

**Raquel Lopes Martins Souza**

**Caracterização fenotípica e funcional de hemócitos circulantes de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*, linhagens resistentes e susceptíveis, durante a infecção por *Schistosoma mansoni***

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE, 2006

## ÍNDICE

<b>Lista</b>	<b>de</b>	
<b>figuras.....</b>	<b>4</b>	
<b>Listas</b>	<b>de</b>	
<b>tabelas.....</b>	<b>8</b>	
<b>Lista</b>	<b>de</b>	
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>9</b>	
<b>Resumo.....</b>	<b>10</b>	
<b>Abstract.....</b>	<b>12</b>	
<b>1.</b>		
<b>Introdução.....</b>	<b>14</b>	
<b>2.</b>	<b>Revisão</b>	<b>da</b>
<b>literatura.....</b>	<b>17</b>	
2.1.		Aspectos
gerais.....	17	
2.2.	Morfologia dos moluscos do	gênero
<i>Biomphalaria</i> .....	17	
2.3.	Moluscos e a transmissão	da
esquistossomose.....	18	
2.4.	Relação parasito	-
hospedeiro.....	23	
2.4.1.		Hospedeiro
definitivo.....	23	
2.4.2.		Hospedeiro
Intermediário.....	24	
2.5.	Sistema de defesa interna	do
molusco.....	28	
2.6.	Mecanismos funcionais na interação parasito	-
molusco.....	38	
<b>3.</b>		
<b>Objetivos.....</b>	<b>44</b>	
3.1.		Objetivos
Gerais.....	44	
3.2.		Objetivos
específicos.....	44	
<b>Capítulo 1</b>		
<b>4. Caracterização morfológica da população de hemócitos circulantes de caramujos <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> durante a infecção experimental pelo <i>S. mansoni</i> e tratamento com sílica.</b>	<b>46</b>	

<b>4.1.</b>	<b>Material</b>	<b>e</b>
<b>métodos.....</b>	<b>49</b>	
4.1.1.		
Caramujos.....	49	
4.1.2.		O
Parasito.....	49	
4.1.3.	Infecção	de
caramujos.....	50	
4.1.4.	Tratamento	com
sílica.....	50	
4.1.5.	Coleta da hemolinfa e isolamento	de
hemócitos.....	51	
4.1.6.	Contagem diferencial de hemócitos	e
viabilidade.....	52	
4.1.7.	Caracterização fenotípica de hemócitos circulantes de <i>B. tenagophila</i>	
.....	53	
4.1.8.		Análise
estatística.....	54	

<b>4.2.</b>	<b>Resultados</b>
<b>.....</b>	<b>55</b>
4.2.1.	Caracterização do perfil fenotípico de hemócitos de caramujos <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> através da citometria de fluxo.....
	55
4.2.2.	Efeito da inoculação de sílica no perfil de hemócitos circulantes de caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i> .....
	64

<b>4.3.</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>81</b>
-------------	-----------------------	-----------

## Capítulo 2

<b>5. Papel de lectina e ação de carboidratos na interação de hemócitos circulantes de <i>B. glabrata</i> e <i>B. tenagophila</i> com <i>S. mansoni</i></b>	<b>86</b>
---	-----------

<b>5.1.</b>	<b>Material</b>	<b>e</b>
<b>métodos.....</b>	<b>89</b>	
5.1.1.		
Caramujos.....	89	
5.1.2.		O
Parasito.....	89	
5.1.3.	Infecção	de
caramujos.....	89	
5.1.4.	Marcação de moléculas expressas na superfície de hemócitos circulantes.....	
	89	

5.1.5. Ação das lectinas e de carboidratos na interação de hemócitos com esporocistos transformados <i>in vitro</i> .....	91
5.1.6. Índice de adesão celular (CAI).....	93
5.1.7. Viabilidade dos esporocistos.....	93
5.1.8. Análise estatística.....	94

## 5.2.

<b>Resultados</b> .....	<b>96</b>
5.2.1. Marcação dos hemócitos circulantes de caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i> com lectinas fluorescentes.....	96
5.2.2. Ação de carboidratos na interação de hemócitos com esporocistos transformados <i>in vitro</i> .....	108

## 5.3.

<b>Discussão</b> .....	<b>125</b>
------------------------	------------

## Capítulo 3

<b>6. Análise da interação dos hemócitos com antígenos e esporocistos de <i>S. mansoni</i></b> .....	<b>131</b>
--	------------

<b>6.1. Material e métodos</b> .....	<b>133</b>
6.1.1. Caramujos.....	133
6.1.2. Parasito.....	133
6.1.3. Infecção de caramujos.....	133
6.1.4. Contagem diferencial de hemócitos e viabilidade.....	133
6.1.5. Análise da interação dos hemócitos com antígenos e esporocistos de <i>S. mansoni</i> . ....	134
6.1.6. Análise estatística.....	135

## 6.2.

<b>Resultados</b> .....	<b>136</b>
6.2.1. Produção de NO.....	136

6.3.		
<b>Discussão.....</b>	<b>140</b>	
7.		
<b>Conclusões.....</b>	<b>142</b>	
8.		<b>Referências</b>
<b>bibliográficas.....</b>	<b>145</b>	
9.		<b>Anexos</b>
<b>.....</b>	<b>158</b>	

**Lista de figuras**  
**página**

Figura 1 Análise do perfil da população dos hemócitos circulantes de caramujos *Biomphalaria* pela citometria de fluxo (FACSCalibur), separados a partir da granulosidade (SSC-Height) versus tamanho (FSC-Height)

A: Leitura da hemolinfa total  
B: Leitura após eliminação de células mortas e debris.....57

Figura 2: Perfil da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* da linhagem BH (BG-BH), *B. tenagophila* linhagem Cabo Frio (BT-CF) e *B. tenagophila* linhagem Taim (BT-T) livres de infecção por *S. mansoni*, obtida na citometria de fluxo. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a população 1 de *B. glabrata* (sem infecção).....58

Figura 3: Perfil da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* nas primeiras 24 horas (A) e durante 30 dias (B) de infecção com *S. mansoni*, obtida através da citometria de fluxo. \* Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao ponto 0 (sem infecção).....60

Figura 4: Perfil da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio nas primeiras 24 horas (A) e durante 30 dias (B) de infecção com *S. mansoni*, obtida através da citometria de fluxo. \* Representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao ponto 0 (sem infecção).....62

Figura 5: Perfil da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem Taim nas primeiras 24 horas (A) e durante 30 dias (B) de infecção com *S. mansoni*, obtida através da citometria de fluxo. \* Representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao ponto 0 (sem infecção).....63

Figura 6: Efeito da inoculação de sílica na porcentagem das populações de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata*, nas primeiras 120 horas de infecção por miracídeos de *S. mansoni*. A: Caramujos inoculados com CBSS e B: Caramujos inoculados com sílica. \* Diferenças significativas em relação ao ponto 0 e # diferenças entre os grupos ( $p < 0,05$ ) Cada ponto representa média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas da hemolinfa total de 3 caramujos. O ponto 0 representa caramujos com 24 horas de inoculação de sílica e livres de infecção.....68

Figura 7: Efeito da inoculação de sílica na porcentagem das populações de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio, nas primeiras 120 horas de infecção por miracídeos de *S. mansoni*. A: Caramujos inoculados com CBSS e B: Caramujos inoculados com sílica. \* Diferenças significativas antes e após infecção e # representa as diferenças significativas entre sílica e CBSS ( $p < 0,05$ ) Cada ponto representa média  $\pm$  desvio

padrão de triplicatas da hemolinfa total de 3 caramujos. O ponto 0 representa caramujos com 24 horas de inoculação de sílica e livres de infecção.....70

Figura 8: Efeito da inoculação de sílica na porcentagem das populações de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem do Taim, nas primeiras 120 horas de infecção por miracídeos de *S. mansoni*. **A**: Caramujos inoculados com CBSS e **B**: Caramujos inoculados com sílica. \* Diferenças significativas antes e após infecção e # representa as diferenças significativas entre sílica e CBSS ( $p < 0,05$ ). Cada ponto representa média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas da hemolinfa total de 3 caramujos. O ponto 0 representa caramujos com 24 horas de inoculação de sílica e livres de infecção.....72

Figura 9: Granulosidade dos hemócitos circulantes de *B. glabrata*. **A**: caramujos livres de infecção e após 24 horas da inoculação da sílica e **B**: caramujos com 5 horas de infecção e 30 horas de inoculação de sílica. Hemócitos analisados pela Citometria de Fluxo.....78

Figura 10: Granulosidade dos hemócitos circulantes de *B. tenagophila* Cabo Frio. **A**: caramujos livres de infecção e após 24 horas da inoculação da sílica e **B**: caramujos com 5 horas de infecção e 30 horas de inoculação de sílica. Hemócitos analisados pela Citometria de Fluxo.....79

Figura 11: Granulosidade dos hemócitos circulantes de *B. tenagophila* Taim. **A**: caramujos livres de infecção e após 24 horas da inoculação da sílica e **B**: caramujos com 5 horas de infecção e 30 horas de inoculação de sílica. Hemócitos analisados pela Citometria de Fluxo.....80

Figura 12: Hemócitos aderidos a superfície dos esporocistos de *S. mansoni* - Índice de adesão celular - IAC.....95

Figura 13: Porcentagem de hemócitos presentes na hemolinfa total de caramujos *Biomphalaria* marcados com lectinas conjugadas com FITC (ConA, PNA, SBA e WGA). BG - *B. glabrata*, BT-CF - *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio e BT-T - *B. tenagophila* da linhagem Taim. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação a *B. glabrata* e dois \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação a *B. glabrata* e linhagem Cabo Frio.....97

Figura 14 Marcação da superfície de hemócitos circulantes de caramujos *B. glabrata*, com lectinas conjugadas a FITC. a e b: marcação com WGA; c e d: marcação com ConA; e e f: marcação com PNA. a, c e e: Nomarski; b, d e f: microscopia de fluorescência. Aumento 600x.....99

Figura 15: Marcação da superfície de hemócitos circulantes de caramujos *B. tenagophila* Cabo Frio, com lectinas conjugadas a FITC. a e b: marcação com WGA; c e d: marcação com PNA; e e f: marcação com ConA-FITC. a, c e e: Nomarski; b, d e f:

microscopia	de	fluorescência.	Aumento
600x.....			92

Figura 16: Marcação da superfície de hemócitos circulantes de caramujos *B. tenagophila* Taim, com lectinas conjugadas a FITC. a e b: marcação com WGA; c e d: marcação com PNA. a e c: Nomarski; b e d: microscopia de fluorescência. Aumento 600x.....100

Figura 17: Padrão de marcação de hemócitos circulantes de *B. glabrata* com lectinas conjugadas com FITC, durante as primeiras 120 horas de infecção pelo *S. mansoni*. Em **A**: marcação com ConA, **B**: marcação com PNA, **C**: marcação com SBA e **D**: marcação com WGA.....101

Figura 18: Padrão de marcação de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio, com lectinas conjugadas com FITC, durante as primeiras 120 horas de infecção pelo *S. mansoni*. Em **A**: marcação com ConA, **B**: marcação com PNA, **C**: marcação com SBA e **D**: marcação com WGA.....105

Figura 19: Padrão de marcação de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Taim, com lectinas conjugadas com FITC, durante as primeiras 120 horas de infecção pelo *S. mansoni*. Em **A**: marcação com ConA, **B**: marcação com PNA, **C**: marcação com SBA e **D**: marcação com WGA.....107

Figura 20: Adesão de hemócitos circulantes de *B. glabrata* ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni* após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. glabrata*. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.....110

Figura 21: Adesão de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni* após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.....112



Figura 22: Adesão de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni* após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.....114

Figura 23: Adesão de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Taim ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni* após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. tenagophila* Taim. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.....116

Figura 24: Adesão de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Taim ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni* após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. tenagophila* Taim. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.....118

Figura 25: Porcentagem de esporocistos de *S. mansoni* mortos após 24 horas de incubação com hemócitos na presença ou não do extrato solúvel da hemolinfa de caramujos *B. glabrata*. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.....120

Figura 26: Porcentagem de esporocistos de *S. mansoni* mortos após 24 horas de incubação com hemócitos na presença ou não de extrato solúvel da hemolinfa de caramujos *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio. Em **A**: esporocistos incubados na presença de diferentes concentrações de N-acetilglicosamina e em **B**: esporocistos incubados na presença de diferentes concentrações de Galactosamina. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle e # representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação aos tratamentos.....122

Figura 27: Porcentagem de esporocistos de *S. mansoni* mortos após 24 horas de incubação com hemócitos na presença ou não de extrato solúvel da hemolinfa de caramujos *B. tenagophila* da linhagem Taim. Em **A**: esporocistos incubados na presença de diferentes

concentrações de N-acetilglicosamina e em **B**: esporocistos incubados na presença de diferentes concentrações de Galactosamina. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle e # representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação aos tratamentos.....124

Figura 28: Cinética de incubação dos hemócitos estimulados com SEA, para medida de nitrito. BG: caramujos *B. glabrata*, BT-CF: caramujos *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio e BT-Taim: caramujos *B. tenagophila* da linhagem Taim.....137

Figura 29: Cinética da produção de Nitrato pelo hemócitos circulantes de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* das linhagens Taim e Cabo Frio, durante a infecção pelo *S. mansoni* sob reestímulo de SEA.....139

**Lista de Tabelas**  
**página**

Tabela 1: Número de granulócitos ( $\times 10^{-5}$ / ml) de hemolinfa retirada de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, tratados ou não com sílica, observados ao microscópio óptico. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de triplicadas com hemolinfa de três caramujos.....66

Tabela 2: Número hemócitos circulantes ( $\times 10^{-5}$ ) na hemolinfa de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados por *S. mansoni* tratados ou não pela sílica, analisada pela técnica de citometria de fluxo. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de triplicadas com hemolinfa de três caramujos.....74

Tabela 3: Número hemócitos circulantes ( $\times 10^{-5}$ ) na hemolinfa de caramujos *Biomphalaria tenagophila* da linhagem Cabo Frio infectados por *S. mansoni* tratados ou não pela sílica, analisada pela técnica de citometria de fluxo. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de triplicadas com hemolinfa de três caramujos.....75

Tabela 4: Número hemócitos circulantes ( $\times 10^{-5}$ ) na hemolinfa de caramujos *Biomphalaria tenagophila* da linhagem Taim infectados por *S. mansoni* tratados ou não pela sílica, analisada pela técnica de citometria de fluxo. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de triplicadas com hemolinfa de três caramujos.....76

### Lista de Abreviaturas

ra	Abreviatu	Significado
	BH	Linhagens de <i>B. glabrata</i> proveniente de Belo Horizonte - MG
	CBSS	Solução salina balanceada de Chernin
	CF	Linhagens de <i>B. tenagophila</i> proveniente de Cabo Frio - RJ
	ConA	Lectina isolada de <i>Conavalia ensiformis</i>
	dpi	Dias após infecção pelo <i>S. mansoni</i>
	ESPs	Produtos excreto-secretados de esporocistos
	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
	FL1	Fluorescência 1
	FL3	Fluorescência 3
	FSC	Tamanho
	hpi	Horas após infecção pelo <i>S. mansoni</i>
	IAC	Índice de adesão celular
	iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
	NO	Óxido nítrico
	NOS	Espécies reativas de nitrogênio
	PNA	Lectina isolada de <i>Arachis hypogaea</i>
	ROS	Espécies reativas de oxigênio
	SBA	Lectina isolada de <i>Glicine Max</i>
	SEA	Antígeno solúvel de ovos de <i>S. mansoni</i>
	SID	Sistema interno de defesa
	SSC	Granulosidade
	WGA	Lectina isolada de <i>Triticum vulgare</i>

## RESUMO

Moluscos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros do *Schistosoma mansoni* possuem um sistema interno de defesa (SID) que compreende células circulantes denominadas hemócitos e fatores solúveis presentes na hemolinfa. Os hemócitos circulantes estão envolvidos na destruição das larvas de trematódas, porém o mecanismo pelo qual eles destroem o parasito ainda não está totalmente esclarecido. Como em outros gastropodas, os hemócitos circulantes de *Biomphalaria* não são uma população homogênea e acredita-se que cada tipo celular está envolvido de maneira diferente na destruição do parasito.

Um dos objetivos deste trabalho é o de caracterização morfológica do perfil da população dos hemócitos circulantes, através da citometria de fluxo, de caramujos *B. tenagophila* Taim (resistente ao *S. mansoni*), *B. tenagophila* Cabo Frio (parcialmente suscetível ao *S. mansoni*) e *B. glabrata* BH (altamente suscetível ao *S. mansoni*) durante a infecção pelo *S. mansoni*. Foi possível identificar duas subpopulações de hemócitos, denominadas população de hemócitos pequenos e de hemócitos grandes. Em *B. tenagophila* não infectado, da linhagem Taim ou Cabo Frio, os hemócitos pequenos representam cerca de 30 % do total de células circulantes, enquanto os hemócitos grandes cerca de 70 %. Entretanto, em *B. glabrata* os hemócitos pequenos equivalem a 56 % do total, já os grandes são 44 %. Após a infecção pelo *S. mansoni*, foram observadas variações no perfil da população dos hemócitos circulantes, principalmente nas primeiras horas de infecção, que correspondem a um aumento da porcentagem de hemócitos pequenos. Estas variações foram ausentes em *B. glabrata* e significativamente marcantes nas linhagens Taim de *B. tenagophila*. Durante a inoculação de sílica nestes caramujos, a análise por citometria de fluxo, demonstrou uma diminuição significativa na porcentagem de hemócitos pequenos e aumento da população de hemócitos grandes. A diminuição da população de hemócitos pequenos poderia ser justificada pelo fato de a sílica destruir pequenos granulócitos que compõem parte da população de hemócitos pequenos. O tratamento com sílica também aumentou a granulocidade dos hemócitos, principalmente na linhagem do Taim de *B. tenagophila*.

Elementos solúveis da hemolinfa atuam sinergicamente com os hemócitos na destruição do parasito, dentre eles a lectina tem sido identificadas. As lectinas são encontradas na hemolinfa de moluscos como um fator que aglutina e opsoniza partícula e que pode mediar o reconhecimento de partículas estranhas e/ou parasito. Em moluscos, as lectinas são secretadas pelos hemócitos e podem estar solúveis na hemolinfa ou serem expressas na superfície destas células. Assim, lectinas e/ou lectinas ligantes podem ser importantes marcadores de ativação de hemócitos em *Biomphalaria*. Além disso, a ligação lectina-carboidrato pode mediar a adesão de hemócitos de *Biomphalaria* ao tegumento do esporocisto de *S. mansoni*, sendo um importante fator na determinação de suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni* em diferentes linhagens geográficas de *B. tenagophila*. Na tentativa de verificar esta hipótese, os hemócitos de caramujos *B. glabrata* (linhagem BH de caramujos altamente susceptível) e *B. tenagophila* Cabo Frio (linhagem de susceptibilidade moderada) e Taim (linhagem completamente resistente) foram submetidos a marcação com diferentes lectinas conjugados com FITC (ConA, PNA, SBA e WGA) e analisados em microscópio de fluorescência. Os resultados demonstraram que todas as lectinas testadas foram capazes de se ligar superfície dos hemócitos, entretanto, a marcação apresenta diferenças significativas em células isoladas de diferentes espécies de caramujo. *B. tenagophila* apresentou um maior proporção de hemócitos marcados em relação a *B. glabrata*. Além disso, a maioria dos hemócitos circulantes de *B. tenagophila* foi marcada intensamente pelas lectinas PNA e

WGA, enquanto os hemócitos de *B. glabrata*, principalmente por ConA. Durante infecção por *S. mansoni*, hemócitos marcados por lectinas quase desaparece da hemolinfa do Taim e acumula em *B. glabrata* BH.

Para verificar a relevância funcional das lectinas, hemócitos e hemolinfa de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* (Cabo Frio e Taim) foram incubados com esporocistos de *S. mansoni*, axenicamente transformados, na presença ou não de carboidratos N-acetilglicosamina e Galactosamina. Após 6 horas de incubação, foi analisado o índice de adesão celular aos esporocistos e medida a viabilidade do parasito. As análises demonstraram que hemócitos circulantes de *B. glabrata* não são capazes de produzir encapsulamento dos esporocistos, *in vitro*, e, conseqüentemente, não ocorre mortalidade expressiva do parasito. Desta forma, a adição de diferentes concentrações de carboidratos também não modificou o padrão de adesão dos hemócitos ou a baixa mortalidade dos esporocistos observada em *B. glabrata*. Em contraste, o índice de adesão celular de *B. tenagophila*, Taim e Cabo Frio ao esporocistos, foi maior, resultando em maior mortalidade dos mesmos, especialmente no caso de hemócitos isolados de *B. tenagophila* Taim. Tanto a adesão quanto a capacidade de destruição dos esporocistos, foram potencializadas na presença da fração solúvel hemolinfa. Hemócitos da linhagem Cabo Frio têm o índice de adesão aumentado pela presença de carboidratos em baixa concentração, enquanto que a linhagem Taim, que apresenta os maiores índices de adesão celular, esta foi amplamente inibida na presença das concentrações mais altas de N-acetilglicosamina e Galactosamina. A inibição da adesão de hemócitos de *B. tenagophila* Taim ao tegumento do parasito resultou em uma expressiva diminuição da mortalidade dos mesmos. Tais dados sugerem que a resistência da linhagem Taim de *B. tenagophila* possa estar relacionada quantidade e qualidade das lectinas presentes em sua hemolinfa e/ou à expressão de ligantes (carboidratos) na superfície dos hemócitos

Durante a incubação de hemócitos circulantes de *Biomphalaria*, principalmente quando infectados pelo *S. mansoni*, estes se revelaram capazes de produzir radicais reativos de nitrogênio. A produção de NO se mostrou dependente do tempo de incubação e do estímulo utilizado. Na presença de esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*, os hemócitos produziram os maiores valores de NO em comparação aos incubados com antígeno solúvel de ovos (SEA). Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas na produção de NO entre as espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

## ABSTRACT

Mollusks of the genus *Biomphalaria*, intermediate hosts of the *Schistosoma mansoni*, possess an internal system of defense (ISD) that is composed by circulating cells, denominated hemocytes, and soluble factors present in the hemolymph. The circulating hemocytes are normally found around trematode larvae in the resistant strains of snail, although it is not completely known how the hemocytes destroy the parasite. As in other gastropods, the circulating hemocytes of *Biomphalaria* are not a homogeneous cell population and it is believed that the different cell types would be involved in a different way in the destruction of the parasite.

One of the objects of this work is the profile characterization, through the flow cytometry analysis, of the circulating hemocyte population isolated from *B. tenagophila* Taim (resistant to *S. mansoni*), *B. tenagophila* Cabo Frio (partially susceptible to *S. mansoni*) and *B. glabrata* BH (highly susceptible to *S. mansoni*) during the infection for *S. mansoni*. Using the flow cytometry, and analysing size and granulocytometry, it was possible to identify two distinct hemocytes populations, denominated population of small hemocytes and of big hemocytes. In non-infected *B. tenagophila* snails of both strains, Taim and Cabo Frio, the small hemocytes population represented about 30% of the total of circulating hemocytes, while big hemocytes about 70%. Meantime, in *B. glabrata*, the population of small hemocytes represents about 56%, while the large hemocytes 44%. After the infection with *S. mansoni*, variations were observed in the profile of circulating hemocytes, mainly in the first hours of infection that corresponds to the decrease of the percentage of small hemocytes. Those variations were absent in *B. glabrata* and significantly outstanding in the *B. tenagophila* Taim. As demonstrated in previous work and confirmed in this study for all the species and/or strains of *Biomphalaria* tested, silica inoculation in snails leads to reduction of circulating granulocytes. In the analysis of circulating hemocytes by flow cytometric, it was observed decrease in the percentage of small hemocytes. Moreover, the proportion increase in the small hemocyte population induced by *S. mansoni* infection was not detected until 72 hpi in *B. tenagophila*. The decrease in the population of small hemocytes would suggest that silica acts on small granulocytes that are part of the population of small hemocytes. The silica also changes the granulocytometry of the hemocytes, mainly in Taim *B. tenagophila*'s strain.

Soluble elements of the snail hemolymph act synergically with the hemocytes in the parasite destruction, among the soluble elements lectins have been identified. The lectins were clearly showed in the hemolymph of mollusks as being a factor that agglutinates and opsonifies particles and that can mediate the recognition of strange particles and/or parasites. In the mollusks, the lectins are secreted by the hemocytes and they can be soluble in the hemolymph or in the surface of the circulating hemocytes. Therefore, lectins and/or lectin-ligands can be important markers of hemocytes activation in *Biomphalaria*. Moreover, variation on lectin label on hemocytes would result in deficient parasite recognition that explain the variations in the susceptibility levels to the infection for *S. mansoni* observed in the different geographical strain of *B. tenagophila*, as well as it would help in the understanding of the destruction process of parasites. With this intent, circulating hemocytes isolated from *B. glabrata* BH (highly susceptible snail strain), *B. tenagophila* Cabo Frio (strain of moderate susceptibility) and *B. tenagophila* Taim completely resistant snail strain) were incubated with different lectins conjugated with FITC (ConA, PNA, SBA and WGA) and analyzed in fluorescence microscope. The results demonstrated that although lectin-labelled hemocytes were detected in hemolymph of all snail species tested, circulating hemocytes from both strains of *B. tenagophila* showed a larger number of lectin-labelled cells than *B. glabrata*.

Moreover, most of circulating hemocytes of *B. tenagophila* were intensively labelled by lectins PNA-FITC and WGA-FITC, while in *B. glabrata* small hemocytes were labeled mainly by ConA. Upon *S. mansoni* infection, lectin-labelled hemocytes almost disappeared from the hemolymph of Taim and accumulated in *B. glabrata* BH.

To verify the functional relevance of lectins, hemocytes plus hemolymph from *B. glabrata* and *B. tenagophila* (Cabo Frio and Taim) were incubated with axenically transformed sporocysts of *S. mansoni*, in the presence or not of competing carbohydrates, N-acetilglicosamina or Galactosamina. After 6 hours of incubation, the index of cellular adhesion to the sporocysts as well as parasite dead was analyzed under microscope. The results showed that the hemocytes from *B. glabrata*, in the presence of hemolymph or not, showed low cellular adhesion index (CAI) to sporocysts leading to low parasite mortality, that was not modified by addition of N-acetilglicosamina. In contrast, large number of hemocytes from *B. tenagophila* adhered to *S. mansoni* sporocysts and cellular adhesion index was higher in the presence of hemolymph, leading to high parasite mortality, especially in the Taim strain. The addition of low concentration of Galactosamina or N-acetilglicosamina to the hemocytes and hemolymph of Cabo Frio snail strain resulted in increased adhesion index. The experiments using hemocytes and hemolymph from Taim snail strain resulted in the greatest cellular adhesion index, with a high proportion of the sporocysts showing encapsulation (CAI=3), however the cellular adhesion was inhibited, in a dose dependent manner, by addition of N-acetilglicosamina, and less intensively by Galactosamina. Moreover, the inhibition of cellular adhesion to sporocysts associated with lower mortality rate. Such data suggest the resistance of Taim strain of *B. tenagophila* can be related to quality and quantity of lectins present in the hemolymph, as well as to lectin ligands expressed on hemocytes.

Finally, our experiments demonstrated that circulating hemocytes from *S. mansoni*-infected *Biomphalaria* were able to produce nitrogen reactive metabolite, such as nitric oxide, in response to in vitro activation with sporocysts or *S. mansoni* soluble egg antigen (SEA). However, there was no significant difference in NO production between the species *B. glabrata* and *B. tenagophila*.



## 1. INTRODUÇÃO

O esclarecimento de mecanismos envolvidos na resistência de moluscos do gênero *Biomphalaria* ao *Schistosoma mansoni* representa uma importante arma epidemiológica principalmente na caracterização das possíveis áreas endêmicas da esquistossomose. No estudo da interação parasito-hospedeiro intermediário tem-se utilizado o modelo experimental *S. mansoni* / *B. glabrata*, sendo que a maioria dos trabalhos é realizada *in vitro*. A espécie *B. tenagophila*, apesar de apresentar linhagens totalmente resistentes a infecção por diversas cepas de *S. mansoni* testadas, e ser a segunda espécie transmissora em importância epidemiológica no Brasil, ainda é muito pouco estudada.

O hemócito circulante é considerado o principal componente funcional do sistema de defesa interna dos moluscos. A resistência de moluscos à infecção por *S. mansoni* tem sido atribuída à capacidade destas células em envolver e destruir o esporocisto. Neste processo, ocorre a produção de superóxidos e fagocitose de partes do tegumento do parasito (van der Knaap & Loker, 1990).

Estudos preliminares, objetivando a caracterização de hemócitos circulantes de moluscos, sugerem uma grande variação morfo-funcional desta população celular (Granath & Yoshino, 1983; Barraco et al., 1993; Matricón-Gondran & Letorcart, 1999). A existência de subpopulações de hemócitos, que possam ser diferencialmente ativados, pode estar associada às diferenças na suscetibilidade à infecção observada entre estes caramujos.

Os mecanismos que regem a interação entre *S. mansoni* e os caramujos do gênero *Biomphalaria* não estão totalmente esclarecidos. Ainda há discordâncias, principalmente em relação aos aspectos celulares desta interação. Há uma carência muito grande de estudos que abordem este aspecto da associação parasito-hospedeiro utilizando outras espécies de *Biomphalaria* que transmitem esquistossomose no Brasil, como é o caso de *B. tenagophila* e *B. straminea*.

*B. tenagophila* é, dentre as demais espécies transmissoras no país, a que possui as maiores variações na taxa de resistência ao *S. mansoni*, apresentando linhagens suscetíveis e linhagens totalmente resistentes à infecção pelo parasito. Em estudos anteriores (Martins-Souza et al. 2003), foi demonstrado que a *B. tenagophila* da linhagem Taim apresenta total resistência à infecção por *S. mansoni*, que mesmo após a destruição parcial da população dos hemócitos circulantes, a resistência à infecção manteve-se inalterada. Este resultado incentivou o estudo da determinação de possíveis fatores relacionados à resistência desta linhagem.

O primeiro passo para o esclarecimento do mecanismo pelo qual o sistema de defesa de algumas linhagens de *B. tenagophila* é capaz de destruir esporocistos de *S. mansoni*, enquanto outras não, consiste na caracterização comparativa da população de hemócitos circulantes e de suas alterações no decorrer da infecção. Este trabalho pretende caracterizar fenotipicamente e morfológicamente a população de hemócitos, através da utilização de Citometria de Fluxo. A técnica de Citometria de Fluxo apresenta-se como uma importante ferramenta na caracterização de diferentes tipos celulares e sua utilização em invertebrados tem sido recentemente relatada com resultados bastante esclarecedores (Amen et al., 1992; Johnston & Yoshino, 2001).

Além disso, torna-se importante o estudo da associação dos hemócitos com os fatores solúveis da hemolinfa, destacando-se neste caso em especial, as lectinas. A descrição precisa da ação destas proteínas, bem como sua influência sobre subpopulações de hemócitos, e que tipo de células são responsáveis por sua síntese, necessitam de estudos mais detalhados. Acredita-se que lectinas possam ser importantes marcadores de ativação celular para hemócitos de *Biomphalaria*. Estes marcadores poderão explicar as variações nos níveis de

suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni* observadas nas diferentes linhagens geográficas de *B. tenagophila*, além de auxiliar no entendimento do processo de destruição do parasito.

Finalmente, apesar de vários autores relatarem a presença de produtos derivados de oxigênio e nitrogênio produzidos pelos hemócitos, como tendo um papel importante na morte do parasito, falta esclarecer por qual(is) a(s) via(s) estes produtos são originados, qual o melhor estímulo e como eles são produzidos em diferentes linhagens e espécies de *Biomphalaria*.

