



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

Roberta Agostini Rohr

**CARACTERIZAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E LOCAL DE FORMAÇÃO DOS
HEMÓCITOS EM *Bradybaena similaris* (FÈRUSSAC, 1821) E
Megalobulimus abbreviatus (BEQUAERT, 1948), (MOLLUSCA,
STYLOMMATOPHORA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia Comparada
Orientadora: Profa. Dra. Suzana Bencke Amato

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PORTO ALEGRE
2013

**CARACTERIZAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E LOCAL DE FORMAÇÃO DOS
HEMÓCITOS EM *Bradybaena similaris* (FÈRUSSAC, 1821) E
Megalobulimus abbreviatus (BEQUAERT, 1948), (MOLLUSCA,
STYLOMMATOPHORA)**

Roberta Agostini Rohr

Aprovada em _____ de _____ de _____.

Dra. Cláudia Calegari Marques

Dra. Inga Ludmila Veitenheimer Mendes

Dra. Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo

Agradecimentos

*À pesquisadora e malacologista Ingrid Heydrich, do Museu de Ciências Naturais, da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, pelos espécimes de *Megalobulimus abbreviatus* cedidos e os protocolos utilizados na histologia. Minha professora querida de Sistemática, Zoologia de invertebrados... à pessoa que me iniciou e incentivou no mundo dos gastrópodes... a qual tenho muito carinho, respeito, admiração e orgulho de chamar de amiga.*

À minha orientadora Dra. Suzana Bencke Amato, pelo carinho, confiança e atenção dispensados ao longo desses dois anos de mestrado.

Ao Dr. José Felipe Amato, do Laboratório de Helminologia, Instituto de Biociências, UFRGS, pelo auxílio na obtenção das fotomicrografias dos hemócitos e seus ensinamentos sempre bem vindos.

Aos Drs. Jorge Ernesto de Araújo Mariath e Rinaldo Pires dos Santos, do Laboratório de Anatomia Vegetal, Instituto de Biociências, UFRGS, pela permissão de uso do microscópio Leica DMR Hc, para fazer as fotomicrografias em DIC. E a técnica Juliana Troleis, que muito me auxiliou nas fotomicrografias.

Ao Dr. Luciano Moura, pelo incentivo e colaboração.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação de Zoologia Dr. Luis Alexandre, pela oportunidade de lecionar.

À Circe Machado do laboratório de histologia, pelos cortes e atenção.

Aos alunos de iniciação científica que passaram pelo Laboratório de Helminologia, em especial à Débora Souza, Lucas Casagrande, Lyssa Rocha e Fabricio Monticelli...

Aos meus colegas de Laboratório, todos sempre muito parceiros, atenciosos, alegres, etc. Em especial à Dr.^a Cláudia Marques, que sempre me auxiliou muito, possibilitando inclusive, que meus colegas e eu tivéssemos acesso a bibliografias de difícil acesso, muito obrigada... à doutoranda Viviane dos Santos, sempre alegre e disposta a ajudar... à doutoranda Samantha Seixas, que

muitas vezes me auxiliou, ensinou, etc. Essas meninas sempre foram muito parceiras, tanto dentro do Laboratório, como fora dele... levo vocês no meu coração!

Ao meu colega, o mestrando Pedro Carvalho Neto, que sempre ajudou na coleta de serapilheira, entre outras coisas... Ao mestrando Tiago Silveira, que também me auxiliou na coleta de serapilheira, e ao mestrando Moisés Gallas.

À secretária do programa de Pós-Graduação de Zoologia, Ana Paula Batista, que sempre foi muito atenciosa e prestativa.

À todos os colegas que entraram comigo no mestrado em 2011, cujo sonho dividíamos....

Ao Diego Accioly Corrêa, pelo amor e paciência.

Aos meus pais e irmã, que sempre estiveram ao meu lado torcendo.

Aos meus sogros, pelo apoio.

E a CAPES, pela bolsa concedida para a realização do mestrado.

*“A ciência é feita de erros, mas de erros que levam,
pouco a pouco, à verdade”.*

Júlio Verne (1828-1905)

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Resumo	vi
1. Introdução.....	1
1.1. Mollusca.....	1
1.2. Sistema de defesa.....	3
1.3. Hemócitos.....	4
1.4. Coração.....	5
1.5. Estudos dos hemócitos em gastrópodes.....	6
1.6. Tecido hematopoiético	10
1.7. Espécies utilizadas no estudo	12
1.8. Justificativa	13
2. Objetivo geral	15
2.1. Objetivos específicos	15
3. Material e Métodos	16
3.1. Coleta dos gastrópodes utilizados no estudo.....	16
3.2. Manutenção dos gastrópodes utilizados no estudo.....	16
3.3. Diferenciação de jovens e adultos	17
3.4. Coleta e preparação dos hemócitos.....	19
3.5. Câmara de Neubauer ou Hemocitômetro.....	20
3.6. Histologia do tecido hematopoiético	21
3.7. Análise estatística.....	23
4. Resultados	24
4.1. Morfologia dos hemócitos	24

4.1.1. <i>Megalobulimus abbreviatus</i>	24
4.1.2. <i>Bradybaena similis</i>	29
4.2. Densidade dos hemócitos e Análise estatística	34
4.2.1. <i>Megalobulimus abbreviatus</i> e <i>Bradybaena similis</i>	34
4.3. Tecido hematopoiético de <i>Megalobulimus abbreviatus</i> e <i>Bradybaena similis</i>	39
5. Discussão	45
5.1 Hemócitos.....	45
5.2 Tecido hematopoiético	51
6. Considerações finais	54
7. Referências bibliográficas.....	56

Resumo

Os hemócitos atuam no sistema de defesa contra organismos invasores, ajudam a reconhecer o que é próprio e o que é não próprio no corpo dos gastrópodes. Os hemócitos são originados em um agrupamento de células especiais (hemócitos primários), denominadas de tecido hematopoiético. O objetivo deste trabalho foi caracterizar, identificar e quantificar os hemócitos presentes na hemolinfa de duas espécies de gastrópodes (*Bradybaena similaris* e *Megalobulimus abbreviatus*), descrever morfologicamente o órgão hematopoiético de ambas as espécies, e observar as diferenças existentes entre os gastrópodes jovens e adultos. Os gastrópodes utilizados no estudo eram provenientes dos municípios de Canoas (*B. similaris*) e de Barra do Ribeiro (*M. abbreviatus*), Rio Grande do Sul, e foram mantidos em laboratório ao longo do estudo. A coleta da hemolinfa foi realizada diretamente da cavidade renopericárdica; as células foram coradas com Giemsa, o que possibilitou a identificação de três tipos celulares (células redondas, hialinócitos e granulócitos) na hemolinfa de ambas as espécies, em jovens e adultos. As células em maior número na hemolinfa foram os hialinócitos, seguidas pelas células redondas e pelos granulócitos. A densidade média de células por ml, sem distinção de tipo celular foi calculada com o auxílio da câmara de Neubauer, sendo para adultos da espécie *M. abbreviatus* o valor de 214.000 células/ml, e para os jovens 170.833 células/ml. Para *B. similaris* os valores médios foram de 506.000 células/ml em adultos, e 326.667 células/ml em jovens. Os três tipos de hemócitos foram medidos, e foi calculada a média para

cada um deles. Foram realizados testes estatísticos (teste D'Agostinho, teste t de Student e o teste de Mann-Whitney), para observar se existiam diferenças significativas entre o tamanho dos tipos de hemócitos (células redondas, hialinócitos e granulócitos) entre os indivíduos jovens e adultos de ambas as espécies. Os testes demonstraram que existia uma diferença significativa ($p=0,0331$) entre o tamanho dos granulócitos de *B. similis*, de indivíduos jovens e adultos. A identificação do tecido hematopoiético foi realizada com cortes histológicos seriados, corados com hematoxilina e eosina. O tecido estava presente em na região renopericárdica, próximo ao ventrículo e à aurícula, dentro do saco pericárdico. Se apresentava, em banda simples de hemócitos primários, sem forma muito definida. A espessura do tecido variou entre as espécies, de 125 a 138 μm para indivíduos adultos e 70 a 120 μm para jovens de *M. abbreviatus*, e de 150 a 162 μm para indivíduos adultos e 50 a 70 μm para jovens de *B. similis*. Seu aspecto geral do foi bastante uniforme, como a presença de hiperplasia no tecido hematopoiético apenas em adultos de *B. similis*. De modo geral, não foram observadas muitas diferenças entre a morfologia dos tipos de hemócitos e do tecido hematopoiético de jovens e adultos, de ambas as espécies.

1. Introdução

1.1. Mollusca

Mollusca é um filo monofilético muito antigo de invertebrados, que data antes do Cambriano (KAY 1995; BARKER 2001). Possui cerca de 70.000 espécies fósseis, e 130.000 atuais, mas sua real diversidade pode estar em torno de 200.000 espécies (HASZPRUNAR *et al.* 2008). Os moluscos constituem um grupo muito diverso, na sua morfologia, anatomia, ecologia e fisiologia, por isso, sua filogenia e classificação em nível superior tem sido controversa desde o início das investigações comparativas (BARKER 2001). Segundo HASZPRUNAR *et al.* (2008), Mollusca além de ser importante para os humanos como alimento, arte, jóias, pragas e vetores de doenças, também desempenham um importante papel como organismos modelos na ciência, especialmente em neurobiologia e biologia evolutiva. Além disso, como é praticamente desconhecido para o grande público (e para muitos conservacionistas), este grupo está entre os mais ameaçados pela humanidade (6.183 espécies, segundo lista vermelha de 2012 elaborada pela IUCN). De acordo com PONDER & LINDBERG (2008), são reconhecidas sete ou oito classes de moluscos viventes: Aplacophora (que pode ser subdividida em Caudofoveata (=Chaetodermomorpha) e Solenogastres (=Neomeniomorpha)), Polyplacophara, Monoplacophora, Bivalvia, Scaphopoda, Cephalopoda e Gastropoda.

Gastropoda é a maior classe dentro de Mollusca, com 80% das espécies viventes. A estimativa do número total de espécies de gastrópodes vivos é de pelo menos 40.000 e, talvez mais do que 150.000; com cerca de 13.000 gêneros nomeados (BARKER 2001; CHASE 2002). Na classificação tradicional, Gastropoda é subdividida em três subclasses: Prosobranchia, Opisthobranchia e Pulmonata (LINDBERG *et al.* 2004). Os prosobrânquios são representados pelas lapas, lesmas, moluscos marinhos e de água doce, e alguns de vida terrestre. Podem ser encontrados em ambientes extremos, como fontes hidrotermais (GEIGER *et al.* 2008; LINDBERG 2008). Os opistobrânquios são gastrópodes com conchas com forma redonda, lebres do mar e lesmas do mar, quase todos são marinhos. Este grupo é composto de aproximadamente 6.000 espécies (WÄGELE *et al.* 2008). Os pulmonados incluem a grande maioria de caracóis e lesmas terrestres, assim como muitos caracóis de água doce e poucas famílias marinhas. Estima-se que existam entre 25.000 e 30.000 espécies de pulmonados (MORDAN & WADE 2008).

Entre os grupos atualmente incluídos em Pulmonata está Stylommatophora, que representa cerca de 95% de todas as espécies de caracóis e lesmas terrestres (MORDAN & WADE 2008). No grupo dos estilomatóforos a cavidade do manto é revestida com vasos sanguíneos para as trocas gasosas, e por uma única passagem estreita, o pneumostômio, há comunicação com o meio externo, que pode fechar ou abrir, se necessário, a cavidade do manto, reduzindo evaporação de água. Esta característica capacita os gastrópodes a explorar diretamente o ar como fonte de oxigênio (CHASE 2002). Além disso, este grupo se caracteriza por ter um corpo tipicamente com cabeça, pé e massa visceral, coberto com um pálio ou manto

que normalmente secreta a concha (ou, mais raramente, espículas), apesar deste ter sido perdido em alguns grupos. Há um pé ventral utilizado na locomoção através de ondas musculares ou cílios em combinação com muco. Larvas, trocófora ou véliger, são encontradas em muitos táxons aquáticos, mas o desenvolvimento direto também é comum (LINDBERG *et al.* 2004). Os gastrópodes pulmonados estão adaptados a uma grande variedade de ambientes (habitats terrestres, marinhos que vão desde as mais profundas bacias oceânicas até o supralitoral, bem como em ecossistemas de água doce), apresentando grande diversidade na anatomia interna e externa, no comportamento e na fisiologia (AKTIPIS *et al.* 2008).

1.2. Sistema de defesa

Os moluscos possuem um sistema de defesa diferenciado, mas comum em todo o grupo (BAYNE 1983; KLEIN 1989). O sistema de defesa é capaz de perceber pequenas diferenças, do que é próprio e o que não é. Este sistema de defesa é composto por um mecanismo humoral, que inclui proteínas efetoras, tais como: peptídeos antimicrobianos, fenoloxidase e lisozima. As proteínas efetoras atuam na primeira linha de defesa, são sintetizadas basicamente nos hemócitos e armazenadas em seus grânulos (BACHÈRE *et al.* 2004). Também faz parte desse sistema de defesa interno, um mecanismo celular, constituído por hemócitos e fatores solúveis da hemolinfa. Os fatores solúveis encontrados na hemolinfa de moluscos incluem aglutinas, opsoninas, enzimas, inibidores enzimáticos e substâncias imobilizadoras de miracídios. A imunidade humoral é

mediada por lectinas, que são proteínas sintetizadas por hemócitos, com afinidade específica a carboidratos (ZELK *et al.* 1995). Os fatores solúveis da hemolinfa e os hemócitos agem juntos na destruição de material estranho ao corpo (BOULANGER *et al.* 2006).

1.3. Hemócitos

Os hemócitos podem estar livres (circulantes na hemolinfa), ou fixos nos tecidos. Destacam-se na defesa, mobilizam-se em direção às regiões onde aparecem as formas parasitárias, acumulando-se ao seu redor, atacando, formando cápsulas e/ou complexos encapsulantes para a inativação e absorção dos parasitos (LIE *et al.* 1975; JEONG *et al.* 1983). Possuem também, como função, fazer reparação tecidual, limpar a hemolinfa e o tecido conjuntivo fagocitando partículas estranhas ou encapsulando material estranho e sintetizam fatores para a defesa humoral. Como o sistema circulatório dos gastrópodes é aberto, os hemócitos podem se mover livremente para dentro e para fora dos tecidos (VAN DER KNAAP & LOKER 1990).

O primeiro relato sobre os hemócitos dos gastrópodes, abordando o sistema de defesa dos moluscos, provavelmente foi realizado por LEYDIG (1850). O autor observou a existência de corpúsculos nucleados, que podiam apresentar pseudópodes. Em 1891, CUÉTON observou que as células presentes na hemolinfa constituíam-se apenas em um tipo de amebócito (termo utilizado no passado para os hemócitos) com diferentes tipos de grânulos refringentes, variáveis em números e em cores (verdes, amarelos e marrons), em diferentes

espécies, e às vezes contendo produtos de reserva. Em suas figuras evidenciou células do tipo linfóide, que categorizou como células degeneradas (células granulares que tinham perdido os seus grânulos). KOLLMANN (1908) identificou dois tipos de leucócitos: células com uma pequena quantidade de citoplasma hialino em torno de um núcleo esférico, as quais chamou fase I, considerando como forma primitiva da fase II, e que se desenvolvia através da aquisição de mais citoplasma e núcleos polimórficos. As células de ambas as fases (I e II) eram muito fagocitárias. GEORGE & FERGUSON (1950), observaram três tipos distintos de células e fragmentos celulares, em *Busycon carica* Gmelin, 1791; *B. canaliculatum* Linnaeus, 1758 e *Fasciolaria tulipa* (Linnaeus, 1758). Caracterizando-as da seguinte maneira: células linfóides, com pouco citoplasma e não abundantes; macrófagos granulares, com grande quantidade de grânulos finos no citoplasma, e podiam desenvolver pseudópodes; amebócitos granulares eosinofílicos, com o citoplasma repleto de grânulos bem definidos de tamanho aproximadamente uniforme; e por fim, fragmentos celulares, os mais visíveis, com vacúolos globulares. Também, mostraram que os hemócitos dos caracóis que tiveram contato com miracídios eram mais largos, quando comparado com células normais (que não tiveram contato com miracídios).

