

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALTERAÇÕES NOS ASPECTOS ETOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DO
MOLUSCO *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) INDUZIDAS PELA
QUEBRA DO CICLO CIRCADIANO COMO CONSEQÜÊNCIA DA ILUMINAÇÃO
CONTÍNUA.

Iedo Waissel do Patrocinio e Silva

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Janeiro – 2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALTERAÇÕES NOS ASPECTOS ETOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DO
MOLUSCO *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) INDUZIDAS PELA
QUEBRA DO CICLO CIRCADIANO COMO CONSEQÜÊNCIA DA ILUMINAÇÃO
CONTÍNUA.

Iedo Waissel do Patrocínio e Silva

Orientador: Prof. Dr. Cezar Laerte Natal

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Janeiro – 2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALTERAÇÕES NOS ASPECTOS ETOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DO
MOLUSCO *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) INDUZIDAS PELA
QUEBRA DO CICLO CIRCADIANO COMO CONSEQÜÊNCIA DA ILUMINAÇÃO
CONTÍNUA.

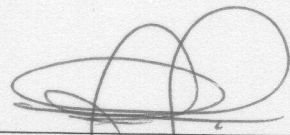
Iedo Waissel do Patrocinio e Silva

APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA EM 10/01/2000

Nota 93,0

Prof. Dr. Cezar Laerte Natal
Orientador

Prof. Dr. José Roberto Mineo



Prof. Dr. Oswaldo Marçal Jr.

Iedo Waissel do Patrocinio e Silva
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Prof.^a Ana Maria Coelho Carvalho
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, 05 de janeiro de 2000.

*“Se em certa altura
Tivesse voltado para a esquerda em vez de para a direita;
Se em certo momento
Tivesse dito sim em vez de não, ou não em vez de sim;
Se em certa conversa
Tivesse tido as frases que só agora, no meio-sono...elaboro
Se tudo isso tivesse sido assim,
Seria outro hoje, e talvez o universo inteiro
Seria insensivelmente levado a ser outro também.”*

FERNADO PESSOA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que tudo cria e recria, mas oculta-se nas últimas fibras de sua própria obra e que deixa a cada um a glória da descoberta.

Ao Prof. Dr Cezar Laerte Natal, meu orientador, e ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, meu co-orientador, pela confiança em mim depositada, pelo incentivo e respeito demonstrados ao longo deste trabalho. Pelo modelo como profissional e pesquisador e principalmente pelas pessoas ativas que são.

Aos Profs. Drs. Oswaldo Marçal Jr., Kleber Del Claro e a Prof. Ms. Ana Maria Coelho Carvalho, Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas, que juntamente com o meu orientador, Dr. Cezar L. Natal, e meu co-orientador, Dr. José R. Mineo, foram a mola mestra ao longo da minha graduação, agindo não apenas como Educadores e Pesquisadores, mas principalmente como amigos, "...este tipo de pessoa que a gente quer ter sempre por perto...". O MEU MUITO OBRIGADO...

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas e ao Departamento de Imunologia pelo apoio técnico, pelo suporte e infraestrutura a que forneceram; e principalmente, ao Departamento de Ciências Biológicas, pelos inúmeros animais a mim fornecidos.

E aos animais, sem os quais nada disto seria possível.

Dedico essa monografia ao meu pai, Oswaldo, pelo exemplo de vida que me deu ao longo destes anos juntos, ao meu irmão, Osvaldo, a minha cunhada, Antonina, pela confiança e apoio que sempre me deram... E a minha eterna companheira, Patricia Giovana, que sempre esteve ao meu lado, dizendo...vai...vai..., apoiando, sempre paciente e afetuosa.

INDICE

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Objetivo.....	07
2. MATERIAL E MÉTODOS	08
2.1. Parte Etológica.....	08
2.2. Parte Imunológica.....	09
2.2.1. Contagem de Hemócitos.....	09
2.2.2. Dosagem de Óxido Nítrico (NO) na Hemolinfa Circulante.....	10
3. RESULTADOS	12
3.1. Parte Etológica.....	12
3.2. Parte Imunológica.....	12
3.2.1. Contagem dos Hemócitos Circulantes.....	13
3.2.2. Dosagem de Óxido Nítrico (NO) na Hemolinfa Circulante.....	13
TABELAS E FIGURAS	15
4. DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÕES	24
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

Embora existam vários estudos relacionados a comportamento dos caramujos bionfalários, não tem sido descritas variações no componente imunocelular em função do estresse de qualquer natureza ou, em particular, do possível estresse provocado por alterações do ciclo circadiano.

Biomphalaria tenagophila (Orbigny, 1835) é um molusco da classe Gastropoda de habitat aquático. Tem uma importante participação neste ecossistema, pois, juntamente com as espécies *B. glabrata* e *B. straminea*, é um dos hospedeiros intermediários mais importantes da esquistossomose no Brasil. Como alguns outros caramujos, *B. tenagophila* consegue sobreviver sob condições adversas do meio devido à manifestação de certos comportamentos específicos. Como exemplo, pode-se citar: retração da massa cefalopodal na concha, saída da água e entrada em buracos em resposta a dosagens subletais de moluscidas (PIERI & JURBERG, 1981; JURBERG, 1987). Entre os comportamentos bem conhecidos dos caramujos destacam-se os deslocamentos

ativos:- deslizar e arrastar, os passivos: descida e subida súbitas, boiar; e parar que caracteriza-se pela ausência destes comportamentos (JURBERG, 1995).

