

## Aspectos imunológicos e parasitológicos em *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* e outros Digenea\*

### *Immunological and parasitological aspects of Biomphalaria tenagophila infected by Schistosoma mansoni and other Digenea*

Doralice de Souza Luro Balan\*\*, Luiz Augusto Magalhães\*\*\*, Aquiles Eugênic Piedrabuena\*\*\*\*

BALAN, D. de S.L. et al. Aspectos imunológicos e parasitológicos em *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni* e outros digenea. *Rev. Saúde Pública*, 27: 421-9, 1993. Estudou-se o comportamento de amebócitos de *Biomphalaria tenagophila* infectadas por *Schistosoma mansoni*, por outros Digenea e a resistência à superinfecção, presente em infecções mistas. Foi verificada a atividade fagocitária dos amebócitos, o número destas células circulantes, a reação amebocitária nos tecidos, o perfil eletroforético da hemolinfa, além da reação de imunodifusão. Concluiu-se que moluscos infectados por outros Digenea apresentam resistência à superinfecção por *S. mansoni*, sendo que os amebócitos parecem não ter participação direta na destruição dos esporocistos de *S. mansoni* nesta eventualidade. Nos moluscos infectados observou-se maior número de amebócitos circulantes e aumento de capacidade fagocitária destas células.

*Descritores:* *Biomphalaria*, parasitologia. *Schistosoma mansoni*.

### Introdução

A grande maioria das investigações sobre a esquistossomose mansônica na região Neotropical utiliza a *Biomphalaria glabrata* como modelo de agente transmissor, provavelmente porque este molusco ajustou-se muito bem à condição de vetor do *Schistosoma mansoni* na América do Sul e no Caribe. Poucas investigações têm sido realizadas utilizando *Biomphalaria tenagophila* ou *Biomphalaria straminea*.

Tanto no campo (Magalhães<sup>27</sup>) como em laboratório (Magalhães<sup>28</sup>), *B. tenagophila* mostrou-se

pouco susceptível à infecção esquistossomótica, apresentando, além de baixa taxa de infecção, número médio reduzido de cercárias por molusco, provavelmente devido à eficiência dos mecanismos de defesa do molusco (Guaraldo e col.<sup>16</sup>, 1981).

Além de ter de vencer a resistência natural à infecção oferecida pelo molusco, as larvas de *S. mansoni* podem enfrentar outros fatores que se interpoem ao seu desenvolvimento no interior do hospedeiro intermediário. Lim & Heyneman<sup>21</sup> (1972), referiram a existência de competição entre larvas de diferentes digenéticos no interior de moluscos planorbídeos. Esta competição poderia ocorrer por dois mecanismos: *direto* - predação por rédias que se alimentariam de esporocistos ou cercárias rivais; e *indireto* - elaboração de substâncias tóxicas às outras larvas, luta por espaço vital, competição alimentar, mecanismos imunológicos e perturbações no equilíbrio hospedeiro-parasito.

Ratchiffe e col.<sup>35</sup> (1985) assinalaram o papel dos mecanismos de defesa celular e humoral presentes nos moluscos. A defesa celular é mediada por amebócitos da hemolinfa e inclui processos de fagocitose, formação de granulomas, coagulação de hemolinfa e cicatrização. A defesa humoral inclui a presença e a ação de lisinas, aglutininas, fatores antimicrobianos e substâncias com ação semelhante às linfocinas. Em gastrópodos a resposta celular foi demonstrada por Standen<sup>37</sup> (1952), Cheng e col.<sup>12</sup> (1970), Tripp<sup>43</sup> (1970), Michelson<sup>31</sup> (1975) e Abdul-Salam e Michelson<sup>1</sup> (1980).

\* Trabalho realizado com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processo nº 88.2336.2.

\*\* Bolsista da FAPESP (Processo nº 84.2132-7) junto ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas, SP - Brasil

\*\*\* Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas, SP - Brasil

\*\*\*\* Departamento de Genética do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) - Campinas, SP - Brasil

Separatas/Reprints: D. de S.L. Balan - Caixa Postal 6109 - UNICAMP - 13083-970 - Campinas, SP - Brasil

Edição subvencionada pela FAPESP. Processo Medicina 93/0208-5.

Em 1961 e 1970, Tripp<sup>41,43</sup> verificou em *B. glabrata* a capacidade dos amebócitos de distinguir material "próprio" do "não-próprio". Esses moluscos aceitaram implante de tecido homólogo, porém rejeitaram tecido heterólogo.

Mecanismos humorais estudados por Mackin<sup>29</sup> (1961), Feng<sup>14</sup> (1962) e Michelson<sup>30</sup> (1963), revelaram fatores biologicamente ativos da hemolinfa que funcionalmente simulavam anticorpos. Vários fatores ativos da hemolinfa foram identificados como opsoninas que iniciariam ou facilitariam o processo de fagocitose (Tripp<sup>42</sup>, 1966).

Lie e col.<sup>19</sup> (1976) assinalaram resistência adquirida em *B. glabrata* à infecção por *S. mansoni*. Bayne e col.<sup>7</sup> (1984) verificaram a presença de receptores específicos para esporocistos primários de *S. mansoni* em amebócitos de *B. glabrata*.