1.4. Coração

Segundo JONES (1983), o coração dos gastrópodes possui um ventrículo e uma aurícula, que recebem hemolinfa oxigenada do órgão respiratório. A

hemolinfa sai do ventrículo através de uma ou duas artérias, que se dividem em artéria cefálica e visceral. O coração possui um epicárdio e as fibras musculares estão ligadas internamente, não há endocárdio. Em ventrículos mais musculares, as fibras musculares são organizadas como trabéculas, que funcionam através do lúmen. Esta disposição permite a ocorrência de espessamento, isso ocorre de tal forma que todas as fibras são perfundidas com hemolinfa, assim, uma circulação coronária é desnecessária.

1.5. Estudos dos hemócitos em gastrópodes

Os estudos sobre hemócitos de gastrópodes são baseados principalmente nos gêneros *Lymnaea* Lamarck, 1799 e *Biomphalaria* Preston, 1910.

MÜLLER (1956), SMINIA (1972), SMINIA *et al.* (1981), SMINIA *et al.* (1983), DIKKEBOOM *et al.* (1985a), DIKKEBOOM *et al.* (1985b) e SURESH *et al.* (1994), descreveram para *Lymnaea*, um tipo celular presente na hemolinfa, e chamaram estas células de hemócitos. Os hemócitos foram divididos em dois subtipos: os hialinócitos e os granulócitos (antigamente nomeados de amebócitos). Os granulócitos, podem ser distinguidos em até quatro subtipos. São eles: as células normais com forma redonda ou oval, podendo apresentar um ou mais pseudópodes; os leucócitos, que se caracterizariam por ser a fase em que as células normais possuem movimento amebóide; as células pequenas que podem surgir pela ruptura das células normais; e as células vagantes que podem ser células fagocitárias normais. SMINIA *et al.* (1983),

levou em consideração apenas um tipo de hemócito, mas esse, expressava variações morfológicas correspondentes a diferentes estágios de maturidade destas células. Portanto, as células jovens eram arredondadas e apresentavam uma grande atividade mitótica. As células maduras tinham prolongamentos citoplasmáticos e pouca atividade mitótica e eram mais ativas na fagocitose. RUSSO & LAGADIC (2004) observaram para *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), dois tipos de hemócitos distintos morfolologicamente, designados como: células redondas e granulócitos. As células redondas com núcleo esférico e central, com poucos grânulos citoplasmáticos. Os granulócitos foram caracterizados como grandes células irregulares com projeções citoplasmáticas longas e filamentosas, com muitos grânulos citoplasmáticos.

JOENG & HEYNEMAN (1976), estudaram o comportamento e a morfologia dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Observaram a presença de apenas um tipo de hemócito presente na hemolinfa, os granulócitos. Estes, variavam quanto ao tamanho e a concentração dentro da hemolinfa. HUMPHRIES & YOSHINO (2003), através da análise de citometria de fluxo da hemolinfa de *B. glabrata* e *Planorbarius corneus* (Linnaeus, 1758), dividiram a população de hemócitos em duas subpopulações, que diferiram em tamanho, e na quantidade de grânulos presentes no citoplasma. As células pequenas representavam as células redondas, e o restante, os granulócitos.

HARRIS (1975), YOSHINO (1976), CHENG & GUIDA (1980), LOVERDE *et al.* (1982) e BARRACO *et al.* (1993) distinguiram na hemolinfa de *Biomphalaria*, dois tipos de hemócitos: os granulócitos e os hialinócitos. Os hialinócitos apresentavam contorno circular, pouca tendência de formar pseudópodes e pouca estrutura lisossomal e, além disso, representavam menos que 10% dos

hemócitos em circulação (BARRACO *et al.* 1993). Segundo JEONG *et al.* (1983), eles não eram evidentes no tecido hematopoiético (tecido produtor de hemócitos). Os granulócitos formavam pseudópodes, eram ativos na fagocitose e representavam mais de 90% das células circulantes (BARRACO *et al.* 1993; BEZERRA *et al.* 1997). JOKY *et al.* (1983) fizeram distinção de quatro tipos de hemócitos através de diferenças morfológicas e da capacidade, ou não, de expressar receptores de lectinas na superfície celular em *B. glabrata*. MATRICON-GONDRAN & LETOCART (1999), também com *B. glabrata*, levaram em consideração o tamanho das células e características ultraestruturais, e reconheceram três tipos de células: grandes hemócitos assimétricos, com numerosas mitocôndrias e agregados de glicogênio; hemócitos de médio porte, pobres em glicogênio e organelas; e os hemócitos de pequeno porte, com organelas e alguns grânulos densos, mas todos com capacidade fagocitária.

OTTAVIANI (1992) sugeriu a existência de dois tipos de hemócitos circulantes para *P. corneus*, os estrelados e os arredondados. Os hemócitos estrelados caracterizavam-se por emitirem pseudópodes e apresentar atividade fagocitária, e os hemócitos arredondados não apresentavam atividade fagocitária. O autor sugeriu ainda, que os hemócitos arredondados apresentavam características semelhantes as de linfócitos T de vertebrados, enquanto que os estrelados assemelhavam-se aos macrófagos.

VAN DER KNAAP & LOKER (1990) registraram a existência de quatro tipos diferentes de células de defesa em gastrópodes, em geral, representados por células não circulantes e células circulantes. Três tipos de células foram caracterizadas como não circulantes: as células endoteliais bloqueadoras de antígenos que impediam a disseminação de microrganismos; as células

reticulares que possuíam uma alta capacidade de endocitar partículas de material estranho ao corpo e estavam presas aos tecidos por fibrilas extracelulares, e as células do poro que estavam ligadas às células reticulares e caracterizavam-se por apresentar um papel seletivo na endocitose de proteínas. As células circulantes, denominadas de hemócitos caracterizavam-se por apresentar maior capacidade de defesa e por circularem livremente pelos tecidos. Os hemócitos podiam exibir diferentes morfologias, podendo ser classificados como células redondas ou hialinócitos, quando possuísem um grande núcleo no citoplasma, algumas estruturas lisossomais, pseudópodes e fagocitose. Outro tipo, são os granulócitos que possuíam mais citoplasma e lisossomos, que estendiam facilmente os pseudópodes, e com atividade fagocitária fundindo fagossomos com lisossomos.

Mais recentemente, CAVALCANTI *et al.* (2012), trabalhando com as espécies *B. glabrata* e *B. straminea* (Dunker, 1848), caracterizaram três tipos (sendo um deles subdividido em três morfotipos) de hemócitos circulantes. As 'blast-like cells', células com perfil esférico, com grande núcleo localizado centralmente que ocupava quase toda a célula. Os granulócitos que possuíam um perfil circular para fusiforme, preenchidos com um número variável de grânulos basófilos, que diferiam em número e distribuição dentro da célula (periferia ou centro), e com projeções citoplasmáticas (pseudópodes - tipo filopódio). E os hialinócitos, que foram divididos em três tipos: o Tipo I: com perfil polimórfico, núcleo localizado numa posição central ou um pouco deslocado, também foi observado células com dois núcleos, sugerindo uma divisão celular atípica; Tipo II: caracterizados por serem células ovais, com núcleo excêntrico e citoplasma homogêneo; e Tipo III: com perfil redondo/oval,

caracterizados por um grande núcleo esférico, que podia ser central ou excêntrico, com citoplasma homogêneo e com projeções citoplasmáticas. Assim, através da revisão bibliográfica observamos que os hemócitos exibem heterogeneidade de morfologia e bioquímica, e seu significado funcional continua a ser debatido.

1.6. Tecido hematopoiético

BAECKER (1932) afirmava ser desconhecido o local de formação dos hemócitos em gastrópodes. HAUGHTON (1934), indicou os espaços sanguíneos como o centro de origem destas células. Segundo PAN (1958) os possíveis sítios de produção dos hemócitos seriam os sinusóides sanguíneos e a parede da porção sacular do rim, os quais formam a porção sacular do pericárdio. Essa parede da porção sacular do rim seria composta por tecido linfóide, e o autor a considerava como possível tecido hematopoiético. Com isso, dependendo da espécie de gastrópode, áreas específicas do tecido conjuntivo foram consideradas como ponto de formação dos hemócitos e, portanto chamadas de órgão hematopoiético ou tecido hematopoiético (TH). No mesmo trabalho, PAN (1958) sugeriu que o TH de *Biomphalaria glabrata* (Say, 18181) = *Australorbis glabratus* Say, 1818, era formado no tecido linfóide localizado na parede do rim e nos sinus sanguíneos, mas isso em condições normais (sem infecção). O TH também já foi identificado em *B. glabrata* e *Bulimus* sp., localizando-se entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto (KINOTI 1971; LIE *et al.* 1975; JEONG *et al.* 1983). Para a espécie *L. stagnalis*, foi

registrada a formação do TH no tecido conjuntivo, particularmente na cavidade palial (também, chamada de pulmão) (MÜLLER 1956). SMINIA (1974), também para *L. stagnalis*, afirmava não ser definido o local de formação dos hemócitos (o tecido hematopoiético) e que a produção de hemócitos acontecia ao longo do tecido conjuntivo e do sistema vascular. Já para *L. truncatula* Müller, 1774 o TH estava localizado entre o pericárdio e o rim, com a extremidade anterior afilada na direção do ducto conectivo dos túbulos renais e o pericárdio; a extremidade posterior possuía limites indefinidos com o tecido conjuntivo adjacente (RONDELAUD & BARTHE 1981; RUELLAN & RONDELAUD 1992). Não há registro da localização deste tecido em outras espécies, e em espécies de gastrópodes terrestres.

Segundo KINOTI (1971) e JEONG *et al.* (1983), o tecido hematopoiético caracteriza-se como uma estrutura pequena e superficial, formada por poucos hemócitos primários com núcleos que podem variar de oval a alongados. Encontram-se entre células epiteliais próximas do pericárdio e da membrana posterior da cavidade do manto, com poucas ou sem células em divisão. Localiza-se em um retículo frouxo formado por músculos lisos e algumas células fibroblásticas. Em contato com miracídios ocorrem mudanças morfológicas significativas no tecido hematopoiético. Aparece uma grande quantidade de hemócitos primários e secundários, e muitos sofrem mitose. Quando ativo, o TH fica indistintamente maior (resultado da hiperplasia ou hipertrofia), com massas celulares livres e organizadas em zonas de progressiva maturação, com atividade mitótica bem evidente.

1.7. Espécies utilizadas no estudo

Bradybaena similis (Bradybaenidae), é um molusco terrestre, natural do sudeste da Ásia e que está amplamente distribuído nas regiões tropicais, disseminado pelo comércio de plantas. Ocorre na América do Norte, Central e do Sul; no Brasil é encontrado em praticamente todos os estados (ALMEIDA & BESSA 2001). Pode ser facilmente encontrado em substratos que retenham a umidade e que os protejam contra predadores, e com acesso à alimentação (ARÉVALO *et al.* 2006). É resistente a variações ambientais, apresentando capacidade de estivação durante condições desfavoráveis de temperatura e umidade, e colonizando novamente o local, quando as condições se tornam mais favoráveis (FERREIRA *et al.* 2010). É considerado como praga agrícola de espécies de hortaliças (PICORAL & THOMÉ 1989; ALMEIDA & BESSA 2001), além de possuir grande interesse parasitológico, atuando como hospedeiro intermediário de helmintos de interesse médico/veterinário, como de *Eurytrema coelomaticum* Giard & Billet, 1882 (PINHEIRO & AMATO 1995), *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923 (DUARTE 1980; AMATO & BEZERRA 1989) e de *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 (AMATO & BEZERRA 1992; RAMBO *et al.* 1997) e *A. cantonensis* (Chen, 1935) (JAUME *et al.* 1981; CALDEIRA *et al.* 2007; CARVALHO *et al.* 2012).

Megalobulimus abbreviatus é uma espécie de pulmonado estilomatóforo sul-americano, encontrado com frequência na Mata Atlântica, em ambiente geralmente úmido, onde pode permanecer enterrado se a umidade do ar se tornar muito baixa (LEME 1973). São mais ativos durante a noite e também

durante o dia, em situações de umidade do ar relativamente alta. Pertencem à família Megalobulimidae (monofilética), com 62 espécies listadas para o Brasil e apenas cinco presentes no Rio Grande do Sul (SIMONE, 2006). A citação da espécie *M. globosus* (Martens, 1876) para o Rio Grande do Sul, talvez não esteja correta (Ingrid Heydrich, comunicação pessoal, 2010). Uma dessas espécies (*M. proclivis* (Martens, 1888)) está presente na Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção, na categoria 'criticamente em perigo', e na Lista das Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul, na categoria 'em perigo' (MARQUES *et al.* 2002; MANSUR *et al.* 2003). E, segundo TEIXEIRA *et al.* (1993), existe a possibilidade de *M. abbreviatus* fazer parte do ciclo de vida do nematóide *A. costaricensis*. Tornando este gastrópode, com importância médico/veterinária.

1.8. Justificativa

A base do conhecimento imunológico dos moluscos é tirada das pesquisas feitas, sobretudo, com os gastrópodes da espécie *B. glabrata* infectado com *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 e com *Echinostoma paraensei* Lie & Basch, 1967. E, de *L. columella* (Linnaeus, 1758), *L. stagnalis* e *L. trunculata* Müller, 1774, infectadas com *Trichobilharzia ocellata* (La Vallette, 1854), ou ainda com *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (NEGRÃO-CORRÊA *et al.* 2007; ARAQUE *et al.* 2003; NODA 1992; DIKKEBOOM *et al.* 1985 a); RONDELAUD & BARTHE, 1981). No Brasil, foram realizados alguns estudos com hemócitos, mas, a maioria destes refere-se a espécies de *Biomphalaria* sob

condições, ou não, de infecção (BARBOSA *et al.* 2006; BEZERRA *et al.* 2003; BEZERRA *et al.* 1997; CAVALCANTI *et al.* 2012; SANTOS *et al.* 2011; SANTOS & DINIZ 2009). Estudos envolvendo o sistema imunológico dos moluscos, são importantes, principalmente porque não existem e/ou são poucos os trabalhos com *Bradybaena similaris* (Fèrussac, 1821) e *Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948), espécies utilizadas no estudo em questão. Também é importante o conhecimento dos hemócitos de caracóis não infectados, para que em futuros estudos, seja possível avaliar a ação do parasitismo sobre o sistema de defesa do hospedeiro. Existem algumas lacunas na caracterização, quantificação, função e estrutura das células de defesa em gastrópodes. Não existe concordância entre o número e os tipos celulares nestes animais. O tecido hematopoiético das espécies deste estudo não está bem caracterizado, ou inexistem informações sobre tal tecido. Sua melhor caracterização poderá auxiliar o entendimento do seu funcionamento.

2. Objetivo geral

Caracterizar os hemócitos dos gastrópodes *Bradybaena similaris* e *Megalobulimus abbreviatus*.