Entre os mecanismos homeostáticos implicados com a autopreservação, os moluscos são dotados de um eficiente sistema de defesa com características semelhantes às dos vertebrados. Nestes processos estão envolvidos diversos fatores como células de defesa, reconhecimento de corpos estranhos, resposta encapsuladora, fagocitose, reações citotóxicas assim como fatores humorais. Na atividade de defesa contra organismos estranhos, podem participar células da hemolinfa, hemócitos, como também componentes humorais com a liberação de substâncias citotóxicas (CHENG & YOSHINO, 1976; FOLEY & CHENG, 1977). A atividade dos hemócitos é influenciada por fatores químicos que podem estar presentes na hemolinfa, como por exemplo, substâncias estranhas. A composição do meio ambiente onde estas células se encontram, também pode interferir na sua atividade. Entre os fatores do soro que provavelmente influenciam o comportamento dessas células estão as lecitinas (RENWRANTZ & CHENG, 1977; SCHOENBERG & CHENG, 1980; VAN DER KNAAP & LOKER, 1990). Tem sido evidenciada a participação de tais fatores humorais através da indução de resistência adquirida. A transferência de soro de moluscos refratários à infecção por *Schistosoma mansoni* torna resistentes moluscos susceptíveis (GRANATH & YOSHINO, 1984). Quanto à participação de componentes celulares de defesa tem sido observado que amebócitos de moluscos susceptíveis têm menor capacidade de fagocitar em relação aos resistentes. (FRYER & BAYNE, 1990).

As células sangüíneas circulantes, denominadas amebócitos ou hemócitos, estão presentes na hemolinfa e fluídos do corpo dos moluscos e

atuam como defensoras, sendo capazes de fagocitar e encapsular corpos estranhos. São também importantes no processo do reparo da concha, quando necessário, e o fazem através do transporte de cálcio. Podem ainda liberar substâncias citotóxicas que atuam no processo de coagulação da hemolinfa, onde desempenham o papel de "tampão", característica semelhante à do fibrinogênio, em casos de ferimentos dos moluscos, impedindo, assim, o extravasamento da hemolinfa (WAGGE, 1955; CHENG & BUTLER, 1979; BAYNE *et al.*, 1980; SMINIA & VAN DER KNAAP, 1987).

Os amebócitos possuem movimentação independente, o que facilita a fagocitose de materiais estranhos (ABDUL-SALAM & MICHELSON, 1980 a,b). Apesar de possuírem aspectos morfológicos muito variados, devido à sua capacidade de movimentação e emissão de pseudópodes, duas categorias de células podem ser descritas, granulócitos e hialinócitos (CHENG, 1975).

Os granulócitos são células que possuem grânulos citoplasmáticos, apresentam-se com maior número de lisossomos quando comparado aos hialinócitos, emitem pseudópodes e fagocitam corpos estranhos. Por estas características, são muito parecidos com os macrófagos humanos (CHENG 1975), e representam a maior subpopulação de células circulantes, perfazendo 85 a 90% do total. Os hialinócitos possuem um contorno circular ou ovalado, têm grande núcleo em relação ao raio citoplasmático com poucas estruturas lisossomais, não emitem pseudópodes, não possuem função fagocitária e são encontrados na hemolinfa na proporção de 10 a 15%.

SMINIA *et al.* (1981) sugerem que os moluscos mais jovens seriam mais susceptíveis à infecção por possuírem mais hialinócitos e conseqüentemente teriam menos enzimas e menos capacidade fagocítica.

Os amebócitos podem aumentar quantitativamente na hemolinfa circulante através de vários estímulos, como uma injeção de bactérias, ou após penetração de um trematódeo (SULLIVAN *et al.*, 1984).

De modo geral, os moluscos possuem uma resistência inata bem desenvolvida devido aos amebócitos circulantes, aos componentes do plasma, às presenças da concha e do muco.

Um outro aspecto relacionado ao sistema de defesa dos moluscos diz respeito ao mecanismo chamado "*burst respiratório*" (liberação de metabólitos de oxigênio), o qual produz ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio simples (O_2) e radicais hidroxila (OH). Os radicais gerados no "burst" são altamente reativos e potencialmente tóxicos, podendo participar no processo de inflamação (FRIDOWICH, 1978; NATHAN *et al.*, 1980) e na destruição de parasitas, (BABIOR, 1978; DIKKEBOOM *et al.*, 1987, 1988; SMINIA & VAN DER KNAAP, 1987). Um outro mecanismo citotóxico presente nos hemócitos é a produção de óxido nítrico (NO), um importante agente bactericida (OTTAVIANI *et al.*, 1993), com ação semelhante à encontrada nos macrófagos de vertebrados (HIBBS *et al.*, 1987 a,b; 1988), onde esse sistema composto pelo NO provavelmente promove uma aglutinação de bactérias ao redor dos macrófagos, com subsequente fagocitose e morte (OTTAVIANI *et al.*, 1993).

À semelhança de outros sistemas homeostáticos, o sistema de defesa dos seres vivos, em geral, e dos moluscos, em particular, deve estar sujeito a mecanismos reguladores de forma a adequar a resposta imune às necessidades provocadas pelas diferentes situações de desequilíbrio ou agressão.

Nas últimas décadas, estudos detalhados a respeito dos sistema imunológico e neuroendócrino vêm evidenciando a existência de uma

comunicação bidirecional efetiva entre esses dois sistemas (RABIN *et al.*, 1989; ADER *et al.*, 1990), demonstrando ainda que uma alteração no equilíbrio de um desses sistemas interfere na atividade do outro. Assim um desequilíbrio emocional ou até mesmo um estresse por tempo prolongado pode acarretar numa atividade imunológica hiperativa ou hipoativa, acarretando uma resposta adaptativa inapropriada. Tal conceito tem sido construído a partir dos resultados de estudos de várias condições de estresse sobre o sistema imunológico e da presença de hormônios característicos da resposta ao estresse em células do sistema imunológico.

O estresse pode ser visto como a mais importante e complexa reação orgânica para garantir a sobrevivência, em resposta a uma situação qualquer de quebra da homeostasia.

A grande quantidade de informações a respeito de estresse e sistema imunológico tem sido resultado de investigações envolvendo, quase que exclusivamente, a classe dos mamíferos, sendo o camundongo o principal alvo de investigação. A partir dos resultados obtidos desses roedores, principalmente, tem sido construído o conhecimento a respeito do sistema neuroimunológico para todos os outros animais, incluindo os invertebrados.