A verificação de antagonismos entre larvas de Digenea que parasitam um mesmo molusco tem sido assinalada no Brasil (Machado e col.<sup>25,26</sup>, 1987, 1988). Esse fato tem importância epidemiológica como assinalaram Lim e Heyneman<sup>21</sup> (1972), sugerindo que esses fenômenos competitivos fossem utilizados no combate ao *S. mansoni* no campo. Para isso seriam utilizados larvas de digenéticos rivais que predariam ou destruiriam os esporocistos ou cercárias de *S. mansoni*.

No presente trabalho avaliou-se a atividade fagocitária dos amebócitos nos moluscos parasitados, a formação de reações amebocitárias em torno das larvas infectantes, além da determinação do número de amebócitos na hemolinfa e a análise da imunodifusão e da imunoelctroforese da hemolinfa dos moluscos.

## Material e Método

### Procedência dos moluscos

Os 2.243 exemplares de *B. tenagophila* utilizados foram provenientes de Louveira, SP, capturados em tanques de piscicultura. Esse local nunca foi apontado como foco de esquistossomose. Em alguns experimentos, por motivos de planejamento, utilizaram-se 68 exemplares de *B. tenagophila*, nascidas e criadas em laboratório, descendentes de exemplares coletados no Vale do Rio Paraíba do Sul, SP.

### Verificação da taxa de infecção natural

Após a captura os moluscos foram expostos à luz e ao calor para a eliminação de cercárias (Pellegrino e col.<sup>34</sup>, 1955). Tal exposição foi repetida a cada 4 dias por um período de 60 dias. Os exemplares que não eliminaram cercárias durante esse período e não apresentaram sinais visíveis de

esporocistos à lupa estereoscópica, foram considerados livres de infecção. As cercárias foram identificadas pelo critério adotado por Machado e col.<sup>25</sup> (1987), sendo os moluscos infectados separados por grupos, conforme o tipo de cercária eliminada. Os moluscos foram mantidos em frascos com água sem cloro e alimentados com alface.

### Constituição dos grupos de moluscos

**Grupo A** - Moluscos *B. tenagophila* capturados em Louveira, SP

- 1A - Moluscos livres de infecção por digenéticos.
- 2A - Moluscos infectados por furcocercárias longifurcadas sem ocelos.
- 3A - Moluscos infectados por furcocercárias longifurcadas com ocelos.
- 4A - Moluscos infectados por equinostomocercárias.
- 5A - Moluscos infectados por xifidiocercárias.
- 6A - Moluscos naturalmente infectados por furcocercárias longifurcadas sem ocelos ou por equinostomocercárias ou ainda por xifidiocercárias e superinfectadas por *S. mansoni*.

**Grupo B** - *B. tenagophila* nascidos em laboratório

- 1B - Moluscos livres de infecção.
- 2B - Moluscos infectados experimentalmente por *S. mansoni*.

### Infecção experimental de *B. tenagophila* por *S. mansoni*

A infecção dos planorbídeos em laboratório foi realizada pela técnica de Standen<sup>37</sup> (1952). Os moluscos foram infectados pela linhagem SJ de *S. mansoni*. Os miracídios foram obtidos de ovos de fezes de camundongos Swiss SPF. Os moluscos destinados à eliminação de cercárias foram expostos, isoladamente, a 10 miracídios, e os destinados à observação histológica, a 100 miracídios.

### Exame histopatológico dos moluscos

Exemplares de *B. tenagophila* naturalmente infectados por furcocercárias longifurcadas sem ocelos ou por equinostomocercárias ou ainda por xifidiocercárias foram submetidos, individualmente, a superinfecção com 100 miracídios de *S. mansoni* SJ e sacrificados por imersão em fixador Bouin alcoólico 24, 48 e 72 horas após a superinfecção.

Utilizaram-se 4 moluscos para cada tipo de infecção. As peças foram submetidas a cortes seriados com 7 µm de espessura e coradas pelo Tricrômico de Gomori.

### Obtenção e armazenamento da hemolinfa

A hemolinfa foi colhida na região céfalo-podal do molusco, por rompimento do tegumento com estilete, recolhendo-se com pipeta Pasteur, o material extravasado. Foram utilizados moluscos de 9 a 12 mm de diâmetro e o volume obtido foi de 20 a 30 µl de hemolinfa por espécime. Para obtenção de hemolinfa livre de células, foi a mesma submetida à centrifugação a 800g, por 10 min. A hemolinfa colhida dos moluscos dos grupos A e B foi utilizada para a dosagem de proteínas, contagem de amebócitos, ensaios de fagocitose e testes imunológicos.

### Teor protéico da hemolinfa

As concentrações protéicas da hemolinfa foram estudadas utilizando-se os métodos de Biureto (Weichselbaum<sup>44</sup> (1946) e Lowry e col.<sup>24</sup> (1951), modificado. O método de biureto foi utilizado quando a hemolinfa foi proveniente de três "pools" de 30 moluscos constituídos de: 1) *B. tenagophila* de laboratório livres de infecção (controle) - 2) *B. tenagophila* do campo livres de infecção (controle) e 3) *B. tenagophila* de laboratório infectadas por *S. mansoni*. O método de Lowry e col.<sup>24</sup> (1951), foi utilizado para hemolinfa fresca, colhida individualmente de exemplares de: *B. tenagophila* do campo livres de infecção; *B. tenagophila* do campo infectadas por furcocercárias; *B. tenagophila* do campo infectadas por xifidiocercárias e *B. tenagophila* do campo infectadas experimentalmente com *S. mansoni*.