2.1. Objetivos específicos

1. Descrever morfologicamente os hemócitos encontrados, com microscopia óptica.
2. Avaliar o número de hemócitos na hemolinfa circulante e o percentual de cada um dos tipos identificados em moluscos jovens e adultos.
3. Localizar e descrever o tecido hematopoiético dos moluscos estudados, através de estudo histológico, relacionando sua estrutura à indivíduos jovens e adultos.

3. Material e Métodos

3.1. Coleta dos gastrópodes utilizados no estudo

Os indivíduos da espécie *B. similaris* (Figs. 1-2), foram coletados no município de Canoas, RS, em uma propriedade particular. As coletas ocorreram em dois finais de semana de outubro de 2011, e em um final de semana de junho e outro em julho de 2012, para a manutenção da população em laboratório (substituição dos gastrópodes mortos). Foram feitas buscas ativas embaixo de pedras e telhas, e na vegetação. Os indivíduos de *M. abbreviatus* (Figs. 3-4), procedentes do município de Barra do Ribeiro, RS, foram cedidos pelo Museu de Ciências Naturais, da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, RS.

3.2. Manutenção dos gastrópodes utilizados no estudo

Os moluscos foram mantidos em condições ambientais não controladas, no Laboratório de Helminologia, no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Os gastrópodes foram acondicionados em caixas plásticas (26 cm x 17,7 cm x 8,5 cm ou 20 cm x 20 cm x 10 cm) com substrato de serrapilheira (cerca de 2 cm de espessura) e um recipiente plástico com água, para manter a umidade e suprir suas

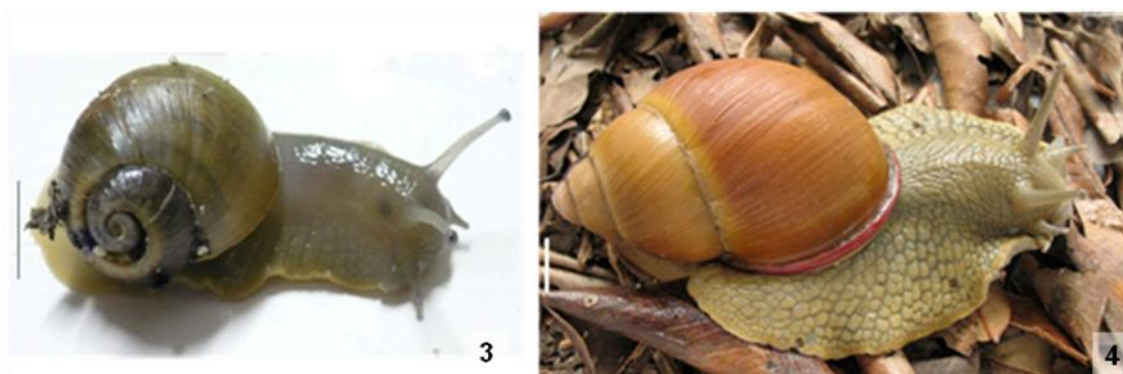
necessidades hídricas. A alimentação consistiu, basicamente, em folhas de couve. A limpeza, troca de água e alimentação foram realizadas em intervalos de um dia. Quando necessário, eram recolhidos os moluscos mortos, e os mesmos foram fixados em etanol 70° GL. Os ovos produzidos pelos gastrópodes cultivados em laboratório, foram transferidos para uma caixa plástica menor (13,5 cm x 13,5 cm x 8,5 cm), com serrapilheira e um recipiente com água. A troca da serrapilheira foi realizada com intervalo máximo de 15 dias, dependendo das condições das caixas em que os moluscos se encontravam. As medidas dos gastrópodes foram realizadas no momento dos procedimentos, com auxílio de um paquímetro.

3.3. Diferenciação de jovens e adultos

Os gastrópodes da espécie *B. similaris* foram considerados jovens quando a concha apresentava um diâmetro $\leq 3,5$ mm (ALMEIDA & BESSA 2001). Espécimes de *M. abbreviatus*, foram considerados adultos após seis meses e meio da data de eclosão (Ingrid Heydrich, dados não publicados 2011).



Figuras 1-2. (1) Espécime de *Bradybaena similaris*, procedente do município de Canoas, RS. Barra=1cm. (2) Postura realizada pelos indivíduos da espécie *Bradybaena similaris* em laboratório. Barra=1cm.



Figuras 3-4. (3) Indivíduo jovem de *Megalobulimus abbreviatus*. Barra=1,5cm. (4) Indivíduo adulto de *Megalobulimus abbreviatus*. Barra=3cm. Ambos espécimes procedentes do município de Barra do Ribeiro, RS.

3.4. Coleta e preparação dos hemócitos

Amostras de hemolinfa foram coletadas, diretamente, da cavidade pericárdica de 18 indivíduos adultos e 17 jovens de *M. abbreviatus*, e 14 indivíduos adultos e 13 jovens de *B. similis*, nascidos em laboratório. Para a coleta utilizou-se seringas estéreis Plastipak B-D, 1 ml de capacidade, com agulhas microfinas II. Foi feito um pequeno orifício nas conchas, previamente limpas com etanol 70° GL, sobre a região pericárdica para permitir a introdução da agulha. Foi coletado 0,1 ml de hemolinfa por molusco, diluída na própria seringa, com solução salina fisiológica 0,65% até completar o volume de 0,5 ml. A hemolinfa foi então colocada sobre uma lâmina biológica para microscopia, previamente identificada com o número do espécime e espécie, e colocada em uma câmara úmida (placa de petri 12 mm de diâmetro com um pedaço pequeno de algodão embebido em água), onde permaneceu por cerca de 20 a 30 minutos para a formação de uma monocamada de células, de acordo com a técnica usada por FORD *et al.* (1993). Após a drenagem do sobrenadante, a lâmina foi removida da câmara úmida, e os hemócitos foram fixados com metanol absoluto, por cerca de 10 minutos. A coloração foi feita com Giemsa (diluído em água tamponada, na proporção de 1:9), por 30 a 35 minutos (CARNEIRO & DAEMON 2002; CARNEIRO & DAEMON 1997; HUMASON 1972). As amostras de hemolinfa foram analisadas com microscopia óptica e os diferentes tipos de hemócitos foram descritos com auxílio de literatura (DIKKEBOOM *et al.* 1984; 1985b; DIKKEBOOM *et al.* 1985a; CAVALCANTI *et al.*

2012). Os hemócitos foram fotomicrografados ao microscópio Leica DMR Hc, com contraste de interferência diferencial de Nomarski (sigla em inglês DIC).

3.5. Câmara de Neubauer ou Hemocitômetro

Para avaliar o número total de hemócitos por ml dos moluscos (densidade média), foi utilizada a câmara de Neubauer, também conhecida como hemocitômetro, que consiste de uma lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, com marcações ao quadrantes, de medidas conhecidas (NODA & LOKER 1989). A contagem diferenciada dos hemócitos foi realizada em 20 campos ópticos escolhidos ao acaso, em microscópio. As lâminas com a hemolinfa foram observadas logo após a coleta do material, e após 20 minutos de repouso, para observar as diferenças existentes entre as células encontradas. A densidade dos hemócitos foi calculada utilizando a fórmula de FORD *et al.* (1993):

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ hemócitos}}{\text{Hemolinfa ml}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de hemócitos contados}}{\text{N}^\circ \text{ de campos contados}} \times \frac{\text{Área da câmara (mm}^2\text{)}}{\text{Área do campo (mm}^2\text{)}} \times \frac{1}{\text{Vol. de hemolinfa (ml)}}$$

3.6. Histologia do tecido hematopoiético

Os indivíduos utilizados na histologia foram escolhidos pelo seu *status* de maturidade, dois jovens, e dois adultos de cada espécie. Separados em uma caixa sem serrapilheira, por no mínimo 24 horas, antes dos procedimentos, para que houvesse a limpeza do trato intestinal. Os moluscos foram colocados em um vidro com tampa, com água e cristais de mentol em ambiente refrigerado por \pm 24 horas (indivíduos pequenos), e \pm 48 horas, para indivíduos grandes (sacrifício sob ação anestésica). Em seguida, os espécimes foram retirados das conchas e foi realizada a incisão e fixação da região renopericárdica e parte do manto (Fig. 5). Para fixação foi utilizado o fixador Duboscq-Brasil modificado de HUMASON (1972) (600 ml de EtOH 80° GL, 250 ml de formalina 37% filtrada e 150 ml de Ácido acético glacial). Os tecidos foram processados para histologia. Foram feitos cortes seriados com espessura de 7 a 8 μ m. Após as lâminas foram deixadas em estufa (60 °C), por pelo menos 24 horas, para a secagem. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina de Harris e eosina (HUMASON 1972), para evidenciar as células em divisão mitótica. Os trabalhos de KINOTI (1971), LIE *et al.* (1975), JEONG *et al.* (1983), SOUZA & ANDRADE (2006), foram utilizados para caracterizar o tecido hematopoiético das espécies aqui estudadas. Para medir o tecido hematopoiético (TH) utilizou-se a metodologia de NODA (1992), onde foram escolhidas partes centrais de cada TH para a medição da espessura. Foram fotomicrografados com microscópio Leica DMR Hc. As lâminas confeccionadas ficaram depositadas no laminário da coleção de moluscos do Museu de Ciências Naturais, da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.

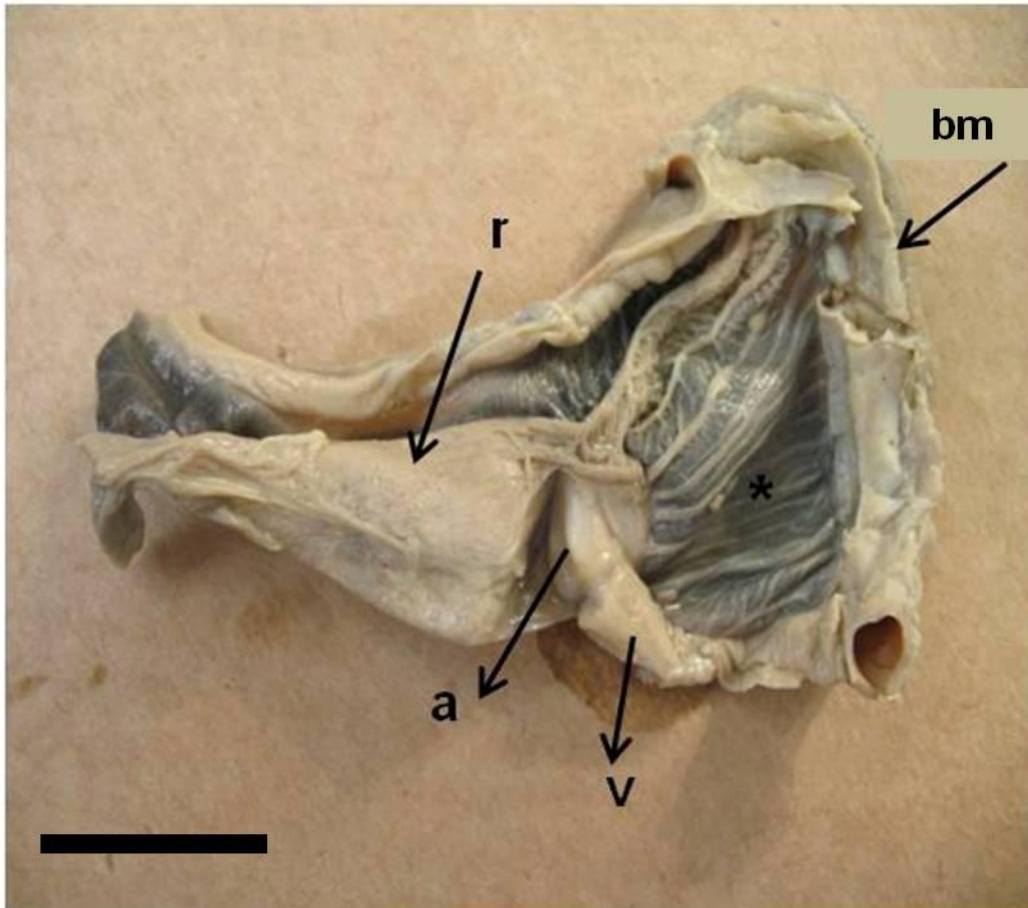


Figura 5. Manto de *Megalobulimus abbreviatus*; (a) aurícula; (bm) borda do manto; (r) rim; (v) ventrículo; (*) cavidade palial, vista dos vasos pulmonares. Barra=3cm.

3.7. Análise estatística

Para a realização de todas as análises estatísticas foi utilizado o programa BioEstat 4.0 (AYRES *et al.* 2005). Foi realizado o teste D'Agostinho, para verificar se o tamanho dos hemócitos encontrados em ambas as espécies, em adultos e jovens, possuíam distribuição normal. Através desta informação foi possível utilizar o teste paramétrico t de Student, para avaliar se existiam diferenças significativas entre o tamanho dos hemócitos presentes na hemolinfa dos indivíduos jovens e adultos, de cada uma das espécies de gastrópodes estudadas. Não foi possível aplicar esse teste na comparação entre as células redondas, hialinócitos e os granulócitos de *B. similis*, pois alguns dos dados não mostraram normalidade. Utilizou-se então, o teste de Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test), para avaliar os dados não paramétricos e observar se existiam diferenças significativas entre os tamanhos celulares (AYRES *et al.* 2005).

4. Resultados

4.1. Morfologia dos hemócitos

4.1.1. *Megalobulimus abbreviatus*

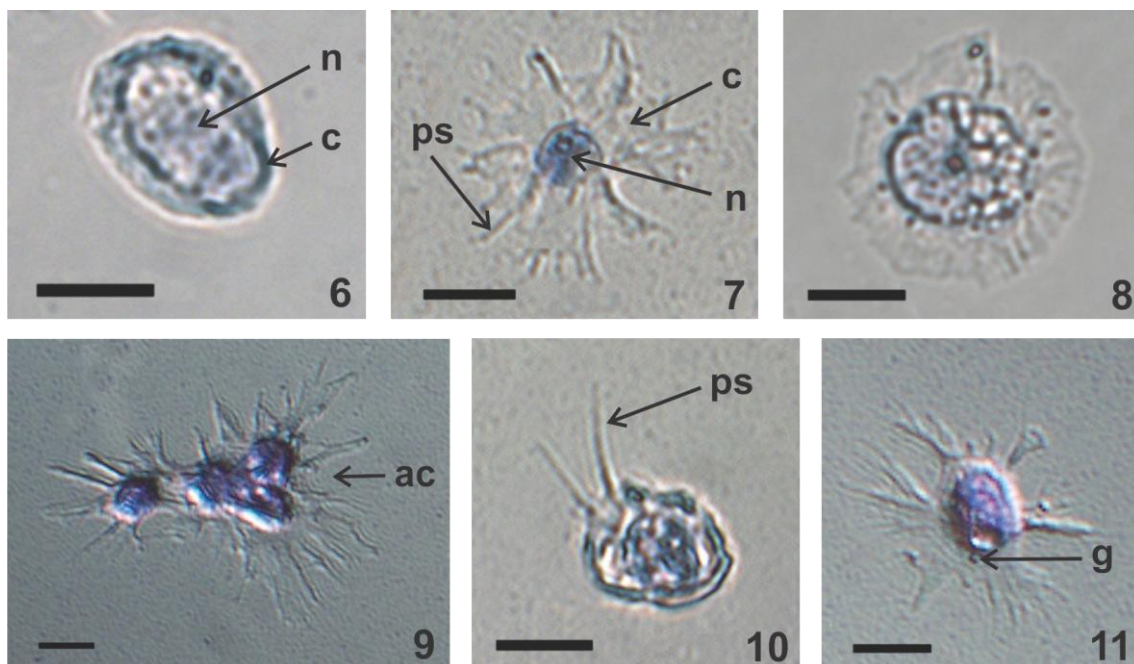
Cem por cento das células da hemolinfa apresentavam forma arredondada, logo que foram colocadas na câmara de Neubauer. Após 20 minutos, 60 a 80% das células inicialmente arredondadas, espalharam-se no vidro da lâmina, e apresentaram projeções citoplasmáticas. A adesão das células sobre a lâmina, possibilitou a diferenciação de três tipos celulares presentes na hemolinfa dos gastrópodes (células redondas, hialinócitos e granulócitos).