Alguns estudos evidenciam características comuns do sistema neuroimunológico que são compartilhadas na diversidade do reino animal. Por exemplo, o efeito do fenômeno estresse é também observado nos invertebrados (STEFANO & CATAPANE, 1977; STEFANO *et al.*, 1978) e alguns moduladores do sistema neuroendócrino e seus receptores específicos têm sido encontrados nesses animais (STEFANO *et al.*, 1989a; STEFANO *et al.*, 1989b; OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996). Estes estudos têm sugerido que não apenas o estresse

afeta o sistema imunológico, mas também que existe uma linha evolutiva que torna os mecanismos da resposta imunológica, frente ao estresse, bastante semelhantes entre invertebrados e vertebrados.

Em particular, os moluscos apresentam um sistema neural e um sistema endócrino relativamente complexos, porém, faltam órgãos como o hipotálamo, a pituitária e as adrenais, ou seja, faltam os principais órgãos envolvidos na resposta ao estresse dos vertebrados (BATEMAN *et al.*, 1989).

Nos moluscos, as principais células do sistema imunológico, são os hemócitos circulantes ou amebócitos. Eles estão presentes na hemolinfa e nos fluidos corporais do molusco, sendo eles as células de defesa que encapsulam e fagocitam patógenos estranhos. Eles contêm moléculas semelhantes ao Hormônio Adreno-Cortico-Trópico (ACTH) e aminas biogênicas como adrenalina (A), noradrenalina (NA), dopamina (DO); além de óxido nítrico (NO), que tem ação bactericida (OTTAVIANI *et al.*, 1993). Além disso, aparentemente ocorre uma cascata de reações semelhante ao observado em vertebrados. Assim, a incubação de hemócitos em meio contendo Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH) provoca a liberação de ACTH que por sua vez estimula a liberação de aminas biogênicas pelos hemócitos de moluscos (OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996).

1.1 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo determinar o possível efeito do estresse induzido por iluminação contínua nos parâmetros comportamentais (alterações nos comportamentos de arrastar, deslizar e parar-boiar) e imunológicos (quantidade de hemócitos circulantes na hemolifa, quantidade de óxido nítrico presente na hemolinfa circulante e contagem de hemócitos circulantes nos intervalos de 12h, 24h, 36h e 48h de experimentos) de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), um molusco de água doce, importante hospedeiro intermediário, na América do Sul, de *Schistosoma mansoni*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. PARTE ETOLÓGICA

Animais adultos, acima de 11 mm de diâmetro de concha (PARAENSE, 1970), da espécie de molusco *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), foram obtidos do Departamento de Biociências da Universidade Federal de Uberlândia.

Inicialmente, foram utilizados 40 animais divididos em grupos experimental (n = 20) e controle (n = 20). Cada grupo foi mantido em um aquário de vidro (50 cm x 28 cm x 35 cm), contendo água sob as mesmas condições físico-químicas e temperatura ambiente (25 °C) por três dias de ambientação para a situação experimental e 2 de observação. Antes do início do experimento, procedeu-se o tratamento para eclosão dos miracídios, que pudessem ter infectado os caramujos, por exposição à luz e calor de 28 °C fornecido por uma lâmpada incandescente de 60 W colocada a 40 cm de distância, durante 30 minutos (STANDEN, 1951).

Durante os dois dias de observação, uma câmera filmadora

Panasonic M 9000, com sensibilidade luminosa mínima de 3 lux, registrava os movimentos dos animais. As observações gravadas em fita cassete foram feitas em sessões de 20 minutos consecutivos, três vezes ao dia, sendo às 8h, às 15h e às 21h. Durante o dia (8 e 15 h) a luminosidade era de 200 lux e no período da noite (21 h) era de aproximadamente 10 lux.

O grupo controle foi submetido a um ciclo claro-escuro natural, sendo 14 h claro (200 lux) e 10 h escuro (aproximadamente 10 lux). Os animais do grupo experimental foram expostos a 48 h de iluminação contínua (200 lux).

A análise das filmagens foi feita utilizando-se a tabela comportamental de Jurberg (1995). Os comportamentos foram quantificados somando-se o número total de cada expressão comportamental ao longo de 120 minutos e os grupos foram comparados estatisticamente pelo teste χ^2 . Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

2.2. PARTE IMUNOLÓGICA

2.2.1. Contagem dos hemócitos circulantes

Um outro grupo de 93 animais adultos provindos do mesmo Departamento e mantidos nas mesmas condições supra citadas foi utilizado para o estudo do número de hemócitos circulantes na hemolinfa. Foram utilizados 93 animais adultos da espécie *Biomphalaria tenagophila*, que foram inicialmente divididos em grupo controle (n = 47) e grupo experimental (n = 46). Cada um destes grupos foi subdividido em grupos de 12 h (n = 8), 24 h (n = 8), 36 h (n = 8) e 48 h (n = 23 controle e n = 22 experimental). O grupo controle foi submetido a

um ciclo claro-escuro natural, sendo 14 h claro (200 lux) e 10 h escuro (aproximadamente 10 lux). Os animais do grupo experimental foram expostos a 12, 24, 36 e 48 h de iluminação contínua (200 lux), dependendo do subgrupo a que pertenciam, a partir do ciclo normal. Assim, o grupo 12 h, por exemplo, era submetido a 10 h de escuro e 26 h (14 h + 12 h) de claro.

A hemolinfa foi obtida mediante punção céfalo-podal, com pipeta Pasteur esterilizada (MICHELSON, 1966), transferida para um tubo de ensaio de vidro e mixada. Após a mistura das células sangüíneas, um certo volume de hemolinfa foi colocado em uma câmara de Neubauer para a contagem dos hemócitos. Foram contados os hemócitos de cada molusco em separado. Os experimentos foram feitos em duplo cego e os dados analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student, aceitando-se significância para $p < 0,05$.