Estes conhecimentos, além de contribuírem para o esclarecimento dos mecanismos de proteção desenvolvidos por hospedeiros invertebrados, também serão de grande valia na definição de novas estratégias de controle da população de linhagens de *Biomphalaria* sp altamente suscetíveis ao parasito.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Aspectos gerais**

O *Schistosoma mansoni* é um helminto da classe Trematódea, causador da esquistossomose mansoni, doença debilitante que afeta milhões de pessoas especialmente em algumas regiões da América Latina e África. É um parasito que apresenta um ciclo biológico complexo, pois envolve um hospedeiro intermediário e um definitivo para completar seu desenvolvimento. Na fase sexuada, o parasito pode ser encontrado em algumas espécies de mamíferos, inclusive o homem, seu principal hospedeiro definitivo. Sua multiplicação assexuada ocorre no hospedeiro intermediário, que necessariamente são moluscos do gênero *Biomphalaria*.

### **2.2. Morfologia dos moluscos do gênero *Biomphalaria***

Os moluscos do gênero *Biomphalaria* apresentam concha discoidal, variando de 7 a 40 cm de diâmetro; apresentam hemolinfa pigmentada devido à presença de hemoglobina e tubo renal em forma de J.

Entre as dez espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* descritas no Brasil, apenas três foram encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*: a *B. glabrata*, a *B. tenagophila* e a *B. straminea* (Paraense, 1970). A distribuição da esquistossomose pelo território brasileiro coincide com a distribuição geográfica destas três espécies, principalmente com a da *B. glabrata*.

A espécie *B. glabrata* se caracteriza por apresentar concha com até 40 cm de diâmetro e 11 mm de largura, seis a sete giros arredondados. Apesar da descrição característica da concha da espécie, alguns exemplares podem apresentar morfologia que foge à referida descrição, o que leva a concha não ser um parâmetro ideal para a identificação da

espécie. Por outro lado, a *B. glabrata* apresenta características internas típicas que são utilizadas para a sua identificação. Dentre estas se destaca a presença de crista renal pigmentada ao longo da superfície ventral do tubo renal em indivíduos adultos e a linha pigmentada em indivíduos jovens. Tal característica não pode ser vista em nenhuma outra espécie deste gênero. Além da crista renal pigmentada, a *B. glabrata* apresenta ovoteste com mais de 350 divertículos; presença de bolsa vaginal; porção média da bainha do pênis aproximadamente do mesmo diâmetro que a porção mais larga do canal deferente.

A *B. tenagophila* apresenta concha com até 35 cm de diâmetro e 11 mm de largura; sete a oito giros, carena (angulação longitudinal na lateral da concha) em ambos os lados, sendo mais acentuada à esquerda. A presença da carena normalmente só é vista nesta espécie, porém podem ser encontrados indivíduos *B. glabrata* mais largos e com esta característica, ou mesmo *B. tenagophila* em que esta está ausente. Sendo assim estas espécies podem ser confundidas se forem levadas em conta apenas as características das conchas. Em relação à anatomia interna da *B. tenagophila*, esta espécie difere de *B. glabrata* pela ausência de linha ou crista renal pigmentada e presença de ovoteste com mais de 150 e menos de 350 divertículos.

A terceira espécie, *B. straminea*, apresenta concha com até 16,5 cm de diâmetro e 6 mm de largura; cinco giros arredondados. Internamente, *B. straminea* apresenta um enrugamento na parede dorsal da vagina, o que lhe diferencia de *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

Apesar das características morfológicas marcantes, a diferenciação das três espécies tem sido realizada através da biologia molecular.

### **2.3. Moluscos e a transmissão da esquistossomose**

Epidemiologicamente, a principal espécie transmissora da esquistossomose no Brasil é a *B. glabrata*. Esta espécie encontra-se amplamente distribuída pelo território brasileiro, principalmente na região Sudeste e na região Nordeste (Paraense 1986). Nestas regiões, destaca-se a presença de *B. glabrata* nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Goiás, São Paulo e Paraná (Souza e Lima, 1990). Recentemente, Carvalho et al. (1998) relataram a presença de *B. glabrata* no Estado do Rio Grande do Sul. *B. glabrata* apresenta as maiores taxas de suscetibilidade ao parasitismo pelo *S. mansoni*, o que faz com que esta seja a espécie de escolha para trabalhos experimentais, visando esclarecer os mecanismos que regem a interação entre o parasito e seu principal hospedeiro intermediário.

*B. straminea* apresenta uma densidade populacional alta no Nordeste brasileiro, mas apresenta baixas taxas de infecções naturais. Assim, esta espécie é responsável pela transmissão de *S. mansoni* em várias áreas do Nordeste brasileiro, sendo a única hospedeira do *S. mansoni* no Estado do Ceará (Souza e Lima, 1990).

Atualmente, *B. tenagophila* é encontrada desde a Argentina (Patagônia) até o sul do Estado da Bahia (Paraense, 2001). Esta espécie vem apresentando crescente importância epidemiológica na transmissão da esquistossomose, devido à descoberta de novos focos mantidos por ela no país, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. No Brasil, *B. tenagophila* pode transmitir a esquistossomose em algumas regiões nos estados do Rio de Janeiro e vem sendo responsável por muitos casos autóctones de esquistossomose diagnosticados no estado de São Paulo. Casos de transmissão da doença em regiões com *B. tenagophila* também têm sido descritos em Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Paraense & Corrêa 1987, Espíndola et al. 1992, Graeff-Teixeira et al., 1999), ampliando sua distribuição pelo território brasileiro e sua importância na transmissão da esquistossomose. Em Minas Gerais, *B. tenagophila* pode ser encontrada nas regiões do Norte de Minas, Vale do Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Vale

do Rio Doce, na Zona da Mata e na região Central do Estado, como a área Metropolitana de Belo Horizonte, sendo estas regiões consideradas como endêmicas para a esquistossomose (Souza et al., 2001). Na região Metropolitana de Belo Horizonte, destaca-se a presença de *B. tenagophila* nos municípios de Belo Horizonte (Milward, 1972), Jaboticatubas (Melo, 1982) e em Itajubá (Souza e Lima, 1990).

As diversas linhagens geográficas de *B. tenagophila* possuem variado grau de resistência à infecção pelo *S. mansoni*, sendo encontradas algumas suscetíveis e outras totalmente resistentes ou refratárias (Coelho, 1995). Em comparação com a *B. glabrata*, *B. tenagophila* apresenta-se mais resistente à infecção pelo *S. mansoni* (Silva et al., 1994; Souza et al., 1995), entretanto, estudos com diferentes linhagens geográficas brasileiras de *B. tenagophila*, na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos nesta resistência, constituem tema de investigação praticamente inexplorado.

Estudo comparativo analisou os níveis de suscetibilidade de *B. glabrata* originária de Belo Horizonte, *B. tenagophila* do lago da Pampulha (Belo Horizonte) e *B. straminea* da cidade de Paracatu (MG), à infecção experimental por uma cepa de *S. mansoni* originada do Estado de Alagoas, obtendo os seguintes índices de infectividade: *B. glabrata* - 75,3%, *B. tenagophila* - 32,6% e *B. straminea* - 11,3% (Souza et al. 1997).

O grau de compatibilidade entre o *Schistosoma* e os moluscos é determinado pela constituição genética tanto do parasito como de seu hospedeiro intermediário (Basch, 1976). Newton (1953) foi o primeiro a sugerir que a suscetibilidade dos moluscos *B. glabrata* ao *S. mansoni* é condicionada por fatores genéticos. Posteriormente, estes resultados foram confirmados por Richards (1973), que também demonstrou que o caráter de resistência, adquirido pelo molusco na maturidade, é determinado por um único gene dominante, com herança mendeliana. Por outro lado, Kagan & Geiger (1965) demonstraram a importância da

constituição genética do parasito, na determinação dos índices de infecção de linhagem albina de *B. glabrata*.

Além dos fatores genéticos, o desenvolvimento do *S. mansoni* no molusco também é influenciado por fatores ambientais, por aspectos comportamentais do miracídio e do caramujo. A associação de *S. mansoni* com o hospedeiro intermediário tem se mostrado altamente específica e restritiva ao desenvolvimento do parasito. Exemplificando, é possível encontrar inúmeras espécies de mamíferos, pertencentes aos vários gêneros, que podem atuar como hospedeiros definitivos (Adema e Loker, 1997), entretanto, somente poucas espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* permitem o desenvolvimento do miracídio de *S. mansoni* (Basch, 1976). Algumas linhagens do parasito podem ser restritas a uma única espécie de *Biomphalaria*, ou até mesmo a uma determinada linhagem geográfica dessa espécie de molusco, o que determina as variações na suscetibilidade dos caramujos em relação ao *S. mansoni*

Este conjunto de fatores interfere no nível de susceptibilidade das espécies de *Biomphalaria* que transmitem o parasito no Brasil. Desta forma, analisando populações de *B. glabrata* de diferentes localidades Paraense & Corrêa (1963) relataram que as diferentes linhagens desta espécie apresentavam suscetibilidade variável de 0 a 100% frente a uma única cepa do *S. mansoni* de Belo Horizonte – Minas Gerais. De maneira semelhante, Paraense & Corrêa (1978) testaram a suscetibilidade de *B. tenagophila* de 18 localidades do Brasil à infecção por uma determinada linhagem de *S. mansoni*, e encontraram taxas de infectividade que variaram de 0 a 91,5%. Corrêa et al. (1979), estudaram a suscetibilidade de duas linhagens de *B. tenagophila* (uma isolada de Belo Horizonte, MG, e outra de Cabo Frio, RJ) e uma de *B. glabrata* (isolada de Santa Luzia, MG) frente à infecção por duas cepas de *S. mansoni* (LE – Belo Horizonte, MG e SJ – São José dos Campos, SP). Neste estudo, foi



demonstrado que a linhagem de *B. glabrata* se infecta com as duas cepas de *S. mansoni* empregadas. Já *B. tenagophila* de Belo Horizonte e Cabo Frio não apresentaram nenhum exemplar infectado com a cepa LE, porém se mostraram suscetíveis à infecção pela cepa SJ, sendo que a *B. tenagophila* de Cabo Frio apresentou 100% suscetibilidade. Martins-Souza (1999), demonstrou que caramujos *B. tenagophila* de Cabo Frio são mais susceptíveis à cepa LE de *S. mansoni*, uma vez que estes apresentaram taxa de positividade que pode chegar a 40%. Uma população de *B. tenagophila* originária da Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, foi testada por Souza et al. (1987), quanto a sua potencialidade em se tornar hospedeira de diferentes cepas de *S. mansoni*. Para tanto os autores utilizaram as cepas "LE" e "HK" (de fezes de pacientes residentes próximo a Pampulha) de Belo Horizonte, "AL" de Alagoas e "SJ" de São Jose dos Campos, São Paulo e as taxas de infecção obtidas foram de 4% (cepa "LE"), 6% (cepa "HK"), 30% (cepa "SJ") e 40% (cepa "AL"). A variação do grau de resistência da *B. tenagophila* pela cepa LE de *S. mansoni*, foi confirmada por Silva et al. (1994). Neste trabalho, os autores demonstraram que a terceira geração de *B. tenagophila* proveniente de Ouro Branco (MG), apresentou apenas 2% de positividade para infecção com a cepa LE de *S. mansoni*. Sendo assim, nos estudos epidemiológicos da esquistossomose tornar-se importante verificar a taxa de suscetibilidade e/ou resistência de uma linhagem local de *Biomphalaria* frente às diversas cepas de *S. mansoni*, e a partir daí determinar o potencial da área tornar-se ou não endêmica para a esquistossomose, em função da origem dos migrantes portadores da doença.

A variação na suscetibilidade de *Biomphalaria* frente ao *S. mansoni* tem sido relacionada à sua origem geográfica (adaptabilidade), às diferenças de idades e as variações genéticas dos moluscos (Richards, 1976a, b; 1977; Richards & Shade 1987). Em última análise, estes diferentes fatores podem interferir no sistema de defesa interno do molusco,

influenciando a determinação da suscetibilidade ou resistência de *Biomphalaria* à infecção pelo *S. mansoni*.

## **2.4. Relação parasito – hospedeiro**

### **2.4.1. Hospedeiro definitivo**

O ciclo vital do *S. mansoni* foi estudado, em seus aspectos gerais, por Lutz (1917, 1919). A evolução do *S. mansoni* dentro de seu hospedeiro definitivo, inicia-se pela penetração ativa das cercárias, através da pele e mucosa do hospedeiro. Este processo de penetração pode levar de 5 a 15 minutos (Coelho, 1957, 1970). Durante a penetração, as cercárias perdem a cauda e sofrem transformações estruturais e fisiológicas dando origem aos esquistossômulos (Standen, 1951). Estes migram em direção aos vasos sanguíneos e, através da circulação, atingem os pulmões. Dos pulmões, os esquistossômulos chegam ao fígado onde completam seu desenvolvimento atingindo a maturidade sexual. Depois de migrarem para as veias mesentéricas inferiores, os vermes acasalados iniciam a postura de ovos em torno de 35 dias após infecção. Segundo Moore & Sandground (1956), em hamsters infectados, as fêmeas de *S. mansoni* produzem cerca de 300 ovos por dia, sendo que somente 22% destes ovos saem nas fezes, 18 % ficam retidos na parede do intestino grosso, 32% no intestino delgado, enquanto 25% são carregados para o fígado e 2% para outros órgãos. Os ovos retidos nos tecidos estimulam reações granulomatosas, fundamentais na patogenia da esquistossomose mansoni.

#### 2.4.2. Hospedeiro Intermediário

Os ovos maduros de *S. mansoni* eliminados no ambiente através de fezes dos hospedeiros, contêm embriões ciliados, denominados miracídios. Em contato com a água, estes eclodem dos ovos e nadam ativamente a procura do hospedeiro intermediário - moluscos do gênero *Biomphalaria*. Alguns autores sugerem a existência de um mecanismo de atração de miracídios mediado por substâncias secretadas pelo hospedeiro intermediário (Lutz, 1919; Faust e Hofmann, 1934; Brumpt, 1940; Kloetzel, 1958; Leiper & Atkinson, 1975). Chernin (1970, 1974) demonstrou que os moluscos produzem substâncias que estimulam a concentração de miracídios e sua movimentação nas proximidades do caramujo, este processo resulta no aumento da eficiência da penetração do trematódeo. Entretanto, essas substâncias não promovem uma atração seletiva do miracídio em relação ao caramujo *Biomphalaria*, pois estes miracídios excitados, podem penetrar em moluscos de outros gêneros, ou mesmo em substrato gelatinoso (Chernin, 1974).

Outro fator que influencia fortemente a penetração dos miracídios no molusco é a temperatura. Maldonado & Acosta-Matienzo (1974) mostraram que a redução de 1° C na temperatura (de 26° C para 25° C) produz uma redução na taxa de infecção dos moluscos de 80% para 40%.

Após a localização do hospedeiro intermediário, o miracídio tem o primeiro contato com o tecido do molusco e inicia-se o processo de penetração ativa. O miracídio de *S. mansoni* pode penetrar por qualquer ponto das partes expostas do caramujo, porém, a base das antenas e o pé são os locais mais utilizados (Coelho, 1957). O contato do miracídio com o tegumento do molusco ocorre inicialmente através do terebratorium, órgão localizado na extremidade anterior da larva, que, ao contato com o molusco, assume a forma de ventosa. Simultaneamente, o conteúdo das glândulas de adesão, localizadas lateralmente ao

terebratorium é excretado. A ação combinada das enzimas digestivas das glândulas de penetração e dos movimentos contráteis e rotatórios intensos podem resultar na penetração da larva do parasito pelo epitélio e o seu estabelecimento no tecido subcutâneo do molusco (Coelho, 1957). Durante a penetração no caramujo, os miracídios liberam o conteúdo das glândulas de adesão e penetração e perdem suas placas ciliares. Durante este processo também são observadas alterações estruturais na musculatura subepitelial e sistema nervoso. Após a penetração inicia-se o desenvolvimento de células germinativas, e passadas 72 horas, a larva dobra de tamanho e é denominada de esporocisto primário (Coelho, 1957). Na segunda semana da infecção, observam-se alterações nas estruturas internas do esporocisto primário, quando suas células germinativas encontram-se em franca multiplicação, e, em condições ideais de temperatura (entre 25 e 28°C), estas originam os esporocistos secundários (Faust & Hoffmann, 1934; Maldonado & Acosta-Matienzo, 1947; Oliver & Mao, 1949; Pan, 1965; Pereira et al., 1984). A formação do esporocisto secundário inicia-se com um aglomerado de células germinativas nas paredes do esporocisto primário, verificando-se uma vacuolização acentuada na parte central da larva. Esses aglomerados se reorganizam e dão origem a septos, ficando o esporocisto primário dividido em 150 a 200 camadas, cada septos ou camada já podendo ser considerado um esporocisto secundário.

As paredes desse esporocisto apresentam uma dupla camada muscular, logo abaixo da camada cuticular, apresentando fibras musculares longitudinais e transversais. Esta musculatura, associada à formação de espinho na parte mais externa da cutícula, terá papel fundamental na motilidade e na capacidade de migração intratissular das larvas. A migração processa-se ativamente através dos tecidos do molusco. A migração dos esporocistos secundário do local de penetração do miracídio onde a maioria se desenvolve, até as glândulas digestivas ou hepatopâncreas, leva de 2 a 3 dias.

A localização final dos esporocistos será nos espaços intertubulares da glândula digestiva, local com riqueza nutritiva onde começam, então, a sofrer profundas modificações anatômicas no conteúdo de células germinativas (Melo e Coelho, 2005). Nas glândulas digestivas, os esporocistos secundários sofrem transformações anatômicas e suas células germinativas podem originar as cercárias. Segundo Jourdane et al. (1980) alguns esporocistos secundários também podem originar outra geração esporocistos, que poderão gerar cercárias ou novos esporocistos. De acordo com estes autores, a produção de novas gerações de esporocistos forneceria a única explicação plausível para uma prolongada eliminação de cercárias nos caramujos infectados, pois isso não ocorrendo, deveria haver uma exaustão no processo de formação cercariana a partir de esporocistos secundários.

O desenvolvimento de *S. mansoni* em *Biomphalaria*, desde a penetração do miracídio até a produção de cercárias e sua emergência para o meio aquático, pode ocorrer dentro de um período de 27 a 30 dias, em condições ideais de temperatura (cerca de 28°C). Um único miracídio pode gerar cerca de 300 mil cercárias (Faust & Hoffman, 1934), sendo que cada miracídio já leva definido o sexo das cercárias que serão produzidas.

O sucesso do desenvolvimento do *S. mansoni* em seus hospedeiros dependerá da capacidade do parasito em: (1) encontrar e penetrar hospedeiros compatíveis; (2) adaptar-se à condição de stress, como variação de fatores fisiológicos (osmolaridade, pH, concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, e concentração de glicose) que ocorre na passagem do hospedeiro definitivo para o meio aquático e daí para o hospedeiro intermediário; (3) escapar do sistema de defesa dos hospedeiros e (4) obter nutrientes para o seu crescimento e reprodução.

A complexidade da resposta imune do hospedeiro vertebrado à infecção pelo *S. mansoni* vem sendo estudada em vários aspectos. No molusco hospedeiro intermediário, Van der Knaap & Loker (1990), descrevem um sistema interno de defesa compreendendo

elementos celulares e humorais que agem juntos na destruição de agentes patógenos. No caso da infecção pelo *S. mansoni*, observa-se uma variação na intensidade dos mecanismos funcionais de defesa, entre diferentes espécies e linhagens geográficas dos moluscos, que pode estar relacionada com diferentes graus de suscetibilidade ou resistência à infecção (Martins-Souza, 1999). A relação entre as diferenças na suscetibilidade de algumas linhagens de *Biomphalaria* a infecção pelo *S. mansoni* e os diferentes mecanismos de defesa desenvolvidos por estes hospedeiros durante a infecção, ainda apresenta-se como uma linha de pesquisa pouco explorada.

## 2.5. Sistema de defesa interna do molusco

O sistema interno de defesa dos caramujos é composto de elementos celulares, constituídos pelos hemócitos ou amebócitos, e por fatores solúveis presentes na hemolinfa.

### 2.5.1. Elementos celulares

Os hemócitos podem estar livres, circulantes na hemolinfa, ou estarem fixos nos tecidos. A hemolinfa dos Planorbideos circula em um sistema semi-aberto, impulsionada pelo coração, de onde parte a artéria aorta, que se ramifica para diversos tecidos, drenando nos seios venosos e retornando ao coração pelas veias pulmonar e renal, após ser re-oxigenado na parede pulmonar. O coração, envolto pela membrana do pericárdio, é dividido em duas câmaras, a aurícula, que recebe hemolinfa da cavidade pulmonar, e o ventrículo, que impele a hemolinfa através da aorta. A aorta se divide em duas artérias: a visceral, a qual irriga a parte posterior do corpo do caramujo, incluindo os sistemas digestivo e genital, e a cefálica, que atinge a toda região cefalopodal. As artérias se esvaziam nos espaços pseudovasculares dos tecidos, acumulando hemolinfa em três seios venosos: cefalopodal, visceral e sub-renal, retornando para o coração após circular pelo rim e pulmão (Baker, 1945; Paraense, 1970).

Os hemócitos podem ser produzidos por vários tecidos hematopoiéticos. Em *B. glabrata* e *Bulinus* sp., foi identificada uma região bem definida, localizada entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto, que provavelmente é o principal local de formação de hemócitos, também designado de APO (“amebocyte producing organ”). Em animais não estimulados, esta região se caracteriza como uma estrutura pequena, pouco espessa e conspícua, sendo formada por células arredondadas e alongadas, que apresentam citoplasma basófilo e núcleo oval ou alongado (Lie et al., 1976). Observações recentes (Sullivan et al., 2004) mostraram um aumento de mitoses nas células desta região, ente 24 -



72 h após inoculação de antígenos de miracídios ou cercárias de *S. mansoni*. A observação de células em processo de mitose foi muito maior em linhagem resistente de *B. glabrata*, que em susceptíveis.

Outras regiões descritas como capazes de produzir hemócitos são a porção sacular dos túbulos renais, margeando o pericárdio e, ocasionalmente, a região dorsal do reto. Contudo, o número de mitoses e a população de células nestes sítios foram menores do que as observadas no APO. A transferência do pericárdio de *B. glabrata* resistente (linhagem 13-16-R1) à infecção por *S. mansoni* para a linhagem susceptível NIH resultou em redução de esporocistos íntegros no tecido e na diminuição na produção de cercárias (Sullivan & Spence, 1994). A redução da susceptibilidade somente foi observada quando o pericárdio implantado era de doador de linhagem resistente e havia sido previamente exposto a miracídios de *S. mansoni*. A observação histológica destes implantes de doadores resistentes revelou a presença de hemócitos em processo de mitose (Sullivan et al., 1995). Outras regiões retiradas de *B. glabrata* resistente, como manto, coração, rim, glândulas digestivas, glândula do albumen e genitais não produziram alterações na susceptibilidade de *B. glabrata* NIH à infecção por *S. mansoni* (Sullivan & Spence, 1999). A transferência da região do pericárdio de *B. tenagophila* da linhagem Taim (completamente resistente ao parasito) para *B. tenagophila* susceptíveis resultou, na grande maioria dos casos, em uma proteção absoluta ao desafio com miracídios de *S. mansoni*, sendo que a transferência de proteção ocorreu mesmo sem exposição prévia do doador de APO ao parasito. Estes resultados demonstram a importância dos hemócitos na resistência ao parasito observada nesta linhagem de caramujo (Barbosa et al, manuscrito em preparação).

Vários autores acreditam que os hemócitos são os principais efetores do sistema de defesa do molusco, atuando principalmente através fagocitose de partículas ou

microrganismos ou pelo encapsulamento de grandes invasores, como é o caso das larvas de helmintos (Lutz, 1919; Loker et al., 1986; Adema & Loker, 1997). Os hemócitos também produzem fatores solúveis que são lançados na hemolinfa ou estão expressos em sua membrana, que estarão envolvidos no reconhecimento e na destruição de agentes patogênicos. A participação de elementos celulares de *B. glabrata* na reação à infecção pelo *S. mansoni* e outros trematódeos foi descrita inicialmente em estudos histológicos, nos quais foi evidenciada intensa concentração celular ao redor do miracídio recém penetrado (Newton, 1952; Brooks, 1953; Coelho & Barbosa, 1956; Coelho, 1957, 1962; Lie et al., 1987; Guaraldo et al, 1981; Martins-Souza, 1999).

Os hemócitos de invertebrados, em geral, apresentam heterogeneidade morfológica, bioquímica e funcional. Segundo Sminia (1981), apesar de vários estudos caracterizarem a função e estrutura das células circulantes em Gastropoda, ainda não existe uma concordância entre o número e os tipos celulares nestes animais. Este autor considera a população de hemócitos circulantes de Gastropoda como sendo uma população composta de um único tipo celular, sendo assim, as diferenças morfológicas observadas nos hemócitos circulantes correspondem aos diferentes estágios de maturidade destas células. A diferença no estágio de desenvolvimento dos hemócitos acarreta variação em sua capacidade funcional. As células jovens, morfológicamente caracterizadas como células pequenas e arredondadas, apresentam uma grande atividade mitótica e uma baixa atividade fagocitária, enquanto que as maduras, maiores e com prolongamentos citoplasmáticos, têm pouca atividade mitótica, mas alta atividade fagocitária (Sminia, 1981).

Entretanto, a existência de diferentes populações celulares na composição de hemócitos circulantes tem sido aceita por muitos autores e baseia-se em diferenças morfológicas e ultraestruturais, expressão de alguns determinantes antigênicos e no conteúdo

enzimático destas células. Ottaviani (1992) sugere que a população de hemócitos circulantes de moluscos gastrópodes, é constituída basicamente por dois tipos de hemócitos circulantes: os hemócitos estrelados, que emitem pseudópodes e os hemócitos arredondados. Porém, em alguns gastrópodes, somente um tipo celular é descrito e este pode ser considerado como os hemócitos que emitem pseudópodes. Segundo Ottaviani (1992), os hemócitos estrelados são células que apresentam atividade fagocitária, aderem ao vidro, ligam à Concanavalina A e contêm ácido murânico; enquanto que os hemócitos arredondados não possuem atividade fagocitária, não aderem ao vidro, proliferam em presença de Fito-hemoaglutinina e apresentam marcadores típicos de linfócitos T de vertebrados. O autor, neste estudo, conclui que os hemócitos arredondados apresentam características semelhantes às de linfócitos T de vertebrados, enquanto os hemócitos estrelados assemelham-se aos macrófagos.

Outros autores (Harris, 1975; Yoshino, 1976; Lo Verde et al., 1982; Lie et al., 1987; Barraco et al., 1993) também fazem distinção de duas subpopulações de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata*, designando-os de granulócitos e hialinócitos. Os granulócitos são células arredondadas com pequenos pseudópodes, medindo aproximadamente de 7 a 11 µm de diâmetro. Os granulócitos de Gastropoda, em geral, são considerados células morfo-funcionalmente semelhantes aos macrófagos de mamíferos (Bayne et al., 1980 a). Baseado nesta hipótese, Bezerra et al. (1997) demonstraram a realização de pinocitose pelos granulócitos de *Biomphalaria* através de sua capacidade de incorporar vermelho neutro, desenvolvendo assim uma técnica que permitiu quantificar estas células. Posteriormente, Martins-Souza et al. (2003) mostraram que os granulócitos são parcialmente destruídos após a inoculação de sílica, de maneira semelhante ao efeito relatado em macrófagos de mamíferos. A destruição destes hemócitos resultou em um aumento significativo da suscetibilidade de *B. tenagophila* à infecção pelo *S. mansoni*. Os hemócitos circulantes designados de hialinócitos

são usualmente menores, medindo cerca de 4 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, apresentam contorno circular quando em contato com vidro, ausência de pseudópodes extensos e citoplasma contendo raras organelas e pouco ou nenhum corpo semelhante a lisossomo. Barraco et al. (1993) mostraram que os hialinócitos representam cerca de 10% das células presentes na hemolinfa de *B. glabrata* e tanto granulócitos quanto hialinócitos apresentam semelhanças quantitativas e morfológicas em *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

Apesar de observar as diferenças morfológicas entre as subpopulações de hemócitos circulantes, Amen et al. (1991) acreditam que os hialinócitos sejam células precursoras dos granulócitos. Esta hipótese também foi sugerida por Martins-Souza et al. (2003) que demonstraram que a inoculação de sílica em caramujos *B. tenagophila* acarretava uma diminuição passageira no número de granulócitos circulantes. À medida que a população de granulócitos se restabelece, foi observado um aumento considerável na população de hialinócitos, que chega a representar cerca de 50 % da população de hemócitos totais, sugerindo que os hialinócitos possam estar envolvidos na reposição do nível de granulócitos.

Joky et al. (1983) foram capazes de diferenciar 4 subtipos celulares, entre a população de granulócitos, através da associação de diferenças morfológicas, com a expressão de receptores de lectinas na superfície celular.

Em um estudo quantitativo, Granath & Yoshino (1983) analisaram a distribuição e abundância de enzimas lisossomais como fosfatase ácida, esterase não específica e peroxidase em hemócitos de *B. glabrata*. Neste estudo, foi mostrado que, de maneira geral, os hemócitos aderentes ao vidro, isolados de linhagens resistente e suscetível ao *S. mansoni*, apresentam reação para as três enzimas testadas isoladamente e para fosfatase ácida e esterase não específica testadas simultaneamente.

Matricón-Gondran & Letorcart (1999) identificaram três subpopulações de hemócitos presentes na hemolinfa de *B. glabrata*, considerando o tamanho das células e características ultra-estruturais e designando-as: hemócitos grandes, hemócitos de tamanho médio e os pequenos hemócitos. A proporção de cada tipo celular em relação à população total não pode ser determinada pelos autores, apesar de se notar que os hemócitos grandes e os médios são os mais abundantes do que os pequenos hemócitos.

Johnston & Yoshino (2001) utilizaram a citometria de fluxo e caracterizaram, em *B. glabrata*, dois tipos celulares a partir da marcação destes com anticorpos anti-hemócitos e proteínas excreto secretadas de esporocistos conjugadas com partículas fluorescentes.

#### 2.5.2. Elementos solúveis

A associação entre o sistema de defesa interna dos moluscos e agentes patogênicos, do ponto de vista celular e molecular, é complexa e envolve além dos hemócitos circulantes e fixos, os componentes solúveis da hemolinfa. Estes componentes solúveis podem interagir diretamente com agentes patogênicos, através da produção substâncias tóxicas ou peptídeos líticos ou indiretamente, através moléculas mediadoras do reconhecimento do patógeno ou ativadores de hemócitos. Peptídeos com função antimicrobiana, denominadas mytilinas, são produzidos e armazenados em grânulos de hemócitos, bem como são secretados na hemolinfa de *Mytilus galloprovincialis* (Mitta et al., 2000). Apesar da participação destes peptídeos na destruição de infecções bacterianas, não existem evidências da participação dos mesmos na interação do molusco com parasitos metazoários. Sapp e Loker (2000 a e b) demonstraram que na maioria das relações digenético-gastrópoda incompatíveis, fatores presentes na hemolinfa de gastrópoda, não relacionados a osmolaridade, matam o esporocisto após cerca de 6 horas de incubação, mas a natureza destes fatores ainda não foi estabelecida.

Os hemócitos atuam juntamente com fatores solúveis presentes na hemolinfa no processo de encapsulamento e destruição de agentes patogênicos, incluindo larvas de trematódeos. Vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de se estabelecer qual a importância dos fatores solúveis da hemolinfa nos mecanismos de defesa desenvolvidos pelos moluscos durante a presença de agentes patogênicos.