As células redondas (Fig. 6) dos gastrópodes adultos caracterizavam-se por não possuírem projeções citoplasmáticas. Nos gastrópodes jovens (Figs. 12-14) foram observadas algumas células com pequenas projeções, mas o mais comum eram células sem projeções. Foi observado, também, células em divisão (Fig. 15). Possuíam forma esférica ou oval, com grande núcleo central que ocupava quase toda a célula. O citoplasma ocupava apenas uma área estreita em torno do núcleo. O tamanho das células redondas variou de 7,5 a 15 μm , para os indivíduos adultos, e 7,5 a 17,5 μm para os jovens (Tab. 1).

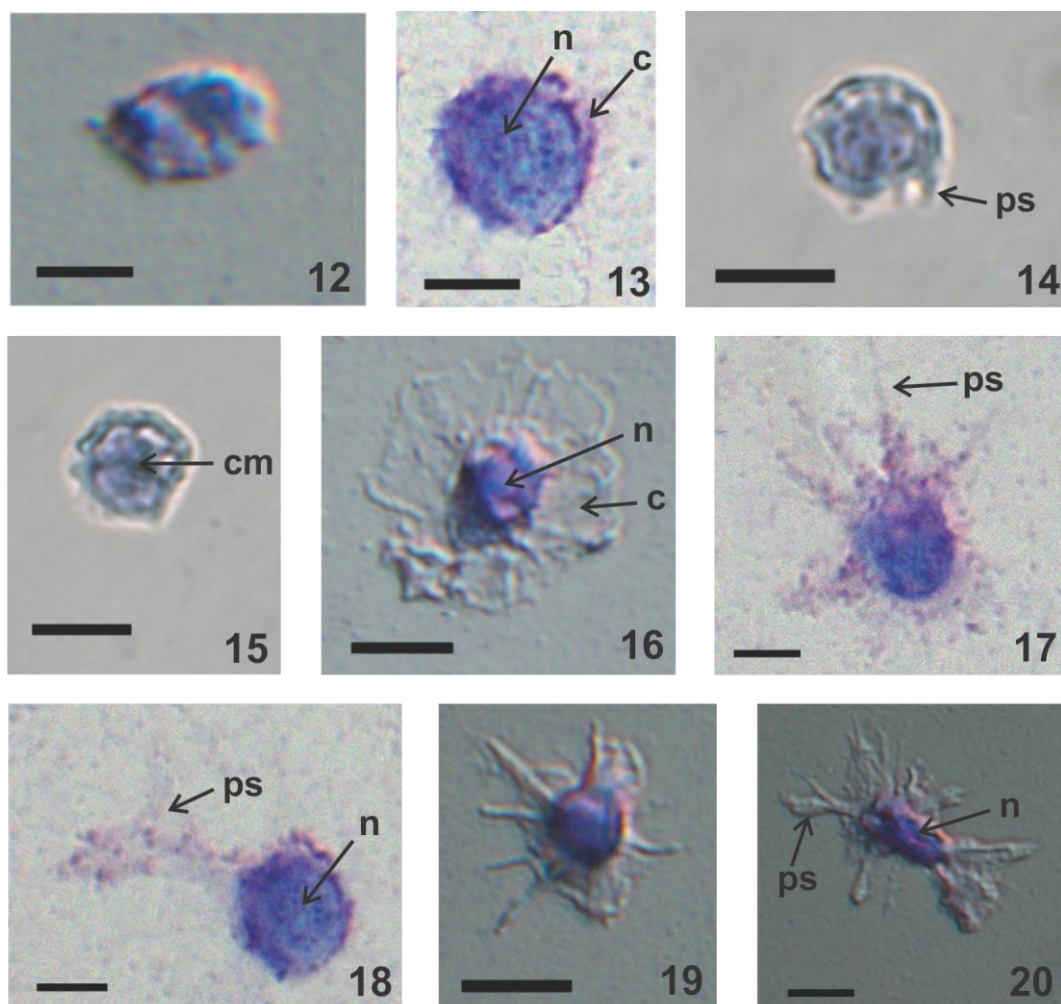
Os hialinócitos (Figs. 7-9; 16-18) possuíam perfil polimórfico, com núcleo excêntrico, podendo estar localizado no centro, com citoplasma homogêneo, às

vezes com alguns poucos grânulos. Essas células apresentavam projeções citoplasmáticas, e pequenos agrupamentos celulares (Fig. 9) foram observados na hemolinfa dos indivíduos adultos. Também, observou-se células com mais de um núcleo, sugerindo uma divisão atípica. Os hialinócitos possuíam tamanho variável, medindo aproximadamente de 12,5 a 47,5 μm nos indivíduos adultos, e de 10 a 50 μm em indivíduos jovens (Tab. 1).

Os granulócitos (Figs. 10-11; 18-20) são células polimórficas, com perfil circular a fusiforme. Células com perfil fusiforme foram mais observadas nos gastrópodes jovens (Fig. 20). A maioria dos granulócitos possuía longas projeções citoplasmáticas e núcleo grande, podendo estar um pouco deslocado do centro, e com variação no formato. Possuíam grânulos basófilos no citoplasma, com número e a distribuição variável, podendo se localizar na periferia ou no centro. O tamanho das células variou de 12,5 a 47,5 μm , para os gastrópodes adultos e de 10 a 50 μm , para os gastrópodes jovens (Tab. 1).



Figuras 6-11. Hemócitos encontrados em indivíduos adultos de *Megalobulimus abbreviatus*. (6) célula redonda, sem pseudópodos; (7-9) hialinócitos, células intermediárias; (10-11) granulócitos, células maduras. (ac) agrupamento celular; (c) citoplasma; (g) grânulo; (n) núcleo; (ps) pseudópode. Barra= 10 μ m.



Figuras 12-20. Hemócitos encontrados em indivíduos jovens de *Megalobulimus abbreviatus*. (12-13) células redondas, sem pseudópodes; (14) célula redonda, com pseudópode; (15) célula redonda em divisão; (16-17) hialinócitos, células intermediárias; (18-19) granulócito, célula madura; (20) granulócito com formato fusiforme, célula madura; (c) citoplasma; (cm) células em mitose; (n) núcleo; (ps) pseudópodes. Barra= 10 μ m.

Tabela 1. Tipos celulares, tamanho médio \pm desvio padrão, tamanho máximo (Tam. máx.) e mínimo (Tam. mín.), dos hemócitos encontrados na hemolinfa de indivíduos jovens e adultos da espécie *Megalobulimus abbreviatus*. Unidade de medida em μm .

Tipos celulares	Jovens			Adultos		
	Redonda	Hialinócito	Granulócito	Redonda	Hialinócito	Granulócito
n	32	103	35	15	131	34
Média \pm DP	12,0 \pm 3,1	24,1 \pm 8,0	28,6 \pm 11,0	11,1 \pm 2,8	26,5 \pm 7,4	25,5 \pm 11,3
Tam. máx.	17,5	50	50	15	47,5	47,5
Tam. mín.	7,5	10	10	7,5	12,5	12,5

n = número de células medidas.

4.1.2. *Bradybaena similaris*

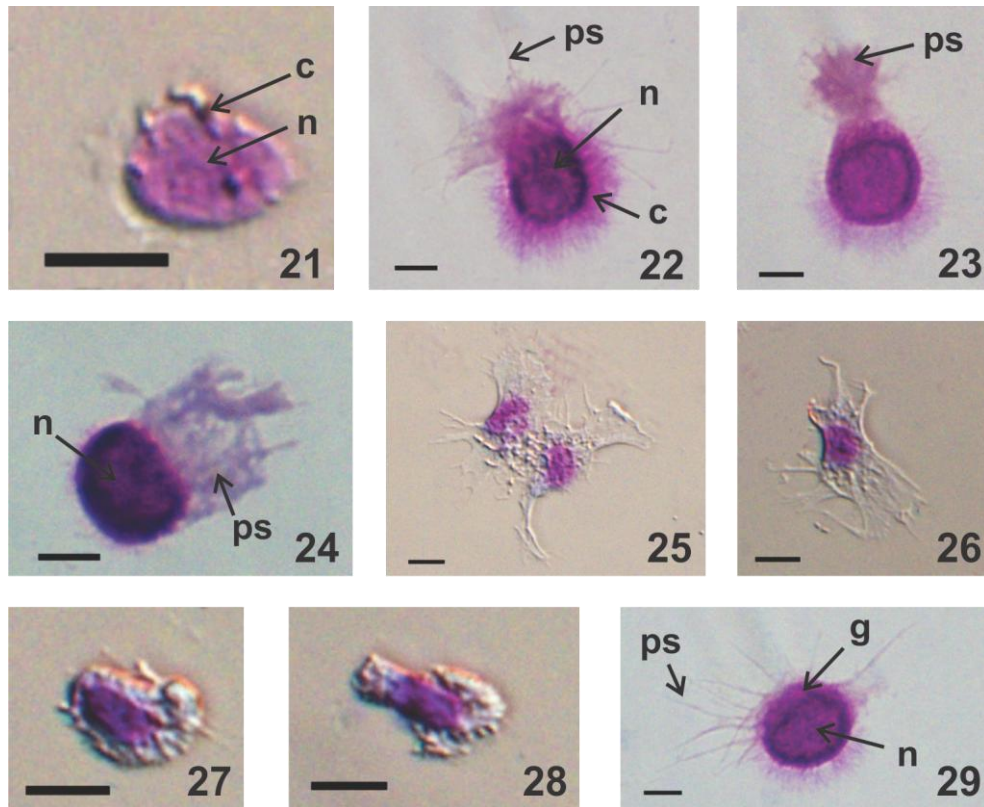
Assim como ocorreu com a análise feita em *M. abbreviatus*, na primeira observação realizada (logo após a retirada da hemolinfa), todas as células se caracterizavam por serem arredondadas e não possuírem projeções citoplasmáticas. Após as células terem ficado repousando 20 minutos na câmara de Neubauer, as células se espalharam sobre o vidro, e na maior parte destas células (60 a 80% das células) foi possível observar as projeções citoplasmáticas. Esta análise possibilitou a diferenciação morfológica de três tipos celulares presentes na hemolinfa (células redondas, hialinócitos e granulócitos).

As células redondas (Fig. 21 e 30), consideradas células jovens ou precursoras, pois são as primeiras a surgir na hemolinfa dos gastrópodes. São células pequenas, com tamanho variando de 7,5 a 12,5 μm , para gastrópodes adultos, e 7,5 a 17,5 μm , para os jovens (Tab. 2). Caracterizaram-se por ter forma esférica a oval, com um grande núcleo central que ocupa quase toda a célula. O citoplasma ocupava uma área estreita em torno do núcleo. Em geral, não possuíam projeções citoplasmáticas

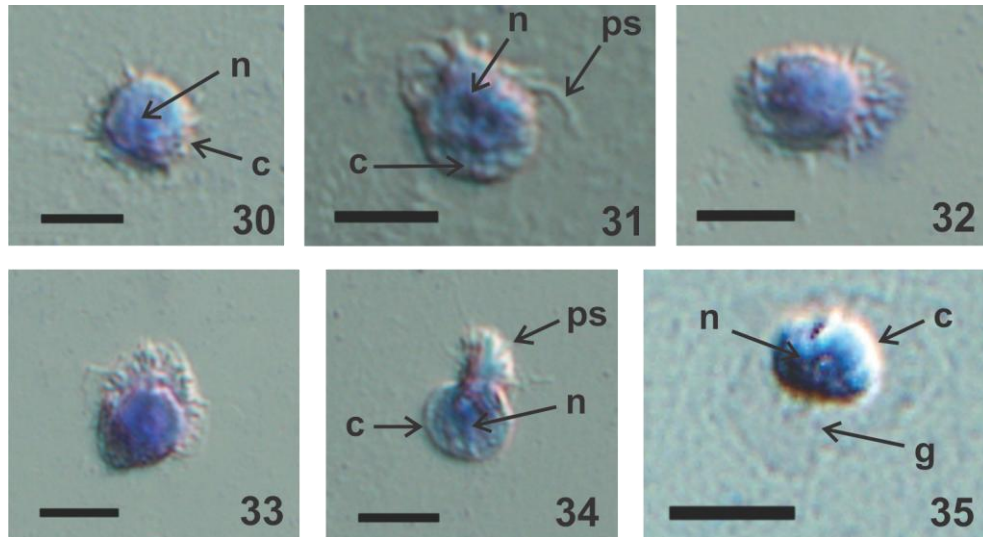
Os hialinócitos (Figs. 22-23; 31-33) possuíam perfil polimórfico, com núcleo excêntrico ou localizado mais no centro das células; com citoplasma homogêneo, e às vezes com alguns poucos grânulos basófilos; e com projeções citoplasmáticas. Também, foram observadas células com mais de

um núcleo, sugerindo uma divisão atípica. Os hialinócitos dos indivíduos adultos e jovens apresentaram tamanho variável de 10 a 40 μm (Tab. 2).

Os granulócitos (Figs. 24-29; 34-35) possuíam tamanho variável de 7,5 a 52,5 μm em adultos, e 7,4 a 40 μm em jovens (Tab. 2). Possuíam perfil circular a fusiforme, a maioria possuía longas projeções citoplasmáticas. Nos indivíduos adultos observou-se alguns granulócitos com formato fusiforme (Figs. 25, 26 e 28), o mesmo não ocorreu nas células dos indivíduos jovens. O núcleo está localizado no centro ou um pouco excêntrico, na maioria das vezes grande, com formato variável (redondo a fusiforme). Com grânulos basófilos no seu citoplasma, com número e distribuição variável, podendo se localizar na periferia ou no centro.



Figuras 21-29. Hemócitos encontrados em indivíduos adultos de *Bradybaena similaris*. (21) célula redonda, sem pseudópodes; (22-23) hialinócitos, células intermediárias; (24-29) granulócitos, células maduras; (c) citoplasma; (g) grânulos; (n) núcleo; (ps) pseudópodes. Barra= 10 μ m.



Figuras 30-35. Hemócitos encontrados em indivíduos jovens de *Bradybaena similaris*. (30) célula redonda, sem pseudópodos; (31-33) hialinócitos, células intermediárias; (34-35) granulócitos, células maduras; (c) citoplasma; (g) grânulos; (n) núcleo; (ps) pseudópodes. Barra= 10µm.

Tabela 2. Tipos celulares, tamanho médio \pm desvio padrão, tamanho máximo (Tam. máx.) e mínimo (Tam. mín.), e dos hemócitos encontrados na hemolinfa de indivíduos jovens e adultos da espécie *Bradybaena similaris*. Unidade de medida em μm .

Tipos celulares	Jovens			Adultos		
	Redonda	Hialinócito	Granulócito	Redonda	Hialinócito	Granulócito
n	20	81	29	19	87	34
Média \pm DP	9,6 \pm 2,8	20,7 \pm 6,0	19,1 \pm 7,3	9,3 \pm 2,4	21,3 \pm 7,4	24,6 \pm 11,2
Tam. máx.	17,5	40	40	12,5	40	52,5
Tam. mín.	7,5	10	7,4	7,5	10	7,5

n = número de células medidas.