### Obtenção de soro imune de coelho, anti-*B. tenagophila* do campo livre de infecção por digenéticos

O esquema de imunização adotado foi o de Oliveira<sup>32</sup> (1975) modificado. Foi injetada em coelho, hemolinfa de moluscos de campo livres de infecção por digenéticos, centrifugada a 17.000g, por 2 min. As duas primeiras inoculações foram feitas nos gânglios poplíteos, com intervalo de 30 dias. A hemolinfa, em concentração protéica de 10mg/ml, foi emulsionada com adjuvante completo de Freund, utilizando-se um volume total de 1ml dessa concentração em cada inoculação. Após 15 dias da segunda inoculação, fez-se uma série de quatro injeções subcutâneas no dorso do animal, em intervalos semanais. Nessas inoculações a hemolinfa não foi emulsionada com adjuvante completo de Freund e a concentração protéica foi de 5mg/ml. Foram realizadas sangrias no coelho nos intervalos das injeções para verificação, por imunodifusão radial, do título de anticorpos produzidos.

### Imunodifusão radial dupla

Os experimentos de imunodifusão foram realizados em gel de ágar a 1% em solução salina 0,15M, segundo indicações de Ouchterlony<sup>33</sup> (1958). A difusão ocorreu em temperatura ambiente por 30 a 40 h. Por meio da precipitação de agregados antígeno-anticorpo, foi analisado o perfil da hemolinfa (Ag) frente ao soro imune do coelho (Ac) anti-hemolinfa. A coloração das lâminas fez-se pelo Coomassie-Blue. Foram utilizadas nas preparações somente hemolinfa dos grupos de *B. tenagophila*, capturadas no campo em Louveira, SP.

### Eletroforese e imunoeletroforese

Foi utilizada a técnica de eletroforese e imunoeletroforese unidimensionais (Grabar & Burtin<sup>15</sup>, 1964), utilizando-se lâminas de 10x10cm com agarose a 1% em tampão barbital 0,05M, pH 8,6. A eletroforese foi realizada a 4°C, por 2 h com gradiente de potencial de 6V/cm. Logo após a corrida eletroforética, efetuou-se a imunodifusão dos componentes separados frente a soro imune de coelho, em câmara úmida, a temperatura ambiente, por 30 a 40 h. A coloração fez-se por Coomassie-Blue.

Foi estudada a hemolinfa de moluscos capturados no campo, parasitados e não parasitados por trematódeos.

### Contagem de amebócitos de hemolinfa

A contagem foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer. Algumas contagens foram feitas em hemolinfa colhida de um "pool" de cinco moluscos, e em outras ocasiões as determinações foram individuais. Foi utilizada hemolinfa coletada na região céfalo-podal de moluscos com 10 a 12mm de diâmetro. Os exemplares destinados a esse estudo foram *B. tenagophila* de campo, livres de infecção; *B. tenagophila* infectadas por furcocercárias sem ocelo; *B. tenagophila* infectadas por xifidiocercárias; e *B. tenagophila* infectadas experimentalmente com *S. mansoni*.

### Avaliação quantitativa da fagocitose

A capacidade de fagocitose dos amebócitos de hemolinfa fresca dos moluscos foi avaliada frente a eritrócitos de carneiro formolizados. Para a realização dos ensaios "in vitro", tomou-se como base a técnica de Abdul-Salam & Michelson<sup>1</sup> (1980). A formolização de eritrócitos de carneiro, suspensos em Alsever, fez-se após lavagens com PBS pH 7,0, adicionando-se a seguir 10 volumes de formol 3% à papa de eritrócitos. Deixou-se a mistura por

24 h em agitação na geladeira. Novas lavagens em PBS e MEM (meio de Eagle) foram executadas. A suspensão foi ajustada para  $7 \times 10^4$  cels/mm<sup>3</sup>. Para o preparo de monocamadas, a hemolinfa de um "pool" de 10 moluscos com 9 a 12mm de diâmetro foi acondicionada em tubo de ensaio e mantida em banho gelo até sua utilização. Colocou-se 25µl de hemolinfa sobre lamínulas de vidro e incubou-se em câmara úmida por 20 min a 22°C. Por inclinação das lamínulas, a hemolinfa foi removida, obtendo-se uma camada de amebócitos firmemente aderida. Para os ensaios de fagocitose de eritrócitos, as monocamadas foram cobertas com 25µl de suspensão de eritrócitos de carneiro formolizados. Fez-se incubação em câmara úmida por uma hora a 22°C. Ao final, os eritrócitos em excesso foram removidos por lavagem em MEM pH 7,5. As lamínulas foram fixadas com álcool metílico por 5 min, coradas com Giemsa 1:5 e montadas em lâminas para microscopia. O grau de fagocitose foi determinado pela contagem ao acaso de um mínimo de 200 amebócitos em cada monocamada, utilizando-se para tanto microscópio óptico. A capacidade de fagocitose dos amebócitos foi avaliada nos grupos *B. tenagophila* de campo, livres de infecção, infectada por furcocercárias sem ocelo, infectadas por xifidiocercárias e *B. tenagophila* de campo infectadas experimentalmente com *S. mansoni*.