2.2.2. Dosagem de óxido nítrico (NO) na hemolinfa circulante

Um outro lote contendo 60 animais adultos, da mesma espécie e sob as mesmas condições físico-químicas, foi dividido em 3 grupos: controle ($n = 10$) e experimentais 12 h ($n = 10$), 24 h ($n = 10$), 36 h ($n = 10$) e 48 h ($n = 10$) e um grupo de recuperação do ciclo circadiano ($n = 10$). O grupo controle foi submetido a um ciclo claro-escuro natural, sendo 14 h claro (200 lux) e 10 h escuro (aproximadamente 10 lux), as coletas de hemolinfa foram feitas logo após o término dos experimentos. Os animais do grupo experimental foram expostos a 12, 24, 36 e 48 h de iluminação contínua (200 lux), dependendo do subgrupo a que pertenciam; as coletas de hemolinfa foram feitas após o término do período a que cada subgrupo pertencia. Já os animais do grupo de recuperação do ciclo

circadiano tiveram seu ciclo quebrado por 48 h de iluminação contínua (200 lux) e novamente restabelecido, onde as coletas da hemolinfa foram feitas 3 dias após o início do restabelecimento do ciclo circadiano normal. Esses animais serão referidos daqui para a frente como grupo recuperado.

A produção de NO (nitrito e nitrato) foi avaliada por teste colorimétrico baseado na reação de Griess em cada um dos grupos supra citados.

Para a dosagem do óxido nítrico extraiu-se a hemolinfa circulante através de punção céfalo-podal, a hemolinfa foi colocada em um tubo de ensaio de vidro e centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm, após a centrifugação foi feita a extração de 150 μ l do sobrenadante da hemolinfa. Deste volume, 50 μ l do sobrenadante foi colocado em uma placa de cultura de 96 poços, com 50 μ l do reagente de Griess (NEED, N-(-1-Naphthyl)Ethyl-Ene-Diamine, + Sulfanilamida), para cada amostra (animal) foi feita uma duplicata e tirada a média das duas, e posterior leitura em um leitor de multiplacas (Titertek Multiscan Plus-Flow, USA) com absorvância de 570 nm.

Os experimentos foram feitos em duplo cego e os dados analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student, aceitando-se significância para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Dos 197 animais utilizados neste estudo, todos mostraram resultado negativo ao teste de infestação por miracídios.

3.1. PARTE ETOLÓGICA

De maneira geral, os animais submetidos à quebra do ciclo circadiano apresentaram maior atividade motora. Com relação ao comportamento de deslizar, o grupo experimental mostrou maior atividade (33 vezes) do que os animais do grupo controle (18 vezes, $p < 0,05$, Tabela 1). Também em relação ao comportamento de arrastar, os animais do grupo experimental expressaram maior número de vezes ($n = 48$) do que os animais do grupo controle ($n = 27$, $p < 0,05$, Tabela 1). Coerentemente quanto aos resultados motores, os animais do grupo controle apresentaram maior expressão do comportamento parar-boiar ($n = 120$) do que os animais do grupo experimental ($n = 71$, $p < 0,001$, Tabela 1).

3.2. PARTE IMUNOLÓGICA

3.2.1. Contagem dos hemócitos circulantes

Com relação à análise da curva do número de hemócitos circulantes, os animais que tiveram quebra do ciclo circadiano por 12 h consecutivas apresentaram redução ($p < 0,05$) desse tipo de células ($X = 134,5 \pm 35,5$ hemócitos/ μl de hemolinfa) quando comparados aos animais controle mantidos por 12 h em ciclo normal ($X = 174,6 \pm 26,4$ hemócitos/ μl de hemolinfa). Os animais experimentais mantidos com iluminação contínua por 24 h consecutivas também sofreram redução ($p < 0,01$) desse tipo de células ($X = 113,6 \pm 36,3$ hemócitos/ μl de hemolinfa) quando comparados aos animais controle mantidos por 24 h em ciclo normal ($X = 172,9 \pm 31,4$ hemócitos/ μl de hemolinfa). Os animais experimentais mantidos com iluminação contínua por 36 h consecutivas também sofreram redução ($p < 0,001$) desse tipo de células ($X = 97,7 \pm 14,0$ hemócitos/ μl de hemolinfa) quando comparados aos animais controle mantidos por 36 h em ciclo normal ($X = 173,7 \pm 45,0$ hemócitos/ μl de hemolinfa). Os animais experimentais mantidos com iluminação contínua por 48 h consecutivas também sofreram redução ($p < 0,001$) desse tipo de células ($X = 77,6 \pm 20,0$ hemócitos/ μl de hemolinfa) quando comparados aos animais controle mantidos por 48 h em ciclo normal ($X = 175,9 \pm 42,8$ hemócitos/ μl de hemolinfa). Não houve diferença entre os subgrupos controle. Os resultados estão mostrados nas figuras 1 e 2.

3.2.2. Dosagem de óxido nítrico (NO) na hemolinfa circulante

Com relação à análise da dosagem de óxido nítrico na hemolinfa circulante, os animais que tiveram quebra do ciclo circadiano apresentaram redução ($p < 0,001$) na produção de óxido nítrico quando comparados aos animais

que foram mantidos em ciclo circadiano normal. Assim, enquanto o grupo controle apresentou produção de $235,9 \pm 8,0 \mu\text{M}$ de NO, os demais grupos apresentaram as seguintes produções de NO: 12 h: $155,5 \pm 11,8 \mu\text{M}$; 24h: $144,7 \pm 10,3 \mu\text{M}$; 36 h: $133,8 \pm 5,6 \mu\text{M}$; 48h: $72,6 \pm 16,7 \mu\text{M}$. O grupo recuperado apresentou produção de NO igual a $230,4 \pm 17,5 \mu\text{M}$, não sendo observada diferença entre este grupo e o grupo controle. Os resultados são mostrados na figura 3.

Tabela 1 – Número de episódios dos comportamentos deslizar, arrastar e parar-boiar apresentados nos dois grupos, controle e experimental, nos moluscos, *Biomphalaria tenagophila*, durante os 2 dias de experimento, determinados pela tabela comportamental de JURBERG (1995).

*P < 0,05 e **P < 0,001 comparados com o controle (teste χ^2).