4.2. Densidade dos hemócitos e Análise estatística

4.2.1. *Megalobulimus abbreviatus* e *Bradybaena similaris*

O tipo celular mais frequente na hemolinfa foi o hialinócito, tanto para jovens como para adultos, em ambas as espécies (Tab. 3). Apesar do menor número de células nos indivíduos jovens de *M. abbreviatus*, observou-se que em ambas categorias (jovens e adultos) as porcentagens foram semelhantes (Tab. 3).

Tabela 3. Porcentagem para cada um dos tipos de hemócitos, de jovens e adultos de *Bradybaena similaris* e *Megalobulimus abbreviatus*.

Tipos celulares/Espécies	Jovens		Adultos	
	<i>Bradybaena similaris</i>	<i>Megalobulimus abbreviatus</i>	<i>Bradybaena similaris</i>	<i>Megalobulimus abbreviatus</i>
Células redondas	21,4%	23,7%	10,9%	21,1%
Hialinócitos	76,9%	88,3%	66,7%	68,0%
Granulócitos	1,6%	1,4%	9,6%	10,9%

A densidade total de hemócitos sem distinção entre jovens e adultos foi calculada para *M. abbreviatus*, em 387.782 células/ml, e para *B. similaris*, em 859.099 células/ml. A densidade média (Figs. 36 e 37) para cada um dos tipos de

hemócitos encontrados na hemolinfa por molusco (células/ml), também foi calculado para ambas as espécies. E, a densidade média de células por ml, sem distinção de tipo celular foi de 214.000 células/ml em adultos, e 170.833 células/ml em jovens, para *M. abbreviatus*, e de 506.000 células/ml para adultos, e 326.667 células/ml para os jovens de *B. similaris*.

Foi realizado o teste D'Agostinho, para saber se o tamanho dos diferentes tipos de hemócitos encontrados em ambas as espécies, tanto em jovens como em adultos, possuíam distribuição normal. Para a espécie *M. abbreviatus*, as células redondas dos indivíduos jovens e adultos, apresentaram normalidade. O σ (desvio padrão) foi igual a 0,27 para os adultos e 0,28 para os jovens, contidos nos limites dos valores críticos tabelados ao nível alfa de 5%, traduzindo um $p > 0,05$. Portanto aceita-se a hipótese de normalidade dos dados. Os hialinócitos dos jovens e adultos, também apresentaram normalidade. O σ foi igual a 0,28 para os adultos e 0,28 para os jovens, também estando dentro dos limites de normalidade dos dados. Os granulócitos também apresentaram normalidade, com σ igual a 0,28 nos adultos e 0,28 nos jovens.

Para a espécie *B. similaris*, as células redondas dos indivíduos adultos apresentaram normalidade, com $\sigma=0,27$, já os gastrópodes jovens não mostraram normalidade ($p<0,01$). Os hialinócitos não apresentaram distribuição normal, com $p<0,01$ para adultos, e $p<0,05$ para os jovens. Os granulócitos dos indivíduos adultos não apresentaram normalidade ($p<0,01$), e nos indivíduos jovens apresentaram normalidade ($\sigma =0,27$).

A partir da confirmação da normalidade dos hemócitos encontrados em *M. abbreviatus*, foi realizado o teste *t* de Student entre os tipos de hemócitos

encontrados nos adultos e jovens, para saber se havia diferença significativa entre o tamanho destes hemócitos ($p < 0,05$). Para as células redondas, obteve-se o valor de $p = 0,1692$, não significativo. Aceitando-se, a hipótese de nulidade: não havendo diferença no tamanho das células redondas entre adultos e jovens, sendo em média 11,16 para os adultos, e 12,03 para os indivíduos jovens. Os hialinócitos, obtiveram o valor $p = 0,6435$, com a probabilidade de 0,0209 (bilateral), e os indivíduos adultos tiveram média do tamanho dos hialinócitos um pouco maior, de 26,48, que os jovens ($\bar{x} = 24,12$). Para os granulócitos, o valor foi $p = 0,2053$, e os gastrópodes jovens obtiveram uma média de tamanho de 28,64, um pouco mais alta que os adultos ($\bar{x} = 25,58$).

Para a espécie *B. similis*, não possível realizar o teste *t* de Student para saber se havia diferenças significativas entre as células redondas, os hialinócitos e os granulócitos, dos indivíduos adultos e jovens da espécie *B. similis*, pois, os dados obtidos através do tamanhos dos tipos de hemócitos nas duas classes (adultos e jovens), demonstraram ser dados não paramétricos, sendo este teste para dados paramétricos. Com isso, foi utilizado o teste de Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum test), com nível de decisão alfa de 0,05, que não indicou diferenças significativas entre os tamanhos das células redondas presentes na hemolinfa ($p = 0,9440$); também, não houve diferença significativa entre o tamanho dos hialinócitos ($p = 0,7786$); somente para os granulócitos houve diferença significativa ($p = 0,0331$) para o seu tamanho celular na hemolinfa dos jovens e adultos.

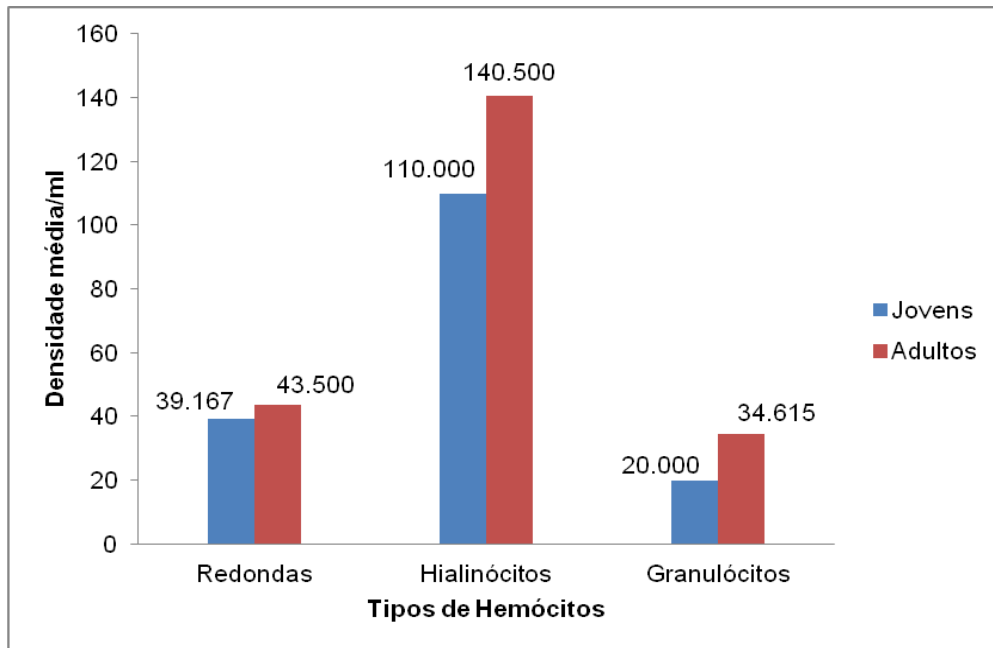


Figura 36. Densidade média/ml dos três tipos celulares encontrados na hemolinfa de indivíduos jovens e adultos de *Megalobulimus abbreviatus*.

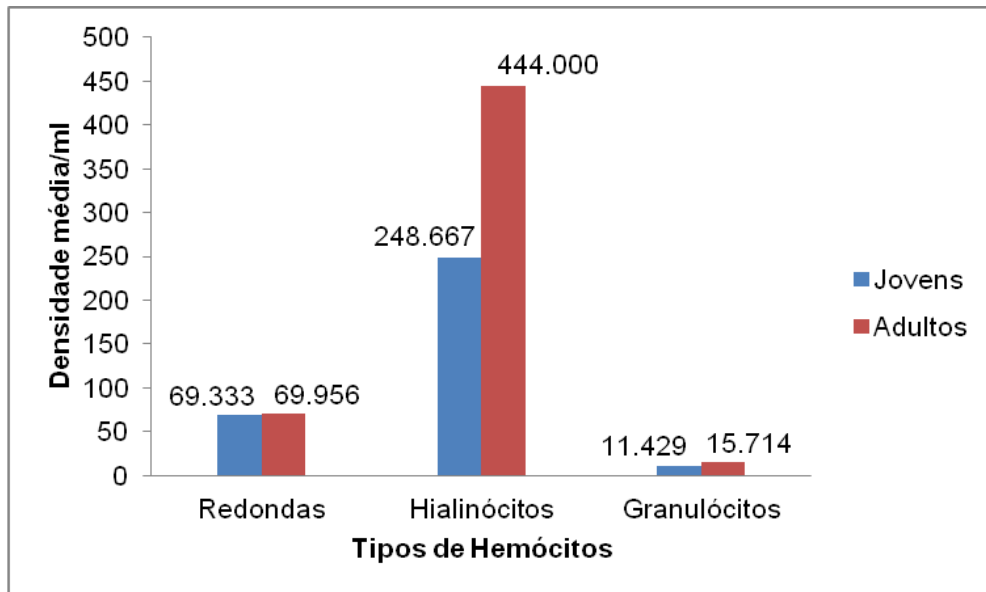
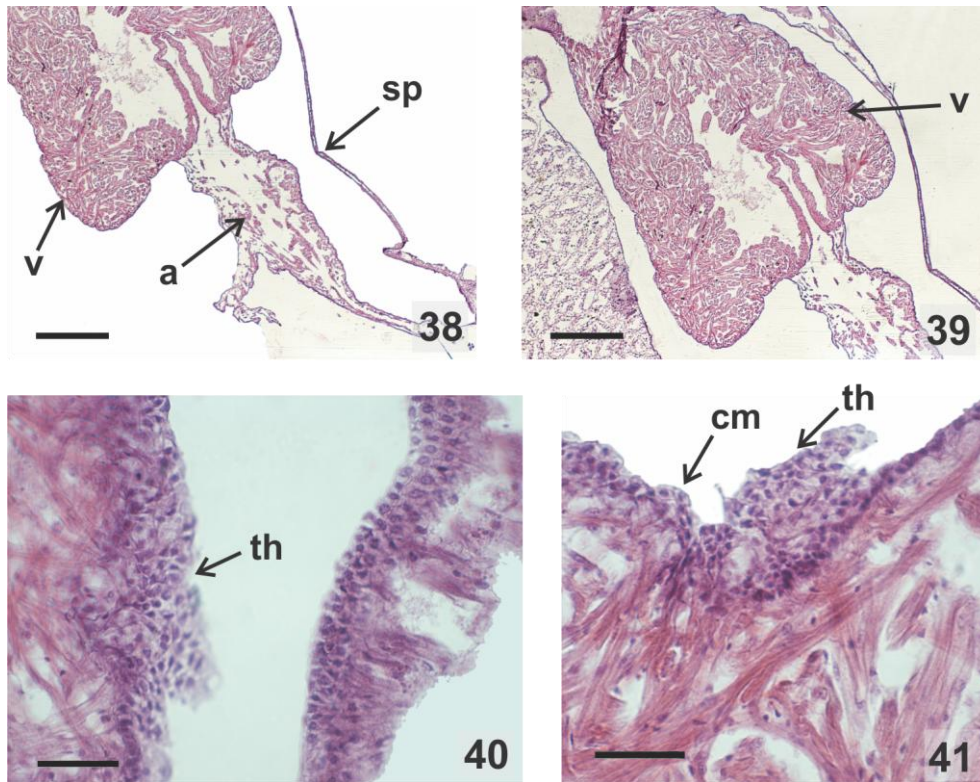


Figura 37. Densidade média/ml para jovens e adultos, dos três tipos celulares encontrados na hemolinfa de *Bradybaena similaris*.

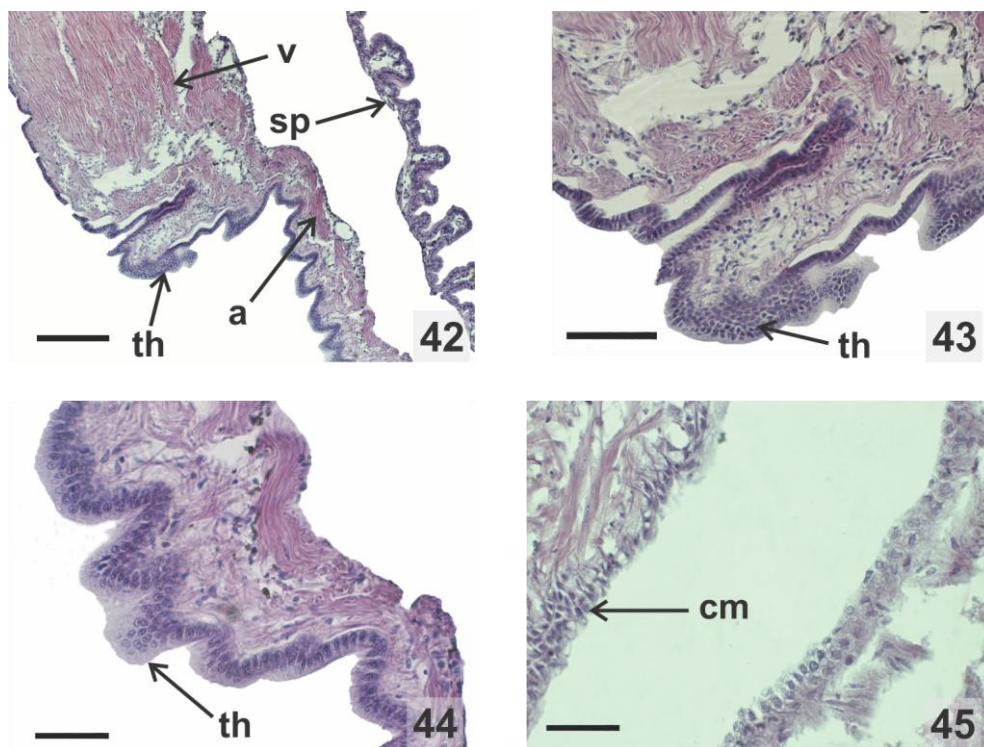
4.3. Tecido hematopoiético de *Megalobulimus abbreviatus* e *Bradybaena similis*

O tecido hematopoiético, ou órgão hematopoiético como também é conhecido, foi caracterizado de mesmo modo para os indivíduos de ambas as espécies, considerados adultos e jovens. Através da análise morfológica de cortes histológicos, foi possível identificar o local de origem dos hemócitos que se encontram livres na hemolinfa e dentro dos tecidos conectivos. Em ambas as espécies, sua origem se dá através de um tecido especial, um agrupamento de células, localizado na região renopericárdica, próxima à aurícula e ao ventrículo, no saco pericárdico (Figs. 38-50). Este tecido constituiu-se de uma banda estreita de tecido epitelial estratificado, com hemócitos primários, com núcleo oval a esférico. O tecido localizou-se na porção lateral superior do saco pericárdico, perto da porção sacular do rim. Foi possível observar, que em alguns pontos do tecido hematopoiético de *M. abbreviatus* e *B. similis* havia mais de uma banda de células (hemócitos primários). Nos indivíduos adultos e jovens de *M. abbreviatus* foram observados alguns pontos com aglomeração de hemócitos (formações que lembram um pequeno pico de montanha) (Figs. 40-41; 44). No tecido hematopoiético de *B. similis* não foram observados pontos com aglomerações de hemócitos. A espessura do tecido variou entre as espécies, e entre jovens e adultos. Em *M. abbreviatus* sua espessura estendeu-se de 125 a 138 μm nos indivíduos adultos, e de 70 a 120 μm nos jovens; em *B. similis* foi cerca de 150 a 162 μm em adultos, e de 50 a 70 μm em jovens. O aspecto geral do tecido hematopoiético foi bastante