#### Análise estatística

Utilizaram-se métodos estatísticos para análise dos valores obtidos nas dosagens protéicas de hemolinfa, nas contagens de células "spreading" da hemolinfa fresca e na avaliação quantitativa da fagocitose. A análise desses fatores foi efetuada pelo teste de Student e pela análise de variância (testes de Bartlett, Cochran e Tukey). Para algumas situações optou-se por testes não paramétricos, como os testes de Kruskal-Wallis e Maun-Withney (IJ test) (Roscoe<sup>36</sup>, 1975). Muitos valores exigiram transformações matemáticas, ou seja, foram normalizados para serem usados no teste de Tukey (Campos<sup>13</sup>, 1979).

## Resultados

#### Taxa de infecção natural dos moluscos

A taxa de infecção natural dos moluscos (Tabela 1) foi calculada para os quatro tipos de cercárias encontradas: furcocercárias longifurcadas sem ocelos, furcocercárias longifurcadas com ocelos, equinostomocercárias e xifidiocercárias. Não foram constatadas infecções concomitantes

**Tabela 1.** Número de exemplares de *B. tenagophila* por tipos de cercárias e taxa de infecção natural.

Tipos de cercária	Número de exemplares	Percentual de infecção
Furcocercárias longifurcadas sem ocelos	122	5,4
Furcocercárias longifurcadas com ocelos	11	0,5
Equinostomocercárias	7	0,3
Xifidiocercárias	62	2,8

por mais de um tipo de cercária. Em 2.041 exemplares não foi observada eliminação de cercárias.

#### Reações teciduais e presença de larvas nos tecidos dos moluscos

Nos cortes histológicos foram observados esporocistos, rédias e cercárias. A superinfecção por *S. mansoni* não determinou a destruição ou a parada do crescimento das larvas de outros trematódeos que anteriormente parasitavam os moluscos, tendo sido encontrados esporocistos íntegros contendo furcocercárias, equinostomocercárias e xifidiocercárias. Nos exemplares superinfectados por *S. mansoni*, os esporocistos de *S. mansoni* foram destruídos, apresentando-se como uma massa amorfa, sem células individualizadas. Em torno das larvas destruídas não foram observadas reações amebocitárias.

#### Observações referentes a hemolinfa

Os resultados referentes a dosagens de proteína (Tabela 2) mostraram uma diferença altamente significativa entre o grupo de moluscos capturados no campo e o grupo nascido e criado no laboratório, infectados e não infectados.

A infecção por digenéticos não alterou o valor protéico na hemolinfa.

**Tabela 2.** Dosagem de proteína total da hemolinfa de *B. tenagophila*.

Procedência dos moluscos	Método	Dosagem (mg/ml)	
Do campo, livres de infecção	Biureto	36,32	2,72
Do laboratório, livres de infecção	Biureto	48,56	7,36
Do laboratório, infectados por <i>S. mansoni</i>	Biureto	44,97	5,77
Do campo, livres de infecção	Lowry	27,86	6,41
Do campo, experimentalmente infectadas por <i>S. mansoni</i>	Lowry	33,90	2,40
Do campo, infectados por furcocercárias sem ocelos	Lowry	25,09	4,63
Do campo, infectados por xifidiocercárias	Lowry	27,88	1,21

### Contagem de amebócitos e avaliação da fagocitose

As contagens de amebócitos foram feitas individualmente por molusco (Tabela 3) e em "pool" de 5 moluscos (Tabela 4). Todos os exemplares examinados foram moluscos capturados no campo.

Os dados da Tabela 4 mostram que houve aumento significativo do número de amebócitos nos moluscos infectados por digenéticos. Os moluscos infectados por xifidiocercárias foram os que apresentaram maior número de amebócitos circulantes.

**Tabela 3.** Número médio de amebócitos na hemolinfa fresca, sem diluição, feita individualmente em exemplares de *B. tenagophila*.

Procedência do molusco	Nº de células "spreading/mm <sup>3</sup> "	
Do campo, livres de infecção	17	8,60
Do campo, infectados experimentalmente por <i>S. mansoni</i>	22	12,10

**Tabela 4.** Número médio de amebócitos em "pool" de hemolinfa fresca, de *B. tenagophila*.

Procedência do molusco	Nº de células "spreading/mm <sup>3</sup> "	
Do campo, livres de infecção	17	1,29
Do campo, experimentalmente infectados por <i>S. mansoni</i>	21	2,08
Do campo, infectados por furcocercárias	21	0,95
Do campo, infectados por xifidiocercárias	22	0,95

A capacidade de fagocitose apresentada pelos amebócitos foi maior nos grupos infectados por trematódeos digenéticos, excluindo-se *S. mansoni*. O grupo que apresentou maior capacidade de fagocitose foi o infectado por xifidiocercárias (Tabela 5).

**Tabela 5.** Taxa de fagocitose dos amebócitos da hemolinfa de *B. tenagophila* frente a eritrócitos de carneiro formolizados.

Procedência dos moluscos	Fagocitose (%)	x*
Do campo, livres de infecção	59,4	5,98 50,452
Do campo, experimentalmente infectados por <i>S. mansoni</i>	60,0	1,58 50,768
Do campo, infectados por furcocercárias	76,4	4,77 65,874
Do campo, infectados por xifidiocercárias	83,2	3,11 61,23

Todos os valores foram significativos ao nível de 0,1% pelo teste de Tukey.