Bayne et al. (1980 a, b) foram os primeiros a desenvolver métodos *in vitro* para avaliar o efeito da hemolinfa de *B. glabrata* sobre o esporocisto primário de *S. mansoni* transformado axenicamente, que facilitaram o estudo dos mecanismos de resistência na associação parasito – hospedeiro. Nestes estudos, os autores mostraram que a hemolinfa livre de células, obtida de linhagens suscetíveis e resistentes de *B. glabrata*, é incapaz de alterar visivelmente a morfologia do esporocisto *in vitro*, o mesmo acontece com hemolinfa contendo hemócitos de linhagens suscetíveis. Entretanto, o esporocisto é destruído quando incubado com fatores solúveis da hemolinfa e hemócitos de linhagens resistentes. Quando os hemócitos de linhagens suscetíveis juntamente com fatores solúveis da hemolinfa de linhagens resistentes são incubados com os esporocistos, estes hemócitos adquirem capacidade de destruir os esporocistos. Granath & Yoshino (1984) confirmaram a importância de fatores solúveis da hemolinfa no processo de destruição de esporocistos de *S. mansoni* em estudos *in vivo*. Estes autores relataram que a transferência de plasma obtido de linhagens resistentes de *B. glabrata* para linhagens suscetíveis resultou em uma redução da taxa de infecção de linhagens de *B. glabrata* pelo *S. mansoni*.

Resultados similares foram obtidos em nosso laboratório quando foi feita a transferência, *in vivo*, de fatores solúveis da hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem Taim para a linhagem Cabo Frio (comunicação pessoal, Pereira 2004)

O estudo de Fryer & Bayne (1996) reforça a importância dos componentes solúveis da hemolinfa na interiorização de partículas pelos hemócitos. Neste estudo, foi mostrado que as partículas de poliestireno tratadas com fatores solúveis da hemolinfa de linhagens parcialmente resistentes de *B. glabrata* são significativamente mais fagocitadas por hemócitos de linhagens suscetíveis do que as partículas não tratadas.

Loker et al. (1984) e Renwranz (1986) detectaram na hemolinfa de moluscos fatores que aglutinam e opsonizam partículas, como lectinas, proteínas com alta afinidade para radicais específicos de monossacarídeos, que possuem dois ou mais locais de ligação para as unidades glicídicas. Bayne (1983) sugere que as lectinas presentes na hemolinfa de gastrópodes poderiam mediar o reconhecimento de partículas estranhas e/ou parasitos. Nos moluscos, as lectinas são secretadas pelos hemócitos e podem estar solúveis na hemolinfa ou na superfície dos hemócitos circulantes (Richards e Renwranz, 1991).

Mais recentemente, um grupo de proteínas com homologia ao fibrinogênio e com atividade de lectina, foi identificado na hemolinfa de *B. glabrata*, sendo sua expressão aumentada após a infecção do molusco com *Echinostoma paraensei*, outro trematódeo digenêico. Esta proteína tem a capacidade de precipitar antígenos de excreção/secreção do parasito e os autores sugerem que, além de participar do reconhecimento, estas proteínas poderiam ser importantes inibidores do mecanismo de evasão do parasito (Adema et al., 1997 a e b).

Além das lectinas, outras proteínas com função homóloga a mediadores celulares já caracterizadas em vertebrados, têm sido identificadas na hemolinfa de moluscos e podem estar envolvidas na ativação dos hemócitos durante a infecção.

Como em vertebrados, a resposta inflamatória parece também desempenhar um papel importante no sistema interno de defesa dos invertebrados (Ottaviani et al., 1993; e

1995; Rowley, 1996). Ottaviani et al. (1993) relatam a presença de uma variedade de proteínas semelhantes a citocinas pró-inflamatórias de vertebrados, como Interleucina-1 alfa (IL-1  $\alpha$ ), Interleucina-1 beta (IL-1  $\beta$ ), Interleucina-2 (IL-2), Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ), em hemócitos de duas espécies de moluscos (*Planorbarius corneus* e *Viviparus ater*), estando presentes somente nos hemócitos com atividade fagocitária. Em trabalhos posteriores, Ottaviani et al. (1995) relatam uma profunda inter-relação entre citocina e a resposta imune inata de invertebrados, principalmente moluscos. Segundo estes autores, diferentes citocinas (IL-1  $\alpha$ , IL-2 e TNF  $\alpha$ ) estimulam significativamente a motilidade, aumentam a atividade fagocitária dos hemócitos e, além disso, provocam a indução da óxido nítrico sintetase. Porém, até onde a motilidade da celular é afetada, a resposta a diferentes citocinas varia entre as espécies de moluscos estudadas. Estes resultados sugerem que citocinas sejam importantes moléculas ancestrais, funcionalmente conservadas que também mantiveram a sua pleiotropicidade redundante no modo de ação e a alta promiscuidade dos seus receptores durante evolução. Apesar destas proteínas apresentarem semelhanças funcionais com citocinas de vertebrados, fazem-se necessários estudos mais sofisticados para estabelecer o grau de homologia entre estas proteínas.

Granath et al. (1994) identificaram uma proteína semelhante ao TNF -  $\alpha$  na hemolinfa de Gastropoda. Esta também foi encontrada na hemolinfa de *B. glabrata* por Boyer (1994). Neste estudo, os autores demonstraram através de Western Blot a presença de uma molécula de 53 kDa imunoreativa a anti-TNF- $\alpha$ , sendo que, sua quantificação através da técnica de ELISA, demonstra que esta proteína diminui durante a infecção por *S. mansoni*. Apesar da imunoreatividade com anticorpos que reconhecem TNF- $\alpha$  de mamífero, o nível de



homologia entre estas proteínas não foi estabelecido bem como a sua importância funcional na destruição do parasito durante a fase intramolusco.

Molécula semelhante a IL-1, ou com atividade imunológica, funcional e/ou biológica semelhante a IL-1, tem sido detectada ou isolada de camarões de água doce (Beck and Habicht, 1986), insetos (Scharrer et al., 1996), mexilhões (Hughes et al., 1990), caramujos (Granath et al., 1994; Ottaviani et al., 1995) e tunicatas (Beck et al., 1989). Na hemolinfa de *B. glabrata* proteína semelhante a IL-1 está associada à ativação e proliferação celular (Hughes et al., 1991; Raftos et al., 1991, 1992), ao aumento da fagocitose (Burke & Watkins, 1991; Beck et al., 1993) e com a produção de superóxidos (Granath et al., 1994). Segundo Granath et al. (1994), as linhagens resistentes de *B. glabrata* apresentam níveis maiores de proteínas semelhantes a IL-1 do que as linhagens suscetíveis, e estes caramujos mantêm quantidades significativamente altas durante a exposição pelo *S. mansoni* em relação às linhagens suscetíveis. Em adição, estudos *in vitro*, realizados por estes mesmos autores, demonstraram que a incubação de hemócitos de caramujos resistentes com uma proteína antagonista específica para o recombinante humano IL-1 $\beta$  (IRAP) leva a eliminação do efeito de rhIL-1 sobre os hemócitos, o que inibe a produção de radicais reativos de oxigênio (ROI), sugerindo que a IL-1 tenha um papel significativo na habilidade de *B. glabrata* resistir a infecção pelo *S. mansoni*. A inoculação de rhIL-1 $\beta$  em caramujos *B. glabrata* suscetíveis resulta em uma rápida ativação dos hemócitos e produção de superóxidos equivalentes aos níveis encontrados em caramujos resistentes e, conseqüentemente, resultando em uma redução altamente significativa do número de cercárias produzidas por estes caramujos (Connors et al., 1995). Mais tarde, estes autores (Connors et al., 1998) demonstraram que a diminuição na produção de cercárias, observada em *B. glabrata* suscetíveis inoculados com rhIL-1 $\beta$ , é conseqüência da elevada mortalidade observada de esporocistos primários. Embora

a hemolinfa livre de células recolhida de caramujos tratados com rhIL-1  $\beta$  tenha sido capaz de matar esporocistos de *S. mansoni*, testes *in vitro* mostram que rhIL-1  $\beta$ , “per si”, não apresenta efeito tóxico, sugerindo que no processo de destruição do parasito esta proteína possa estar atuando na estimulação da produção de fatores citotóxicos solúveis por *B. glabrata*.

## **2.6. Mecanismos funcionais na interação parasito – molusco:**

Dikkeboom et al. (1988a) demonstraram que o principal componente de defesa anti-digeneico em moluscos é formado por hemócitos, células fagocíticas que circulam na hemolinfa e migram através dos tecidos conectivos. Em algumas situações, os hemócitos são capazes de ligar e matar larvas digeneicas em condições *in vitro*, mesmo sem plasma (hemolinfa livre de células). Segundo Van der Knaap et al. (1981); Van der Knaap e Loker (1990) os hemócitos por si só podem produzir lectinas e outros fatores requerentes neste processo.

Vários estudos são realizados com o objetivo de se esclarecer os mecanismos que regem a interação do parasito com seu molusco hospedeiro, principalmente no diz respeito à relação dos hemócitos com o parasito. Em estudo de fagocitose *in vitro*, ZelcK e Becker (1992) demonstraram que na presença de cálcio, hemócitos de caramujos *B. glabrata* resistentes ou susceptíveis, infectados ou não pelo *S. mansoni*, são capazes de reconhecer e fagocitar eritrócitos de carneiro sem a influência de qualquer outra substância. Noda e Loker (1989) avaliaram a atividade fagocitária de hemócitos de *B. glabrata* infectados com *Echinostoma paraensei*, frente à eritrócitos de carneiro e demonstraram que os hemócitos de caramujos infectados possuem um índice de atividade fagocitária significativamente maior que os hemócitos de caramujos não infectados. Adema et al. (1994) avaliaram a infecção por

*Echinostoma paraensei* em caramujos *B. glabrata* (espécie hospedeira) e *Helix aspersa* (espécies não hospedeira), e mostraram que as alterações dos hemócitos de *B. glabrata* decorrentes da infecção não foram observadas na espécie *Helix aspersa*, sugerindo que os efeitos nos hemócitos induzidos pela infecção, apresentam um grau de especificidade entre parasito - hospedeiro. Sapp & Loker (2000a) utilizando em seus experimentos a interação de quatro espécies de trematódeos – *E. paraensei*, *E. trivolvis*, *S. mansoni* e *Schistosomatium douthitti* - e cinco espécies de caramujos - *B. glabrata*, *Heliosoma trivolvis*, *Lymnaea satgalis*, *Stagnicola elodes* e *Helix aspersa*. Os autores observaram que diferentes espécies de parasitos, ou mesmo estágios de desenvolvimento dos mesmos, induziram reações distintas nos hemócitos do hospedeiro, sugerindo que os determinantes de especificidade variam com a combinação parasito-hospedeiro e com o estágio do ciclo de vida do parasito.

Apesar do crescente número de modelos experimentais que tentam elucidar o mecanismo de defesa interna dos moluscos, a maioria dos estudos utiliza caramujos do gênero *Biomphalaria* e *S.mansoni* como o principal modelo experimental.

O processo de destruição dos esporocistos por hemócitos inicia-se com a atração dos hemócitos para a proximidade do esporocisto primário, sugerindo uma resposta quimiotática. Respostas quimiotáticas de células da hemolinfa de moluscos a larvas de trematódeos têm sido demonstrados *in vitro* e *in vivo*, embora o mecanismo de estimulação destas células ainda não está bem estabelecido.

Segundo Núñez et al. (1997), durante a transformação *in vitro* de miracídios de *Trichobilhazia ocellata* em esporocisto-mãe, inicialmente ocorre a liberação de um polipeptídios de 2 kDa entre os produtos excretados e secretados (E/S) pelo parasito, que estimula a atividade dos hemócitos. Subsequentemente, o produto excretado e secretado pelo parasito é constituído predominantemente por uma proteína de 40 kDa, a qual suprime a

atividade dos hemócitos. Núñez et al. (1997) demonstraram que o efeito supressivo da fração de 40 kDa só pode ser encontrado em combinações de parasito e hospedeiro compatíveis. Desta maneira, os autores demonstraram que esporocistos de *S. mansoni* causam uma atividade inicial nos hemócitos de *Lymnaea*, assim como esporocistos de *T. ocellata* ativam os hemócitos de *Planorbarius corneus*, porém, nos dois casos, os parasitos não foram capazes de suprimir esta atividade no decorrer da infecção.

Lodes & Yoshino (1990) mostraram que produtos excretados e secretados por esporocistos de *S. mansoni* estimulam a mobilidade de hemócitos de linhagens resistentes de *B. glabrata* mas, inibem a mobilidade nas cepas suscetíveis. Resultados semelhantes também foram obtidos por Bezerra et al. (1997) que mostraram que o número de hemócitos circulantes e a porcentagem de células fagocitárias são semelhantes em *B. glabrata* e *B. tenagophila* livres de infecção, tanto nas linhagens resistentes quanto nas suscetíveis ao *S. mansoni*. Entretanto, 5 horas após a infecção por *S. mansoni* ocorre uma significativa redução do número de células circulantes em todas as linhagens estudadas, sendo a diminuição mais intensa nas linhagens resistentes. Estes autores relacionaram o desaparecimento de hemócitos circulantes em *Biomphalaria* com o recrutamento destas células para o local da infecção, concluindo que a quimiotaxia e encapsulamento do esporocisto primário por hemócitos são fenômenos que ocorrem num espaço de poucas horas, sendo os mesmos fundamentais para se determinar o sucesso da eliminação do parasito no molusco hospedeiro.

O contato dos hemócitos com o tegumento do parasito pode resultar no encapsulamento dos esporocistos e, em alguns casos, ocorre a destruição dos esporocistos. No processo de encapsulamento e destruição dos esporocistos existe uma interação muito forte entre hemócitos e os fatores solúveis presentes na hemolinfa. Bayne et al. (1984) demonstraram em estudos *in vitro* que hemócitos de *B. glabrata* suscetíveis ou resistentes à

infecção são capazes de encapsular os esporocistos de *S. mansoni*, porém somente hemócitos de linhagens geográficas resistentes são capazes de causar algum dano à membrana dos esporocistos.

Os mecanismos pelos quais os hemócitos destroem o parasito ainda não foram completamente elucidados. Dependendo do tamanho, os organismos (ou partículas) podem ser fagocitados pelos hemócitos ou encapsulados (como no caso de larvas de Digenea) e, subsequente, lesados por metabólitos secretados pelos hemócitos ativados (Adema et al., 1997a).

Quando analisados com um auxílio de microscópico eletrônico, a porção do tegumento do esporocisto, que está rodeada por hemócitos, parece também sofrer fagocitose. Assim sendo, pode ocorrer um mecanismo de destruição do esporocisto por agressão mecânica. A emissão de pseudópodes por hemócitos de linhagens resistentes pode destruir diretamente o tegumento sincicial do parasito, uma estrutura necessária para a aquisição de nutrientes e manutenção do equilíbrio osmótico do esporocisto (van der Knaap & Locker, 1990).

Um dos principais mecanismos envolvidos na morte do parasito, mediada por células, parece ser a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo hemócitos. Hemócitos de gastrópoda produzem ROS (Dikkeboom et al., 1988a) e este processo, semelhante a citotoxicidade oxidativa de macrófagos de mamíferos, é induzido em resposta a infecção por trematódeos parasitos (Dikkeboom et al., 1988b). Segundo Adema et al. (1991) a produção de radicais livres de oxigênio pode ser encontrada em muitas, mas não em todas espécies de moluscos investigadas. Simultaneamente, Shozawa et al. (1989) relatam que os hemócitos de *B. glabrata* produzem ROS. Posteriormente, Hahn et al. (2000) indicam que as lectinas têm um papel muito importante no reconhecimento do parasito pelos hemócitos e na

ativação destas células. Hemócitos de *B. glabrata*, de linhagens susceptíveis e resistentes, foram estimulados com albumina bovina conjugada a seis carboidratos (mannose, galactose, fucose, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina, e lactose), que estão presentes no tegumento de esporocistos de *S. mansoni*, sendo que BSA-galactose, BSA-mannose e BSA-fucose foram capazes de induzir a produção de metabólitos reativos de oxigênio – ROS.

Alguns estudos (Van der Knaap et al., 1981; McKerrow et al., 1985) demonstraram que enzimas lisossomais, capazes de degradar material biológico, estão presentes em hemócitos de moluscos. Em estudos de análise da ultraestrutura do confronto entre os hemócitos e esporocistos *in vitro*, utilizando esporocistos de *S. mansoni* e hemócitos de linhagem resistente de *Lymnaea stagnalis*, foi verificada a presença de peroxidase no espaço compreendido entre o tegumento do esporocisto encapsulado e a membrana do hemócito (Dikkeboom et al., 1988c). Douglas et al. (1993) mediram, *in vitro*, a fagocitose e morte de *Proteus vulgaris* por hemócitos de *B. glabrata* infectados ou não por *S. mansoni*. Embora os hemócitos de caramujos infectados apresentaram uma baixa capacidade fagocitária, estes exibiram uma atividade microbicida elevada 3 semanas após a infecção, em relação aos caramujos não infectados. Os autores não demonstraram nenhuma atividade microbicida no plasma dos caramujos infectados ou não.

Em um ensaio *in vitro* de citotoxicidade mediada por célula, Boehmler et al. (1996) demonstraram que o tratamento do plástico com poli-L-lisina, permite a visualização dos hemócitos encapsulando os esporocistos e desta forma permite a quantificação da mortalidade dos esporocistos. Neste estudo, os autores utilizaram 4 linhagens de *B. glabrata* (2 susceptíveis e 2 resistentes) e demonstraram que nas primeiras 7 horas de incubação não houve diferenças significativas na mortalidade de esporocistos de *S. mansoni* entre as quatro linhagens testadas, porém diferenças significativas foram observadas a partir de 21 horas de incubação, até

mesmo entre as linhagens resistentes. Após 42 e 49 horas de incubação, não há diferenças significativas entre as linhagens resistentes, porém estas são marcantes entre as resistentes e as suscetíveis.

Desta maneira, o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pela destruição de esporocistos de *S. mansoni* pelo molusco gastropoda dependerá do conhecimento detalhado da população de hemócitos e de fatores responsáveis pela sua ativação.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

3.1.1. Caracterizar fenotípica e funcionalmente os hemócitos circulantes de linhagens de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, de linhagens resistente (Taim) e suscetível (Cabo Frio), durante a infecção por *S. mansoni*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

3.2.1. Analisar, comparativamente, através da citometria de fluxo, alterações no perfil morfológico de hemócitos circulantes de *B. glabrata*, *B. tenagophila* Cabo Frio e *B. tenagophila* Taim, durante a infecção por *S. mansoni*.

3.2.2. Verificar alterações no perfil morfológico dos hemócitos circulantes de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, obtido pela citometria de fluxo, após o tratamento com sílica.

3.2.3. Estabelecer o perfil de marcação dos hemócitos circulantes de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, utilizando as lectinas ConA, PNA, SBA e WGA conjugadas com FITC, antes e após infecção experimental com *S. mansoni*.

3.2.4. Analisar, comparativamente, *in vitro*, a adesão celular dos hemócitos circulantes isolados de *B. glabrata*, *B. tenagophila* Cabo Frio e *B. tenagophila* Taim, a superfície dos esporocistos de *S. mansoni* e, posteriormente, analisar a capacidade destas células em destruir as larvas do parasito.



3.2.5. Analisar, comparativamente, a ação de carboidratos no mecanismo de adesão celular de hemócitos circulantes de *B. glabrata*, *B. tenagophila* Cabo Frio e *B. tenagophila* Taim e na destruição dos esporocistos de *S. mansoni*.

3.2.6. Analisar, comparativamente, a produção de radicais de nitrogênio por hemócitos circulantes sob o estímulo da infecção pelo *S. mansoni* e re-estímulo com antígenos solúveis de ovos ou esporocistos do parasito *in vitro*.

#### **4. Caracterização do perfil morfológico da população de hemócitos circulantes de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* durante a infecção experimental pelo *S. mansoni* e após o tratamento com sílica.**

A citometria de fluxo tem sido um instrumento importante na qualificação e quantificação de aspectos biofísicos, bioquímicos e moleculares de partículas biológicas. Esta tecnologia pode ser usada para executar medidas em células inteiras e também em preparação de constituintes celulares, tais como núcleo e organelas, particularmente importante para pesquisas biológicas. Permite análises qualitativas e quantitativas de quaisquer células ou constituintes celulares que tenham sido tratados com uma ampla variedade de reagentes disponíveis comercialmente, tais como corantes e anticorpos monoclonais. Durante esta análise, as células/ partículas podem ser separadas de acordo com seu tamanho, granulosidade e/ou a partir dos vários tipos de fluorescência (Jaroszeki e Radcliff, 1999).

A análise morfométrica a laser vem sendo cada vez mais utilizada na caracterização de células circulantes presentes na hemolinfa, denominadas hemócitos, de várias espécies de invertebrados, como insetos (Willott et al., 1994; Tirowvanziam et al., 2004), aracnídeos (Kuhn, 1996), tunicatos (Raftos et al., 1990; Raftos & Hutchinson, 1995) crustáceos (Cardenas et al., 2000; Cardenas et al., 2004) e moluscos (Franceschi et al., 1991; Amen et al., 1992; Bousseau et al., 2000; Johnston & Yoshino 2001; Allam et al., 2002; Goedken e De Guise 2004).

Em moluscos, esta análise de fluxo mostrou-se como uma ferramenta importante para monitorar a transformação dos hemócitos de caramujos *Mya arena* durante a fagocitose de metais pesados *in vitro* (Bousseau et al., 2000). Allam et al. (2002) utilizaram a citometria de fluxo em um estudo em que foram comparados, por tamanho e granulosidade, os hemócitos circulantes de 3 espécies de moluscos ( *Ruditapes philippinarum*, *Mercenaria*

*mercenaria* e *Crassostrea virginica*) e demonstraram que as referidas espécies apresentam dois grupos de hemócitos morfológicamente similares denominados agranulócitos e granulócitos. Goedken & De Guise (2004) apresentam a citometria de fluxo como uma ferramenta utilizada para caracterizar quantitativamente e funcionalmente as células envolvidas no sistema de defesa de ostras (*Crassostrea virginica*), sendo caracterizadas três populações de hemócitos (granulócitos hialinócitos e células intermediárias) a partir da capacidade fagocitária e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Johnston & Yoshino (2001) analisando as células da hemolinfa de *B. glabrata*, por citometria de fluxo, caracterizaram a população de hemócitos circulantes como sendo uma população constituída por duas subpopulações celulares. Uma subpopulação foi caracterizada como células de tamanho pequeno e arredondadas, medindo entre 5 e 6 µm de diâmetro, e com pouca granulosidade, enquanto que o outro tipo celular era constituído por hemócitos grandes (entre 6,5 e 8 µm de diâmetro) mais granulosos, capazes de aderir fortemente à superfície do vidro com uma extensa emissão de filópodes. Hemócitos de ambas as populações celulares foram marcados por conjugados fluorescentes de proteínas excretadas/secretadas de *S. mansoni* (ESPs), sendo que a marcação foi mais intensa na subpopulação de hemócitos pequenos quando comparada com aos grandes. A ligação de antígenos do parasito (ESPs) à superfície dos hemócitos foi inibida pela incubação com vários açúcares, sugerindo que este reconhecimento pode ser mediado por lectinas.

A importância dos hemócitos na interação com o *S. mansoni*, vêm sendo discutida por vários autores. Dentre eles, Martins-Souza et al., (2003) demonstraram que a inoculação da sílica em caramujos resistentes e parcialmente susceptíveis a infecção, resulta na alteração do grau de resistência e suscetibilidade destes caramujos. A inoculação de partículas de sílica induz uma diminuição significativa e temporária (até 4 dias após inoculação) do número de

granulócitos circulantes na hemolinfa de *B. tenagophila*. Como esta redução é seletiva, para uma subpopulação de granulócitos, o tratamento com sílica pode ser utilizado na tentativa de melhor caracterizar as alterações na população de hemócitos circulantes, analisados pela citometria de fluxo.

A técnica de citometria de fluxo, apresenta-se como uma ferramenta valiosa para a caracterização das subpopulações de hemócitos de moluscos de linhagens resistentes e suscetíveis da espécie *B. tenagophila*, que é a proposta deste trabalho. Ela também permitirá analisar o comportamento destas células durante a infecção por *S. mansoni*, ou seja, a partir do momento da penetração do miracídio até a liberação de cercárias.

Portanto, o objetivo deste trabalho consiste em analisar, comparativamente, através da citometria de fluxo, alterações no perfil morfológico de hemócitos circulantes de *B. glabrata*, *B. tenagophila* Cabo Frio e *B. tenagophila* Taim, durante a infecção por *S. mansoni*; além de verificar alterações neste perfil após o tratamento com sílica.

## **4.1. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1.1. Caramujos**

No presente trabalho foram utilizadas duas espécies de caramujos: *B. glabrata* e *B. tenagophila*. A linhagem de *B. glabrata* utilizada foi proveniente da Lagoa da Pampulha – Belo Horizonte (MG), denominada linhagem BH. Esta linhagem apresenta taxas de susceptibilidade de cerca de 80% a infecção pelo *S. mansoni*.

Os experimentos aqui reportados utilizam duas linhagens de *B. tenagophila*: Cabo Frio (CF) e Taim. A linhagem CF foi originária da região de Cabo Frio (RJ) e apresenta cerca de 40 a 60% de suscetibilidade à infecção pela cepa LE do parasito (Martins-Souza et al., 2003). A linhagem Taim foi proveniente da Reserva Biológica do Taim (RS) e apresenta total resistência frente à infecção pelo *S. mansoni* da cepa LE (Corrêa et al., 1979; Santos et al., 1979; Bezerra et al., 1997; Martins-Souza et al., 2003; Coelho et al., 2004; Rosa et al., 2005).

As linhagens de *B. glabrata* e *B. tenagophila* utilizadas neste estudo foram mantidas nos moluscários do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE) – ICB – UFMG.

### **4.1.2. O Parasito**

Foi utilizada a cepa LE de *S. mansoni*, isolada por Pellegrino de um paciente (Luís Evangelista) de fase aguda de esquistossomose infectado em Belo Horizonte e vem sendo mantida no laboratório do GIDE por 40 anos. A cepa LE foi selecionada para este estudo, pois, segundo dados obtidos rotineiramente nos laboratório do GIDE, as linhagens de *B. tenagophila* se apresentam mais resistentes a esta cepa de *S. mansoni* (Corrêa et al., 1979;

Santos et al., 1979), o fato que facilita os estudos referentes aos mecanismos que interferem na associação parasito-molusco.

#### **4.1.3. Infecção de caramujos**

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *S. mansoni* da cepa LE foram sacrificados entre 45 e 50 dias após infecção para obtenção de miracídios (Pellegrino & Katz, 1968). Os fígados destes animais foram retirados, lavados em solução fisiológica (0,85 % de NaCl) e homogeneizados em liquidificador com água desclorada. Esta suspensão foi transferida para um cálice de sedimentação a 4<sup>o</sup> C por cerca de 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo os ovos do parasito ressuspense em água desclorada em temperatura ambiente e colocado sob a luz de uma luminária, para a eclosão dos miracídios. Amostras deste material foram recolhidas e os miracídios quantificados com auxílio de microscópio estereoscópico.

Exemplares de *B. glabrata* e *B. tenagophila* apresentando conchas com diâmetro de 12 a 14 mm foram transferidos individualmente para poços de placas de cultura (6 wells) contendo 20 miracídios de *S. mansoni*. Estes moluscos foram mantidos nestas condições por 18-24h sob luz artificial. Após este período, os caramujos foram transferidos para aquários de experimentação, onde permanecem até serem utilizados.

#### **4.1.4. Tratamento com sílica**

Inicialmente, 54 caramujos das duas espécies, *B. glabrata* e *B. tenagophila*, foram anestesiados em solução contendo 0,4 mg/ml de Pentobarbital Sódico (Hypnol-Cristália) durante 8 horas, segundo a técnica de Martins-Souza et al., (2001).

Em seguida, utilizando uma seringa de insulina de 500 µl (Manoject 50 unit), os caramujos foram inoculados com 10 µl de Solução Salina Balanceada de Chernin - CBSS (47,7 mM de NaCl, 2,0 mM de KCl, 0,49 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro, 1,8 mM de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 3,6 mM de CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0,59 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM de glicose e 3 mM de trealose, pH 7.2) contendo 0.1 mg/ml Sílica (0.5-10 microns, Sigma, USA), conforme Martins-Souza, et al., (2003). Um grupo controle foi inoculado com 10 µl de CBSS sem sílica.

#### **4.1.5. Coleta da hemolinfa e isolamento de hemócitos**

A coleta da hemolinfa foi realizada através da punção da região cardíaca segundo Zelck & Becker, (1990) e Bezerra et al., (1997). Resumidamente, a concha de cada caramujo foi desinfetada com álcool 70<sup>o</sup> GL e seca com papel absorvente. Posteriormente, utilizando-se uma seringa plástica de 3 ml (Plastipak) com agulha de 21G x 1, a concha do molusco foi perfurada até atingir a região cardíaca.

Para se manter a integridade dos hemócitos e permitir os estudos de caracterização propostos neste trabalho, todas as soluções nas quais os hemócitos foram mantidos, tiveram a osmolaridade acertada para 0,8 - 0,9 mOsm, que corresponde a osmolaridade da hemolinfa, estabelecida em estudos prévios.

Para evitar a aglutinação celular, a hemolinfa foi coletada diretamente em CBSS contendo Citrato /EDTA [50 mM Citrato de Sódio, 10 mM EDTA, e 25 mM de sacarose] pH 7,2, a temperatura ambiente, na proporção de 1 de solução para 2 de hemolinfa. Em seguida, a hemolinfa total foi colocada em tubos de eppendorf e mantida em gelo. Após a sedimentação de partículas sólidas (fragmentos de concha e tecidos, partículas sólidas, etc), por cerca de 5 minutos, a hemolinfa juntamente com as células, foram transferidas para um novo tubo eppendorf e mantidas no gelo.

Amostra de hemolinfa de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* da linhagem CF e da linhagem Taim, coletadas como descrito acima, foram processadas e suas células foram contadas e posteriormente utilizadas para estabelecer o padrão fenotípico da população de hemócitos circulantes pela citometria de fluxo. Inicialmente, o padrão fenotípico foi estabelecido com a utilização de hemócitos de caramujos normais e em seguida, foram analisadas as possíveis alterações neste perfil decorrentes da infecção pelo *S. mansoni* e da inoculação de sílica.

Para avaliar alterações da população de hemócitos circulantes, a hemolinfa de 9 caramujos (em cada ponto de análise) foi retirada, após infecção pelo *S. mansoni*, e os hemócitos foram analisados durante as primeiras 24 horas de infecção (2, 5, 8, 12, 16, 20 e 24 horas de infecção), em seguida após 3, 5, 10, 15, 20 e 30 dias de infecção. Para o estudo do efeito do tratamento de sílica, a hemolinfa foi recolhida 24 horas após a inoculação de sílica ou CBSS, antes da infecção e após 5, 24, 72, 96 e 120 horas de infecção. Em cada ponto foram analisados triplicatas de hemolinfa, sendo que cada amostra das triplicatas continha a hemolinfa total extraída de três caramujos, que foram processadas e coradas como descrito posteriormente.

#### **4.1.6. Contagem diferencial de hemócitos e viabilidade**

Amostras da hemolinfa total recolhida dos diferentes grupos experimentais, em diferentes períodos de infecção, foram diluídas 1\10 em CBSS pH 7.4 contendo 0,05% de vermelho neutro (Sigma). A diferenciação celular foi realizada levando-se em consideração a capacidade de granulócitos de englobar o corante, apresentando-se com coloração avermelhadas. A viabilidade dos hemócitos foi estimada através da incubação das células em meio CBSS contendo 0,4% de Azul de Tripán (diluição 1:10). Tanto para contagem



diferencial quanto para determinar a viabilidade as células, a contagem, em câmara de Neubauer, foi feita imediatamente após a adição do corante. Sendo assim, as células coradas de azul foram consideradas mortas (Martins-Souza, 1999).