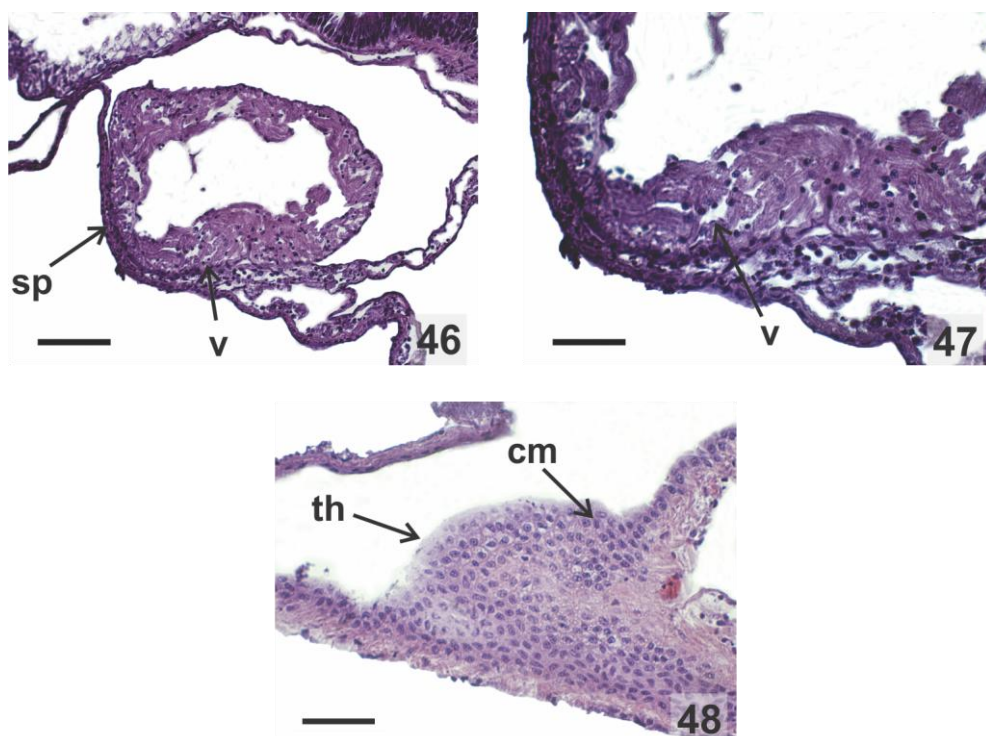
uniforme. Foi observada hiperplasia no tecido hematopoiético de adultos de *B. similis*. Observou-se a presença de células redondas ou cubóide, acondicionadas juntas em bandas. Também, foi registrada a presença ocasional de mitose, em ambas as espécies, e em jovens e adultos. Os hemócitos foram observados no tecido intersticial. O acúmulo de hemócitos foi mais presente no interior da cavidade ventricular, mas também foi observado entre as fibras cardíacas.



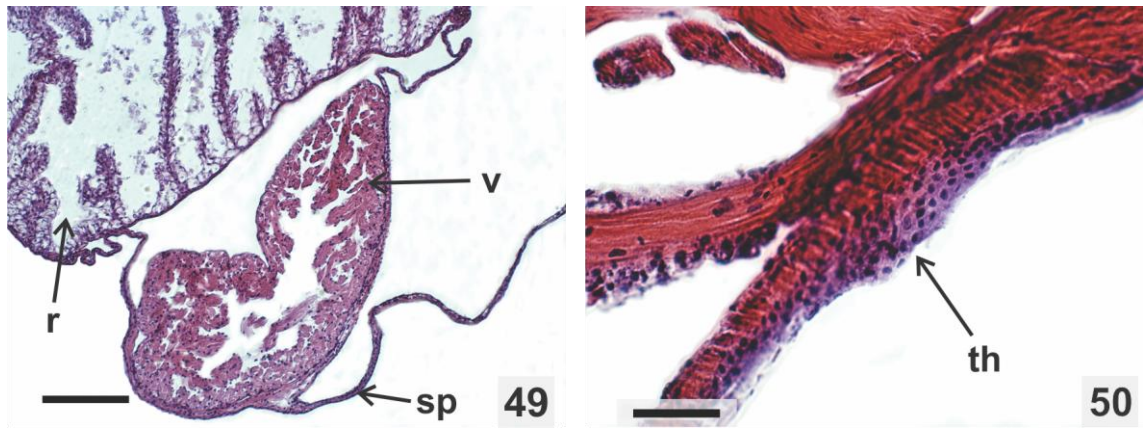
Figuras 38-41. Cortes histológicos da região renopericárdica e do tecido hematopoiético de indivíduos adultos de *Megalobulimus abbreviatus*; (38-39) região pericárdica, Barra=100 μ m; (40-41) detalhe do tecido hematopoiético; Barra=50 μ m. (a) aurícula; (cm) células em mitose; (sp) saco pericárdico; (th) tecido hematopoiético; (v) ventrículo.



Figuras 42-45. Cortes histológicos da região renopericárdica e do tecido hematopoiético de indivíduos jovens de *Megalobulimus abbreviatus*; (42) região pericárdica, Barra=100 μ m; (43-44) detalhe do tecido hematopoiético; (45) detalhe de células em mitose. Barra=50 μ m. (a) aurícula; (cm) células em mitose; (sp) saco pericárdico; (th) tecido hematopoiético; (v) ventrículo.



Figuras 46-48. Cortes histológicos da região renopericárdica e do tecido hematopoiético de indivíduos adultos de *Bradybaena similares*; (46) região pericárdica, Barra=100 μ m; (47) detalhe do ventrículo; (48) detalhe do tecido hematopoiético com hiperplasia; Barra=50 μ m. (cm) células em mitose; (sp) saco pericárdico; (th) tecido hematopoiético; (v) ventrículo.



Figuras 49-50. Cortes histológicos da região renopericárdica e do tecido hematopoiético de indivíduos jovens de *Bradybaena similaris*; (49) região pericárdica; Barra=100 μ m; (50) vista do tecido hematopoiético; Barra=50 μ m. (sc) saco pericárdico; (th) tecido hematopoiético; (r) rim; (v) ventrículo.

5. Discussão

5.1 Hemócitos

O objetivo deste estudo foi caracterizar e quantificar morfologicamente os hemócitos de *M. abbreviatus* e *B. similaris* em indivíduos jovens e adultos. O que foi possível através de análises em lâminas fixas (coradas e fixadas) e através da câmara de Neubauer. Foram observados, descritos e quantificados três tipos de hemócitos: as células redondas, os hialinócitos e os granulócitos.

Nosso estudo, sobre a morfologia dos hemócitos é corroborado por trabalhos como os de GEORGE & FERGUSON (1950), HARRIS (1975), CHENG & GUIDA (1980), LOVERDE *et al.* (1982), JOKY *et al.* (1983), NODA & LOKER (1989), OTTAVIANI (1992), BARRACO *et al.* (1993), CAVALCANTI *et al.* (2012), que demonstraram como os hemócitos podem ser células morfologicamente distintas, com mais de um tipo de hemócito presente na hemolinfa dos gastrópodes. Enquanto outros autores, como: SMINIA (1972), SMINIA & BARENSEN (1980), SMINIA *et al.* (1981), SMINIA *et al.* (1983), VAN DER KNAAP *et al.* (1993), DIKKEBOOM *et al.* (1984), AMEN *et al.* (1991), SURESH *et al.* (1994), HUMPHRIES & YOSHINO (2003) e RUSSO & LAGADIC (2004), caracterizaram apenas um tipo celular, com características morfológicas distintas, ou seja, diferentes estágios de desenvolvimento de uma mesma linhagem de célula.

Os hemócitos encontrados em nosso estudo, possuem poucas diferenças morfológicas entre os indivíduos jovens e adultos da mesma espécie, e entre ambas as espécies. Uma das diferenças observadas foi que algumas células redondas de

jovens da espécie *M. abbreviatus*, apresentaram pequenas projeções citoplasmáticas, enquanto que o mesmo não foi observado nas células da hemolinfa dos adultos da mesma espécie, e nos hemócitos dos jovens e adultos de *B. similis*. Também, foi observado a presença de agrupamentos celulares de hialinócitos, na hemolinfa dos indivíduos adultos de *M. abbreviatus*. Outra informação interessante foi a presença de granulócitos com formato fusiforme na hemolinfa dos adultos de *B. similis* e em jovens de *M. abbreviatus*. Estas informações demonstram que pode haver um padrão um pouco diferente nos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa, nas diferentes espécies de gastrópodes, e entre os indivíduos jovens e adultos da mesma espécie.

As células redondas não variaram muito em relação ao seu tamanho, tanto em jovens, quanto em adultos, em ambas espécies de gastrópodes deste estudo. Nos teste estatísticos observamos que estas não possuíam diferenças significativas de tamanho, entre os indivíduos jovens e adultos. Os hialinócitos e os granulócitos foram as células que mais variaram em relação ao seu tamanho, possuindo células bem pequenas e células grandes. Os hialinócitos de ambas as espécies, não tiveram diferenças significativas, entre os jovens e adultos, apenas uma pequena diferença de média, principalmente em *M. abbreviatus*, a média em adultos foi maior que nos hialinócitos dos jovens. Os granulócitos de indivíduos jovens e adultos de *M. abbreviatus*, apesar de apresentarem variação de tamanho, suas diferenças de tamanho não mostraram-se significativas. Apenas com pouca diferenças entre as médias dos granulócitos, entre os jovens e adultos. Os granulócitos presentes na hemolinfa dos indivíduos jovens, da espécie *B. similis*, foram os que mais variaram em relação ao tamanho, e foi observada uma diferença significativa entre seu

tamanho e os dos granulócitos encontrados nos indivíduos adultos. Estas diferenças observadas acima, demonstram que os hemócitos de indivíduos adultos tendem a ser um pouco maiores que os hemócitos de indivíduos jovens.

As diferenças entre os hemócitos de indivíduos jovens e adultos já foram estudadas em *L. stagnalis* (DIKKEBOOM *et al.* 1984; 1985a; DIKKEBOOM *et al.* 1985b; DIKKEBOOM *et al.* 1988) distinguindo três tipos de hemócitos. Estes três tipos são parecidos com os descritos no presente estudo, em *M. abbreviatus* e *B. similaris*. Através de análise morfológica e algumas análises citoquímicas, os autores acima citados, separaram os hemócitos dos indivíduos jovens e adultos, em três subcategorias (as células redondas, as células intermediárias - que podem ser consideradas hialinócitos, e as células 'espalhadas' – equivalente aos granulócitos), que podem ser comparadas aos três tipos distinguidos neste trabalho. O diâmetro médio das células redondas foi parecido com os valores citados por DIKKEBOOM *et al.* (1984). O tamanho dos hialinócitos e dos granulócitos são mais parecidos com os das células 'espalhadas', do trabalho citado anteriormente.

CAVALCANTI *et al.* (2012), estudando a morfologia dos hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea*, sem distinção entre jovem e adulto, também observaram a presença de três tipos de hemócitos (sendo um tipo dividido em três subcategorias) que correspondem aos tipos de hemócitos descritos no presente estudo. O tamanho destas células foram diferentes (menores) daquelas encontrados para ambas espécies aqui estudadas. Os tipos celulares (hemócitos) mais observados por CAVALCANTI *et al.* (2012), foram parecidos entre si, e com os resultados obtidos para *M. abbreviatus* e *B. similaris*. Sendo o tipo de hemócito mais encontrado, o hialinócito, e o menos encontrado, o granulócito.

As porcentagens encontradas para os tipos de hemócitos em ambas espécies estudadas, jovens e adultos, foram bem semelhantes. As porcentagens de granulócitos na hemolinfa de jovens e adultos, de *M. abbreviatus* foi um pouco maior quando comparada com os resultados obtidos para *B. similaris*. Mesmo com essas pequenas diferenças foi possível observar uma maior porcentagem de hialinócitos, seguida pelas células redondas e granulócitos, em ambas as espécies, em jovens e adultos. Isto pode estar relacionado com seu estado físico, ambas espécies pareciam estar saudáveis (livres de infecções). E, é de se esperar um maior número de hialinócitos, do que de granulócitos, pois estes últimos são responsáveis pela fagocitose de material estranho ao corpo dos gastrópodes.

Comparando nossos resultados com o trabalho de DIKKEBOOM *et al.* (1985b), observamos que eles obtiveram resultados diferentes, com maior porcentagem de células redondas, seguida pelos hialinócitos e pelos granulócitos na hemolinfa dos gastrópodes jovens; para os adultos os resultados foram um pouco diferentes, com menor porcentagem de células redondas e hialinócitos, e maior porcentagem de granulócitos. Neste trabalho citado acima, observamos um padrão diferente na hemolinfa de jovens e adultos, do que o encontrado para *B. similaris* e *M. abbreviatus*. NODA & LOKER (1989), em estudo sem distinção entre jovem e adulto de *B. glabrata*, também obtiveram maior porcentagem de granulócitos, seguida por células redondas e hialinócitos. Corroborando o trabalho de DIKKEBOOM *et al.* (1985b), e mostrando que há realmente diferenças entre as porcentagens dos hemócitos, em diferentes espécies de gastrópodes.

Segundo GÉRARD *et al.* (2005), a resposta do sistema de defesa dos gastrópodes deve ser diferente de acordo com a sua idade, em relação ao padrão

de alocação de energia e ao sistema imunológico de imaturos *versus* maduros. A acumulação por peso corporal é relativamente maior em gastrópodes juvenis, quando comparado aos adultos, provavelmente pela relação entre o desenvolvimento e a eficiência do sistema imunológico. Em *L. stagnalis* foi observado que os indivíduos crescem enquanto vivem e o número total de hemócitos aumenta continuamente. Este aumento não é paralelo ao aumento do volume do corpo, é exponencial. Caracóis juvenis possuem uma menor densidade celular se comparados com os indivíduos adultos (DIKKEBOOM *et al.* (1984); VAN DER KNAAP *et al.* (1993)). Os resultados descritos acima demonstram um padrão parecido com o presente estudo, em que a hemolinfa dos adultos teve uma maior densidade de hemócitos, e a dos jovens teve uma menor densidade. Todos os hemócitos, tanto nos tecidos como na circulação, têm a capacidade de se dividir, mas é especialmente nos jovens, que se caracterizam por terem hemócitos pouco diferenciados, que demonstram atividade mitótica.

No trabalho de LOKER *et al.* (1987), com a espécie *B. glabrata* os autores não definiram os tipos de hemócitos, mas realizaram a contagem do número total de hemócitos em dois grupos e baseados no diâmetro da concha. Neste trabalho (LOKER *et al.* 1987), observamos que os gastrópodes menores, provavelmente mais jovens, possuem uma densidade de hemócitos um pouco maior do que os gastrópodes maiores. Resultado diferente do que o obtido com *B. similis* e *M. abbreviatus*, do presente estudo, onde a densidade de hemócitos foi maior em indivíduos considerados adultos, corroborando as afirmativas de GÉRARD *et al.* (2005), e os trabalhos de DIKKEBOOM *et al.* (1984) e VAN DER KNAAP *et al.* (1993).

Em outros trabalhos, como nos de JOENG & HEYNEMAN (1976) e ABDUL-SALAM & MICHELSON (1980), com *B. glabrata* e o de OTTAVIANI (1992), com *P. corneus*, os autores realizaram uma contagem do número total de hemócitos presentes na hemolinfa, sem distinções se jovem, ou adulto. Os valores obtidos foram menores se comparados aos resultados obtidos para as espécies deste trabalho. CHENG & GUIDA (1980), estudando o gastrópode *Bulinus truncatus rohlfsi* (Clessin, 1886) obtiveram um resultado parecido com a densidade total de hemócitos obtido para *M. abbreviatus*.