\* A média representa os valores transformados pela fórmula:  $x+0.5$

### Teste imunológicos

Todos os testes imunológicos foram realizados, pelo menos, em triplicatas.

A hemolinfa de *B. tenagophila* foi um antígeno adequado para a preparação de soro imune em coelhos. O exame de imunodifusão mostrou título de 1:4, 40 dias após a primeira inoculação nos gânglios poplíteos do animal, sendo logo após iniciadas as inoculações no dorso. No final do esquema de imunização, o título obtido foi de 1:32.

Utilizando-se o teste de precipitação em gel de ágar, verificou-se que houve uma identidade total entre os antígenos de todas as amostras analisadas. Os sistemas antígeno-anticorpo ao reagirem originaram, pelo menos, 3 bandas de precipitação muito nítidas. Como não se observaram diferenças antigênicas entre a hemolinfa do grupo de camundongos do campo infectados e livres de infecção, observou-se identidade total das linhas de precipitação.

O perfil imunoeletroforético foi obtido dos vários grupos experimentais. A migração das proteínas foi em direção ao pólo catódico. Nas preparações a fresco, nas amostras de hemolinfa de *B. tenagophila* livres de infecção, foi encontrada uma banda tênue, próximo ao poço central que migrou em direção ao pólo anódico. Esta banda, entretanto, foi removida facilmente pela lavagem do gel em salina, antes da secagem e coloração.

Foram encontradas na hemolinfa de *B. tenagophila* livre de infecção, linhas de precipitação, sendo uma deslocada para o pólo anódico, uma junto ao próprio poço de depósito da amostra, duas próximas ao poço em direção ao pólo catódico e uma última, muito densa, deslocando-se rapidamente, tendo percorrido maior distância em direção ao pólo positivo.

Quando se submeteu a hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por furcocercárias à imunoeletoforese obtiveram-se 4 linhas deslocando-se em direção ao pólo positivo. Entre elas, uma mais forte e densa, deslocou-se mais rapidamente.

Também foram vistas 4 linhas de precipitação quando se utilizou hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni*, uma delas apresentando-se muito densa e migrando rapidamente.

Na hemolinfa de *B. tenagophila* infectada por xifidiocercárias, detectaram-se 3 linhas de precipitação deslocando-se em direção ao pólo positivo, sendo que a de maior densidade migrou mais rapidamente.

Provavelmente, em todos os testes, a banda mais densa abrigava vários agregados antígeno-anticorpo sobrepostos.

## Discussão

Vários autores verificaram resistência à infecção em moluscos sensibilizados por infecções prévias. Sullivan e col.<sup>40</sup> (1982) indicaram indução de resistência adquirida em *B. glabrata* sensibilizada por miracídeos irradiados de *Ribeiroia marini*, tendo estes moluscos adquirido resistência à reinfeção quando expostos a miracídeos não irradiados. Essas larvas foram destruídas por amebócitos, tendo havido aumento do número dessas células. Jourdan & Mounkassa<sup>17</sup> (1986) descreveram competição intra-específica entre os esporocistos primários de *S. mansoni* e de *Echinostoma caproni*, quando coabitavam com *B. pfeifferi*. Houve degeneração de uma geração significativa de esporocistos primários de *S. mansoni*, sendo que a fração restante migrou para fora de seus microbiótopos preferidos, provavelmente para locais não imunologicamente ativos.

Nos exames histopatológicos verificou-se nas superinfecções total degeneração dos esporocistos primários de *S. mansoni*, tendo os esporocistos de todas as outras espécies de digenéticos permanecido íntegros. Houve evidentemente proteção à superinfecção por *S. mansoni*.

Lic e col.<sup>20</sup> (1980) descreveram as reações teciduais induzidas por *S. mansoni* em *B. glabrata* susceptíveis, expostas previamente a miracídeos mediados de *E. paraensei*, e notaram esporocistos de *S. mansoni* degenerados sem reação amebocitária ou com número muito reduzido dessas células presas aos esporocistos. Constatou-se a ausência de reação amebocitária aparente em torno dos esporocistos destruídos de *S. mansoni* em todas as superinfecções realizadas, o que pode significar a ação de fatores humorais na destruição do parasito. Bayne e col.<sup>5,6</sup> (1980) relataram que fatores na hemolinfa (excluindo-se as células) de *B. glabrata* estariam envolvidos na destruição dos parasitos pelo hospedeiro intermediário. Loker & Bayne<sup>22</sup> (1982) demonstraram em estudos "in vitro" com *B. glabrata* componentes da hemolinfa (fatores humorais ou fatores do plasma) de exemplares resistentes que destruíram esporocistos de *S. mansoni* quando incubados com o parasito. Bayne e col.<sup>8</sup> (1985) postularam que os componentes do plasma que medciam a defesa celular em *B. glabrata* são aglutininas com conformação molecular específica e que reconheceriam diferenças entre espécies distintas de caramujos. Bayne e col.<sup>9</sup> (1986) demonstraram aglutininas na resposta de defesa dos moluscos com papel opsonico na fagocitose "in vitro".