Comportamento	Ciclo circadiano	Iluminação contínua
Deslizar	18	33*
Arrastar	27	48*
Parar-boiar	120	71**

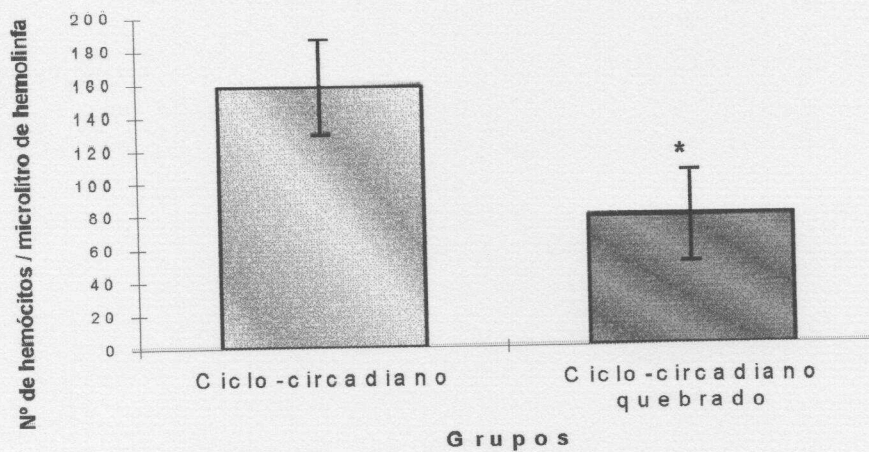


Figura 1 – Número de hemócitos por μl de hemolinfa em animais mantidos em condição de ciclo circadiano regular ou de iluminação contínua, 48h. * $P < 0,001$ quando comparado com ciclo circadiano regular (teste t de Student). Coluna cinza, ciclo circadiano regular; coluna azul, iluminação contínua.

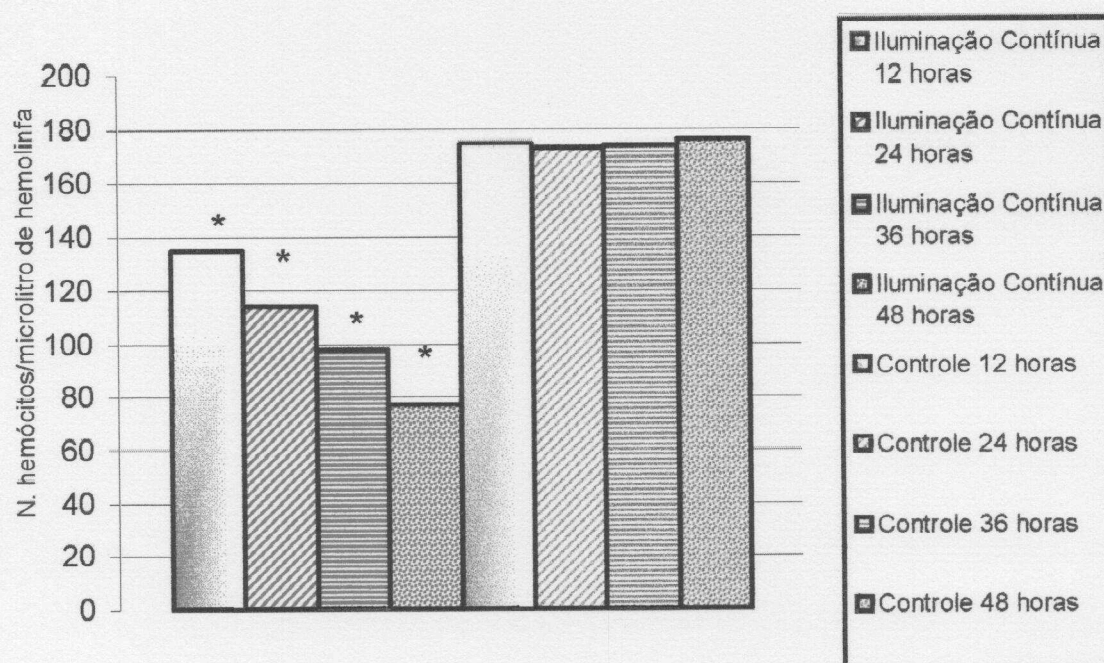


Figura 2 – Número de hemócitos por μl de hemolinfa em animais mantidos em condição de ciclo circadiano regular ou de iluminação contínua. * $P < 0,001$ quando comparado com ciclo circadiano regular (teste t de Student). Coluna azul, ciclo circadiano regular; coluna vermelha, iluminação contínua.

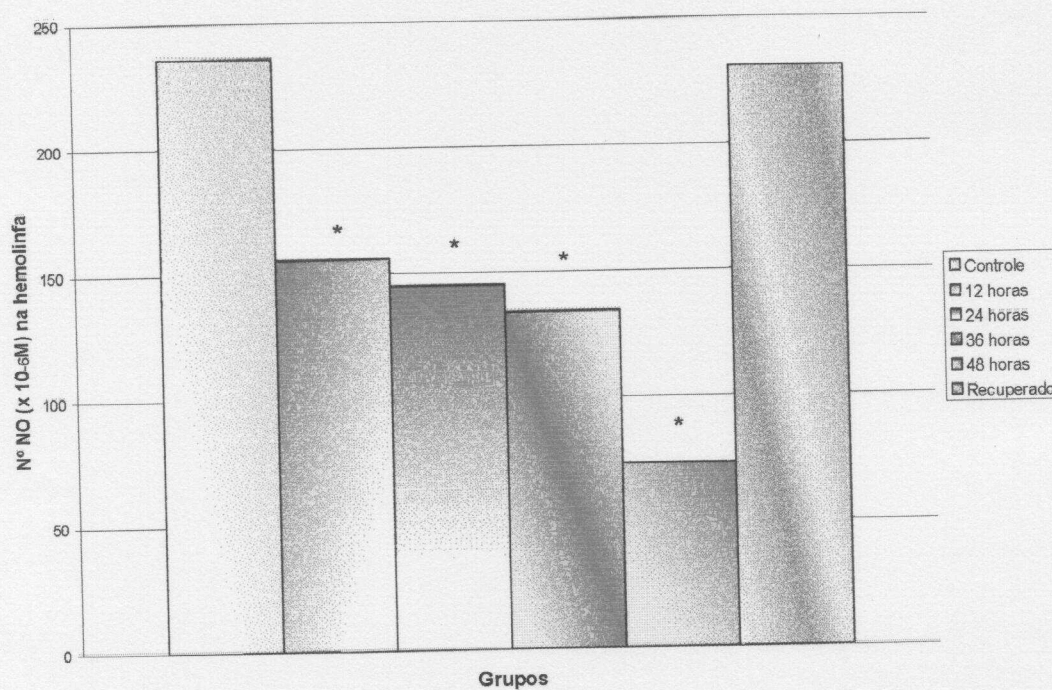


Figura 3 – Produção de óxido nítrico (μM) na hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila*, em animais mantidos em condição de ciclo circadiano regular ou de iluminação contínua. * $P < 0,001$ quando comparado com ciclo circadiano regular e ciclo recuperado (teste t de Student). Coluna azul, ciclo circadiano regular; coluna vermelha, iluminação contínua; coluna cinza, ciclo circadiano recuperado.