Segundo GALLOWAY & DEPLEDGE (2001), a densidade e as funções dos hemócitos, como a fagocitose, por exemplo, poderiam ser afetadas por mudanças nas condições do ambiente. Os padrões de resposta dos hemócitos podem depender do tipo de estressor, e poderiam, portanto, ser utilizados como biomarcadores para discriminar entre alterações biológicas e químicas do ambiente.

5.2 Tecido hematopoiético

O tecido hematopoiético em ambas as espécies deste estudo, tanto de jovens como dos adultos, é morfológicamente semelhante, localizando-se na mesma área da região renopericárdica, dentro do saco pericárdico. Este resultado é corroborado pelos trabalhos de KINOTI (1971), LIE *et al.* (1975), RONDELAUD & BARTHE (1981), JEONG *et al.* (1983) e SOUZA & ANDRADE (2006), que também identificaram o tecido hematopoiético dentro da cavidade do manto, perto da região renopericárdica. Nos trabalhos citados acima, os autores comentam sobre o formato do tecido, que poderia ser ovóide ou em forma de rim. Em nosso estudo não foi possível determinar um formato para esse tecido, ele parece estar presente em bandas, com aglomerações celulares, sem distinção de forma. A presença de hiperplasia foi observada apenas no tecido hematopoiético de gastrópodes adultos da espécie *B. similis*.

A espessura do tecido hematopoiético entre jovens e adultos da espécie *M. abbreviatus*, foi semelhante. Em *B. similis* o tecido apresentou-se menos espesso nos jovens que nos adultos, medindo um pouco mais que metade. Alguns trabalhos, como de LIM & HEYNEMAN (1972), DIKKEBOOM *et al.* (1985a) e DIKKEBOOM *et al.* (1985b), demonstram que é natural haver diferenças entre o sistema imunológico de jovens e adultos de uma mesma espécie, pois quando jovens, estes indivíduos tendem a ser mais suscetíveis a possíveis infecções parasitárias e conforme amadurecem se tornam mais resistentes as infecções.

O tecido hematopoiético, também foi analisado em estudos que tinham como objetivo observar as diferenças entre os órgãos de espécimes saudáveis e infectados com digenéticos. KINOTI (1971), mediu o tecido hematopoiético de três espécies de *Bulimus* não infectados, e a espessura média foi maior do que as encontradas para as espécies do presente estudo, tanto de jovens, como dos adultos. RONDELAUD & BARTHE (1981), mediram o tecido hematopoiético da espécie *L. trunculata*, e a espessura média também, foi um pouco maior do que o encontrado para *M. abbreviatus*, e parecido com o valor encontrado para o tecido hematopoiético dos adultos da espécie *B. similis*. No trabalho de NODA (1992), a espessura média do tecido hematopoiético foi menor do que a do tecido hematopoiético dos indivíduos adultos do presente estudo. No trabalho de JOKY & MATRICON-GONDRAN (1985), os autores não mencionaram medidas, mas demonstram através de fotomicrografias que o tecido hematopoiético de indivíduos da espécie *B. glabrata*, triplicavam de tamanho ao longo da infecção com *Echinostoma caproni* Richard, 1964, e uma das conclusões do trabalho foi que se existe infecção, iria existir mais células em mitose, e o tecido se apresentava com hiperplasia.

A hematopoiesis é contínua, mas as alterações ambientais podem causar flutuações no tecido hematopoiético e na quantidade de hemócitos presentes na hemolinfa (VAN DER KNAAP *et al.* 1993). Entretanto, contrariando o estudo anterior, SOUZA & ANDRADE (2006) afirmaram que a aparência geral, normal do tecido hematopoiético, não muda com a presença de lesões parasitárias.

Segundo PAN (1958), MATRICON-GONDRAN (1990), MONTEIL & MATRICON-GONDRAN (1991), SMINIA (1972, 1974), os hemócitos tiveram uma origem

multicêntrica (no revestimento endotelial dos espaços vasculares e do tecido conjuntivo frouxo). No entanto, para LIE *et al.* (1975) os hemócitos são oriundos de um tecido (órgão) hematopoiético. Segundo SOUZA & ANDRADE (2006), para se considerar o tecido hematopoiético, como um tecido central (originando todos os hemócitos), teríamos que levar em consideração que os hemócitos formados no tecidos hematopoiético, não seriam capazes de se replicar em locais periféricos (observamos neste estudo alguns hemócitos livres na hemolinfa sofrendo mitose). Caso contrário, o tecido teria de ser invadido por muitos hemócitos quando uma forte resposta contra materiais estranhos, ou parasitos estivesse acontecendo. Os autores afirmam, também, que se a migração de hemócitos se dá a partir de um ponto central para os vários locais de reação do corpo de um gastrópode, isso seria refletido sobre os níveis de hemócitos na circulação da hemolinfa. Assim, os resultados obtidos neste estudo apoiam a hipótese do tecido hematopoiético como um tecido central para a produção de hemócitos, mas também, colocamos como possível a existência de outros sítios produtores de hemócitos.

6. Considerações finais

Através das técnicas utilizadas neste estudo foi possível diferenciar morfologicamente três tipos de hemócitos: as células redondas, os hialinócitos e os granulócitos, em *B. similares* e *M. abbreviatus*. Mas, para um entendimento mais profundo, como de ultraestrutura e citoquímico dos hemócitos, são necessários mais estudos. Com a aquisição de novos detalhes, mais fácil será o entendimento funcional e estrutural destas células. Neste estudo, foi demonstrado que os hemócitos de *M. abbreviatus* e *B. similis*, possuem densidade diferente da maioria das espécies já estudadas, sendo os hialinócitos os mais frequentes, tanto em jovens quanto em adultos. Este resultado pode estar relacionado ao estado de saúde destes gastrópodes, os mesmos aparentemente não tendo entrado em contato com parasitos, 'estando saudáveis'. Neste caso, também, seria interessante desenvolver um estudo comparativo com gastrópodes das mesmas espécies parasitados e não parasitados, para observar se realmente há diferenças entre a densidade de hemócitos/ml, dos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa e no tecido hematopoiético.

Apesar de alguns autores afirmarem que existem diferenças entre o sistema de defesa dos gastrópodes jovens e adultos, neste estudo não observamos, com clareza tais diferenças. Sendo a hemolinfa de jovens e adultos bastante semelhantes, com algumas pequenas diferenças nos hemócitos presentes. Outra coisa, que foi muito similar entre os gastrópodes jovens e adultos de ambas as

espécies, foi o tecido hematopoiético. O tecido se encontra no mesmo local (no saco pericárdico, na região renopericárdica) para ambas as espécies; possui morfologia semelhante (em bloco, com aglomerações celulares, e sem distinção de forma), sua espessura não diferiu muito entre os jovens e adultos de *M. abbreviatus*, só o tamanho do tecido de jovens e adultos de *B. similares* parecerem mostrar mais diferença, pois foi observado hiperplasia no tecido hematopoiético dos indivíduos adultos de *B. similares*. Observamos que talvez seja possível haver, além do tecido hematopoiético, outras áreas capazes de originar hemócitos, como dentro do pericárdio.

Através destas informações fica evidente a necessidade de mais estudos com essas espécies, já que *B. similares* é um molusco exótico, que serve como hospedeiro intermediário para digenéticos parasitos de aves (*P. gallinum*) e de bovinos (*E. coelomaticum*). E, *M. abbreviatus* é uma espécie nativa que pode servir como bioindicador ambiental e como hospedeiro intermediário de *A. costaricensis*. Estes dados preliminares podem servir de subsídio em estudos epidemiológicos, mostrando possível susceptibilidade dos moluscos aos seus hospedeiros intermediários.

7. Referências bibliográficas

(Conforme as normas (em anexo) da Revista Zoologia).

- ABDUL-SALAM J. M. & E. H. MICHELSON. 1980. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes: Assay of factors influencing in vitro phagocytosis. **Journal of Invertebrate Pathology** **36** (1): 52-59.
- ALMEIDA, M. N. DE & BESSA, E. C. DE A. 2001. Estudo do crescimento e da reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac) (Mollusca, Xanthonychidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia** **18** (4): 1115-1122.
- AMATO, S. B. & J. C. B. BEZERRA. 1989. Parasitismo natural de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) por *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **84** (1): 75-79.
- AMATO, S. B. & J. C. B. BEZERRA. 1992. Concurrent Infection of *Postharmostomum gallinum* (Digenea, Brachylaimidae) and *Eurytrema coelomaticum* (Digenea, Dicrocoellidae) in *Bradybaena similaris* (Stylommatophora, Xanthonychidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **87** (2): 309-311.
- AMEN, R. I.; J. M. C. BAGGEN; E. A. MEULEMAN; A. WIJSMAN-GROOTENDORST§; M. E. BOON§; P. D. BEZEMBER & T. SMINIA. 1991. *Trichobilharzia ocellata*: quantificatioos of effects on haemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by morphometric means. **Tissue and Cell**, **23** (5): 665-676.

- AKTIPIS, S. W.; G. GIRIBET; D. R. LINDBERG & W. F. PONDER. 2008. Gastropoda: an overview and analysis. p. 201-237. *In*: W. F. PONDER & D. R. LINDBERG. **Phylogeny and Evolution of the Mollusca**. Berkeley, University of California Press. xi+469p.
- ARAQUE, W.; E. E. BARRIOS; P. RODRÍGUES; V. S. DELGADO & H. J. FINOL. 2003. Ultrastructural Study of the in Vitro Interaction between *Biomphalaria glabrata* Hemocytes and *Schistosoma mansoni* Miracidia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98 (7): 905-908.
- ARÉVALO, E. G.; F. O. JUNQUEIRA; G. L. G. SOARES & E. C. DE A. BESSA. 2006. Atividade fagoínibidora do ácido salicílico sobre *Bradybaena similaris* (Ferussac, 1821) (Mollusca, Bradybaenidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zociências** 8 (2):111-115.
- AYRES, M.; M. AYRES JR.; D. L. AYRES & A. S. SANTOS. 2005. **BioEstat 4.0. Aplicações Estatísticas nas Áreas de Ciências Biológicas e Médicas**. Belém, Sociedade Civil de Mamirauá, MCT, Imprensa Oficial do Estado do Pará, xii + 324p.
- BACHÈRE, E.; Y. GUEGUEN; M. GONZALEZ; J. DE LORGERIL; J. GARNIER & B. ROMESTAND. 2004. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological reviews** 198 (1): 149-168.
- BAECKER, R. 1932. Die Mikromorphologie von *Helix pomatia* und einigen anderen Stylommatophoren. **Zeitschrift für die gesamte Anatomie** 29: 449-585.

- BARBOSA, L.; L. M. SILVA; COELHO, P. M. Z.; SANTOS, S. R. & C. L. FORTES-DIAS. 2006. Primary culture of the region of the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 101 (6): 639-643.
- BARKER, G.M. 2001. Gastropods on Land: Phylogeny, Diversity and Adaptive Morphology, p. 1-146. In: G. M. BARKER (Org.). **The Biology of Terrestrial Molluscs**. CABI. xiv+558p.
- BARRACO, M. A.; A. A. STEIL & R. GARGIONI. 1993. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 88 (1): 73-83.
- BAYNE, C. J. 1983. Molluscan Immunobiology. In: Saleuddin, A. S. M. & K. M. WILBUR (Orgs.). **The Mollusca**. New York: Academia Press, Vol. 5, Physiology, Part 2. 407p.
- BEZERRA, F. S. M.; J. A. NOGUEIRA-MACHADO; R. L. MARTINS-SOUZA; M. M. CHAVES; R. F. CORREA & P. M. Z. COELHO. 2003. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and on the course of *Schistosoma mansoni* infection in resistant *Biomphalaria tenagophila* snails. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 98 (1): 73-75.
- BEZERRA, F. S. M.; J. A. NOGUEIRA-MACHADO; M. M. CHAVES; R. L. MARTINS & P. M. Z. COELHO. 1997. Quantification of the number and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** 39 (4): 197-201.

- BOULANGER, N.; P. BULET; C. LOWENBERGER. 2006. Antimicrobial peptides in the interactions between insects and flagellate parasites. **Trends in Parasitology** **22** (6): 262–268.
- CALDEIRA, R. L.; C. L. G. F. MENDONÇA; C. O. GOVEIA; H. L. LENZ; C. GRAEFF-TEIXEIRA; W. S. LIMA; E. M. MOTA; I. L. PECORA; A. M. Z. DE MEDEIROS & O. DOS S. CARVALHO. 2007. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **102** (7): 887-889.
- CARNEIRO, M. E. & E. DAEMON. 1997. Caracterização dos tipos celulares presentes na hemolinfa de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Ixodoidea: Ixodidae) em diferentes estados nutricionais. **Revista Brasileira de Parasitologia** **6** (1): 1-9.
- CARNEIRO, M. E. & E. DAEMON. 2002. Estudo comparativo do aspecto da hemolinfa de algumas espécies de carrapatos (Acari, Ixodidae): descrição da variação hemocitária de adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius) Koch. **Revista Brasileira de Zoologia** **19** (Supl. 1): 171-175.
- CARVALHO, O. DOS S.; R. G. C. SCHOLTE; C. L. F. DE MENDONÇA; L. K. J. PASSOS & R. L. CALDEIRA. 2012. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematode: Metastrongyloidea) in molluscs from harbour areas in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **107**(6): 740-746
- CAVALCANTI, M. G. S.; F. C. FILHO; A. M. B. MENDONÇA; G. R. DUARTE; C. C. G. S. BARBOSA; C. M. M. B. DE CASTRO; L. C. ALVES & F. A. BRAYNER. 2012. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron** **43** (2-3): 285-291.

- CHASE, R .2002. **Behavior and its neural control in gastropod molluscs**. Oxford, University Press. xii+314p.
- CHENG, T. C. & V. G. GUIDA. 1980. Hemocytes of *Bulinus truncatus rohlfsi* (Mollusca: Gastropoda). **Journal of Invertebrates Pathology** **35** (2): 158-167.
- CUÉTON, L. 1891. Études sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale. **Archives de Zoologie Expérimentale** **9** (2): 13-90.
- DIKKEBOOM, R.; J. M. G. H. TIJNAGEL & W. P. W. VAN DER KNAAP. 1988. Monoclonal antibody recognized hemocyte subpopulations in juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*: Functional characteristics and lectin binding. **Developmental and Comparative Immunology** **12**: 17-32.
- DIKKEBOOM, R.; W. P. W. VAN DER KNAAP; J. J. MAASKANT & A. J. R. DE JONGE. 1985a. Different subpopulations of haemocytes in juvenile, adult and *Trichobilharzia ocellata* infected *Lymnaea stagnalis*: a characterization using monoclonal antibodies. **Zeitschrift fur parasitenkunde** **71**: 815-819.
- DIKKEBOOM, R.; W. P. W. VAN DER KNAAP; E. A. MEULEMAN & T. SMINIA. 1985b. A comparative study on the internal defence system system of juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*. **Immunology** **55**: 547-553.
- DIKKEBOOM, R.; W. P. W. VAN DER KNAAP; E. A. MEULEMAN & T. SMINIA. 1984. Differences between blood cells of juvenile and adult specimes of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Cell and Tissue Research** **238**: 43-47.
- DUARTE, M. J .F. 1980. O ciclo evolutivo de *Postharnwstomum gallinum* Witenberg, 1923, no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Trematoda, Brachylaemidae). **Revista Brasileira de Biologia** **40** (4): 793-809.