Loker & Hertel<sup>23</sup> (1987) evidenciaram diferenças na quantidade de proteína total na hemo-

linfa de *B. glabrata*, parasitado por *E. paraensei*, sendo que esse valor aumenta muito nos caramujos susceptíveis. Nos exemplares não infectados, o valor protéico foi maior que nos exemplares infectados por *S. mansoni*. Quando se comparou com moluscos capturados no campo, os moluscos nascidos e mantidos em laboratório, apresentaram valores maiores de proteínas na hemolinfa. Tal situação, talvez deva-se a fatores como alimentação e confinamento. Entre os grupos capturados no campo, verificou-se não haver diferença significativa entre eles, no que se refere ao teor protéico da hemolinfa, quer estejam ou não parasitados por trematódeos digenéticos. Provavelmente em *B. tenagophila* os valores de proteína na hemolinfa podem variar em razão da linhagem dos caramujos e da época de infecção. Estudos complementares poderão confirmar ou não esta hipótese.

Os presentes resultados na contagem de amebócitos na hemolinfa (amebócitos circulantes) mostraram-se concordantes com os assinalados por Stumpe & Gilbertson<sup>39</sup> (1980). Esses autores definiram que granulócitos (células fagociticamente ativas) expressaram aumento em número nos moluscos *B. glabrata* parasitados por *S. mansoni*, em relação aos controles sem infecção. Verificou-se "in vitro" a atividade de fagocitose aumentada nos grupos infectados. Hipoteticamente pode-se admitir que o parasitismo ative as células fagocíticas, já que se sabe por Cheng & Schoenberg<sup>11</sup> (1980), que essas células são dependentes de fatores quimiotáticos ou de fatores de reconhecimento, e que o número participante dessas células na ingestão de partículas é de 30 a 100% (Anderson & Good<sup>3</sup>, 1976). Os trabalhos de Yoshino<sup>45</sup> (1982), Abdul-Salam & Michelson<sup>45</sup> (1983), Bayne e col.<sup>7</sup> (1984) e Knapp e col.<sup>18</sup> (1987) assinalaram os seguintes fatos: esporocistos são encapsulados e mortos por células semelhantes a macrófagos, os determinantes da superfície dos amebócitos são modulados por lectinas; antígenos de *S. mansoni* reagem com amebócitos de *B. glabrata* e com receptores específicos para *S. mansoni* nos amebócitos de *B. glabrata*.

Através da imunodifusão e da imunoelectroforese, vários trabalhos contribuíram para a diferenciação taxonômica de caramujos de importância médica (Bailey e col.<sup>4</sup>, 1986); demonstraram glicoproteínas aglutinantes em *B. glabrata* para o sistema ABO humano (Stanislavsky e col.<sup>38</sup>, 1976) e revelaram variedades de peptídeos em exemplares susceptíveis e resistentes da espécie *B. glabrata* (Bayne e col.<sup>9</sup>, 1986). Bayne e col.<sup>10</sup> (1987) verificaram em *B. glabrata* que muitas macromoléculas componentes da hemolinfa são

glicoproteínas e a ampla maioria dos determinantes antigênicos são carboidratos. Loker & Hertel<sup>23</sup> (1987) verificaram que componentes da hemolinfa de *B. glabrata* exibiam alterações moleculares quantitativas e qualitativas reveladas por SDS-PAGE\*. Pelo perfil eletroforético obtido da hemolinfa dos moluscos infectados pelos diferentes trematódeos, foram encontradas alterações que mostraram características específicas de cada diferente tipo de infecção. A coloração efetuada indicou a natureza protéica das bandas encontradas no gel. As imunodifusões e imunoeletoforeses permitiram afirmar que há diferenças qualitativas e quantitativas na hemolinfa de *B. tenagophila* do campo, parasitadas quando comparadas com a hemolinfa de moluscos do grupo controle, livres de infecção.

Como ocorre com qualquer animal capturado no campo, não se pode descartar a eventualidade de infecções prévias, já curadas, por outras espécies ou mesmo infecções abortadas. Esta é uma limitação do experimento que se acredita não ser muito relevante nos moluscos, pelo fato destes animais não apresentarem mecanismos imunes tão aperfeiçoados como o dos vertebrados.

## Conclusões

*Biomphalaria tenagophila* capturadas no campo, em tanques de piscicultura, foram encontradas parasitadas, sempre em infecção única, por furcocercárias longifurcadas sem ocelo, furcocercárias longifurcadas com ocelo, equinostomocercárias ou xifidiocercárias.

Exemplares de *B. tenagophila* naturalmente parasitados por trematódeos e superinfectados experimentalmente por *S. mansoni* mostraram-se resistentes ao desenvolvimento de esporocistos de *S. mansoni*.

Nos moluscos superinfectados com *S. mansoni* não foram encontradas reações amebocilárias em torno dos esporocistos degenerados de *S. mansoni*. Essas observações sugerem que não houve participação direta dos amebócitos na destruição da larva de *S. mansoni* e que possivelmente fatores da hemolinfa (excluindo-se as células), estariam envolvidos na destruição do parasita.

Os valores de proteínas totais de hemolinfa mostraram-se maiores nos moluscos *B. tenagophila* sem infecção mantidos em laboratório, quando comparados com os capturados no cam-

po livres de infecção por trematódeos. Esses valores não estão aumentados nos caramujos de campo naturalmente parasitados, ou mesmo nos caramujos experimentalmente infectados com *S. mansoni*.

O número de amebócitos da hemolinfa estava elevado em todos os grupos de moluscos infectados.

Foi observada maior atividade fagocitária dos amebócitos recolhidos dos caramujos parasitados, principalmente dos parasitados por xifidiocercárias.