4. DISCUSSÃO

O fato de nenhum dos animais constituintes deste estudo apresentar resultado positivo no teste de infestação por miracídios era esperado, uma vez que todos eles foram obtidos do Departamento de Biociências onde são mantidos em criadouros não naturais, impossibilitados de qualquer contato com larvas do *S. mansoni*. Esse aspecto é de suma importância no âmbito do presente trabalho, pois o contato com miracídios poderia influenciar e modificar os resultados aqui obtidos em condições do aparente estresse por iluminação contínua (REIS *et al.*, 1995).

Este estudo contribui para reforçar o conceito de que o estresse pode afetar a resposta imunológica tanto em invertebrados como nos vertebrados (STEFANO *et al.*, 1990; OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996; ROBERTS, 1995). Tal alteração, produzida pelo estresse, pode levar tanto ao aumento quanto à diminuição da habilidade imunológica, dependendo da intensidade, do tempo de estímulo e da espécie; porém, em geral, provoca imunossupressão. O estímulo estressante, em moluscos, quando por tempo prolongado, pode ativar os mecanismos de defesa do animal, que reagirá de acordo com a circunstância (STEFANO *et al.*, 1990). No

presente trabalho foram observados aspectos do sistema defensivo: resposta comportamental (deslizar, arrastar e parar-boiar) e resposta imunológica: quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa e quantidade de óxido nítrico presente na hemolinfa em condições de iluminação contínua nos gastrópodos da espécie *Biomphalaria tenagophila*. Tal condição, quebra do ciclo circadiano, pode funcionar para tais animais como uma situação de estresse. Em primatas e roedores, a exposição à luz leva a alterações nos ciclos circadianos que poderão provocar variações neuro-endócrinas que, por sua vez, interferem na imunomodulação (ROBERTS, 1995). Um exemplo que retrata este aspecto é a variação circadiana, em humanos, nos níveis de leucócitos. Embora o número total dessas células seja relativamente constante ao longo do dia, o número de granulócitos e de monócitos predomina no período de luz do dia e o de linfócitos, durante a noite. Tal variação está relacionada com o tipo de receptor adrenérgico na superfície da membrana celular (SUZUKI *et al.*, 1997). Estes dados levam-nos a inferir que uma possível quebra do ciclo circadiano poderia afetar o número de células, tanto de ciclo diurno como as de ciclo noturno e, conseqüentemente, alterar a resposta imune destes animais.

De acordo com a tabela 1, observa-se um aumento na expressão de comportamentos motores ativos, tais como arrastar e deslizar, e uma diminuição da expressão dos comportamentos motores não ativos, parar-boiar, em animais com o ciclo circadiano quebrado quando comparados com os animais controle de ciclo regular. A luz contínua poderia estar ativando mudança de circuitos neuronais que transformariam um comportamento em outro. Em moluscos adultos, do gênero *Clione*, e em larvas de anfíbios, do gênero *Xenopus*, tem sido mostrado que circuitos próprios, porém interligados, estão relacionados a mudanças de

comportamentos do tipo boiar para nadar rapidamente, sob interferência de estímulos ambientais. No molusco *Clione*, tais circuitos, denominados geradores de padrões centrais, estão localizados nos gânglios podais (ARSHAVSKY *et al.*, 1993).

Na figura 1 e na figura 2, observamos um decréscimo do número de hemócitos dos animais que tiveram seu ciclo circadiano quebrado, sendo que houve um decréscimo gradual de 12 h para 48 h, quando comparado com os animais de ciclo regular, que tiveram o número de hemócitos invariável. Provavelmente, ocorreu uma inibição do sistema imunológico pelo sistema neural em condições de iluminação contínua, onde um maior tempo de exposição à luz acarretou um maior decréscimo no número de hemócitos, como o observado na figura 3. Uma possível explicação para tal fato pode estar embasada no metabolismo da serotonina e sua transformação em melatonina ou alguma substância semelhante. Sabe-se que, em mamíferos, a luz inibe a transformação de serotonina em melatonina. Assim, a luz que incide sobre a retina estimula o núcleo supraquiasmático do hipotálamo e resulta em aumento dos níveis de serotonina e redução da melatonina. Esse neuro-modulador, a serotonina, inibe a liberação de corticotrofina. Portanto, em presença de luz haverá ativação do sistema de corticosteróides adrenais através do aumento da relação serotonina/melatonina (ROBERTS, 1995). Embora os corticosteróides sejam imunossupressores, sabe-se que a serotonina é capaz de ativar seletivamente a proliferação de linfócitos T (RAO *et al.*, 1990). Dessa forma, os hemócitos poderiam estar sujeitos a um esquema de regulação mais geral em que um aumento de substâncias similares aos corticosteróides levaria a uma inibição da proliferação de tais células ou mesmo à sua migração para órgãos fora da

hemolinfa. Apesar dos moluscos não possuírem o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, envolvido no processo supracitado, deve haver um sistema funcionalmente semelhante a este, uma vez que muitos destes hormônios são encontrados em sua hemolinfa e receptores para tais substâncias são encontrados em seus hemócitos (OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996).

A análise da figura 3 mostra que os animais que tiveram seu ciclo circadiano quebrado pela iluminação contínua apresentaram um decréscimo na expressão de óxido nítrico provavelmente pela migração dos hemócitos da hemolinfa para outros órgãos do molusco, gerada pelo CRH ou pelo ACTH (OTTAVIANI *et al.*, 1990). Pode-se ainda inferir que a quebra no ciclo circadiano poderia levar a uma modificação de algum circuito neural que inibiria, indiretamente, através da interferência nos hemócitos ou em algum outro tipo celular, a liberação de óxido nítrico.