#### **4.1.7. Caracterização fenotípica de hemócitos circulantes de *B. tenagophila***

Para a obtenção de um perfil com a mínima interferência de fragmentos ou células mortas, os hemócitos foram corados simultaneamente com Brometo de Etídio e Laranja de Acridina, permitindo a identificação das populações celulares e sua discriminação dos fragmentos e/ou células mortas. O corante fluorescente brometo de etídio (BE) consegue atravessar uma membrana polarizada, mas só se liga às cadeias do DNA quando a célula não possui um sistema de transporte ativo que expulsa este fluorocromo, ou seja quando a célula está morta (Midgley,1987). Já o laranja de acridina é um corante específico de DNA de células viáveis.

A solução estoque de Brometo de Etídio e Laranja de Acridina contendo 25 e 7,5 mg/ml, respectivamente, diluídos em etanol 95% (Parks et al., 1979), foi diluída na proporção de 1:1000 em CBSS e acrescida a três amostras contendo hemolinfa total de três caramujos, na proporção de 1:1. Após a adição do corante, os hemócitos foram incubados por 1 hora em gelo, no escuro, e após este período foram submetidos à análise no Citômetro de Fluxo.

A análise em citometria de fluxo - FACSCalibur - foi inicialmente realizada através da aquisição de 20000 eventos com os seguintes ajustes: FSC (E00, AmpGain 2.00, Mode Lin), SSC (Voltage 349, AmpGain 1.00, Mode Lin), FL1 (Voltage 547, AmpGain 1.00, Mode Log), FL2 (Voltage 548, AmpGain 1.00, Mode Log) e FL3 (Voltage 600, AmpGain 1.00, Mode Log). Além dos ajuste de compensação FL1 – 0% FL2, FL2 – 24,7% FL1, FL2 – 20,0% FL3 e FL3 – 0% FL2; e Threshold parâmetro FSC, valor 90.

Os perfis de hemócitos foram estabelecidos a partir dos parâmetros Fluorescência 1 (FL1 – verde) correspondente a coloração com Acridina, e Fluorescência 3 (FL3 – vermelho) equivalendo ao Brometo. A partir daí, foi possível separar e marcar somente os hemócitos viáveis baseando-se em suas características de marcação com os corantes empregados, excluindo-se os “debris” e células mortas. Posteriormente, os hemócitos foram analisados quanto ao tamanho e granulosidade desta população celular. Após a aquisição dos perfis das subpopulações dos hemócitos circulantes, estes foram analisados através do “software Cell Quest®”.

#### **4.1.8. Análise estatística**

Os resultados foram estatisticamente analisados, utilizando-se análise de variância ou teste t de Student para os dados paramétricos e teste de Kruskal Wallis para dados não paramétricos.

## 4.2. RESULTADOS

### 4.2.1. Caracterização do perfil fenotípico de hemócitos de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* através da citometria de fluxo:

Inicialmente, foi possível notar que os hemócitos tanto nas linhagens Cabo Frio e Taim de *B. tenagophila*, quanto na espécie *B. glabrata* não infectados apresentaram o mesmo padrão de coloração. O perfil apresentado na figura 1, é representativo das espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

Conforme observados na figura 1A, os hemócitos circulantes recuperados na hemolinfa de *Biomphalaria*, podem ser separados, inicialmente, através da coloração com laranja de acridina (fluorescência 1) e brometo de etídio (fluorescência 3), de debris e células mortas. A partir da análise por tamanho e granulosidade foram observadas 2 subpopulações, denominadas hemócitos pequenos e hemócitos grandes (figura 1B). Apesar dos valores apresentados nos eixos do gráfico B da figura 1, não refletirem dimensões, a população de hemócitos pequenos foi caracterizada por células de menor tamanho (entre 200 e 500) e com menor granulosidade, enquanto que as células da população de hemócitos grandes são maiores (de 500 a 1000) e mais granulosas (figura 1B).

A população total de hemócitos circulantes na espécie *B. glabrata* é composta por 56% de hemócitos pequenos e 44 de grandes, enquanto nas linhagens de *B. tenagophila*, Cabo Frio e Taim, a população de hemócitos pequenos representa 38% e os grandes representaram 62 (figura 2). A diferença da proporção de hemócitos pequenos e grandes observada entre *B. glabrata* e *B. tenagophila* não infectadas é estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), entretanto não foi verificada diferença estatisticamente significativa na proporção de hemócitos circulantes entre *B. tenagophila* das linhagens Cabo Frio e Taim.

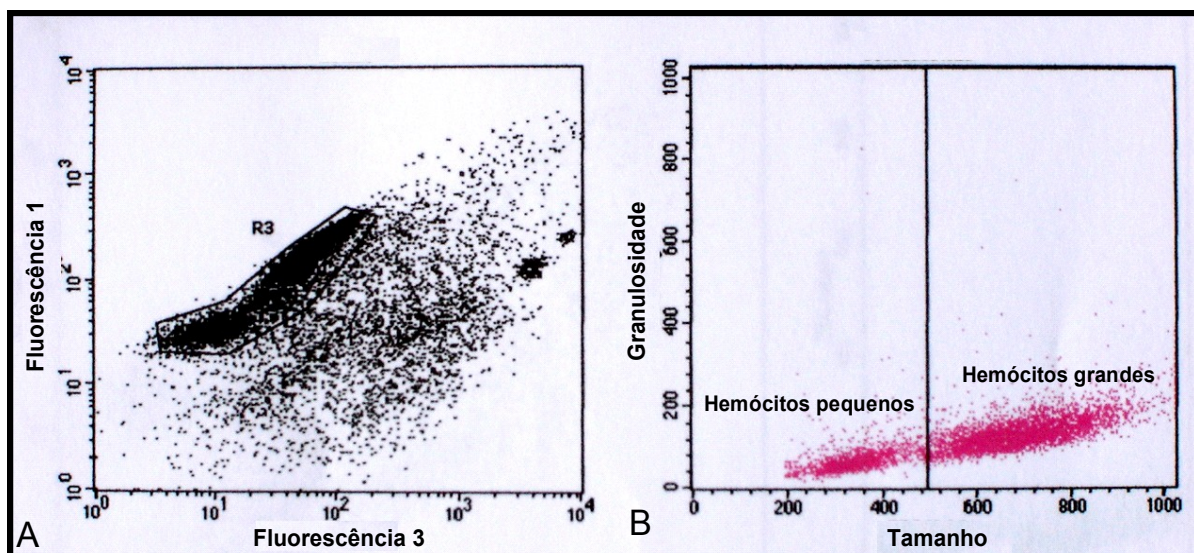


Figura 1: Exemplo da análise do perfil da população dos hemócitos circulantes de caramujos *Biomphalaria* pela citometria de fluxo (FACSCalibur), separados a partir da granulosidade versus tamanho.

A: Leitura da hemolinfa total.

B: Leitura após eliminação de células mortas e debrís.

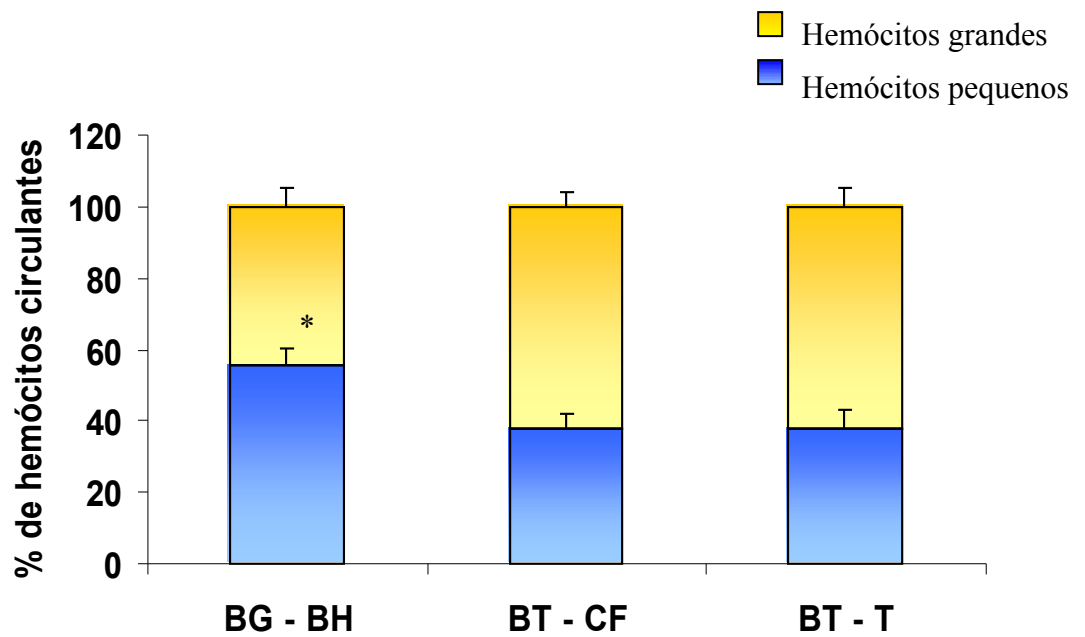


Figura 2: Perfil da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* da linhagem BH (BG-BH), *B. tenagophila* linhagem Cabo Frio (BT-CF) e *B. tenagophila* linhagem Taim (BT-T) livres de infecção por *S. mansoni*, obtida na citometria de fluxo. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação as subpopulações de *B. glabrata* (sem infecção).

Em *B. glabrata*, a infecção por *S. mansoni* não resultou em diferenças estatisticamente significativas no perfil das subpopulações de hemócitos circulantes durante as primeiras 24 horas de infecção (figura 3A). Análise posterior, realizada de 1 – 30 dias de infecção, revelou que somente no 30º dia após infecção houve uma diminuição significativa na proporção de hemócitos pequenos em relação ao padrão presente nos caramujos não infectados (figura 3B).

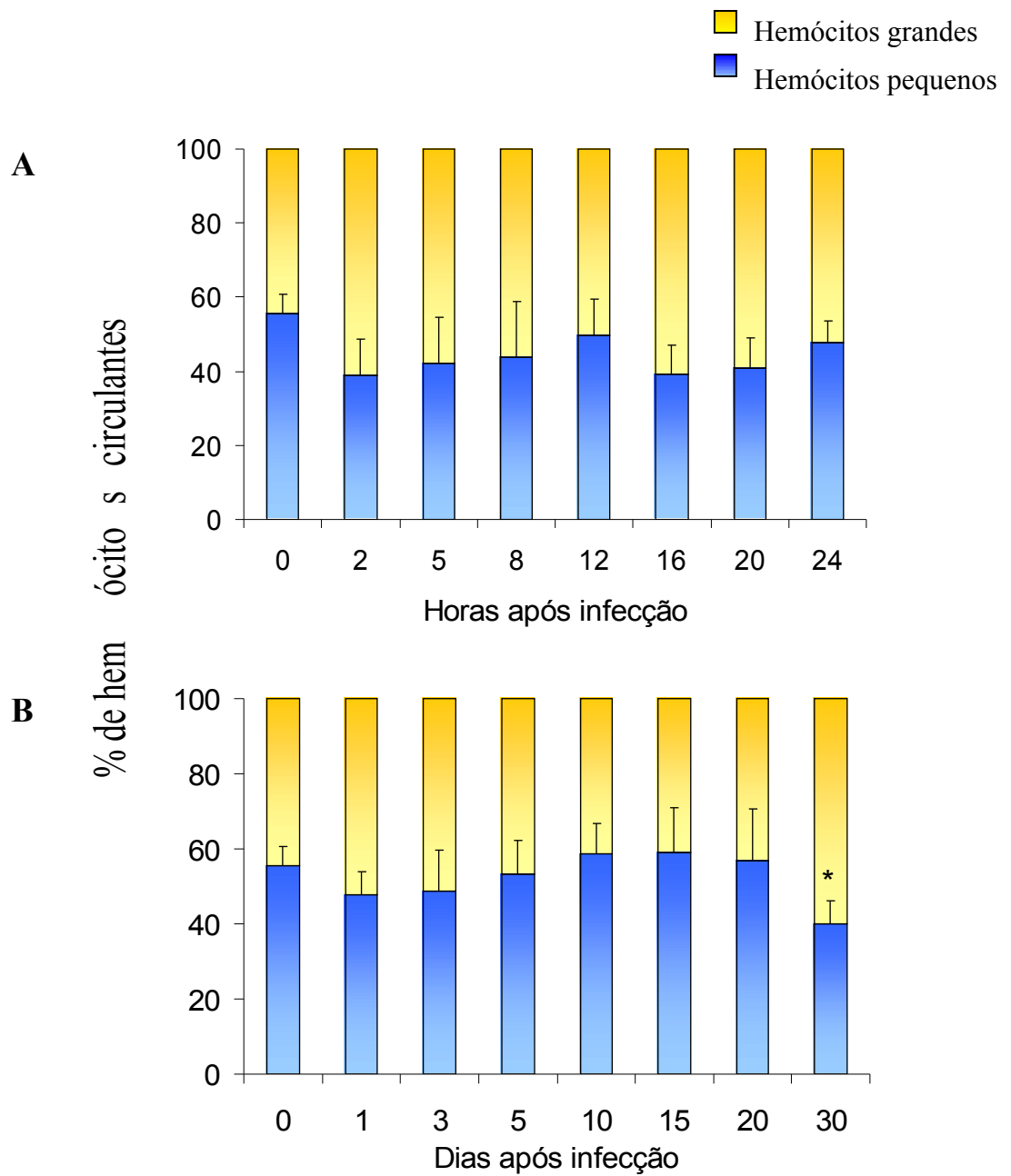


Figura 3: Perfil da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* nas primeiras 24 horas (A) e durante 30 dias (B) de infecção com *S. mansoni*, obtida através da citometria de fluxo. \* Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação a caramujos não infectados (ponto 0).

Em contraste com o padrão observado em *B. glabrata*, a infecção com *S. mansoni* em *B. tenagophila*, das linhagens Cabo Frio e Taim, induz uma variação significativa no perfil dos hemócitos circulantes já nas primeiras horas de infecção (figuras 4 e 5). Em *B. tenagophila* Cabo Frio a infecção por *S. mansoni* resultou em um aumento significativo da porcentagem de hemócitos pequenos em relação aos grandes que pode ser observado após 2 e 24 horas de infecção (figura 4A). Esta mesma alteração, também foi observada em 1, 15, 20 e 30 dias após infecção, quando comparado ao padrão de hemócitos circulantes presentes nos caramujos não infectados (figura 4B).

Com relação a linhagem Taim de *B. tenagophila*, as alterações foram muito mais intensas e persistentes, em comparação a linhagem Cabo Frio e a espécie *B. glabrata*. Foi observado um aumento significativo da porcentagem de hemócitos pequenos, em relação ao padrão não infectado que permaneceu significativo durante quase todo o período de infecção. A diferença entre as subpopulações de hemócitos se manteve durante as primeiras 24 horas de infecção, acontecendo nos períodos de 5,16, 20 e 24 horas (figura 5A) e ao longo dos 30 dias de infecção (figura 5B).



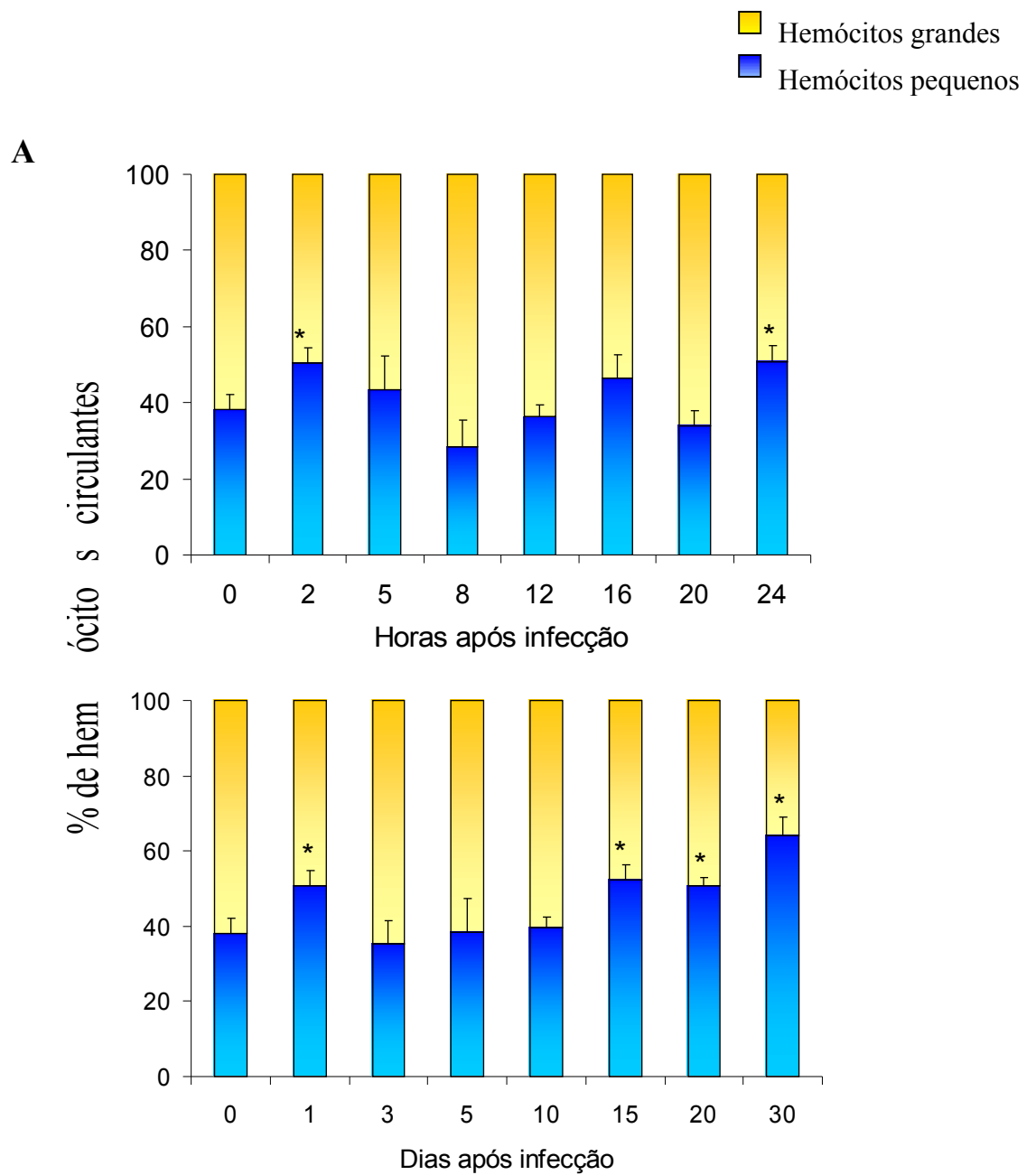


Figura 4: Perfil da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio nas primeiras 24 horas (A) e durante 30 dias (B) de infecção com *S. mansoni*, obtida através da citometria de fluxo. \* Representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação a caramujos não infectados (ponto 0).

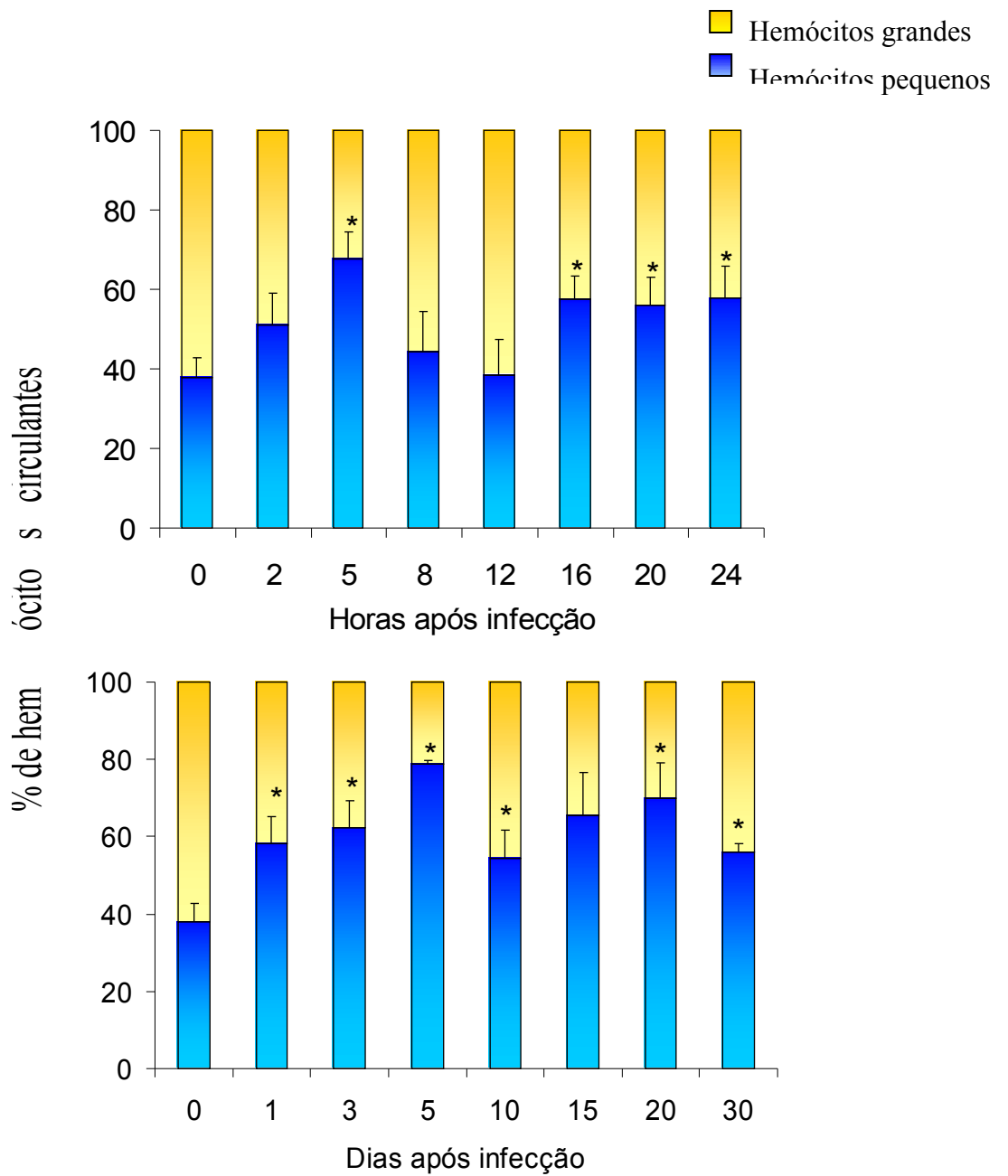


Figura 5: Perfil da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem Taim nas primeiras 24 horas (A) e durante 30 dias (B) de infecção com *S. mansoni*, obtida através da citometria de fluxo. \* Representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação a caramujos não infectados (ponto 0).

Durante a análise do perfil da granulidade dos hemócitos de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* das linhagens Cabo Frio Taim, não foram observadas alterações marcantes na granulidade de hemócitos pequenos e grandes, tanto nos caramujos livres de infecção, quanto nos caramujos infectados (dado não mostrado).

#### **4.2.2. Efeito da inoculação de sílica no perfil de hemócitos circulantes de caramujos do gênero *Biomphalaria***

Caramujos *B. glabrata*, *B. tenagophila* Cabo Frio e *B. tenagophila* Taim, que receberam a inoculação de sílica, apresentaram uma diminuição do número de granulócitos, durante as primeiras horas após a infecção por *S. mansoni*. Na tabela 1, pode-se verificar que o número de granulócitos recuperados da hemolinfa de *B. glabrata*, tratados com sílica e infectados por *S. mansoni*, foi estatisticamente inferior ao recuperado de caramujos não tratados e infectados. Esta diferença foi observada antes da infecção, 5 e 24 horas após infecção, entre os grupos tratados com sílica e os tratados com CBSS. Resultados semelhantes também foram encontrados nas linhagens Cabo Frio e Taim de *B. tenagophila*.

Tabela 1: Número de granulócitos ( $\times 10^5$ / ml) de hemolinfa retirada de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila*, tratados ou não com sílica, observados ao microscópio óptico. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de triplicadas com hemolinfa de três caramujos.

Número de granulócitos $\times 10^5$										
pi	<i>B. glabrata</i>				<i>B. tenagophila</i>			<i>B. tenagophila</i>		
	h	C	Sílica	S	CBS	ca	Sílica	BSS	C	Sílica
*	0	1,	<b>0,5</b>	$\pm 0,5$	1,6	$\pm 0,2$	<b>0,4</b>	$9 \pm 0,4$	0,	<b>0,</b>
		$1 \pm 0,1$	<b><math>\pm 0,08</math></b>						<b><math>2 \pm 0,04</math></b>	
	5	0,	<b>0,3</b>	$\pm 0,15$	1,3	$\pm 0,15$	<b>0,4</b>	$7 \pm 0,2$	0,	<b>0,</b>
		$9 \pm 0,3$	<b><math>\pm 0,07</math></b>						<b><math>2 \pm 0,03</math></b>	
4	2	1,	<b>0,8</b>	$\pm 0,4$	1,5	$\pm 0,1$	<b>0,5</b>	$8 \pm 0,3$	0,	<b>0,</b>
		$4 \pm 0,2$	<b><math>\pm 0,2</math></b>						<b><math>2 \pm 0,06</math></b>	
2	7	0,	0,7	$\pm 0,6$	1,5	$\pm 0,4$	1,1	$7 \pm 0,2$	0,	0,
		$8 \pm 0,6$	$\pm 0,2$						$5 \pm 0,2$	
6	9	1	0,7	$\pm 0,4$	1,2	$\pm 0,2$	1,2	$9 \pm 0,2$	0,	0,
		$\pm 0,6$	$\pm 0,4$						$7 \pm 0,15$	
20	1	1	1 $\pm$	$\pm 0,6$	1,4	$\pm 0,5$	1,8	$8 \pm 0,4$	0,	1
		$\pm 0,5$	0,3						$\pm 0,4$	

hpi = horas após infecção

Os números em negrito representam diferenças significativas com  $p < 0,05$ , em relação ao grupo tratado com CBSS.

\* representa ponto em que os caramujos não foram infectados, mas apresentavam 24 horas de inoculação de sílica.

Hemócitos circulantes recolhidos da hemolinfa dos caramujos (*B. glabrata*, *B. tenagophila* Cabo Frio e Taim), tratados ou não com sílica, também foram analisados por citometria de fluxo durante os primeiros 5 dias de infecção com *S. mansoni*. A análise demonstrou que a inoculação de CBSS não resultou em alteração significativa no perfil de hemócitos circulantes, ou seja, porcentagem de hemócitos pequenos e grandes durante a infecção pelo *S. mansoni* em *B. glabrata* com padrão semelhante ao observado em caramujos não inoculados. Entretanto, em *B. glabrata* tratada com sílica foi observada a diminuição da população de hemócitos pequenos no período de 0 a 24 horas de infecção (figura 6A e B), em comparação com o observado nos inoculados com CBSS.

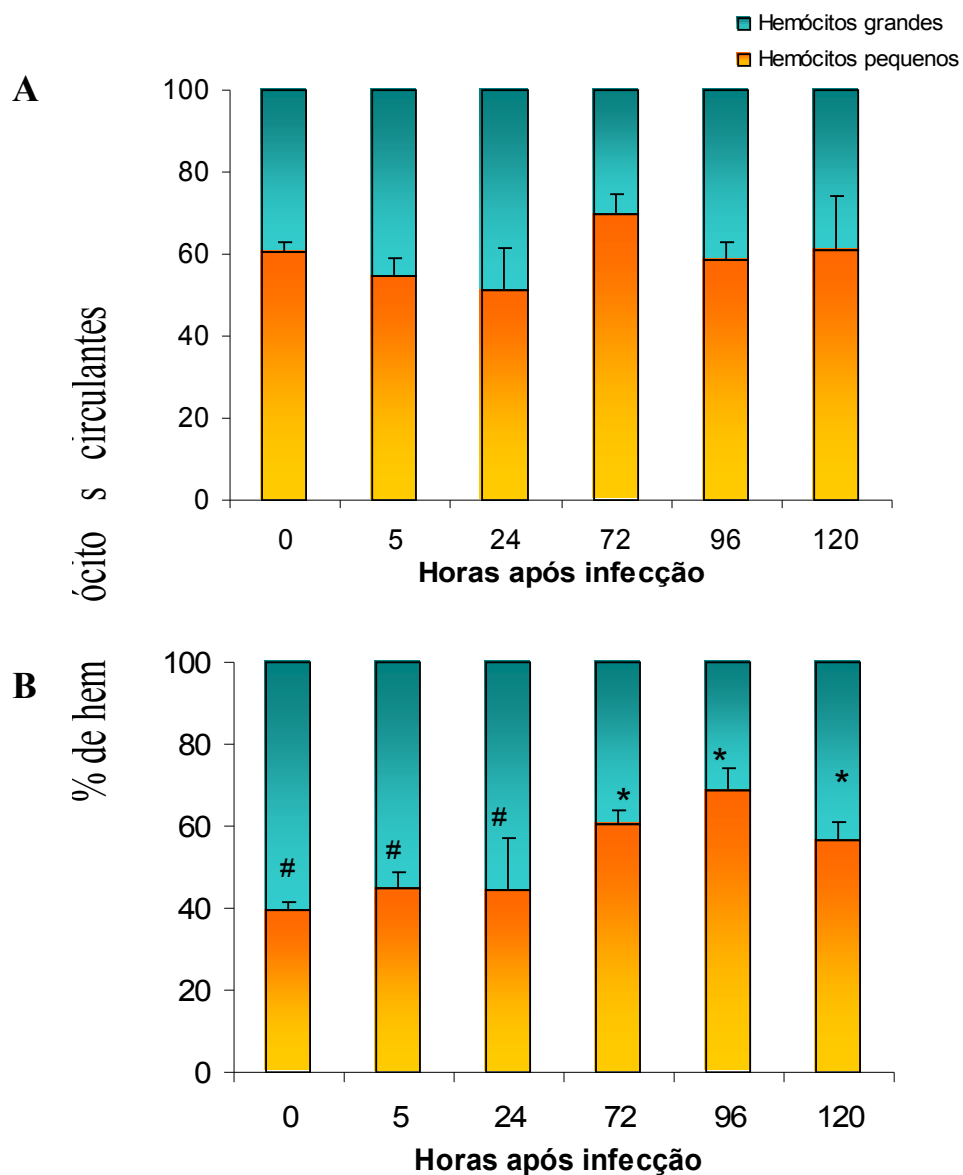


Figura 6: Efeito da inoculação de sílica na porcentagem das populações de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata*, nas primeiras 120 horas de infecção por miracídios de *S. mansoni*. A: Caramujos inoculados com CBSS e B: Caramujos inoculados com sílica. \* Diferenças significativas em relação a caramujos não infectados (ponto 0) e # diferenças entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Cada ponto representa média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas da hemolinfa total de 3 caramujos. O ponto 0 representa caramujos com 24 horas de inoculação de sílica e livres de infecção.

Na espécie *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio, inoculados com CBSS 24 horas antes da infecção por *S. mansoni*, os hemócitos pequenos, que compreendiam 45% do total de hemócitos circulantes antes da infecção, aumentam para 55% após 5 horas de infecção e este aumento se manteve até o último ponto de observação, sendo significativo no ponto 72, 96 e 120 horas após infecção (figura 7 A). Entretanto, em *B. tenagophila* Cabo Frio que recebeu a inoculação de sílica, 24 horas antes da infecção, a porcentagem dos hemócitos pequenos deste grupo, manteve-se inalterada após 5 e 24 horas de infecção (42 e 45%), sendo que neste período a porcentagem destas células, foi estatisticamente diferente entre os caramujos que receberam CBSS e os que foram inoculados com sílica. Um aumento significativo, na porcentagem de hemócitos pequenos, só pode ser observados após 72 horas de infecção, passando a representar 70% da população total (figura 7 B).