- FERREIRA, P.; G. L. G. SOARES; S. D'AVILA & E. C. DE A. BESSA. 2010. Influência da cafeína sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae), com diferentes idades. **Revista Brasileira de Zociências** 12 (2): 157-163.
- FORD, S. E.; S. A. KANALEY & D. T. J. LITTLEWOOD. 1993. Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue infiltrating hemocytes. **Journal of Invertebrates Pathology** 61 (1): 49-57.
- GALLOWAY, T. S. & M. H. DEPLEDGE. 2001. Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. **Ecotoxicology** 10:5-23.
- GEIGER, D. L.; A. NÜTZEL & T. SASAKI. 2008. Vetigastropoda. p.297-330. *In*: W. F. PONDER & D. R. LINDBERG. **Phylogeny and Evolution of the Mollusca**. Berkeley, University of California Press. xi+469p.
- GÉRARD, C.; L. BRIENT & B. LE ROUZIC. 2005. Variation in the response of juvenile and adult gastropods (*Lymnaea stagnalis*) to cyanobacterial toxin (microcystin-LR). **Environmental Toxicology** 20 (6):592-506.
- GEORGE, W. C. & J. H. FERGUSON. 1950. The blood of gastropod mollusks. **Journal of Morphology** 86: 315-324.
- HAUGHTON, I. 1934. Note on the amoeboid elements in the blood of *Helix aspersa*. **Quarterly Journal of Microscopical Science** 77:157-166.
- HARRIS, K. R. 1975. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. **Annals of the New York Academy of Sciences** 266: 446-464.
- HASZPRUNAR, G.; C. SCHANDER & K. M. HALANYCH. 2008. Relationships of Higher Molluscan Taxa. p. 19-69. *In*: W. F. PONDER & D. R. LINDBERG. **Phylogeny and Evolution of the Mollusca**. Berkeley, University of California Press. 469p.

- HUMASON, G. L. 1972. **Animal Tissue Techniques**. 3rd ed. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA. xvi+641p.
- HUMPHRIES, J. E. & T. P. YOSHINO. 2003. Cellular receptors and signal transduction in molluscan hemocytes: Connections with the innate immune system of vertebrates. **Integrative and Comparative Biology** **43**: 305-312.
- IUCN - RED LIST. 2012. **The IUCN Red List of Threatened Species 2012.2**. Disponível em:< <http://www.iucnredlist.org/search>>. [Acesso em: Outubro de 2012].
- JAUME, M. L.; G. P. PUGA & P. H. AGUIAR. 1981. *Bradybaena similaris* (Férussac): hospedeiro intermediário de *Angiostrongylus cantonensis* em Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical** **33**: 207-209.
- JOENG, K. H. & D. HEYNEMAN. 1976. Leukocytes of *Biomphalaria glabrata*: Morphology and behavior of granulocytic cells in vitro. **Journal of Invertebrate Pathology** **28**: 357-362.
- JEONG, K. H.; K. J. LIE; D. HEYNEMAN. 1983. The ultrastructure of the amebocyte producing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comparative Immunology** **7** (2): 217-228.
- JONES, H. D. 1983. The circulatory systems of Gastropods and Bivalves. *In*: **The Mollusca – Physiology, Part 2**. Eds. SALEUDDIN, A. S. M. & K. M. WILBUR. Academic Press. x+500p.
- JOKY, A. & M. MATRICON-GONDRAN. 1985. Response to the amoebocyte-producing organ of sensitized *Biomphalaria glabrata* after exposure to *Echinostoma caproni* miracidia. **Journal of Invertebrate Pathology** **45**: 28-33.

- JOKY, A.; M. MATRICON-GONDRAN & J. BENEX. 1983. Fine structural differences in the amoebocytes of *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comparative Immunology** 7 (4): 669-672.
- KAY, E. A. 1995. Section 1: Proceedings of the Symposium. Chapter 1: Keynote address. Which mollusks for extinction? p.1-7. *In: The Conservation Biology of Molluscs*. Ed. KAY, E. A. IUCN Publications Services Unit. v+83p.
- KINOTI, G. K. 1971. Observations on the infection of bulinid snails with *Schistosoma mattheei* - II. The mechanism of resistance to infection. **Parasitology** 62: 161-170.
- KLEIN, J. 1989. Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? **Scandinavian Journal of Immunology** 29 (5): 499-505.
- KOLLMANN, R. 1908. Recherches sur les leucocytes et le tissu lymphoide des invertébrés. **Annales des Sciences Naturelles** 8 (9): 1-240.
- LEME, J. L. M. 1973. Anatomy and systematics of the neotropical Strophocheiloidea (Gastropoda, Pulmonata) with the description of a new family. **Arquivos de Zoologia** 23 (5): 295-337.
- LEYDING, F. 1850. Zur Anatomie der männlichen Geschlechtsorgane und Anldrüsen der Säugethiere. **Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie** 2: 125-197.
- LIE, K. J.; D. HEYNEMAN & D. YAU. 1975. The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology** 61 (3):574-576.
- LIM, H-K. & D. HEYNEMAN. 1972. Intramolluscan inter-trematode antagonism: a review of factors influencing the host-parasite system and its possible role in biological control. **Advances in Parasitology** 10: 191–268.

- LINDBERG, D. R. 2008. Patellogastropoda, Neritimorpha and Cocculinoidea: The low-diversity gastropod clades. p.271-296. *In*: W. F. PONDER & D. R. LINDBERG. **Phylogeny and Evolution of the Mollusca**. Berkeley, University of California Press. xi+469p.
- LINDBERG, D. R.; W. F. PONDER & G. HASZPRUNAR. 2004. The Mollusca: relationships and patterns from their first half-billion years. p.252-278. *In*: J. CRACRAFT & M. J. DONOGHUE. **Assembling the tree of life**. Oxford, University Press. xvi+576p.
- LOVERDE, P. T.; J. GHERSON & C. S. RICHARDS. 1982. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: Fine Structure. **Developmental & Comparative Immunology** 6 (3): 441-449.
- LOKER, E. S.; D. F. CIMINO; G. A. STRYKER & L. A. HERTEL. 1987. The effect of size of M line *Biomphalaria glabrata* on the course of development of *Echinostoma paraensei*. **Journal of Parasitology** 98: 1-10.
- MANSUR, M. C. D.; I. HEYDRICH; L. M. Z. RICHINITTI; J. C. TARASCONI & E. DE C. RIOS. 2003. Moluscos. p. 49-71. *In*: C. S. FONTANA; G. A. BENCKE & R. E. DOS REIS. (Orgs.). **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul**. EDIPUCS. 632p.
- MARQUES, A. A. B. DE; C. S. FONTANA; E. VÉLEZ; G. A. BENCKE; M. SCHNEIDER & R. E. DOS REIS. 2002. **Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul**. Decreto no 41.672, de 11 junho de 2002. FZB/MCT-PUCRS/PANGEA, 52p. (Publicações Avulsas FZB, 11). Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br/downloads/fauna_ameacada.pdf> [Acesso em: Setembro de 2009].

- MORDAN, P. & C. WADE. 2008. Heterobranchia II: the Pulmonata. p. 409-426. *In*: W. F. PONDER & D. R. LINDBERG. **Phylogeny and evolution of the Mollusca**. Berkeley, University of California. xi+469p.
- MATRICON-GONDRAN, M. 1990. The site of ultrafiltration in the kidney sac of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Tissue and Cell** **22** (6): 911-923.
- MATRICON-GONDRAN, M. & M. LETOCART. 1999. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. **Journal of Invertebrates Pathology** **74** (3): 224-234.
- MONTEIL, J. F. & M. MATRICON-GONDRAN. 1991. Hemocytes production in trematode-infected *Lymnaea trunculata*. **Parasitology Research** **77**: 491-497.
- MÜLLER, G. 1956. Morphologie, Lebensablauf, und Bildungsort der Blutzellen von *Lymnaea stagnalis*. **Zeitschrift für Zellforschung** **44**: 519-556.
- NEGRÃO-CORRÊA, D.; C. A. J. PEREIRA; F. M. ROSA; R. L. MARTINS-SOUZA; Z. A. ANDRADE & P. M. Z. COELHO. 2007. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* Interaction. **Invertebrate Survival Journal** **4**: 101-111.
- NODA, S. 1992. Effects of excretory-secretory products of *Echinostoma paraensei* larvae on the hematopoietic organ of M-Line *Biomphalaria glabrata* snails. **Journal of Parasitology** **78** (3): 512-517.
- NODA, S. & E. S. LOKER. 1989. Effects of infection with *Echinostoma paraensei* on the circulating hemocytes population of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology** **98**: 35-41.

- M. ALMEIDA & M. D. SILVA. 2000. Invertebrados terrestres. pp. 53–62. *In*: H. G. BERGALLO; C. F. D. ROCHA; M. A. S. ALVES & M. VAN SLUYS. **A fauna ameaçada de extinção do estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Editora UERJ. 166p.
- OTTAVIANI, E. 1992. Immunorecognition in the gastropod molluscs with particular reference to the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). **Italian Journal of Zoology** 59 (2): 129-139.
- PAN, C. 1958. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology** 119: 237-299.
- PICORAL, M. & J. W. THOMÉ. 1989. Sobre a anatomia do sistema genital de *Bradybaena similis* (Férussac, 1821) (Pulmonata, Stylommatophora, Bradybaenidae) ocorrentes em Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 84 (4): 435-439.
- PINHEIRO, J. & S.B. AMATO. 1995. *Eurytrema coelomaticum*: influence of the infection on the reproduction and nucleic acids contents in the albumen gland and ovotestis of *Bradybaena similis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 90 (5): 635-638.
- PONDER, W. F. & D. R. LINDBERG. 2008. Molluscan Evolution and Phylogeny: an introduction. p. 1-17. *In*: W. F. PONDER & D. R. LINDBERG. **Phylogeny and evolution of the Mollusca**. Berkeley, University of California Press. xi+469p.
- RAMBO, P. R.; A. A. AGOSTINI & C. GRAEFF-TEIXEIRA. 1997. Abdominal angiostrongylosis in southernence and parasitic burden in molluscs intermediate hosts from eighteen endemic foci. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 92 (1): 9-14.

- RONDELAUD, D. & D. BARTHE. 1981. The development of the amebocyte-producing organ in *Lymnaea truncatula* (Müller) by *Fasciola hepatica* (L.). **Zeitschrift fur parasitenkunde** **65**:331-341.
- RUELLAN, L. & D. RONDELAUD. 1992. Lamellar structure of amoebocytes-producing tissue in *Lymnaea truncatula* infected with *Fasciola hepatica*. **Parasitology Research** **78** (3): 270-272.
- RUSO, J. & L. LAGADIC. 2004. Effects of environmental concentrations of antrazine on hemocyte density and phagocytic activity in pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). **Environmental Pollution** **127**: 303-311.
- SANTOS, M. A. V. & J. A. P. DINIZ. 2009. Aspectos ultraestruturais de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* Say (1818) (Gastropoda: Planorbidae) analisados sob microscopia eletrônica de transmissão. **Acta Amazonica** **39** (3): 707-712.
- SANTOS, D. V. V.; M. A. V. SANTOS & I. R. DE C. RODRIGUES. 2011. Hemocyte production in *Biomphalaria glabrata* snails after exposure to different *Schistosoma mansoni* infection protocols. **Revista Pan-Amazônica de Saúde** **2** (2): 33-38.
- SIMONE, L. R. L. 2006. **Land and Freshwater Molluscs of Brazil**. São Paulo, Fapesp. xii+390p.
- SMINIA, T. & BARENSEN, L. 1980. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata*, and *Bulinus truncates*. **Journal of Morphology** **165** (1): 31–39.

- SMINIA, T. 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. **Zeitschrift für Zellforschung** **130**: 497-526.
- SMINIA, T. 1974. Haematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography. **Cell and Tissue Research** **150**: 443-454.
- SMINIA, T.; A. A. WINSEMIUS & W. P. W. VAN DER KNAAP. 1981. Recognition of foreignness by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*, with special reference to the role and structure of the cell coat. **Journal of Invertebrate Pathology** **38**: 175-183.
- SMINIA, T.; W. P. W. VAN DER KNAAP; L. A. VANASSELT. 1983. Blood cell types and blood cell formation in gastropod molluscs. **Developmental & Comparative Immunology** **7** (4): 665-668.
- SOUZA, S. DOS S. & Z. A. ANDRADE. 2006. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **101** (1): 213-218.
- SURESH, P. G.; M. K. REJU & A. MOHANDAS. 1994. Factors influencing total haemocytes counts in freshwater gastropods. **Comparative Haematology International** **4**: 17-24.
- TEIXEIRA, C. G.; S. C. THIENGO; J. W. THOMÉ; A. B. MEDEIROS; L. CAMILLO-COURA & A. A. AGOSTINI. 1993. On the diversity of molluscs intermediate hosts of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Cespedes, 1971 in southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **88** (3): 487-489.
- VAN DER KNAAP, W. P. W. & E. S. LOKER. 1990. Immune Mechanisms in Trematode-Snail Interactions. **Parasitology Today** **6** (6): 175-182.

- VAN DER KNAAP, W. P. W.; C. M. ADEMA & T. SMINIA. 1993. Invertebrate blood cells: Morphological and functional aspects of the haemocytes in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. **Comparative Haematology International 3**: 20-26.
- WÄGELE, H.; A. KLUSMANN-KOLB; V. VONNEMANN & M. MEDINA. 2008. Heterobranchia I: The Opisthobranchia. p.385-408. *In*: W. F. PONDER & D. R. LINDBERG. **Phylogeny and Evolution of the Mollusca**. Berkeley, University of California Press. xi+469p.
- YOSHINO, T. P. 1976. The ultrastructure of circulating hemolymph cells of the marine snail *Cerithidea californica* (Gastropoda: Prosobranchiata). **Journal of Morphology 150**: 485-494.
- ZELCK, U. E.; W. BECKER & C. J. BAYNE. 1995. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. **Developmental and Comparative Immunology 19** (3): 181-194.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Literature Cited. Citations are arranged alphabetically. All references cited in the text must appear in the literature cited section and all items in this section must be cited in the text. Citation of unpublished studies or reports is not permitted, i.e., a volume and page number must be available for serials and a city, publisher, and full pagination for books. Abstracts not subjected to peer review may not be cited. Work may be cited as "in press" only exceptionally and until the copyediting stage when the reference should be completed or suppressed if not published by then. If absolutely necessary, a statement may be documented in the text of the paper by "pers. comm.", providing the person cited is aware of the manuscript and the reference to his person therein. Personal communications do not appear in the Literature Cited section. The references cited in the text should be listed at the end of the manuscript, according to the examples below. The title of each periodical must be complete, without abbreviations.

Periodicals

GUEDES, D.; R.J. YOUNG & K.B. STRIER. 2008. Energetic costs of reproduction in female northern muriquis, *Brachyteles hypoxanthus* (Primates: Platyrrhini: Atelidae).

Revista Brasileira de Zoologia 25 (4): 587-593.

LENT, H. & J. JURBERG. 1980. Comentários sobre a genitália externa masculina em *Triatoma* Laporte, 1832 (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Biologia** 40(3): 611-627.

SMITH, D.R. 1990. A synopsis of the sawflies (Hymenoptera, Symphita) of America South of the United States: Pergidae. **Revista Brasileira de Entomologia** 34 (1): 7-200.

Books

HENNING, W. 1981. **Insect phylogeny**. Chichester, John Wiley, XX+514p.

Chapter of book

HULL, D.L. 1974. Darwinism and historiography, p. 388-402. In: T.F. Glick (Ed.). **The comparative reception of Darwinism**. Austin, University of Texas, IV+505p.

Electronic resources

MARINONI, L. 1997. Sciomyzidae. In: A. Solis (Ed.). **Las Familias de insectos de Costa Rica**. Available online at: <http://www.inbio.ac.cr/papers/insectoscr/texto630.html> [Accessed: date of access].