As análises da tabela I e das figuras 1, 2 e 3, mostram que os animais que tiveram o ciclo circadiano quebrado apresentaram maior mobilidade, menor expressão de hemócitos, um decréscimo progressivo na curva do número de hemócitos circulantes da hemolinfa, além de um decréscimo na expressão de óxido nítrico da hemolinfa circulante. É possível imaginar que um tipo de circuito dedicado a cada um dos aspectos de regulação esteja envolvido a cada vez (MORTON & CHIEL, 1994). Assim, a iluminação contínua ativaria um circuito motor ao mesmo tempo que desativaria um circuito relacionado ao eixo neuroimunológico. Ou ainda, que um neuromodulador estivesse envolvido nesses circuitos, ligando um e desligando o outro. Por exemplo, sabe-se que a serotonina ativa a produção de corticosteróides que são imunossupressores. No molusco *Clione*, esta substância está envolvida na transformação de um comportamento de

fuga modificando a natação lenta em natação rápida (ARSHAVSKY *et al.*, 1993). Os nossos resultados permitem sugerir que o mesmo pode estar ocorrendo com os moluscos objeto deste trabalho. Uma substância que poderia ser a própria serotonina ou algo semelhante a ela, que tenha o seu nível aumentado pela luz, poderia estar, ao mesmo tempo, induzindo uma diminuição do número de hemócitos na hemolinfa e também inibindo a produção de óxido nítrico, seja por uma inibição da enzima ou por uma competição pelo substrato que converte arginina em NO (HIBBS *et al.*, 1987a,b; 1988). Ainda, em relação à redução na produção de NO, pode-se imaginar que o mesmo estaria ocorrendo por uma via indireta envolvendo o neurotransmissor glutamato e receptores de N-methyl-D-aspartato (NMDA) sobre os quais o glutamato também atua. SNYDER & BREDT (1992), utilizando preparações de cerebelo, observaram que quando se adicionava NMDA ou glutamato a atividade NOSintase triplicava, conseqüentemente aumentando os níveis de NO. Pode-se inferir que um possível aumento no nível de serotonina, nos animais expostos à iluminação contínua, poderia estar inibindo um circuito glutamatérgico que, de uma forma semelhante àquela observada por SNYDER & BREDT (1992), poderia inibir a produção de óxido nítrico.

5. CONCLUSÕES

A iluminação contínua representa, para o molusco *Biomphalaria tenagophila*, um fator de estresse que interfere com o seu sistema imunológico. Tal interferência aparece, neste estudo, pela redução do número de hemócitos na hemolinfa e pela redução na expressão de óxido nítrico na hemolinfa circulante. Ocasionalmente não apenas uma redução efetiva no número de células de defesa, mas também uma diminuição na sua eficiência - redução da atividade citotóxica.

A iluminação contínua interfere também com o aspecto comportamental do animal, aqui manifesto pelo aumento na expressão de comportamentos ativos. Possivelmente existe um mecanismo comum, representado por circuitos neurais, que participam no controle da expressão comportamental e da expressão do sistema imunológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-SALAM, J.M.; MICHELSON, E.H. *Biomphalaria glabrata* assay of factors influencing in vitro phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, v.36, p. 52-r9, 1980a.

ABDUL-SALAM, J.M.; MICHELSON, E.H. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes: Effect of *Schistosoma mansoni* infection on in vitro phagocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, v.35, p.241-47, 1980b.

ADER, R.; FELTEN, D.; COHEN, N. Interations between the brain and the immune sistem. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.30, p.561-602, 1990.

ARSHAVSKY, Y.I.; ORLOVSKY, G.N.; PANCHIN, Y.V.; ROBERTS, A.; SOFFE, S.R. Neuronal control of swimming locomotion: analysis of the pteropod mollusc *Clione* and embryos of the amphibian *Xenopus*. *TINS*, v.16, n.6; p.227-233, 1993.

- BABIOR, B.M. Oxygen-dependent killing by phagocytes. *New England J. Med.* v.298, n.12, p.659-68, 1978.
- BATEMAN, A.; SINGH, A.; KRAL, T.; SOLOMON, S. The Immune - Hypothalamic - Pituitary - Adrenal. Axis. *Endocrine Reviews*, v.10, p.92-112, 1989.
- BAYNE, C.J.; BUCKLEY, P.M.; DEWAN. *Schistosoma mansoni*: Citotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.*, v.50, p. 409-16, 1980.
- DIKKEBOOM, R.; TIJNAGEL, J.M.G.H.; MULDER, E.C.; VAN DER KNAAP, W.P.W. Hemocytes of the pond snail *Lymnaea stagnalis* fenerate reactive forms of oxygen. *J. Invertebr. Pathol.*, v.49, p.321-31, 1987.
- DIKKEBOOM, R.; BAYNE, C.J.; VAN DER KNAAP, W.P.W.; TIJNAGEL, J.M.G.H. Possible role of reactive forms of oxigen in vitro killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitol. Res.* v.75, p.148-54, 1988.
- CHENG, T.C. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.266, p.343-79, 1975.
- CHENG, T.C.; BUTLER, M.S. Experimentally induced elevations in acid phosphatase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *J. Invertebr. Pathol.*, v.45, p.119-29, 1979.

- CHENG, T.C.; YOSHINO, T.P. Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacterial lipids. *J. Invertebr. Pathol.*, v.28, p.143-46, 1976.
- FOLEY, D.A.; CHENG, T.C. Degranulation and other changes of molluscan granulocytes associated with phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, v.29, p.321-5, 1977.
- FRIDOWICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science*, v.169, p.875-79, 1978.
- FRYER, S.E.; BAYNE, C.J. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, v.76, p.45-52, 1990.
- GRANATH, W.O.; YOSHINO, T.S. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.* v.58, p. 188-193, 1984.
- HIBBS, J.B. Jr.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deaminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, v.235, p.473, 1987a.
- HIBBS, J.B. Jr.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target T-cells. *J. Immunol.*, v.138, p.550, 1987b.