Na hemolinfa dos vários grupos estudados houve identidade antigênica total. As imunodifusões mostraram ao menos 3 linhas de precipitação, formando 3 sistemas diferentes.

Os resultados obtidos na imunoeletoforese permitem afirmar que existem diferenças qualitativas e quantitativas na hemolinfa dos moluscos parasitados com relação aos não parasitados. As diferenças parecem ter características específicas dependentes do tipo de infecção apresentada.

BALAN, D. de S.L. et al. [Immunological and parasitological aspects of *Biomphalaria tenagophila* infected by *Schistosoma mansoni* and other Digenea]. *Rev. Saúde Pública*, 27: 421-9, 1993. The behavior of *Biomphalaria tenagophila* amoebocytes was studied in infections produced by *Schistosoma mansoni* and other Digenea. The resistance to superinfection was also verified in mixed infections. Data on amoebocyte phagocytic activity, on the number of amoebocytes in hemolymph, and on amoebocyte tissue reactions were obtained and eletrophoretic and imunodiffusion examinations of the hemolymph were carried out. It was concluded that the snails infected with Digenea show resistance to superinfection with *S. mansoni*. Apparently sporocysts are not destroyed by the action of amoebocytes. An increase in amoebocyte phagocytic activity was discovered in infected snails. Immunoeletoforese shows quantitative and qualitative differences in the hemolymph of the infected snails.

**Keywords:** *Biomphalaria*, parasitology. *Schistosoma mansoni*.

## Referências Bibliográficas

1. ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes assay of factors influencing in vitro phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 36: 52-9, 1980.
2. ABDUL-SALAM, J.M. & MICHELSON, E.H. *Schistosoma mansoni*: immunofluorescent detection of its antigen reacting with *Biomphalaria glabrata* amoebocytes. *Exp. Parasitol.*, 55: 132-7, 1983.
3. ANDERSON, R.S. & GOOD, R.A. Opsonic involvement phagocytosis by mollusk hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 27: 57-64, 1976.

\* "Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis".

