*: a taxonomic appraisal. In: ROLLINSON, D.; SIMPSON, A. J. G. *The biology of Schistosomes: from genes to latrines*. V. 1, Academic Press, 1987.

SAAP, K. K.; LOKER, E. S. Mechanisms underlying deigning-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. *J. Parasitol.*, v. 86, p. 1012-1019, 2000.

SAMBON, L. W. Reworks on *Schistosoma mansoni*. *J. Trop. Med. Hyg.*, v. 10, p. 3003-3004, 1907.

SCHOENBERG, D. A.; CHENG, T. C. Lectin-binding specificities of hemocytes from two strains of *Biomphalaria glabrata* as determined by microadsorption assays. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 4, p. 617-628, 1980.

SILVEIRA, E. P.; MARÇAL JR, O.; MACHADO, M. I. Ocorrência de *Biomphalaria straminea* (Pulmonata: Planorbidae) na estação de aquicultura do IBAMA em Uberlândia, MG. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 30, n. 5, p. 401-403, 1997.

SIMPSON, A. J. G.; SMITHERS, S. R. Characterization of the exposed carbohydrates on the surface membranes of adult *Schistosoma mansoni* by analysis of lectin binding. *Parasitology*, v. 81, p. 1-15, 1980.

SMYTH, J. D.; HAILTON, D. W. *The Physiology of trematodes*. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.

SOUSA, C. P.; LIMA, L. C. *Moluscos de interesse parasitológico do Brasil*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1990. p. 35-48.

SOUZA, C. P.; CUNHA, R. C. P.; ANDRADE, Z. A. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*; *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 37, n. 3, p. 291-296, 1995.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; FERREIRA, S. S.; GUIMARÃES, C. T.; VIEIRA, I. B. F.; MARIANE JUNIOR, R. Moluscos límnicos da microrregião de Belo Horizonte, MG, com ênfase nos vetores de parasitoses. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 31, n. 5, p. 449- 456, 1998.

SPRAY, F. J.; GRANATH Jr, W. O. Structural analyses of hemolymph proteins from *Schistosoma mansoni* (Trematoda)- Susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 94b, n. 3, p. 543-553, 1989.

STANDEN, O. D. Experimental schistosomiasis: maintenance of *Schistosoma mansoni* in the laboratory, with some notes on experimental infections with *Schistosoma haematobium*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 43, p. 268-283, 1949.

STIREWALT, M. *Effect of snail maintenance temperatures on development of Schistosoma mansoni*. Bethesda, Maryland: Naval Medical Research Institute, 1954.

VALLE, C.M.; PELLEGRINO, J.; ALVARENGA, N.; *Ritmo circadiano de emergência de cercarias (Schistosoma mansoni-Biomphalaria glabrata)*. *Revista Brasileira de Biologia*, v.31, p.53-63, 1971.

VIANEY-LIAUD, N.; DUSSART, G. Starvation, disiccation and use of allosperm in the hermaphrodite freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). *Hidrobiologia*, v. 291, p. 125-130, 1994.

YOSHINO, T. P. Comparison of concealing A-reactive determinants on hemocytes of two *Biomphalaria glabrata* snail stocks: Receptor binding and redistribution. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 5, p. 229-239, 1981.

YOSHINO, T. P.; GRANATH, W. O. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (gastropoda) hemocytes. Functional heterogeneity in cell populations recognized by a monoclonal antibody. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 45, p. 174-186, 1985.

YOSHINO, T. P.; CHENG, T. C.; RENWRANTZ, L. R. Lectin and human blood group determinants of *Schistosoma mansoni*: Alteration following in vitro transformation of miracidium to mother sporocysts. *J. Parasitol.*, v. 63, p. 818-824, 1977.

ZELCK, U.; BECKER, W. *Biomphalaria glabrata*: influence of calcium, lectins and plasma factors on *in vitro* phagocytic behavior of hemocytes of noninfected or *Schistosoma mansoni*- infected snails. *Exp. Parasitol.*, v. 75, p. 126-136, 1992.

ZELCK, U. E.; BECKER, W.; BAYNE, C. J. The Plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 19, n. 3, p. 181-194, 1995.



**ANEXOS**