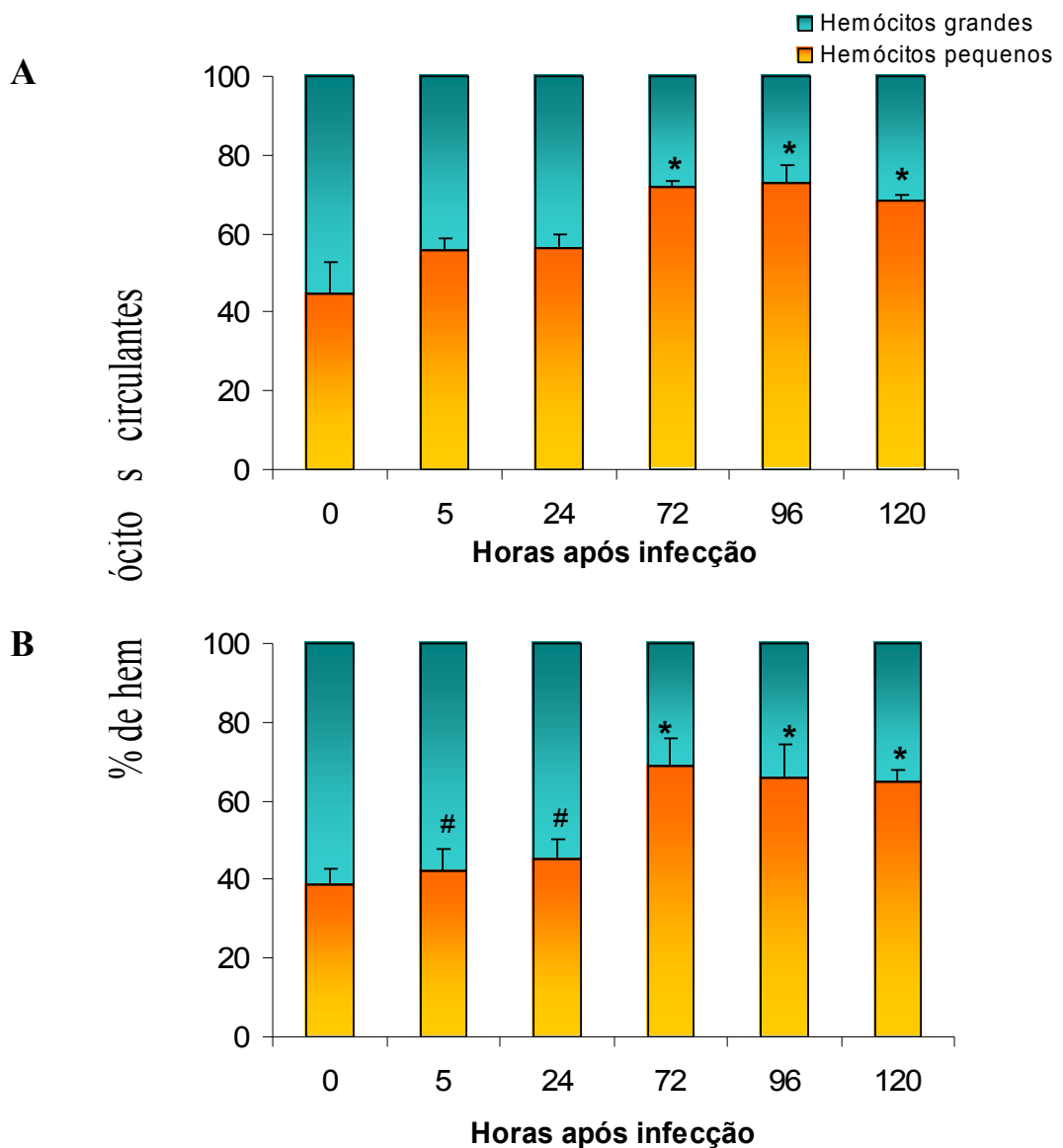


Figura 7: Efeito da inoculação de sílica na porcentagem das populações de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio, nas primeiras 120 horas de infecção por miracídeos de *S. mansoni*. A: Caramujos inoculados com CBSS e B: Caramujos inoculados com sílica. \* Diferenças significativas antes e após infecção e # representa as diferenças significativas entre sílica e CBSS ( $p < 0,05$ ). Cada ponto representa média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas da hemolinfa total de 3 caramujos. O ponto 0 representa caramujos com 24 horas de inoculação de sílica e livres de infecção.

O efeito do tratamento de sílica em *B. tenagophila* da linhagem de Taim, provoca uma diminuição na proporção de hemócitos pequenos, vista nas primeiras horas após a infecção, quando comparadas ao grupo tratado com CBSS (figura 8 A e B). Foi observado, no grupo sem tratamento com sílica, um aumento na proporção da população de hemócitos pequenos, após 5 horas de infecção (65%), esta se manteve maior proporção que dos hemócitos grandes ao longo das primeiras horas de infecção (figura 8A). Já no grupo que recebeu sílica, a proporção da população dos hemócitos pequenos se manteve menor que a população dos hemócitos grandes até às 72 horas de infecção (35, 31, 36 e 43%) e se restabelece após 96 horas de infecção (66%) (figura 8B).

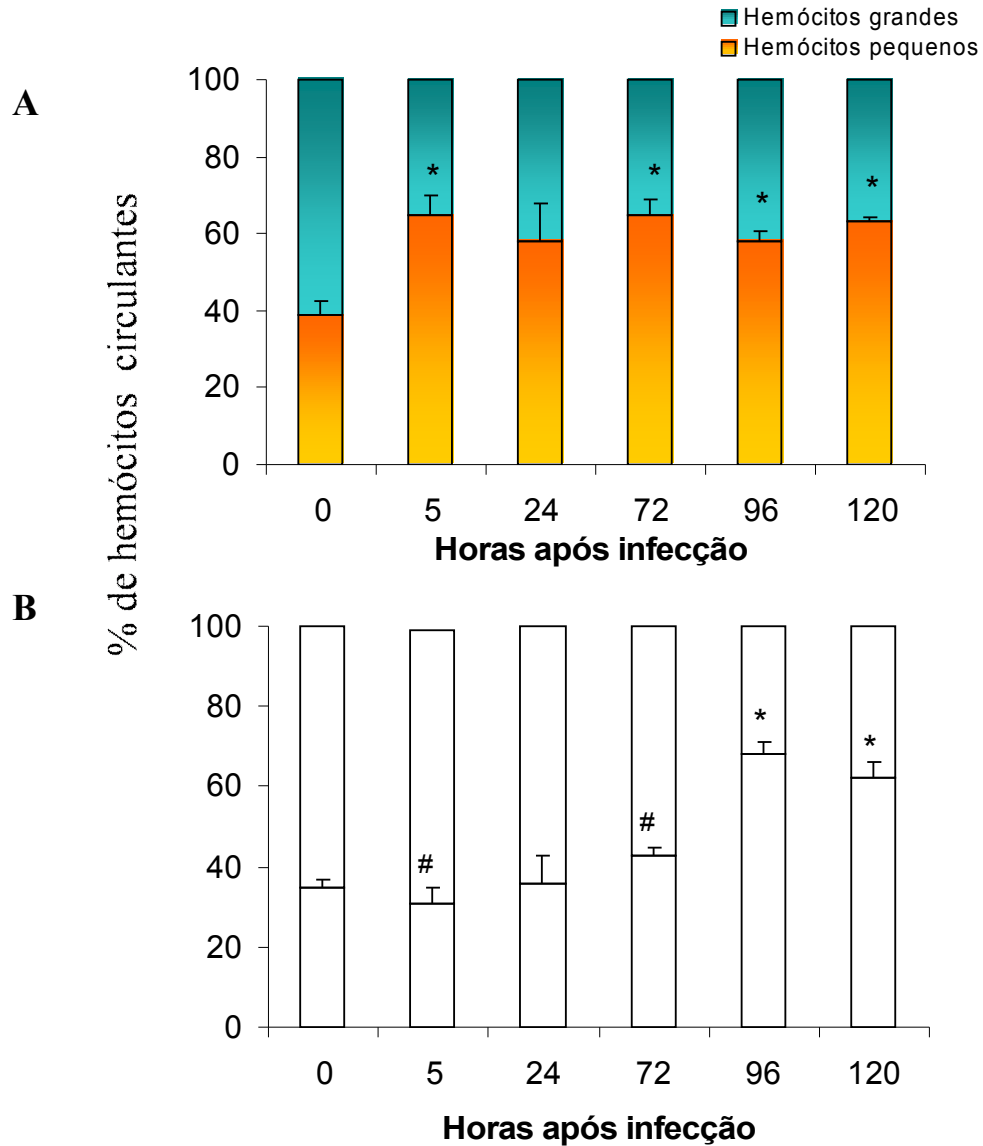


Figura 8: Efeito da inoculação de sílica na porcentagem das populações de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem do Taim, nas primeiras 120 horas de infecção por miracídeos de *S. mansoni*. A: Caramujos inoculados com CBSS e B: Caramujos inoculados com sílica. \* Diferenças significativas antes e após infecção e # representa as diferenças significativas entre sílica e CBSS ( $p < 0,05$ ). Cada ponto representa média  $\pm$  desvio padrão de triplicatas da hemolinfa total de 3 caramujos. O ponto 0 representa caramujos com 24 horas de inoculação de sílica e livres de infecção.

A frequência das subpopulações de hemócitos, caracterizadas pela citometria de fluxo, foi empregada numa análise complementar através do cálculo do valor absoluto de células/mm<sup>3</sup> de hemolinfa.

A análise em citometria de fluxo das subpopulações de hemócitos de caramujos tratados ou não com sílica mostrou-se semelhante nas duas espécies analisadas (*B. glabrata* e *B. tenagophila*). Foi observado que o tratamento de sílica acarretou alterações marcantes nas subpopulações de hemócitos pequenos (tabelas 2, 3 e 4), tanto em *B. glabrata* quanto em *B. tenagophila*, nas linhagens Cabo Frio (Tabela 3) quanto Taim (Tabela 4).

Em *B. glabrata*, o grupo não tratado pela sílica manteve o número de hemócitos pequenos maior que de hemócitos grandes, o que se inverte no grupo não tratado em *B. tenagophila*. O tratamento com sílica resulta em uma diminuição marcante nos hemócitos pequenos, durante as primeiras 72 horas de infecção, nas duas espécies e linhagens testadas.

Tabela 2: Número hemócitos circulantes ( $\times 10^{-5}$ ) na hemolinfa de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados por *S. mansoni* tratados ou não pela sílica, analisada pela técnica de citometria de fluxo. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de triplicadas com hemolinfa de três caramujos.

<i>População de hemócitos circulantes</i>					
		<i>Número de hemócitos pequenos</i>		<i>Número de hemócitos grandes</i>	
<b>h</b>		CBSS	Sílica	CBSS	Sílica
<b>pi</b>					
<b>0</b>	*	0,6 $\pm$ 0,2	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,2</b>	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,3
<b>5</b>		0,4 $\pm$ 0,1	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,2</b>	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,2
<b>2</b>		0,8 $\pm$ 0,2	<b>0,6 <math>\pm</math> 0,3</b>	0,8 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,3
<b>4</b>					
<b>7</b>		0,7 $\pm$ 0,5	0,6 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,3
<b>2</b>					
<b>9</b>		0,8 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,1
<b>6</b>					
<b>1</b>		0,9 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1
<b>20</b>					

hpi = horas após infecção

\* representa ponto em que os caramujos não foram infectados, mas apresentavam 24 horas de inoculação de sílica.

Tabela 3: Número hemócitos circulantes ( $\times 10^{-5}$ ) na hemolinfa de caramujos *Biomphalaria tenagophila* da linhagem Cabo Frio infectados por *S. mansoni* tratados ou não pela sílica, analisada pela técnica de citometria de fluxo. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de triplicadas com hemolinfa de três caramujos.

		<i>População de hemócitos circulantes</i>			
		<i>Número de hemócitos pequenos</i>		<i>Número de hemócitos grandes</i>	
<b>pi</b>	<b>h</b>	CBSS	Sílica	CBSS	Sílica
*	<b>0</b>	0,7 $\pm$ 0,1	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>	0,7 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
	<b>5</b>	0,5 $\pm$ 0,2	<b>0,4 <math>\pm</math> 0,1</b>	0,5 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1
<b>4</b>	<b>2</b>	0,7 $\pm$ 0,2	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,3</b>	0,6 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,2
<b>2</b>	<b>7</b>	0,6 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1
<b>6</b>	<b>9</b>	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1
<b>20</b>	<b>1</b>	1,0 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1

hpi = horas após infecção

\* representa ponto em que os caramujos não foram infectados, mas apresentavam 24 horas de inoculação de sílica.

Tabela 4: Número hemócitos circulantes ( $\times 10^{-5}$ ) na hemolinfa de caramujos *Biomphalaria tenagophila* da linhagem Taim infectados por *S. mansoni* tratados ou não pela sílica, analisada pela técnica de citometria de fluxo. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão de triplicadas com hemolinfa de três caramujos.

<i>População de hemócitos circulantes</i>					
		<i>Número de hemócitos pequenos</i>		<i>Número de hemócitos grandes</i>	
<b>pi</b>	<b>h</b>	CBSS	Sílica	CBSS	Sílica
*	0	0,6 $\pm$ 0,2	<b>0,2 <math>\pm</math> 0,1</b>	0,7 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2
	5	0,5 $\pm$ 0,2	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
4	2	0,8 $\pm$ 0,2	<b>0,3 <math>\pm</math> 0,1</b>	0,6 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2
2	7	0,7 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
6	9	1,0 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,0
20	1	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1

hpi = horas após infecção

\* representa ponto em que os caramujos não foram infectados, mas apresentavam 24 horas de inoculação de sílica.

O tratamento com a sílica não acarretou alterações na granulosidade dos hemócitos pequenos e grandes da espécie *B. glabrata* (Figura 9 A e B), nem na linhagem Cabo Frio de *B. tenagophila*, infectados ou não (Figura 10 A e B). Porém, na linhagem Taim de *B. tenagophila*, foram observadas alterações significativas na granulosidade dos hemócitos grandes tratados com sílica (Figura 11A e B). Essa alteração foi observada nos caramujos sem infecção (Figura 11 A) e foi maior ainda naqueles com 5 horas de infecção (Figura 11 B).



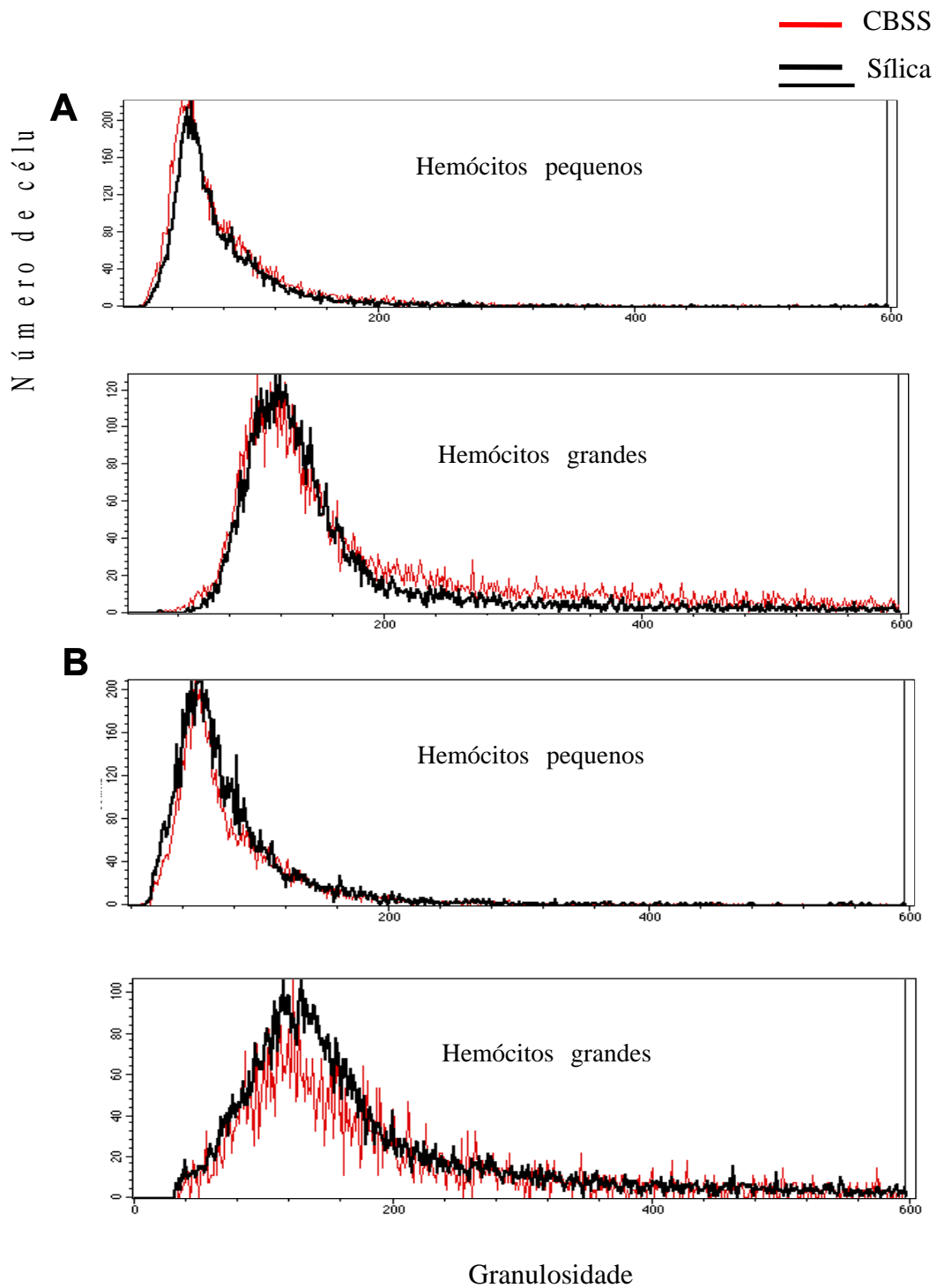


Figura 9: Granulosidade dos hemócitos circulantes de *B. glabrata*. **A**: caramujos livres de infecção e após 24 horas da inoculação da sílica e **B**: caramujos com 5 horas de infecção e 30 horas de inoculação de sílica. Hemócitos analisados pela Citometria de Fluxo

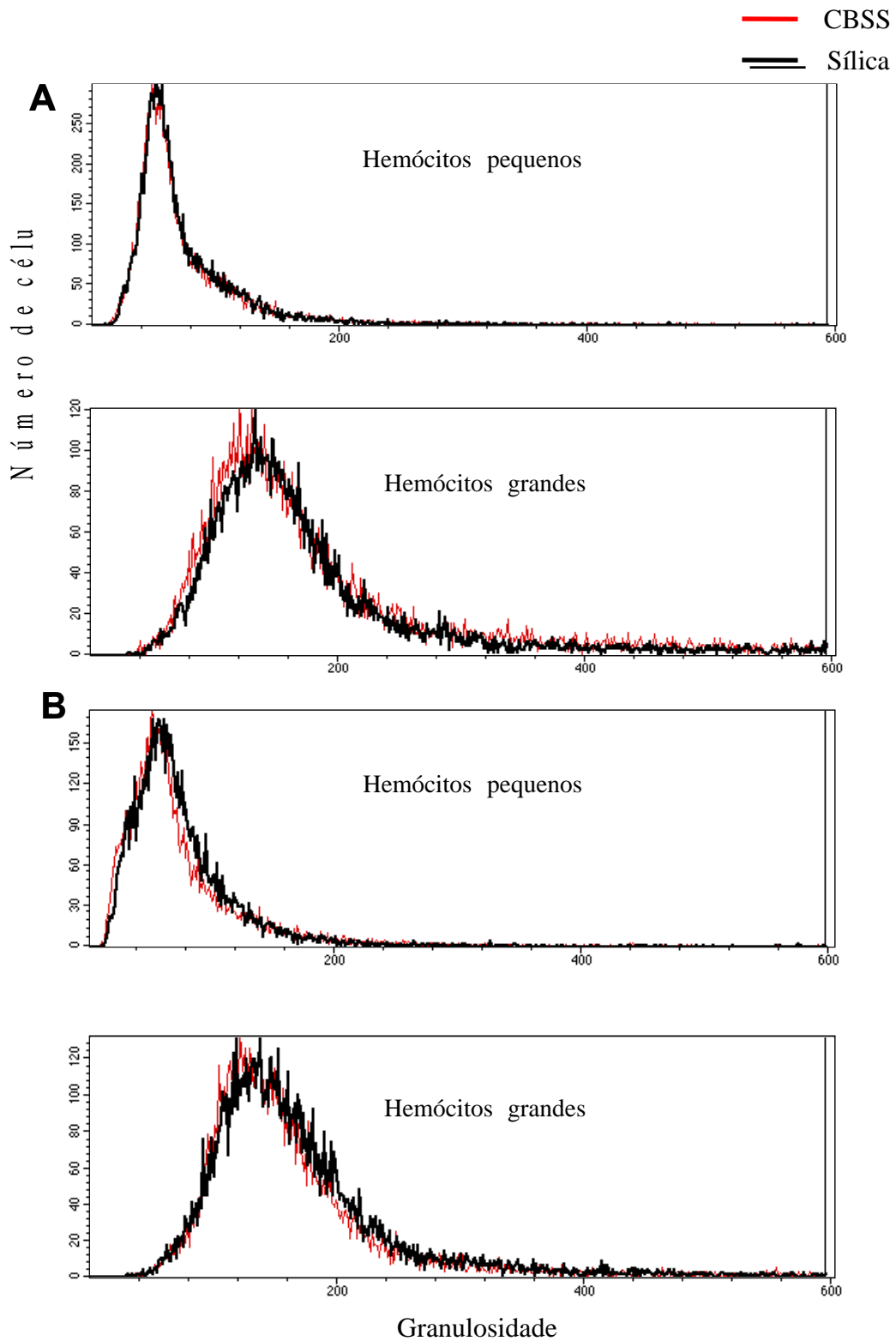
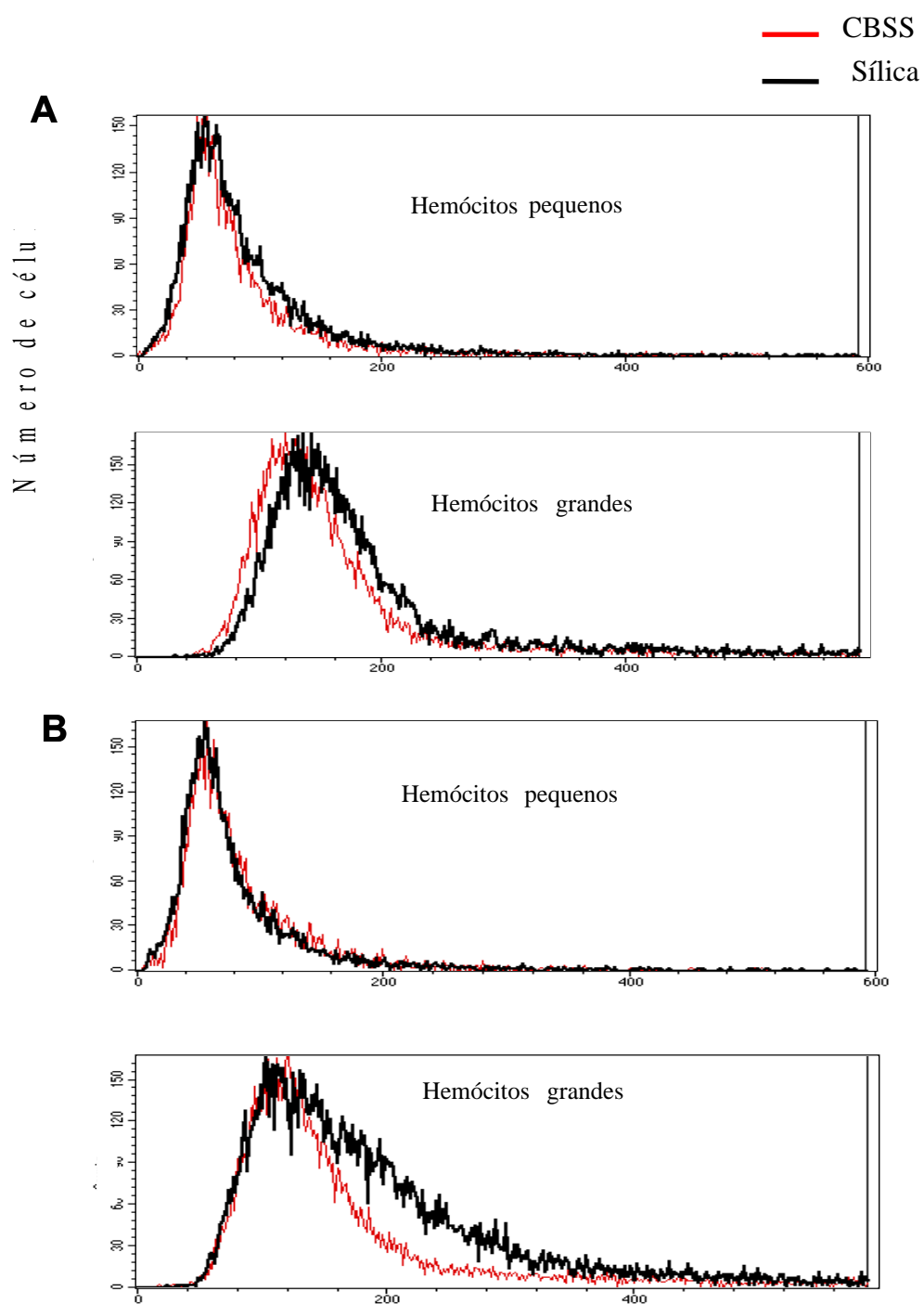


Figura 10: Granulosidade dos hemócitos circulantes de *B. tenagophila* Cabo Frio. **A**: caramujos livres de infecção e após 24 horas da inoculação da sílica e **B**: caramujos com 5 horas de infecção e 30 horas de inoculação de sílica. Hemócitos analisados pela Citometria de Fluxo



### Granulosidade

Figura 11: Granulosidade dos hemócitos circulantes de *B. tenagophila* Taim. **A**: caramujos livres de infecção e após 24 horas da inoculação da sílica e **B**: caramujos com 5 horas de infecção e 30 horas de inoculação de sílica. Hemócitos analisados pela Citometria de Fluxo

### 4.3. DISCUSSÃO

A caracterização dos hemócitos circulantes de moluscos do gênero *Biomphalaria* vem sendo realizada por vários autores (Amen et al., 1991; Matricon-Gondran & Letorcart, 1999; Johnston & Yoshino, 2001), tendo como base características morfológicas e bioquímicas destas células. O diferencial deste trabalho é que a caracterização dos hemócitos foi realizada com células vivas sendo analisada a dinâmica de seu comportamento frente a infecção pelo *S. mansoni*. Além disso, como no trabalho de Johnston & Yoshino (2001), a citometria de fluxo se mostrou uma ferramenta útil para a análise dos hemócitos circulantes. Johnston & Yoshino (2001) realizaram a análise dos hemócitos, com a citometria de fluxo, em caramujos *B. glabrata* não infectados. No presente trabalho, além de estabelecer o perfil da população de hemócitos presentes na hemolinfa de caramujos livres de infecção, procuramos caracterizar alterações no perfil destas células durante a infecção pelo *S. mansoni*. A análise através da citometria de fluxo também permitiu comparar as alterações dos hemócitos em diferentes espécies: *B. glabrata* e *B. tenagophila* e entre diferentes linhagens de *B. tenagophila* (Cabo Frio – linhagem suscetível e Taim – linhagem resistente).

Com relação à metodologia empregada na análise pela citometria de fluxo, a separação consistente dos subtipos de hemócitos só foi possível com a utilização de Tampão CBSS/Citrato/EDTA/Sacarose, pH 7.2. De acordo Cardenas et al. (2000), o qual utilizou tampão de antiagregação celular, a coleta de hemolinfa de moluscos tem que ser feita em tampão gelado, porém neste estudo a coleta da hemolinfa em temperatura ambiente se mostrou de fundamental importância para o estabelecimento do perfil celular. Do mesmo modo a coloração simultânea com Brometo de Etídio e Laranja de acridina, permitiu a separação dos hemócitos circulantes viáveis das células mortas e pequenos fragmentos, sendo possível analisar o perfil das populações de hemócitos vivos em relação ao tamanho e

granulosidade de cada célula. Cardenas et al., (2000) analisaram hemócitos de camarões de água doce em citometria de fluxo e demonstraram que a utilização de tampão anticoagulante também foi essencial para a observação de subpopulações celulares distintas.

A análise da hemolinfa total de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* mostrou duas subpopulações distintas em tamanho e granulosidade, com um padrão similar ao apresentado por Johnston & Yoshino (2001). Apesar de serem duas espécies diferentes, o perfil das duas subpopulações se apresentou semelhante nas espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*, diferenciando-se apenas no que diz respeito à porcentagem de hemócitos que compõe cada subpopulação: Hemócitos pequenos e Hemócitos grandes.

Em trabalhos anteriores (Barraco et al., 1993; Martins-Souza et al., 2003), a contagem diferencial dos hemócitos circulantes demonstrou que as células coradas pelo vermelho neutro (granulócitos) representam cerca de 70 a 80% do total de células circulantes presentes na hemolinfa, ao passo que as células não coradas pelo vermelho neutro (hialinócitos) representam 20 a 30% do total. Quando analisados pela citometria de fluxo, a proporção dos subtipos dos hemócitos circulantes se mostrou composta por cerca de 44% de hemócitos pequenos e 56% de grandes em *B. glabrata* e cerca 60% de hemócitos pequenos e 40% grandes em *B. tenagophila*. Acredita-se que a diferença entre as porcentagens dos subtipos da população de hemócitos circulantes, obtida pela citometria e contagem diferencial pela microscopia ótica, reforçam a hipótese de que a subpopulação de hemócitos pequenos compreendem os hialinócitos e os pequenos granulócitos que são evidenciados claramente através da utilização do vermelho neutro, (Bezerra et al., 1997; Martins-Souza, 1999).

Durante a infecção pelo *S. mansoni*, pode-se observar alterações na porcentagem de células que compõem as populações de hemócitos pequenos e grandes, em caramujos *B. tenagophila*. Acredita-se que esta alteração seja devido a resposta celular ao estímulo, que no

caso é a infecção pelo *S.mansoni*. E se caracterizaram pelo aumento da população de hemócitos pequenos nas linhagens Cabo Frio e Taim e podem estar associadas à resistência parcial da linhagem Cabo Frio e total de Taim, onde as alterações foram mais marcantes. A falta de alteração na proporção dos hemócitos circulantes em *B. glabrata* sugere que a presença do parasito não favorece a retenção dos hemócitos ou de um tipo celular ao sítio de infecção, como é visto através de estudos histológicos, o que justifica o seu alto grau de susceptibilidade a infecção pelo *S. mansoni*. Vários estudos histológicos mostram intenso infiltrado celular ao redor do parasito recém penetrado (Newton, 1952; Brooks,1953; Coelho & Barbosa, 1956; Coelho, 1957, 1962; Lie et al.,1987; Guaraldo et al, 1981; Martins-Souza, 1999). Martins-Souza (1999), demonstrou a presença de tal infiltrado nas linhagens Cabo Frio (com menor intensidade) e Taim (com maior intensidade) de *B. tenagophila* durante a infecção pelo *S. mansoni*.

Em adição, alterações observadas nas subpopulações de hemócitos podem ainda ser explicadas pelo fato de que, sendo os granulócitos as células efetoras do mecanismo de defesa dos moluscos, elas migram para o local de penetração do parasito, o que justifica sua diminuição na hemolinfa circulante (Bezerra et al., 1997). Além disso, alguns autores consideram os hialinócitos como sendo precursores dos granulócitos o que justificaria o seu aumento.