- HIBBS, J.B. Jr.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.157, p.87, 1988.
- JURBERG, P. Why it is difficult to control *Biomphalaria glabrata*, the vector of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.82, n.4, p.203-207, 1987.
- JURBERG, P. Etologia. In: BARBOSA, F.S. (Editor), *Tópicos em Malacologia Médica*. Editora Fio Cruz, Rio de Janeiro, 1995.
- NATHAN, C.F.; MURRAY, H.W. & COHN, Z.A. The macrophage as an effector cell. *The New England J. Med.* V.303, n.11, p.622-26, 1980.
- MICHELSON, E.H. Specificity of hemolymph antigens in taxonomic discrimination of medically important snails. *J. Parasitol.*, v.52, n.3, p.466-472, 1966.
- MORTON, D.W.; CHIEL, H.J. Neural architectures for adaptive behavior. *TINS*, v.17, n.10, p.413-420, 1994.
- OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Prog. in Neurobiol.*, v.48; p.421-440, 1996.
- OTTAVIANI, E.; PAEMEN, L.R.; CADET, P.; STEFANO, G. Evidence for nitric

oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.248, p.319-324, 1993.

OTTAVIANI, E.; PETRAGLIA, F.; GENEDANI, S.; BERNAEDI, M.; BERTOLINI, A.; CASSARIZZA, A.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. Phagocytosis and ACTH- and (-endorphin-like molecules in invertebrate (molluscan) and in vertebrate (human) cells: possible significance for the evolution of the immunoneuroendocrine system. *Ann. NY Acad. Sci.*, v.594, p.454-457, 1990.

PARAENSE, W.L.. Planorbídeos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A.S. (Editor), *Esquistossomose mansoni*. Edusp, São Paulo, 1970.

PIERI, O.S.; JURBERG, P. Aspectos etológicos na sobrevivência dos caramujos vetores da xistosomose ao tratamento com muluscidas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.76, p.47-55, 1981.

RABIN, B.S.; COHEN, S.; GANGULI, R.; LYSLE, D.T.; CUNNICK, J.E. Bidirectional interaction between the central nervous system and the immune system. *Critical Rev. in Immunol.*, v.9, n.4, p.279-312, 1989.

RAO, M.L.; MILLER-OERLINGHAUSEN, B.; MACKERT, A.; STIEGLITZ, R.D.; STREBEL, B.; VOLZ, H.P. The influence of phototherapy on serotonin and melatonin in non-seasonal depression. *Pharmacopsychiatry.*, v.23; p.155-158,

1990.

REIS, S.M.P.M.; MAGALHÃES, L.A.; CARVALHO, J.F. Ação da inoculação de hemolinfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Rev. Saúde Publ. São Paulo*, v.29, n.4, p.259-64, 1995.

RENWRANTZ, L.; CHENG, T.C. Agglutinin receptors attachment of erythrocytes to hemocytes of *Helix pomatia*. *J. Invertebr. Pathol.*, v.29, p.88-96, 1977.

ROBERTS, J.E. Visible light induced changes in the immune response trough an eye-brain mechanism (photoneuroimmunology). *J. Photochemistry and Photobiol.*, v.29, p.3-15, 1995.

SCHOENBERG, D.A.; CHENG, T.C. Lectin binding specificities of hemocytes from two strains of *Biomphalaria glabrata* as determined by microhemadsorption assays. *Dev. Comp. Immunol.* v.9, p.497-509, 1980.

SMINIA, T.; VAN DER KNAAP, W.P.W. Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev. Comp. Immunol.*, v.11, p.17-28, 1987.

SMINIA, T.; WINSEMIUS, A.; VAN DER KNAAP, W.P.W. Recognition of foreignness by blood cells of the fresh-water snail *Lymnaea stagnalis* with special reference to the role and structure of the cell coat. *J. Invertebr. Pathol.*, v.38, p.175-83, 1981.

- SNYDER, S.H.; BREDT, D.S. Biological role of nitric oxide. *Scien. Americ.*, may, p.28-35, 1992.
- STANDEN, O.D. The effects of temperature, light and salinity upon the hatching ova of *Schistosoma mansoni*. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.45, n.2, p.221-241, 1951.
- STEFANO, G.B.; CADET, P.; DOKUN, A.; SCHARRER, B. A neuroimmunoregulatory-like mechanism responding to stress in the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Brain, Behavior and Immunity*, v.4, p.323-329, 1990.
- STEFANO, G.B.; CADET, P.; SCHARRER, B. Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: Evidence for a subtype of δ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.86; p.6307-6311, 1989a.
- STEFANO, G.B.; CATAPANE, E.J. The effects of temperature acclimation on monoamine metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.203, p.449-546, 1977.
- STEFANO, G.B.; HIRIPI, L.; CATAPANE, E.J. The effects of temperature acclimation on monoamine metabolism. *J. Therm. Biol.*, v.3, p.79-83, 1978.
- STEFANO, G.B.; LEUNG, M.K.; ZHAO, X.; SCHARRER, B. Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.86,

p.626-630, 1989b.

SULLIVAN, J.T.; CHENG, T.C.; HOWLAND, K.H. Mitotic responses of the anterior pericardial wall of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) subjected to challenge. *J. Invertebr. Pathol.*, v.44, p.144-46, 1984.

SUZUKI, S.; TOYABE, S.; MORODA, T.; TADA, T.; TSUKAHARA, A.; HAI, T.; MINAGWA, M.; MARUYAMA, S.; HATAKEYAMA, K.; ENDOH, K.; ABO, T. Circadian rhythm of leucocytes and lymphocyte subsets and its possible correlation with the autonomic nervous system. *Clin. Exp. Immunol.*, v.110, p.500-508, 1997.

VAN DER KNAAP, W.P.W.; LOKER, E.S. Immune mechanism in trematode-snail interactions. *Parasitol. Today*, v.6 n.6, p.175-82, 1990.

WAGGE, L.E. Amoebocytes. *Cytology*. v.4, p.31-78, 1955.