4. BAILEY, J.B.; MICHELSON, E.H.; PARAENSE, W.L. Differentiation of the sibling species *Biomphalaria occidentalis* and *Biomphalaria tenagophila* by the electrophoretic patterns of their hemoglobin. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81: 319-22, 1986.
5. BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M.; DEWAN, P.C. Macrophagelike hemocytes of redistant *B. glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *S. mansoni* in vitro. *J. Parasitol.*, 66: 413-19, 1980 (a).
6. BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M.; DEWAN, P.C. *S. mansoni* cytotoxicity of hemocytes form susceptible snail hosts for sporocysts in plasma resistant, *B. glabrata*. *Exp. Parasitol.*, 50: 409-13, 1980.
7. BAYNE, C.J.; LOKER, E.S.; YUI, M.A.; STEPHENS, H.A. Immune-recognition of *S. mansoni* primary sporocysts may require specific receptors on *B. glabrata* hemocytes. *Parasite Immunol.*, 6: 519-28, 1984.
8. BAYNE, C.J.; BOSWELL, C.A.; LOKER, E.S.; YUI, M.A. Plasma components which mediate cellular defences in the gastropod mollusc *B. glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.*, 9: 523-30, 1985.
9. BAYNE, C.J.; LOKER, E.S.; YUI, M.A. Interactions between the plasma proteins of *B. glabrata* (Gastropoda) and the sporocyst tegument of *S. mansoni* (Trematoda). *Parasitology*, 92: 653-64, 1986.
10. BAYNE, C.J.; BOSWELL, C.A.; YUI, M.A. Widespread antigenic cross-reactivity between plasma proteins of a gastropod and its trematode parasite. *Dev. Comp. Immunol.*, 11: 321-29, 1987.
11. CHENG, T.C. & SCHOENBERG, D.A. Phagocytic funnel-like pseudopodia in lectin-treated gastropod hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 36: 141-4, 1980.
12. CHENG, T.C. & RIFKIN, E. Cellular reactions in marine molluscs in response to helminth parasitism. *Amer. Fish. Soc.*, 5: 443-96, 1970.
13. CAMPOS, H. *Estatística experimental não paramétrica*. 3ª ed. Piracicaba, Dep. Matemática e Estatística ESALC - USP, 1979.
14. FENG, S.Y. The responses of oysters to the introduction of soluble and particulate materials and factors modifying the response. New Brunswick, N.J., 1962. [Doctoral Thesis - Rutgers University].
15. GRABAR, P. & BURIN, P. *Immuno-electrophoretic analysis*. New York, Elsevier, 1964. p. 3-29, 94-124.
16. GUARALDO, A.M.A.; MAGALHÃES, L.A.; RANGEL, H. de A.; PAREJA, G. Evolução dos esporocistos de *S. mansoni* (Sambon, 1907) em *B. glabrata* (Say, 1818) e *B. tenagophila* (D'Orbigny, 1835). *Rev. Saúde Pública*, 15: 436-48, 1981.
17. JOURDANE, J. & MOUNKASSA, J.B. Topographic shifting of primary sporocysts of *S. mansoni* in *Biomphalaria pfeifferi* as a result of coinfection with *Echinostomas caproni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 48: 269-74, 1986.
18. KNAAP, W.P.W.; MEULEMAN, E.A.; SMINIA, T. Alterations in the internal defenses system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* induced by infection with the schistosomose *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitol. Res.*, 73: 57-65, 1987.
19. LIE, K.J.; HEYNEMAN, D.; YAU, P. Studies on resistance in snails. 6. Escape of *E. lindoense* sporocysts from encapsulation in the snails heart and subsequent loss of the host's ability to resist infection by the same parasite. *J. Parasitol.*, 62: 298-302, 1976.
20. LIE, K.J.; JEONG, K.H.; HEYNEMAN, D. Tissue reactions by *S. mansoni* in *B. glabrata*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 74: 157-66, 1980.
21. LIM, M.K. & HEYNEMAN, D. Intramoluscan inter trematode antagonism: a review of factors influencing the host-parasite system and its possible role in histological control. *Adv. Parasitol.*, 10: 191-268, 1972.
22. LOKER, E.S. & BAYNE, C. In vitro encounters between *S. mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *B. glabrata*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31: 999-1005, 1982.
23. LOKER, E.S. & HERTEL, L.A. Alterations in *B. glabrata* plasma induced by infection with the digenetic trematode *Echinostoma paraensei*. *J. Parasitol.*, 73: 503-13, 1987.
24. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-75, 1951.
25. MACHADO, S.M.P.; CORDEIRO, N.S.; MAGALHÃES, L.A.; ARTIGAS, P.T. Algumas considerações sobre cercárias naturalmente encontradas em *B. tenagophila* capturadas em Louveira, SP. *Mem. Inst. Butantan*, 49: 79-86, 1987.
26. MACHADO, S.M.P.; MAGALHÃES, L.A.; ARTIGAS, P.T.; CORDEIRO, N.S.; CARVALHO, J.F. Verificação de antagonismo entre larvas de *S. mansoni* e larvas de outros digenea em *B. tenagophila* molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP, Brasil. *Rev. Saúde Pública*, 22: 484-8, 1988.
27. MAGALHÃES, L.A. Moluscos planorbídeos do Estado da Guanabara. *Rev. Bras. Biol.*, 24: 277-88, 1964.
28. MAGALHÃES, L.A. Estudo dos dados obtidos de uma população de *B. glabrata* de Belo Horizonte infectada por *S. mansoni* da mesma cidade, e de uma população de *B. tenagophila* infectada por *S. mansoni* de São José dos Campos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 3: 195-6, 1969.
29. MACKIN, J.G. Oyster leukocytes in infections diseases (abstr.). *Am. Zool.*, 1: 371, 1961.
30. MICHELSON, E.H. "Immune" reaction of *S. mansoni* in the snail *Australorbis glabratus*. *J. Insect. Pathol.*, 5: 412-20, 1963.
31. MICHELSON, E.H. Cellular defense mechanisms and tissue alterations in gastropod molluscs. In: Maramorosch, K. & Shope, R. E., ed. *Invertebrate Immunity*. New York, Academic Press, 1975. p. 181-95.
32. OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção do antígeno no linfonódulo. *Summa. Phytop.*, 1: 61, 1975.
33. OUCHTERLONY, O. Difusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy*, 5: 1-78, 1958.
34. PELLEGRINO, J. & MACEDO, D.G. A simplified method for the concentration of cercariae. *J. Parasitol.*, 41: 329-30, 1955.
35. RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F.; FITZGERALD, S.W.; RHODES, C.P. Invertebrate immunity: basic concepts and advance. *Int. Rev. Citol.*, 97: 183-350, 1985.
36. ROSCOE, V.T. *Fundamental research statistics the behavioral sciences*. 2ª ed. New York. Hort. Richard and Winstou. INC, 1975.
37. STANDEN, O.D. Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *S. mansoni* - I. Individual and mass infection of snails and the relationship of infection temperature and season. *Ann. Trop. Med.*, 44: 48-53, 1952.
38. STANISLAWSKI, E.; RENWRANTZ, L.; BECKER, W. Soluble blood group reative substances in the hemolymph of *B. glabrata* (Mollusca). *J. Invertebr. Pathol.*, 28: 301-8, 1976.
39. STUMPE, J.L. & GILBERTSON, D.E. Differential leukocytic responses of *B. glabrata* to infection with *S. mansoni*. *J. Invertebr. Pathol.*, 35: 217-18, 1980.
40. SULLIVAN, J.T.; RICHARDS, C.; LIE, K.J.; HEYNEMAN, D. *Ribeiroia marini*: irradiated miracidia and introduction of acquired resistance in *B. glabrata*. *Exp. Parasitol.*, 53: 17-25, 1982.



41. TRIPP, M.R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, 47: 745-51, 1961.
42. TRIPP, M.R. Hemagglutinin in the blood of the oyster *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.*, 8: 478-84, 1966.
43. TRIPP, M.R. Defense mechanism of mollusks. *J. Retic. Endoth. Soc.*, 7: 173-82, 1970.
44. WEICHSELBAUM, T.E. An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *Am. J. Clin. Pathol. Technol.*, 10: 40, 1946.
45. YOSHINO, T.P. Lectin-induced modulation of snail hemocytes surface determinants: clearance of con a receptor complexes. *Dev. Comp. Immunol.*, 6: 451-61, 1982.

Recebido para publicação em 25.3.1993

Reapresentado em 8.9.1993

Aprovado para publicação em 20.9.1993