Diante do efeito da inoculação de sílica, relatado em trabalho anterior (Martins-Souza et al., 2003), que resultou em diminuição parcial do número de hemócitos circulantes de caramujos *B. tenagophila*, tornou-se importante a análise da hemolinfa de caramujos tratados ou não com sílica, em citometria de fluxo. Tal análise demonstrou que a inoculação da sílica não alterou o padrão do perfil das subpopulações de hemócitos circulantes, podendo ser observadas as populações de hemócitos pequenos e grandes. Tal fato é justificado pelo uso

dos corantes, brometo de etídio e laranja de acridina. Com esta coloração, no momento da análise dos dados, foi possível observar que a não alteração do perfil reforça o fato que a sílica não elimina totalmente um tipo celular, ou até mesmo sugere que as células sob ação da sílica não são destruídas, e sim se tornam incapacitadas ou fisiologicamente sem função.

Quando se observa o efeito da sílica nos hemócitos, podemos notar que o tratamento afeta de maneira distinta as duas subpopulações, tanto a analisada pela microscopia ótica, quanto por citometria de fluxo. Ao observar os hemócitos analisados por microscopia ótica, durante o tratamento com sílica, o número de hialinócitos aumenta enquanto que os granulócitos caem (Martins-Souza, 2003). Por outro lado, os dados da citometria mostram que a população de hemócitos pequenos cai enquanto que a de hemócitos grandes aumenta. Esses dados, a princípio, parecem controversos, se considerarmos que os hemócitos pequenos correspondem aos hialinócitos, enquanto que os hemócitos grandes aos granulócitos. Porém, tal fato pode ser explicado porque a microscopia ótica analisa aspectos funcionais da fagocitose e a citometria de fluxo os aspectos meramente morfométricos. Baseando-se na hipótese de que os granulócitos tratados com sílica perderiam a habilidade de fagocitose, a microscopia ótica não os identificaria. Assim, parte dos hialinócitos, identificados pela microscopia ótica, após tratamento com sílica, poderiam ser na verdade granulócitos não funcionais, que não fagocitaram o vermelho neutro. Além do mais, acredita-se que a população de hemócitos pequenos analisada pela citometria de fluxo abranja os hialinócitos, observados ao microscópio, e pequenos granulócitos que possuem capacidade fagocitária e coram-se pelo vermelho neutro. Além disso, a sílica agiria sobre estes pequenos granulócitos compreendidos entre os pequenos hemócitos.

Durante a infecção e o tratamento com a sílica, podemos observar que a sílica manteve a população de hemócitos pequenos em níveis semelhantes ao do ponto 0 (sem

infecção), durante as primeiras 72 horas da infecção. Nos caramujos que receberam a inoculação do tampão CBSS, tanto o perfil quanto o número de células totais praticamente não se alteram durante as primeiras horas de infecção.

A diminuição no número de célula, como já foi mencionada por Martins-Souza (2003) e a alteração no perfil das células analisadas pela citometria de fluxo, pode ser devida a migração destas células para o local da infecção, sendo restabelecida 24 horas após infecção, no grupo tratado com CBSS e por volta de 72 horas no grupo tratado com sílica. As análises feitas pela citometria sugerem que, principalmente em *B. tenagophila*, a sílica deleta os hemócitos pequenos, reforçando a hipótese de que esta população compreende além dos hialinócitos, pequenos granulócitos com capacidade fagocitária que sofreram a ação da sílica e não foram percebidos na análise pela citometria de fluxo.

A análise pela citometria de fluxo demonstra, mais uma vez, o comportamento diferencial dos hemócitos de linhagem Taim de *B. tenagophila*, em se tratando da análise da granulosidade, durante o tratamento com sílica, somente as células desta linhagem apresentaram alterações significativas principalmente nas primeiras 5 horas de infecção. A alteração na granulosidade pode ser considerada devida ao tratamento com sílica uma vez que caramujos que receberam CBSS, não apresentaram alterações marcantes. Tal fato pode reforçar a hipótese levantada anteriormente em que a sílica, ao ser incorporada pelos hemócitos, não necessariamente levaria a sua destruição e, sim, o hemócitos permaneceria íntegro, porém sem sua capacidade fagocitária.

Com base nos resultados apresentados, a citometria se apresentou uma ferramenta útil na caracterização da população de hemócitos circulantes, além de ajudar na análise comportamental dos hemócitos ao longo da infecção pelo *S. mansoni*, em linhagens resistentes e susceptíveis.



## **5. Papel de lectina e ação de carboidratos na interação de hemócitos circulantes de *B. glabrata* e *B. tenagophila* com *S. mansoni*.**

Dentre os fatores relatados pela literatura, como envolvidos no reconhecimento de parasito e na ativação dos hemócitos, estão algumas proteínas presentes na fração solúvel da hemolinfa de *Biomphalaria*. O estudo de Fryer & Bayne (1996) reforça a importância dos componentes solúveis da hemolinfa na interiorização de partículas pelos hemócitos. Neste estudo, foi mostrado que as partículas de poliestireno tratadas com fatores solúveis da hemolinfa de linhagens parcialmente resistentes de *B. glabrata* são significativamente mais fagocitadas por hemócitos de linhagens suscetíveis do que as partículas não tratadas.

Loker et al. (1984) e Renwranz (1986) detectaram na hemolinfa de moluscos fatores que aglutinam e opsonizam partículas. Bayne (1983) sugere que proteínas, designadas de lectinas, presentes na hemolinfa de gastrópodes poderiam mediar o reconhecimento de partículas e/ou parasitos. Lectinas são proteínas capazes de ligar-se a radicais específicos de monossacarídeos e possuem dois ou mais locais de ligação para as unidades glicídicas. Nos moluscos, as lectinas são secretadas pelos hemócitos e podem estar solúveis na hemolinfa ou na superfície dos hemócitos circulantes (Richards & Renwranz, 1991). Desta forma, lectinas poderiam, funcionalmente, intermediar a ligação dos hemócitos ao tegumento de larvas de trematódeos (van der Knapp & Loker, 1990).

Corroborando a possível participação de lectinas no processo de reconhecimento celular de esporocistos de *S. mansoni*, Johnston & Yoshino (1996) identificaram na hemolinfa de *B. glabrata*, lectinas semelhantes às isoladas de *Conavalia ensiformis* (ConA), *Erythrina corallodendrom* (ECA), *Glycine max* (SBA), *Tetragonolobus purpureas* (TPA) e *Triticum vulgare* (WGA). Segundo estes autores, estas lectinas também foram capazes de se ligarem à

superfície do esporocisto de *S. mansoni*. Posteriormente, Castillo & Yoshino (2002) relataram que o tegumento do esporocisto de *S. mansoni* se apresenta altamente glicosilado e alguns destes oligossacarídeos são estágio específico. Estes autores também demonstraram que a adesão da linhagem de células embrionárias de *B. glabrata* (Bge), ao esporocisto primário de *S. mansoni*, foi reduzida, *in vitro*, pelo tratamento prévio com fucoidina, que possui um grupo sulfato carregado negativamente ligado a uma espinha dorsal de unidades repetitivas de mono/dissacarídeos de fucose. Este resultado sugere que a ligação de lectinas/glicoproteínas pode representar o mecanismo primário para iniciar a reação de encapsulamento do esporocisto pelos hemócitos.

A ligação lectina-carboidrato possivelmente leva a uma mudança conformacional do complexo, que pode induzir a ativação do hemócito (Bayne 1990), resultando em aumento da atividade fagocitária (Fryer et al., 1989) e/ou da geração de derivados reativos de oxigênio (ROI) (Hahn et al., 2000). Por esta razão, a resistência ou suscetibilidade de espécies ou linhagens de *Biomphalaria* a infecção por *S. mansoni* pode estar relacionadas a diferenças qualitativas e/ou quantitativas na produção de determinadas lectinas (Zelck & Becker, 1990) e, conseqüentemente, no reconhecimento do parasito.

Desta forma, lectinas podem ser importantes marcadores de ativação celular para hemócitos de *Biomphalaria*. Estes poderão explicar as variações nos níveis de suscetibilidade à infecção pelo *S. mansoni* observado nas diferentes linhagens geográficas de *B. tenagophila*, além de auxiliar no entedimento do processo de destruição do parasito.

O objetivo deste trabalho consiste em estabelecer o perfil de marcação dos hemócitos circulantes de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, utilizando as lectinas ConA, PNA, SBA e WGA conjugadas com FITC, antes e após infecção experimental com *S. mansoni*. Além disso, analisar comparativamente, *in vitro*, a adesão celular dos hemócitos a superfície dos

esporocistos de *S. mansoni* e a ação de carboidratos neste mecanismo. Posteriormente analisar a capacidade dos hemócitos de *B. glabrata*, *B. tenagophila* Cabo Frio e *B. tenagophila* Taim em destruir esporocistos de *S. mansoni*.

## **5.1. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1.1. Caramujos**

Assim como citado no capítulo 1, os caramujos utilizados pertencem às espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*, ambas mantidas nos moluscários do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE) – ICB – UFMG. A linhagem de *B. glabrata*, utilizada é proveniente da Lagoa da Pampulha – Belo Horizonte (MG), denominada linhagem BH. As linhagens de *B. tenagophila* são duas: uma proveniente de Cabo Frio (CF) e outra da reserva ecológica do Taim - RS.

### **5.1.2. O Parasito**

Os caramujos acima referidos foram infectados com a cepa LE de *S. mansoni* que vem sendo mantida no laboratório do GIDE por 35 anos.

### **5.1.3. Infecção de caramujos**

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *S. mansoni* da cepa LE foram sacrificados entre 45 e 50 dias após infecção para obtenção de miracídios e os caramujos foram infectados, individualmente, com 20 miracídios de acordo com a técnica de Pellegrino & Katz (1968) (com algumas modificações já citadas no capítulo 1).

### **5.1.4. Marcações das moléculas expressam na superfície de hemócitos circulantes.**

A marcação da superfície dos hemócitos foi feita com lectinas isoladas de *Concanavalin A* (ConA), *Glycine max* (SBA), *Triticum vulgare* (WGA) e *Arachis hypogaea*

(PNA) conjugadas com Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (EY laboratories - San Mateo) e analisados sob microscopia de fluorescência. A hemolinfa total foi recolhida, através de punção cardíaca, de *B. glabrata* ou *B. tenagophila* da linhagem CF (susceptíveis à infecção por *S. mansoni*) e Taim (resistente ao parasito) não infectados e após 5, 24, 72 e 120 h da infecção com 20 miracídios de *S. mansoni*. A hemolinfa foi coletada na ausência de tampão anticoagulante, sendo utilizado um pool de 15 caramujos de cada linhagem, em cada período. Os hemócitos presentes em cada pool foram separados da hemolinfa e lavados com solução balanceada de Chernin – CBSS, livre de glicose e trealose, através de centrifugação (200 g por 3 min. à temperatura ambiente). O sedimento de hemócitos foi ressuscitado em 1 ml de CBSS sem glicose e trealose, contendo 2% de albumina bovina e as células foram quantificadas em Câmara de Neubauer. A viabilidade dos hemócitos foi feita através da coloração com Azul de Tripán (Martins-Souza et al., 2003). Para incubação com cada lectina marcada, foi utilizado  $1 \times 10^5$  hemócitos por tubo tipo eppendorff, sendo que o tratamento foi realizado em triplicata. Paralelamente, cada marcação também contou com um controle para especificidade da ligação lectina-hemócito, realizado com  $1 \times 10^5$  hemócitos, em triplicata. Após a distribuição dos hemócitos, estes tubos foram centrifugados (200 g/3 min), as células foram ressuscitadas em 200  $\mu$ l de CBSS contendo 10  $\mu$ g/ml de diferentes lectinas conjugadas com FITC e incubadas por 1 h à temperatura ambiente, no escuro. Para confirmar a especificidade da ligação entre as lectina-FITC e as glicoproteínas da superfície dos hemócitos, após a incubação, os hemócitos dos tratamentos controles foram novamente centrifugados e ressuscitados em CBSS livre de glicose e trealose contendo 0.2 M de carboidratos competidores. Foi utilizado Manose para competir com a ligação da lectina ConA/hemócito, N-acetilglicosamina no tratamento contendo WGA e D-galactose no tratamento contendo PNA e SBA.

Após o tratamento com as lectinas marcadas e a adição dos carboidratos, no caso dos tratamentos controle, os hemócitos foram lavados, centrifugados (200 g) e ressuspensos em 100 µl de CBSS sem glicose e trealose e observados em microscópio de epifluorescência (Olympus IX 70). Esta análise foi realizada em um aumento de 60x, com filtro FITC: EX450 – EM535 e a contagem total dos hemócitos foi feita em dez campos diferentes de cada amostra, sendo diferencialmente quantificados a presença ou não de marcação fluorescente em hemócitos pequenos, médios e grandes.

#### **5.1.5. Ação das lectinas e de carboidratos na interação de hemócitos com esporocistos transformados *in vitro*.**

##### 5.1.5.1. Transformação de miracídios de *S. mansoni* em esporocistos *in vitro*

Os esporocistos foram obtidos a partir da transformação de miracídios recuperados de ovos dos parasitos isolados do fígado de hamsters, após 45 a 50 dias da infecção com *S. mansoni* (Chaia, 1956). Para a transformação, os miracídios recuperados foram lavados em CBSS gelado e incubados em meio completo RPMI-1640 contendo 5 % de soro fetal bovino por 24 horas a 27 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> (Martins-Souza, 1999). Após a transformação, confirmada pela perda do tegumento ciliado do miracídio, os esporocistos foram novamente lavados com CBSS, quantificados e utilizados em testes *in vitro*.

##### 5.1.5.2. Efeito da adição de carboidratos na associação hemócitos e esporocistos de *S. mansoni*, *in vitro*.

Para estudar a interação de esporocistos de *S. mansoni* e hemócitos *in vitro*, foi retirada a hemolinfa de 15 caramujos de cada espécie estudadas *B. glabrata* BH e *B. tenagophila* Cabo Frio e Taim. Os hemócitos foram separados da hemolinfa e lavados com

CBSS livre de glicose e trealose, através de centrifugação (200 g/5 min/T.A.). Os hemócitos foram ressuspensos em CBSS sem glicose e trealose, contendo 2% de albumina bovina e em seguida foram contados e incubados com esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*. A fração solúvel recuperada do sobrenadante da hemolinfa total, foi novamente centrifugada a (3000 g/30 min/4 °C) e mantida em gelo até o momento do uso.

A associação entre os hemócitos e os esporocistos foi realizada em placa de cultura de células com 96 poços. Como controle de sobrevivência do esporocisto às condições de cultivo *in vitro*, 50 esporocistos foram incubados, em triplicatas, em CBSS suplementado com 1% de glutamina (2mM), 2% de aminoácidos, 1% de HEPES, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e 2% de albumina, mas sem glicose e trealose. O efeito dos hemócitos na sobrevivência do parasito foi estimado nos tratamentos, em triplicata, com 50 esporocistos incubados com  $1 \times 10^5$  hemócitos. O mesmo tratamento foi realizado em triplicata na presença de 10% de plasma dos caramujos, previamente separado da hemolinfa total.

Em outros tratamentos contendo esporocistos e hemócitos, foram adicionados carboidratos na tentativa de inibir a ligação de lectinas durante o processo de reconhecimento do parasito. Previamente, para se estabelecer à concentração ideal dos carboidratos, N-acetilglicosamina e galactosamina, 50 esporocistos ou  $1 \times 10^5$  hemócitos foram incubados separadamente com 100, 50, 25 e 5 mM de cada carboidrato para certificação da ausência de efeito do carboidrato na sobrevivência das células ou do parasito. A partir deste teste, os experimentos foram montados utilizando-se as concentrações de 100, 25, 5 e 1 mM para N-acetilglicosamina e 25, 12, 6 e 3 mM para galactosamina.

Na placa de 96 poços, foram estabelecidos os tratamentos nos quais, 50 esporocistos foram incubados com  $1 \times 10^5$  hemócitos, em triplicata, sendo adicionado as diferentes concentrações dos carboidratos, N-acetilglicosamina e galactosamina, na presença ou não de

hemolinfa, em CBSS suplementado. Após 2, 6 e 24 horas de incubação em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 28 °C, foi avaliado o índice de adesão celular e, em seguida, foi verificada a viabilidade dos esporocistos.

#### **5.1.6. Índice de adesão celular (IAC).**

A avaliação do número de hemócitos ligados ao esporocisto foi realizada de maneira semelhante ao descrito por Castillo & Yoshino (2002), após 2 e 6 horas de incubação. Resumidamente, em cada poço da placa de cultura, inicialmente foram fotografados dez campos diferentes de cada amostra da triplicada. Nesta avaliação foi atribuído um valor arbitrário, de 0 a 3, para cada esporocisto, baseado no número de hemócitos aderidos a sua superfície. Este valor arbitrário, denominado índice de adesão celular – IAC, foi determinado da seguinte maneira: o valor 0 foi dado aos esporocistos que não apresentaram hemócitos aderidos a sua superfície (figura 12A); o valor 1 para aqueles que apresentavam até 10 células aderidas (figura 12B); valor 2 para os que apresentaram de 10 a cinquenta hemócitos aderidos (figura 12C) e valor 3 para esporocistos com mais de 50 células (figura 12D).

#### **5.1.7. Viabilidade dos esporocistos**

Após 6 e 24 horas de incubação, posteriormente à análise de adesão celular, foi realizada a contagem dos esporocistos mortos a partir da coloração destes com 20 µl de solução de 0,4% de Azul de Tripan. Todos os esporocistos presentes nos poços foram contados e os que se apresentavam corados foram considerados mortos.



### **5.1.8. Análise estatística**

Os resultados foram estatisticamente analisados, utilizando-se análise de variância ou teste t de Student para os dados paramétricos e teste de Kruskal Wallis para não paramétricos.

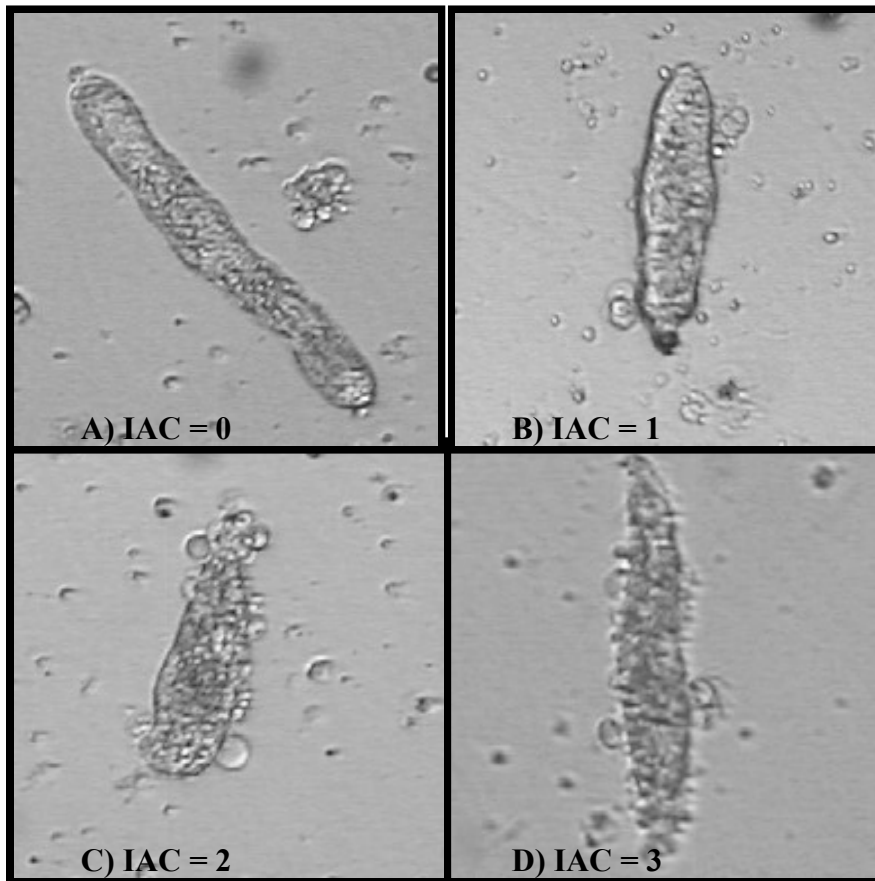


Figura 12: Hemócitos aderidos à superfície dos esporocistos de *S. mansoni* - Índice de adesão celular – IAC.

## 5.2. RESULTADOS

### 5.2.1. Marcação dos hemócitos circulantes de caramujos do gênero *Biomphalaria* com lectinas fluorescentes

Do total de células recuperadas de *B. glabrata* não infectado, 10 e 13%, apresentaram fluorescência em sua superfície, quando incubadas com PNA e SBA, respectivamente. Enquanto que, 50 e 37% estavam fluorescentes após incubação com ConA e WGA. Com relação aos hemócitos circulantes recuperados de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio, 52% se mostraram fluorescentes após a incubação com ConA, 24% com PNA, 37% foram marcados com SBA e 70% com WGA. Na linhagem Taim as lectinas PNA e WGA apresentaram as maiores porcentagens de marcação, 64 e 73%, respectivamente (figura 13). A marcação dos hemócitos da linhagem Cabo Frio de *B. tenagophila* com SBA foi significativamente maior em comparação com a marcação em *B. glabrata*, porém não foi diferente nos hemócitos da linhagem Taim (figura 13). Com relação da linhagem Taim de *B. tenagophila*, a marcação dos hemócitos, em comparação com *B. glabrata* e a linhagem Cabo Frio, foi significativamente menor com ConA e significativamente maior com PNA (figura 13).

A especificidade da ligação das lectinas com hemócitos foi confirmada pela adição de solução concentrada de carboidrato: Manose para ConA, N-acetilglicosamina para WGA e Galactosamina para PNA e SBA. Em todos os casos, o tratamento com o carboidrato correspondente resultou em eliminação ou redução significativa da marcação fluorescente dos hemócitos.

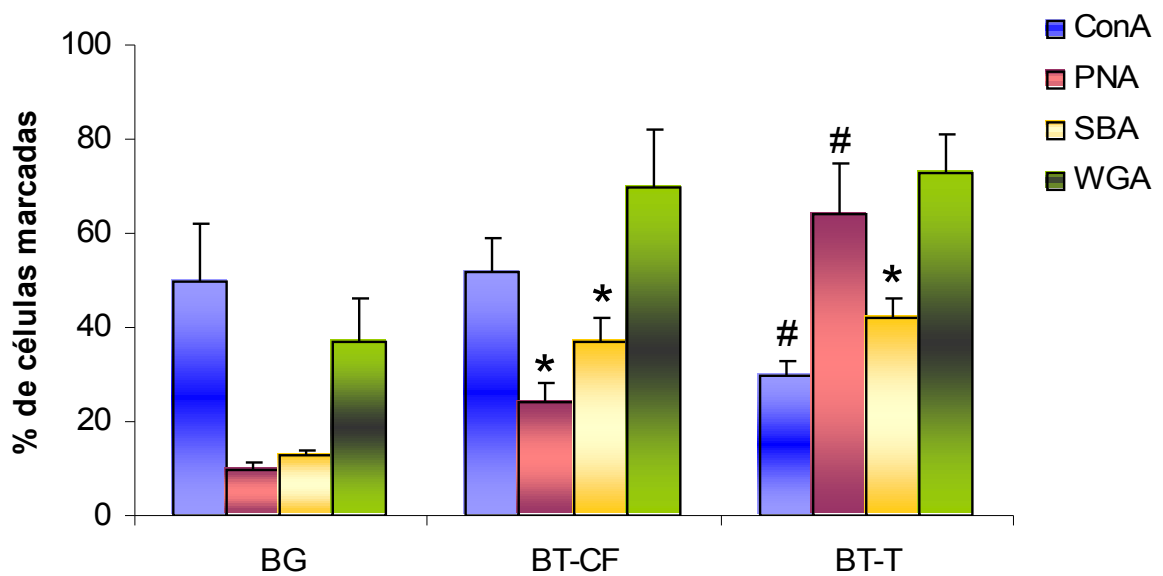


Figura 13: Porcentagem de hemócitos presentes na hemolinfa total de caramujos *Biomphalaria* marcados com lectinas conjugadas com FITC (ConA, PNA, SBA e WGA). BG - *B. glabrata*, BT-CF - *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio e BT-T - *B. tenagophila* da linhagem Taim. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação a *B. glabrata* e # representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação a *B. glabrata* e a linhagem Cabo Frio.

Em hemócitos isolados de *B. glabrata* não infectados, foi observada uma marcação de baixa intensidade com ConA e WGA, principalmente em células pequenas ou médias. Poucas células pequenas foram marcadas por PNA ou SBA (figura 14).

A marcação de hemócitos isolados de *B. tenagophila* não infectados com lectinas fluorescentes foi, geralmente, mais intensa que *B. glabrata*, com células grandes apresentando uma clara marcação na membrana. Porém, essa intensidade na marcação não pode ser observada com ConA (figura 15 e 16). Outra diferença marcante foi o elevado número de hemócitos marcados por PNA, especialmente em *B. tenagophila* Taim, sendo observados muitos hemócitos grandes com marcação intensa (figura 16).

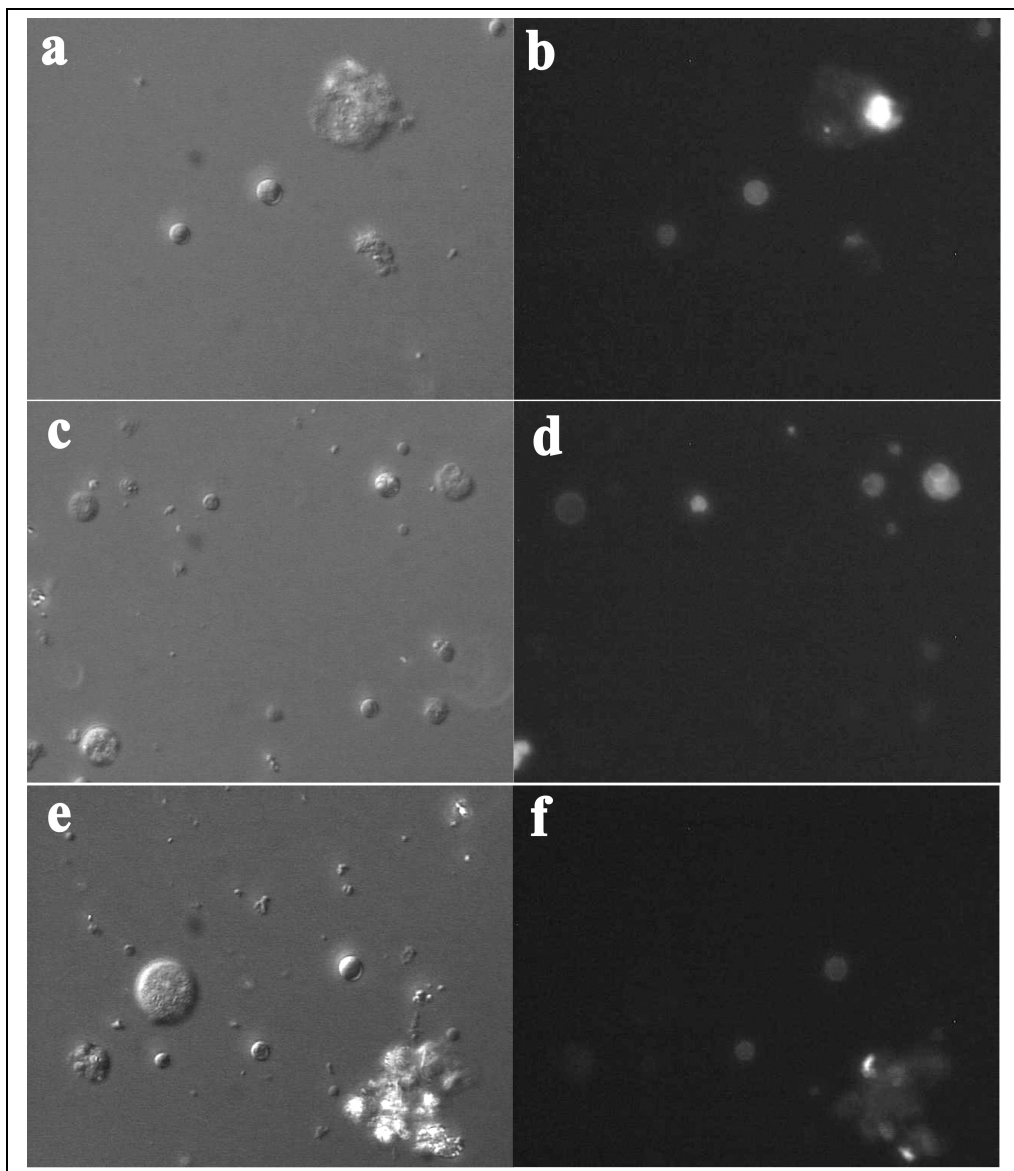


Figura 14: Marcação da superfície de hemócitos circulantes de caramujos *B. glabrata*, com lectinas conjugadas a FITC. a e b: marcação com WGA; c e d: marcação com ConA; e e f: marcação com PNA. a, c e e: Nomarski; b, d e f: microscopia de fluorescência. Aumento 600x.

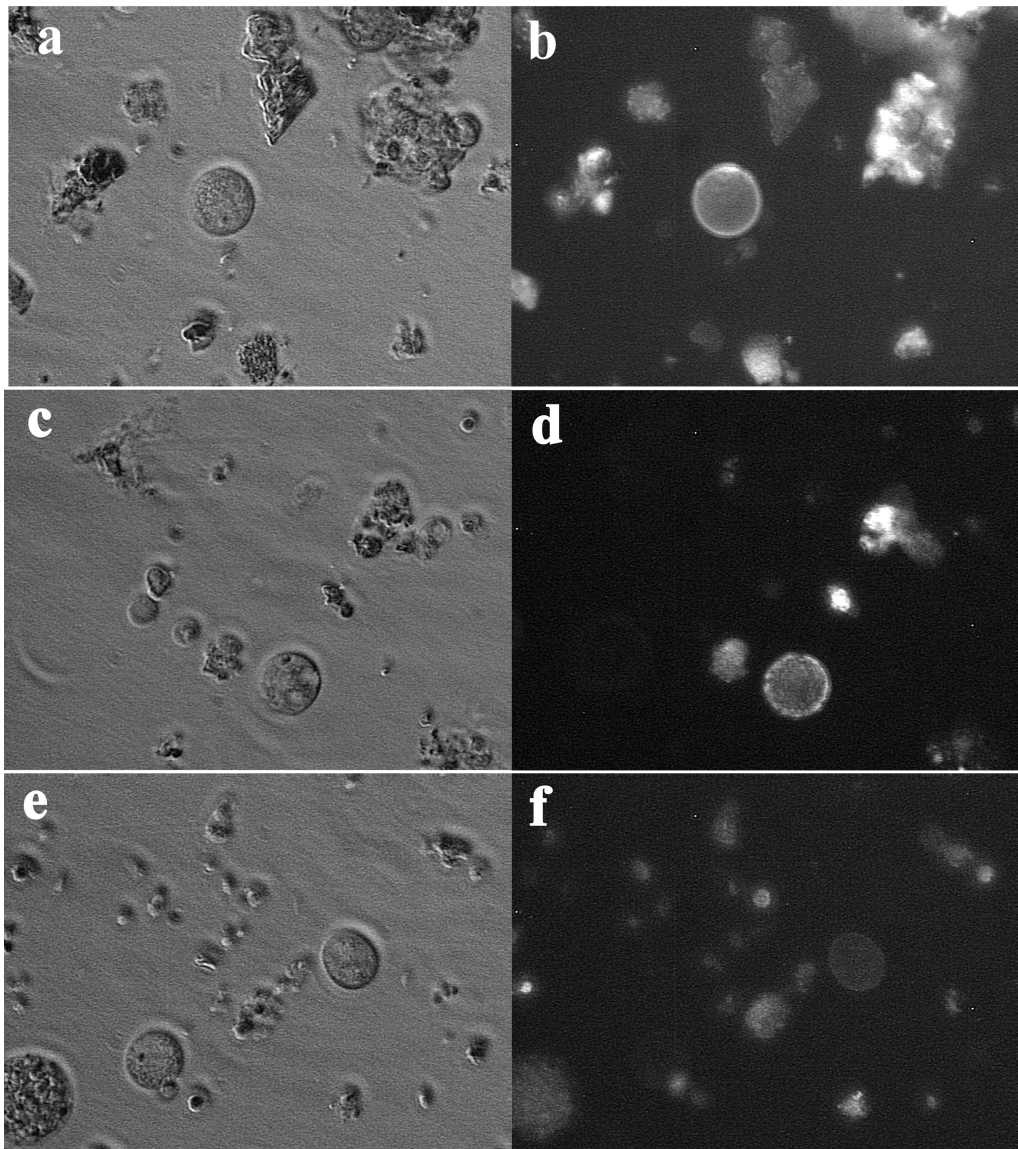


Figura 15: Marcação da superfície de hemócitos circulantes de caramujos *B. tenagophila* Cabo Frio, com lectinas conjugadas a FITC. a e b: marcação com WGA; c e d: marcação com PNA; e e f: marcação com ConA. a, c e e: Nomarski; b, d e f: microscopia de fluorescência. Aumento 600x.

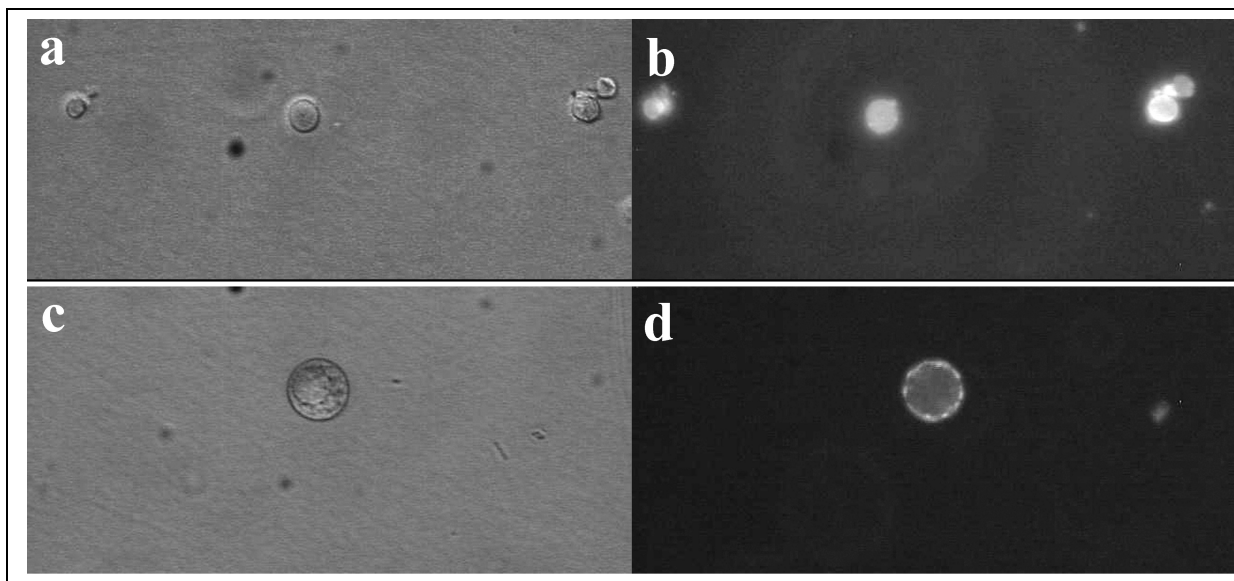


Figura 16: Marcação da superfície de hemócitos circulantes de caramujos *B. tenagophila* Taim, com lectinas conjugadas a FITC. a e b: marcação com WGA; c e d: marcação com PNA. a e c: Nomarski; b e d: microscopia de fluorescência. Aumento 600x.



A marcação de células circulantes isoladas de *B. glabrata*, com lectinas, durante as primeiras 120 horas da infecção por *S. mansoni*, mostrou um aumento de hemócitos marcados com ConA, entre 5 e 24 hpi, sendo esta elevação consequência do maior número de células pequenas marcadas. O pequeno número de hemócitos grandes com ConA praticamente desaparece após 5 horas da infecção. De uma maneira geral, o número de células circulantes (pequenas, médias e grandes) marcados com ConA diminuiu após 72 hpi (figura 17A). Já com PNA, o número total de hemócitos marcados foi muito pequeno e constituem quase que exclusivamente células pequenas. Após a infecção por *S. mansoni* o número de hemócitos, marcados com PNA, se manteve até 72 horas e, posteriormente, houve um aumento ainda maior após 120 hpi, devidos aos hemócitos pequenos (figura 17B). Com relação à marcação com SBA, poucas células apresentaram-se marcadas pelas lectinas fluorescentes e praticamente só ocorreu nos hemócitos pequenos. A infecção por *S. mansoni* induziu um aumento da marcação por SBA (figura 17C). Analisando o padrão de marcação de hemócitos de *B. glabrata* com WGA, foi observado um grande número de células marcadas, sendo que a maioria representada por hemócitos pequenos. Porém o número de hemócitos médios e grandes que se apresentaram marcados pela WGA foi consideravelmente maior que o das demais lectinas. Durante a infecção foi observado uma queda no número de hemócitos médios marcados após 5 horas de infecção e um aumento de hemócitos grandes marcados após 72 horas (figura 17D).

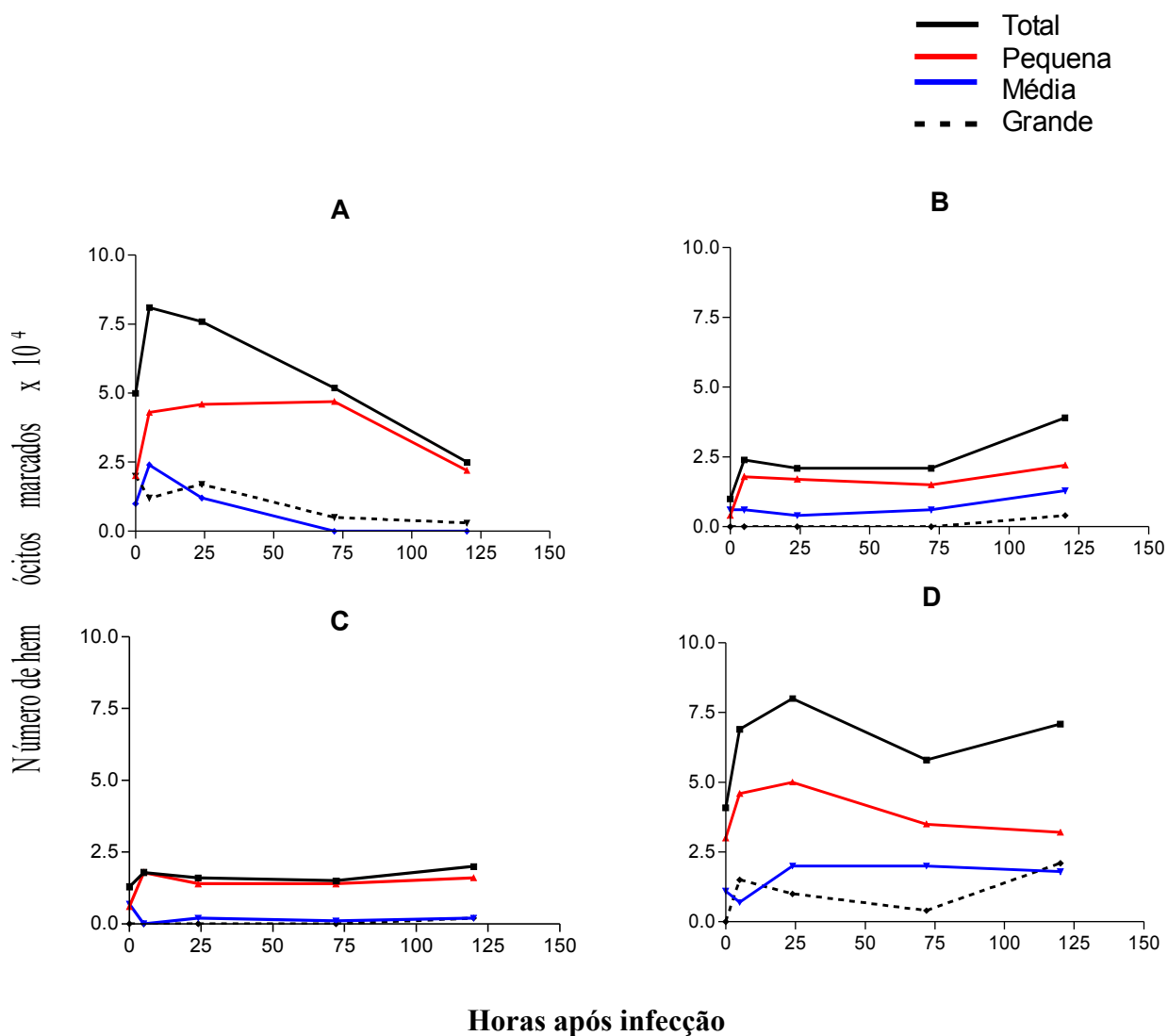


Figura 17: Padrão de marcação de hemócitos circulantes de *B. glabrata* com lectinas conjugadas com FITC, durante as primeiras 120 horas de infecção pelo *S. mansoni*. Em **A**: marcação com ConA, **B**: marcação com PNA, **C**: marcação com SBA e **D**: marcação com WGA.

Da mesma forma, a incubação de hemócitos circulantes isolados de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio, com ConA-FITC resultou na marcação de um grande número de hemócitos pequenos, médios e grandes, sendo que a maioria foi representada por hemócitos pequenos, não sendo alterado pela infecção pelo *S. mansoni* (figura 18A).

Com relação a PNA e SBA, inicialmente o número de células marcadas foi pequeno, sendo que a infecção induziu um aumento significativo neste número, principalmente devido ao aumento do número de hemócitos pequenos marcados. Este aumento se manteve até 120 horas de infecção (figura 18B e C).

Já com relação a WGA, a diferença de marcação entre os tipos celulares não foi marcante em relação as demais lectinas e, mesmo assim, os hemócitos pequenos são os que mais marcaram (figura 18D). A infecção também não induz alterações marcantes no perfil de marcação dos hemócitos de *B. tenagophila* Cabo Frio incubados com WGA (figura 18D).

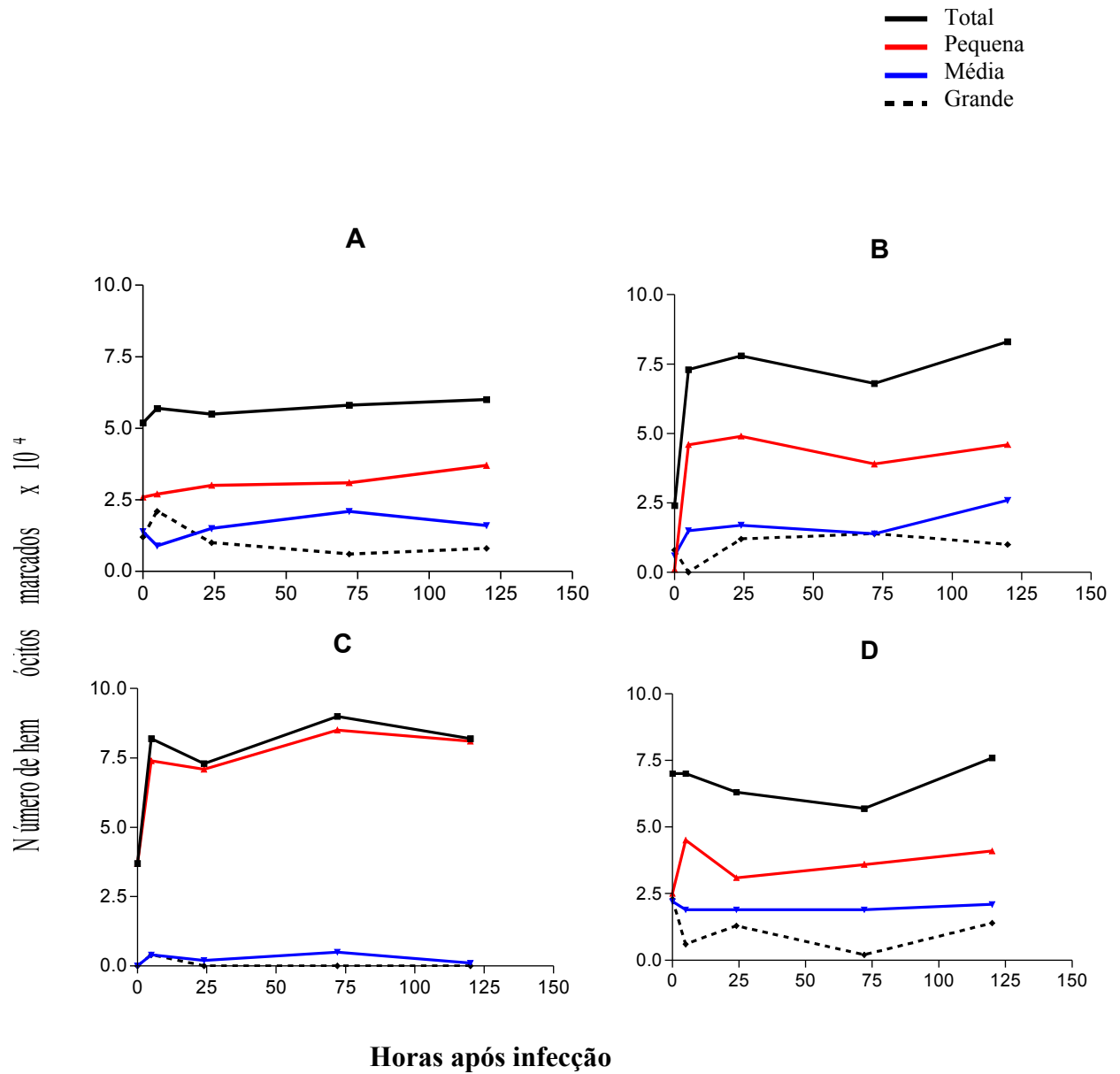


Figura 18: Padrão de marcação de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio, com lectinas conjugadas com FITC, durante as primeiras 120 horas de infecção pelo *S. mansoni*. Em **A**: marcação com ConA, **B**: marcação com PNA, **C**: marcação com SBA e **D**: marcação com WGA.

Na linhagem do Taim de *B. tenagophila*, assim como em Cabo Frio e na espécie *B. glabrata*, os hemócitos pequenos foram o tipo celular que apresentou maior número de células marcadas, com as quatro lectinas utilizadas (ConA, PNA, SBA e WGA). Com relação a infecção, diferente do que foi observado em *B. glabrata* e na linhagem Cabo Frio, após 5 horas de infecção foi observada uma diminuição marcante do número de hemócitos circulantes com todas as lectinas testadas (figura 19).

Com relação a ConA, de maneira geral, após o período 5 hpi, houve um aumento significativo no número de hemócitos marcados, que se manteve até as 120 hpi. (figura 19A). A marcação dos hemócitos grandes com ConA foi muito baixa e não se alterou ao longo da infecção (figura 19A). Com PNA e SBA, a marcação se deu principalmente em hemócitos pequenos e poucos hemócitos médios, mantendo-se até as 120 hpi (figura 19B e C). Mais uma vez a marcação dos hemócitos grandes com PNA e SBA foi muito baixa e não se alterou com a infecção (figura 19B e C). Já com a WGA, a marcação dos hemócitos pequenos e médios se apresentou praticamente estável ao longo da infecção, destacando-se apenas uma leve diminuição na marcação dos hemócitos pequenos por volta de 24 horas de infecção (figura 19D). A marcação dos hemócitos grandes mostrou uma diminuição marcante durante às 5 hpi, o que representou a diminuição dos hemócitos totais. Após este período, o número de hemócitos grandes aumentou e se manteve até 120 hpi (figura 19D).

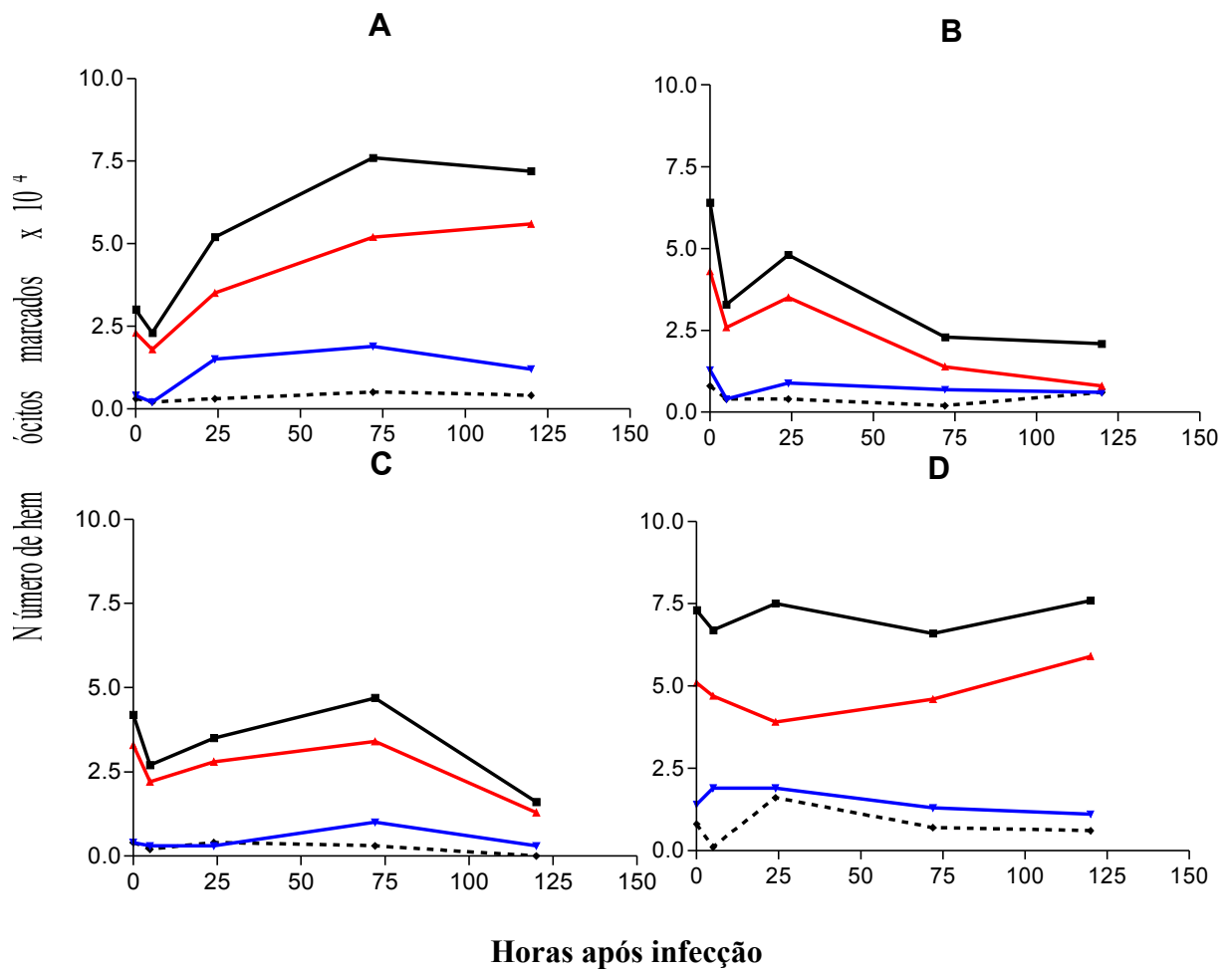


Figura 19: Padrão de marcação de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Taim, com lectinas conjugadas com FITC, durante as primeiras 120 horas de infecção pelo *S. mansoni*. Em **A**: marcação com ConA-FITC, **B**: marcação com PNA-FITC, **C**: marcação com SBA-FITC e **D**: marcação com WGA-FITC.

## **5.2.2. Ação de carboidratos na interação de hemócitos com esporocistos transformados *in vitro*.**

### 5.2.2.1. Adesão dos hemócitos aos esporocistos

Nas concentrações de 1, 5, 25 e 100 mM e 3, 6, 12 e 25 mM, de n-acetilglicosamina e Galactosamina, respectivamente, cerca de 90% dos esporocistos permaneceram viáveis mesmos após 24 horas de incubação, o mesmo sendo observado na incubação com hemócitos tanto de *B. glabrata* quanto de *B. tenagophila*.

A análise realizada após 2 h revelou que o índice de adesão celular (IAC) foi baixo, tanto em *B. glabrata* quanto em *B. tenagophila* (Cabo Frio e Taim), mesmo na ausência de carboidratos. Desta forma, a avaliação da adesão de hemócitos à superfície de esporocistos (IAC), realizada após 6 h de incubação, será apresentada para os diversos tratamentos nas diferentes espécies e linhagens *Biomphalaria*. Foi verificado que a maioria dos esporocistos de *S. mansoni* (67 %) incubados com hemócitos circulantes de *B. glabrata* não infectados não apresentou células aderidas a sua superfície, ou seja, apresentaram IAC=0, e o restante dos esporocistos (33 %) apresentou de 1 a 10 hemócitos aderidos, IAC=1 (figura 20A). A adição de N-acetilglicosamina, na concentração final de 1 e 5 mM, resultou em um aumento significativo na proporção de esporocistos com poucos hemócitos aderidos, IAC=1, embora não tenha sido observados os índices IAC=2 ou IAC=3 (figura 20A). Em concentrações de 25 e 100 mM de N-acetilglicosamina, não foi notada alteração no padrão de adesão celular dos esporocistos, permanecendo semelhante ao observado nos controles (figura 20A). Resultados semelhantes foram observados em testes em que se adicionou 10% da fração solúvel de hemolinfa de *B. glabrata* juntamente com hemócito e esporocisto (figura 20B). Na presença destes fatores solúveis, foi observado um pequeno aumento na porcentagem de esporocistos de *S. mansoni* com IAC = 0 (75%), sendo poucos com hemócitos aderidos apresentaram IAC

= 1. A adição de diferentes concentrações de N-acetilglicosamina não alterou expressivamente este perfil de adesão de hemócitos ao tegumento de esporocistos, não sendo observados esporocistos com IAC = 2 ou IAC = 3 em nenhum tratamento (figura 20B).

A adição de galactosamina na incubação de hemócitos *B. glabrata* com esporocisto não foi testado, devido ao pequeno número de células desta espécie que expressam carboidratos ligantes para PNA.



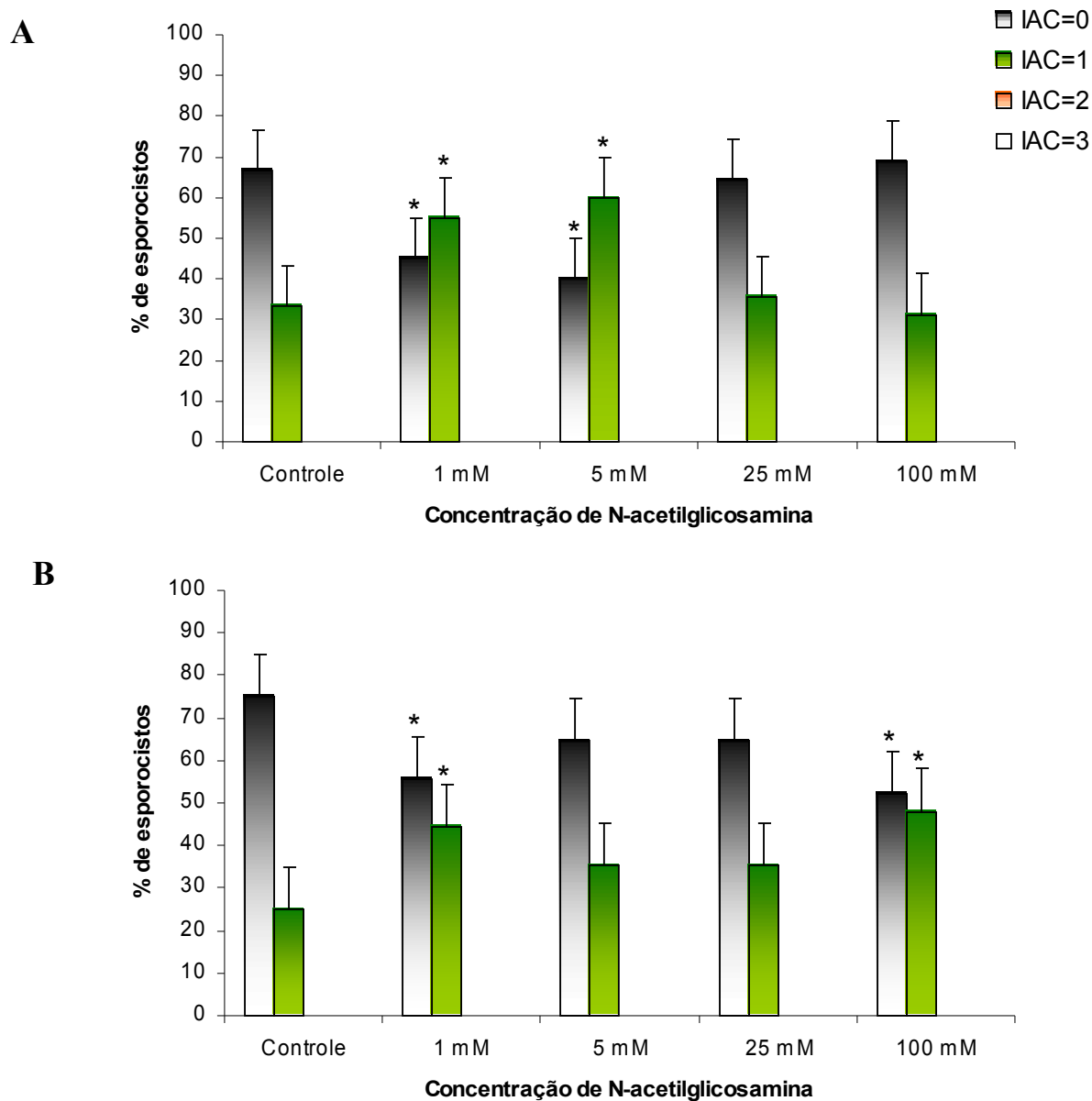
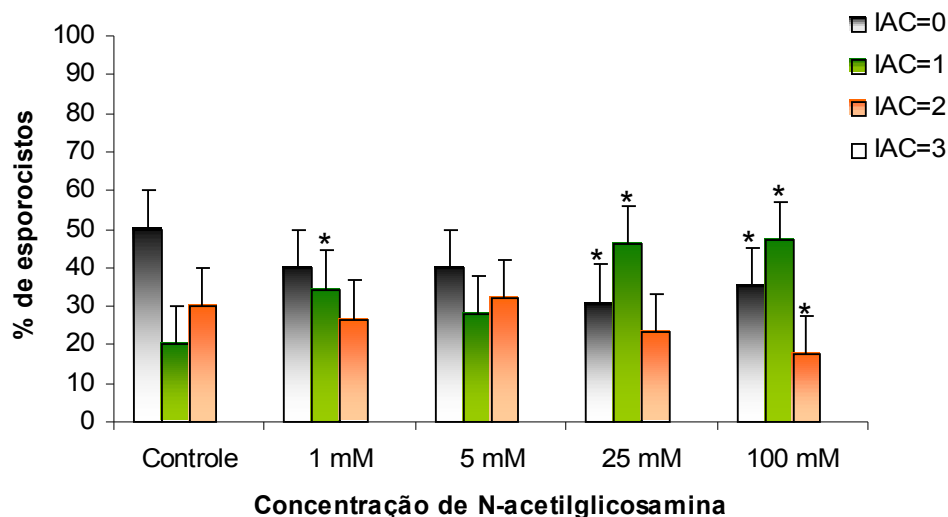


Figura 20: Adesão de hemócitos circulantes de *B. glabrata*, ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni*, após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. glabrata*. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.

A adesão de hemócitos de *B. tenagophila* (Taim e Cabo Frio) ao esporocisto de *S. mansoni* foi maior que a observada em *B. glabrata*. Na presença de hemócitos da linhagem Cabo Frio, 50 % dos esporocistos não apresentaram células aderidas em sua superfície (IAC=0), 20 % mostraram IAC=1 e 30 % IAC=2. Na adição de concentrações crescentes de N-Acetilglicosamina foi observado um aumento significativo do número de esporocistos com o IAC=1 nas concentrações de 1, 25 e 100 mM de N-acetilglicosamina, em consequência especialmente da redução da porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos (IAC = 0) (nas concentrações de 25 e 100 mM) e de esporocistos com IAC = 2 (a 100 mM) (figura 21A). A presença de hemolinfa, durante a incubação de hemócitos com esporocistos, resultou em alterações nos índices de adesão celular ao tegumento do parasito; ou seja, apenas 10% apresentaram IAC=0, 60% IAC=1 e 30% IAC=2. Não foi observado nenhum esporocisto com mais de 50 células aderidas a sua superfície (figura 21B). A adição de N-acetilglicosamina, reverteu o padrão de adesão de hemócitos ao esporocisto, aumentando significativamente a porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos e diminuição significativa daqueles com IAC=1 nas concentrações 1, 5, 25 e 100 mM e dos com IAC=2 na concentração de 1 mM (figura 21B). Entretanto, foram observados esporocistos com IAC=3 nos testes com adição de 1, 5 e 25 mM de N-acetilglicosamina, porém estes desaparecem na concentração de 100 mM (figura 21B).

**A**



**B**

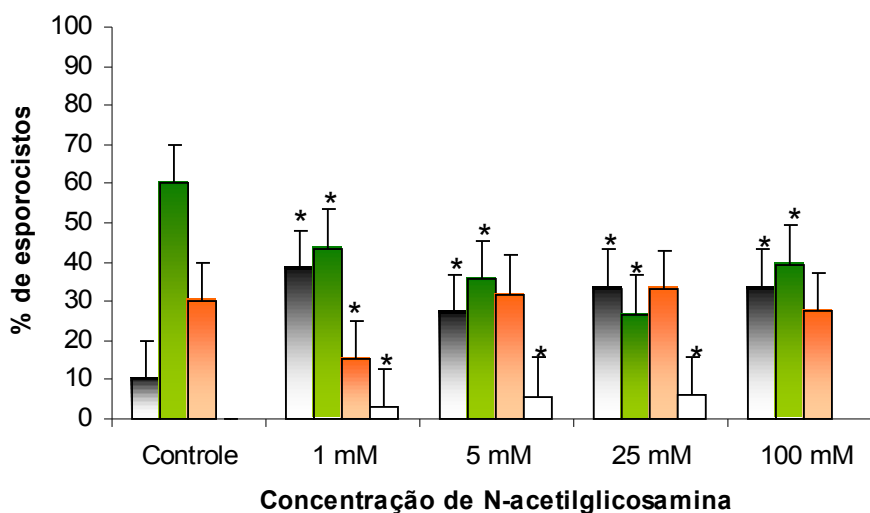


Figura 21: Adesão de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni*, após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.

A incubação de hemócitos de *B. tenagophila* Cabo Frio com esporocistos de *S. mansoni* na presença de Galactosamina, resultou em diminuição significativa de esporocistos com IAC=0 nas concentrações de 3 e 6 mM e, conseqüentemente, um aumento do IAC=1 nestas mesmas concentrações. Também foi observada uma diminuição de esporocistos, com IAC=2, nas concentrações de 12 e 25 mM e o aparecimento de IAC=3 na concentração de 3 mM (figura 22A). Quando os esporocistos e hemócitos foram incubados com Galactosamina na presença de hemolinfa, foi observado um aumento dos esporocistos com IAC=0, em todas as concentrações de Galactosamina, sendo este aumento significativo nas concentrações de 12 e 25 mM e uma diminuição de IAC=1 nas concentrações de 3 e 25 mM. Além disso, foi observada uma diminuição significativa de esporocistos com IAC= 2, com 6 e 12 mM e o aparecimento de esporocistos com IAC=3 nas concentrações de 3 e 6 mM que já não mais visto nas concentrações de 12 e 25 mM (figura 22B).

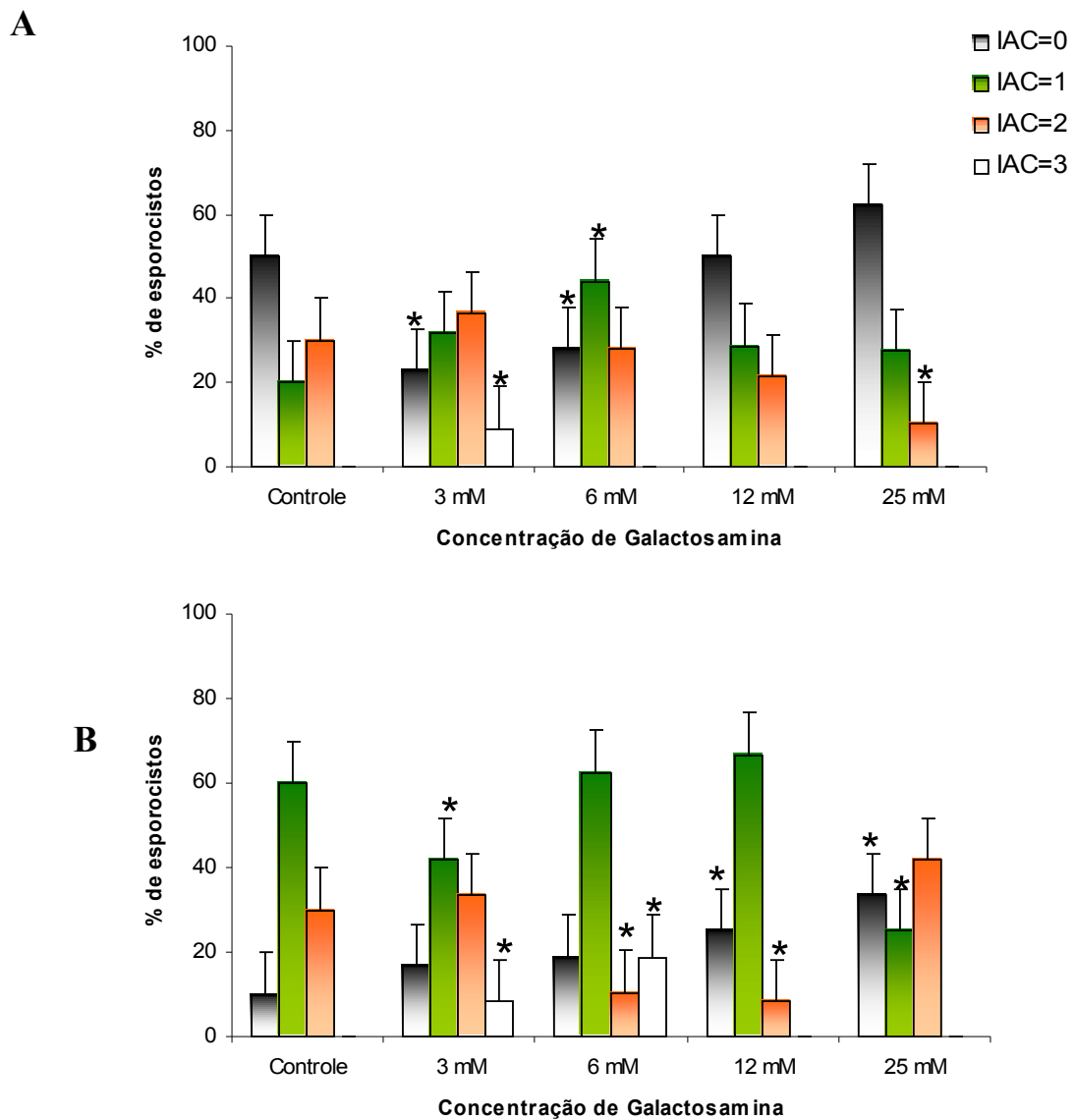


Figura 22: Adesão de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni*, após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.

Esporocistos de *S. mansoni* incubados com os hemócitos isolados de *B. tenagophila* do Taim mostraram um grande número de células aderidas ao tegumento do parasito. Mesmo na ausência de hemolinfa, somente 10% dos esporocistos se encontravam sem hemócitos aderidos a sua superfície, IAC=0, sendo que 45% dos esporocistos apresentaram IAC=1, 35% IAC=2 e 5% mais de 50 células aderidas a sua superfície (IAC=3) (figura 23A). A adição de N-acetilglicosamina, resultou inicialmente, em um aumento significativo na porcentagem de esporocistos com IAC=3, na presença de 1 e 5 mM do carboidrato, entretanto, nas concentrações de 25 e 100 mM, observou-se um aumento significativo de esporocistos sem hemócitos aderidos e conseqüente diminuição de esporocistos com IAC=2 e IAC = 3 (figura 23A).

Na presença de fatores solúveis da hemolinfa desta linhagem de caramujo, os hemócitos de *B. tenagophila* do Taim aumentaram significativamente a capacidade de aderir ao tegumento dos esporocistos (figura 23B). Na ausência de carboidratos, não foram encontrados esporocistos sem hemócitos aderidos a sua superfície, ao passo que 16,7% apresentaram IAC=1, 50% IAC=2 e 33,3% IAC=3. A presença de concentrações crescentes de N-acetilglicosamina resultou em um aumento progressivo e significativo na porcentagem de esporocistos com IAC=0 e com IAC=1 em conseqüência da diminuição progressiva e significativa na porcentagem do IAC=2. Os esporocistos com IAC=3 diminuíram na presença de 5 mM de N-acetilglicosamina, não sendo observados esporocistos encapsulados por hemócitos (IAC = 3) na presença de 25 e 100 mM (figura 23B).

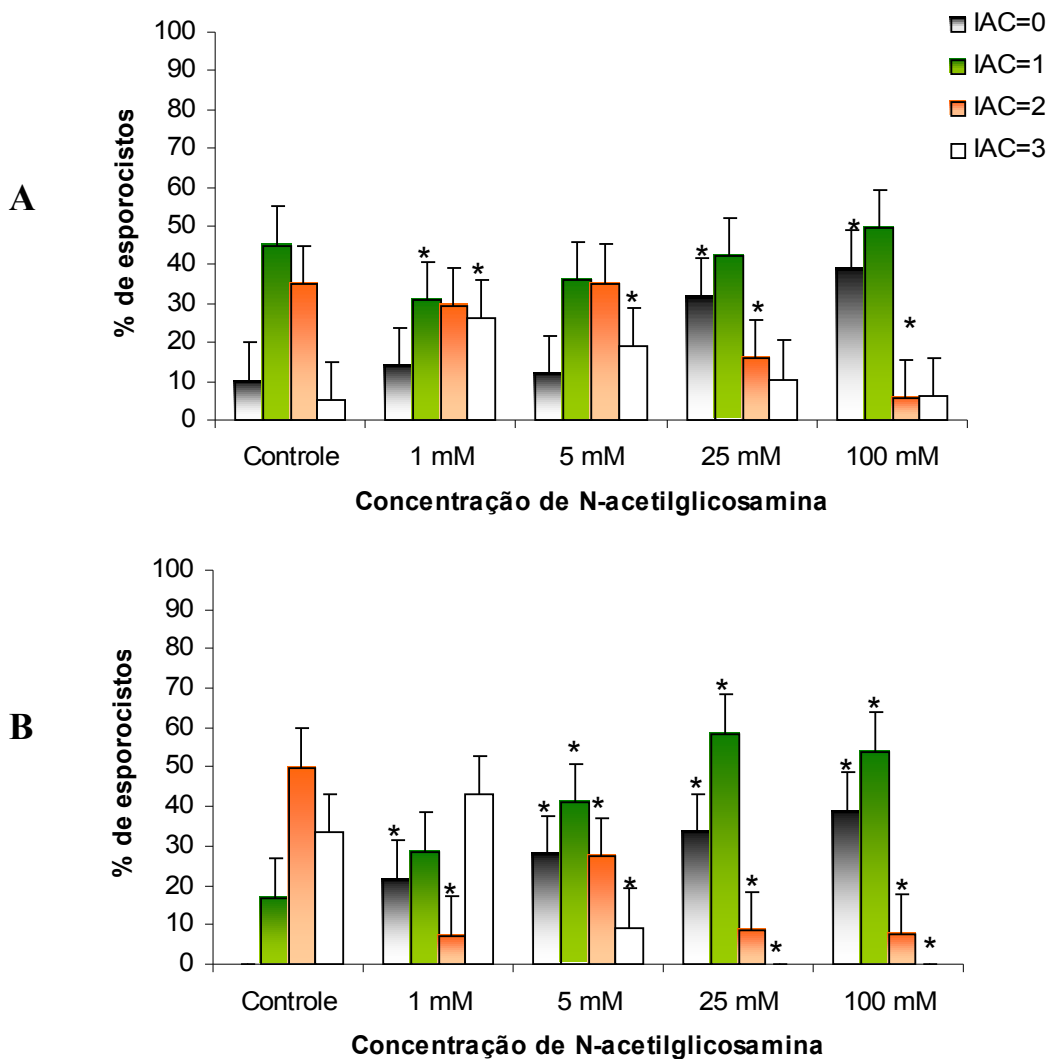


Figura 23: Adesão de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* da linhagem Taim ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni*, após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. tenagophila* Taim. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.

A adesão de hemócitos de *B. tenagophila* do Taim a superfície dos esporocistos de *S. mansoni*, *in vitro*, foi alterada pela adição de galactosamina, sendo observado aumento nos índices de adesão de esporocistos com IAC=1, IAC=2 e IAC=3 na concentração de 3 mM do açúcar. Entretanto, foi observada diminuição nos índices de adesão nas concentrações de 6 e 12 mM e, em 25 mM, os índices são semelhantes ao controle. Na presença de hemolinfa, a adição de galactosamina resultou em inibição de adesão de hemócitos aos esporocistos, sendo observado um aumento significativo de esporocistos com IAC=0 e IAC=1 e conseqüente diminuição com IAC=2 e IAC=3, em todas as concentrações testadas (figura 24B). Entretanto, a inibição observada com adição de 6mM não aumentou nas concentrações maiores do açúcar, mas alguns esporocistos com IAC=3 continuaram presentes (figura 24B).



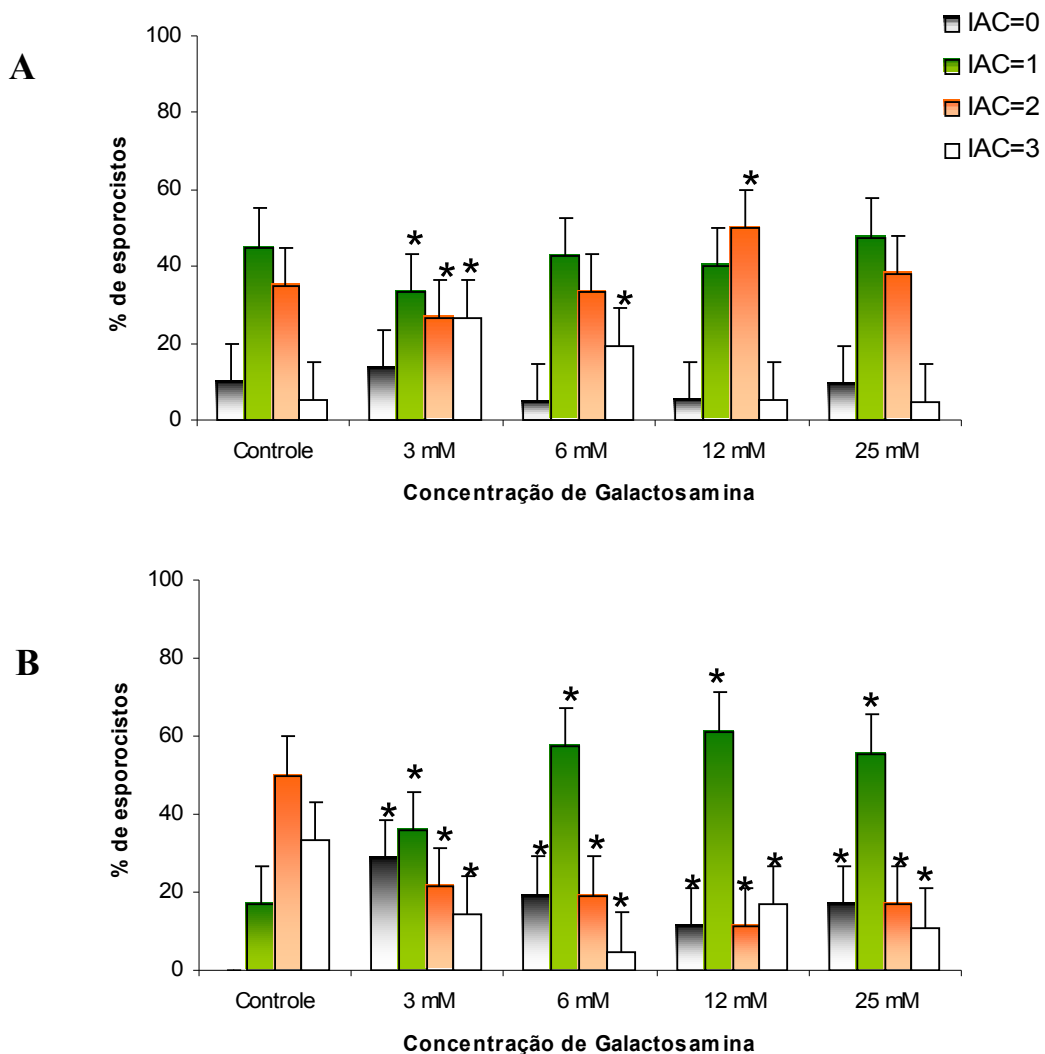


Figura 24: Adesão de nemócitos circulantes de *B. tenagophila* da imagem 1a1m ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni*, após 6 horas de incubação *in vitro*. Índice de adesão expresso como porcentagem de esporocistos sem hemócitos aderidos ao tegumento IAC = 0, esporocistos com até 10 hemócitos aderidos IAC = 1, esporocistos com até 50 hemócitos aderidos IAC = 2 e esporocistos com mais de 50 hemócitos aderidos IAC = 3. **A**: Esporocistos de *S. mansoni* incubados com hemócitos e **B**: Esporocistos incubados com células na presença de hemolinfa de *B. tenagophila* Taim. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.

#### 5.2.2.2. Mortalidade de esporocistos

Os resultados mostraram baixa porcentagem de esporocistos mortos pelos hemócitos da espécie *B. glabrata*. Por outro lado, os esporocistos incubados com hemócitos das linhagens Cabo Frio e Taim revelaram porcentagens de mortalidade maiores que as da espécie *B. glabrata*.

A incubação dos esporocistos de *S. mansoni* com hemócitos, na presença ou não da fração solúvel da hemolinfa de *B. glabrata*, não resultou em diferenças significativas na porcentagem de esporocistos mortos após 6 horas de incubação. Além disso, não houve alterações significativas na mortalidade de esporocistos com a adição de concentrações crescentes de N-acetilglicosamina (figura 25).

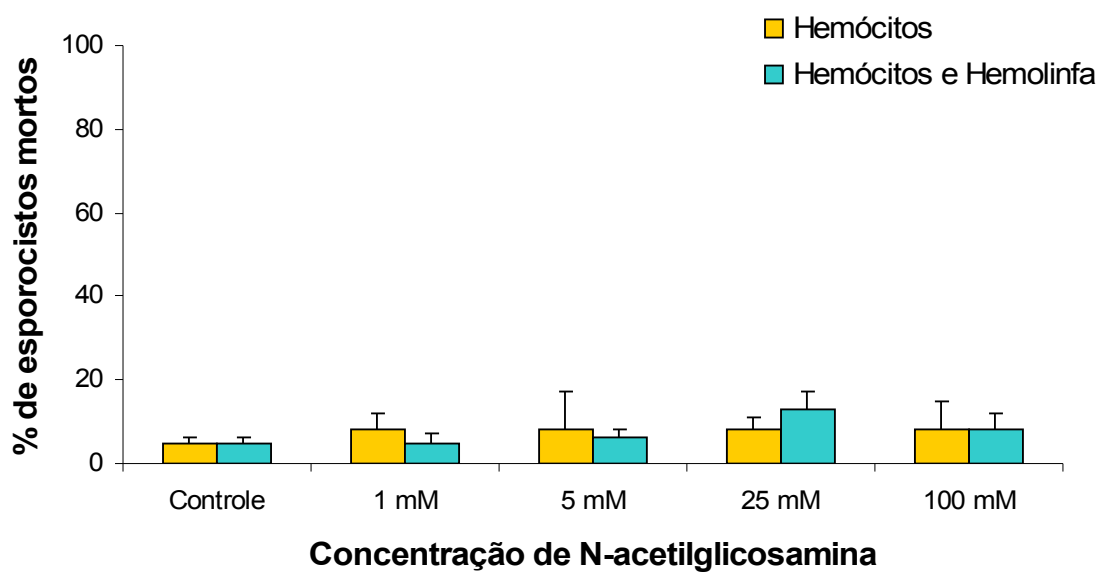


Figura 25: Porcentagem de esporocistos de *S. mansoni* mortos após 6 horas de incubação com hemócitos na presença ou não do extrato solúvel da hemolinfa de caramujos *B. glabrata*. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle.

Em *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio, após 6 horas de incubação dos esporocistos de *S. mansoni* nas diferentes concentrações de N-acetilglicosamina, inicialmente apresentou porcentagem de mortalidade significativamente maior quando comparados ao grupo sem adição de N-acetilglicosamina (figura 26). Na concentração de 1 mM observou-se um aumento significativo na porcentagem de esporocistos mortos, na presença da fração solúvel da hemolinfa (20 %) (figura 26A). Na concentração de 25 foi observada uma diminuição brusca na porcentagem de esporocistos mortos (0%), quando estes foram incubados somente com os hemócitos, porém um aumento significativo da mortalidade na presença da fração solúvel da hemolinfa. Os valores na porcentagem de esporocistos mortos observados quando os hemócitos foram incubados com a fração solúvel da hemolinfa apresentaram diferenças significativamente maiores que a incubação somente com os hemócitos, nas concentrações de 1, 25 e 100 mM de N-acetilglicosamina (figura 26A).

Quando os esporocistos de *S. mansoni* são incubados com os hemócitos da linhagem Cabo Frio de *B. tenagophila*, na presença de Galactosamina, observamos um aumento significativo na porcentagem de mortos na concentração de 6 mM, em relação ao controle sem o carboidrato. Na concentração de 12 mM, pode-se observar uma diminuição significativa na mortalidade (figura 26B). Mais uma vez, a presença da fração solúvel da hemolinfa acarretou um aumento significativo na porcentagem de esporocistos mortos, quando comparado a incubação somente com os hemócitos e, na presença da hemolinfa, foi observada uma tendência de diminuição da porcentagem de mortos na presença de 3, 6 e 12 mM de galactosamina (figura 26B).

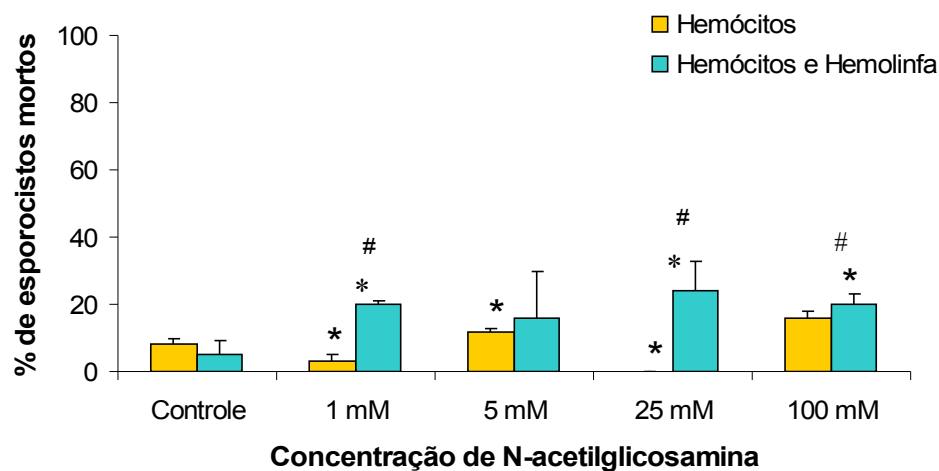
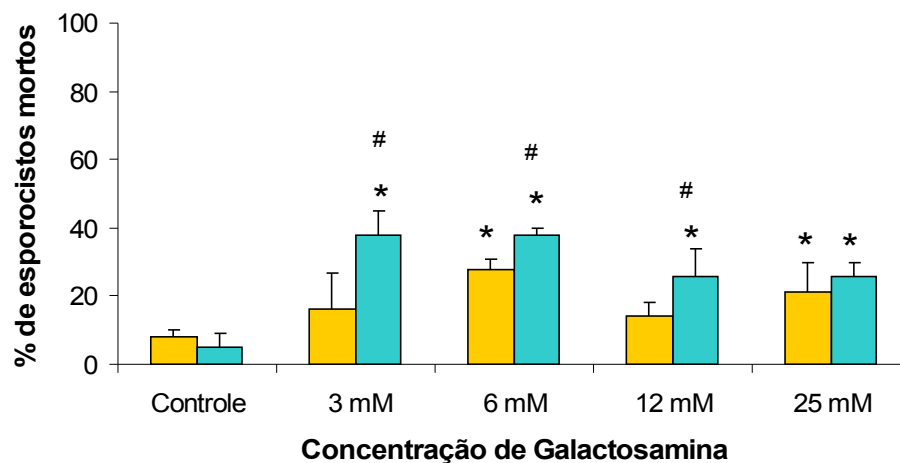
**A****B**

Figura 26: Porcentagem de esporocistos de *S. mansoni* mortos após 6 horas de incubação com hemócitos na presença ou não de extrato solúvel da hemolinfa de caramujos *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio. Em **A**: esporocistos incubados na presença de diferentes concentrações de N-acetilglicosamina e em **B**: esporocistos incubados na presença de diferentes concentrações de Galactosamina. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle e # representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação a presença da hemolinfa.

Após 6 horas de incubação dos esporocistos de *S. mansoni* com hemócitos de *B. tenagophila* da linhagem do Taim, foi observado um aumento significativo na porcentagem de esporocistos mortos, entre o controle sem a adição de carboidrato e a incubação na presença de 1mM de N-acetilglicosamina. Entretanto, nas concentrações de 25 e 100 mM, foi observada uma diminuição significativa na porcentagem de esporocistos mortos quando estes são incubados com hemócitos na presença ou não da fração solúvel da hemolinfa (figura 27A).

Em relação a incubação dos esporocistos em variadas concentrações de Galactosamina, foi observada a tendência a diminuição na porcentagem mortos na concentração mais alta (25 mM) quando se compara o grupo controle (sem galactosamina), principalmente na presença da fração solúvel da hemolinfa (figura 27B). Como em outros grupos testados, a presença do extrato solúvel da hemolinfa resultou em aumento significativo na porcentagem de esporocistos mortos, principalmente no grupo controle e na concentração de 3 mM de Galactosamina. (figura 27B).

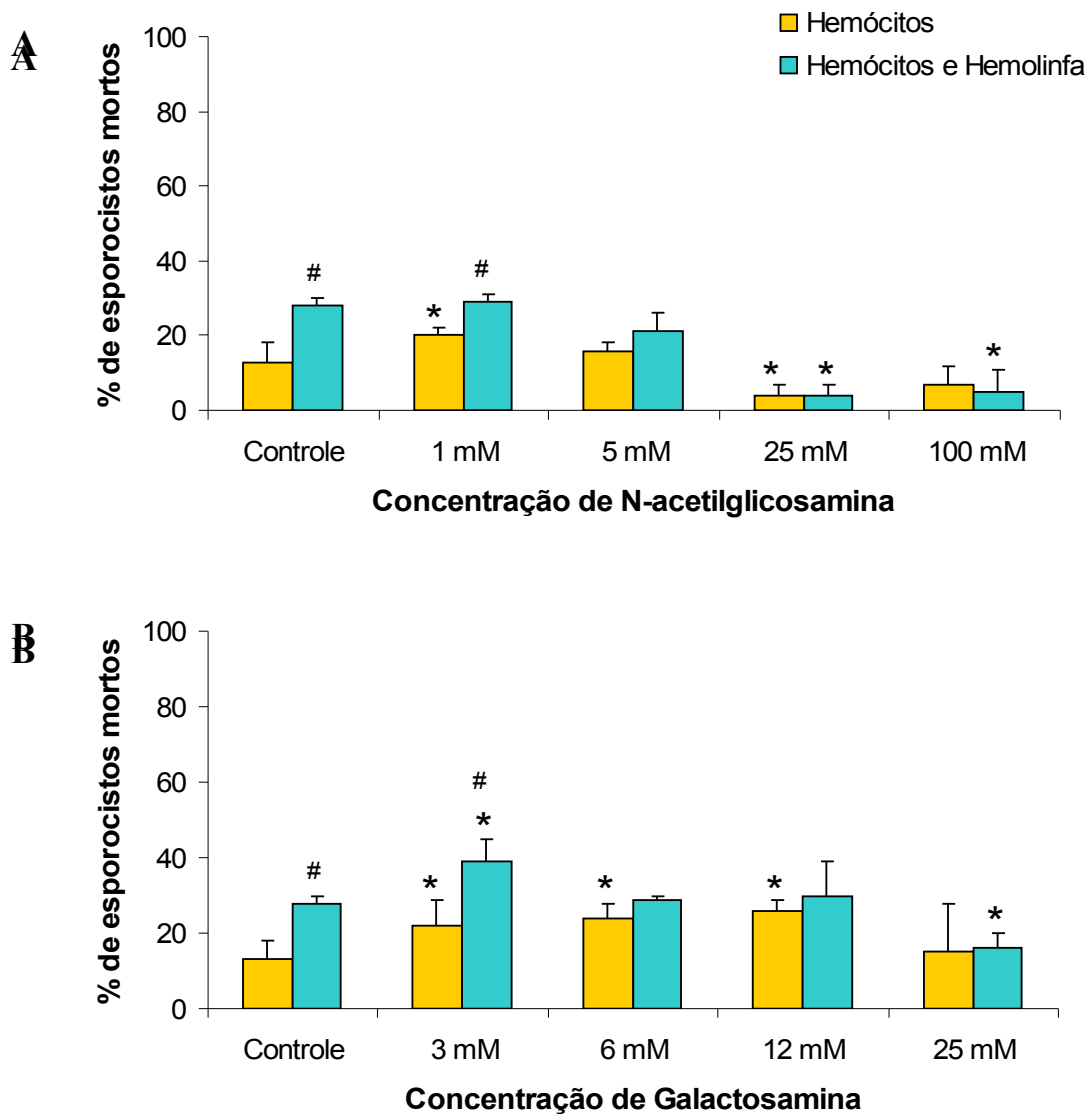


Figura 27: Porcentagem de esporocistos de *S. mansoni* mortos após 6 horas de incubação com hemócitos na presença ou não de extrato solúvel da hemolinfa de caramujos *B. tenagophila* da linhagem Taim. Em **A**: esporocistos incubados na presença de diferentes concentrações de N-acetilglicosamina e em **B**: esporocistos incubados na presença de diferentes concentrações de Galactosamina. \* representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação ao controle e # representa diferenças significativas com  $p < 0,05$  em relação a presença de hemolinfa.

### 5.3. DISCUSSÃO

No sistema interno de defesa dos moluscos do gênero *Biomphalaria*, vários estudos destacam a importância do fator humoral juntamente com o celular, na determinação do sucesso ou fracasso da infecção por trematodas (Van der Knaap & Loker, 1990; Zelck & Becker, 1990; Uchikawa & Loker, 1991; Johnston & Yoshino, 1996; Martins-Souza 1999; Bayne et al., 2001; Johnston & Yoshino, 2001; Castilho & Yoshino, 2002).

A interação de lectinas com carboidratos também possui um papel importante neste sistema de defesa (Fryer et al., 1989). Van der Knaap & Loker (1990) descrevem a importância das lectinas como sendo responsável pela ligação entre os hemócitos e a superfície tegumentar do *S. mansoni*. Além disso, estes autores demonstram que elas podem estar presentes solúveis na hemolinfa ou expressas na superfície dos hemócitos. Tal fato possibilitaria vários tipos de ligações entre o hemócito e o parasito: 1. a ligação direta da lectina expressa na membrana do hemócito e os carboidratos do tegumento do parasito; 2. a lectina como uma ponte entre carboidratos da membrana do hemócito e carboidratos do tegumento do parasito; e 3. as lectinas, estando presentes no tegumento do parasito, ligam-se aos carboidratos da membrana do hemócitos.

A composição do tegumento do esporocisto de *S. mansoni* é outro fator de fundamental importância para a comunicação entre o parasito e seu molusco hospedeiro. O tegumento larval serve como alvo para o sistema interno de defesa, no qual os hemócitos reconhecem, encapsulam e destroem os esporocistos após a invasão em caramujos resistentes (Bayne & Yoshino, 1989; Loker, 1994; Yoshino & Vasta, 1996). Sendo assim, carboidratos da membrana, especialmente aqueles associados a glicoproteínas e glicolipídios, representam o principal componente químico do miracídio e do esporocisto de *S. mansoni* (Uchikawa & Loker, 1991). Acredita-se que o principal mecanismo de ligação dos hemócitos ao tegumento



dos esporocistos se dá através do reconhecimento, por parte das lectinas, dos carboidratos presentes no tegumento do parasito (Johnston & Yoshino, 1996).

Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que a membrana dos hemócitos presentes na hemolinfa de caramujos *Biomphalaria* apresenta uma variedade de receptores em sua superfície o que é justificado pela marcação de uma variedade de lectinas (ConA, PNA, SBA e WGA). A heterogeneidade da população de hemócitos circulantes, presentes na hemolinfa de caramujos do gênero *Biomphalaria*, vem sendo demonstrada por vários autores levando em consideração aspectos morfológicos, bioquímicos e funcionais (Harris, 1975; Yoshino, 1976; Joky et al., 1983; Lie et al., 1987; Ottaviani, 1992; Barraco et al., 1993; Bezerra et al., 1997; Matricon-Gondran & Letorcart, 1999; Johnston & Yoshino, 2001 e Martins-Souza et al., 2003). Pouco se sabe a respeito da caracterização molecular destas células.

Quando analisamos de maneira geral a marcação dos hemócitos de *B. glabrata* e *B. tenagophila* das linhagens Cabo Frio e Taim, com as lectinas testadas (ConA, PNA, SBA e WGA), podemos concluir que na superfície destas células são encontrados vários receptores (carboidratos), porém a distribuição dos mesmos difere entre as espécies e os diferentes tipos celulares. O fato dos hemócitos pequenos, tanto de *B. glabrata* quanto *B. tenagophila*, apresentarem receptores para todas as lectinas testadas, poderia estar relacionado à hipótese de que células (que compreendem os hialinócitos) podem ser precursoras dos hemócitos grandes (granulócitos) mais diferenciados (Sminia, 1981). Sendo uma célula indiferenciada, elas apresentariam uma quantidade maior de carboidratos em sua superfície, assim como uma variedade maior dos tipos de carboidratos.

As diferenças no número de hemócitos marcados e a intensidade da marcação observadas na espécie *B. glabrata* e nas linhagens Cabo Frio e Taim de *B. tenagophila*,

podem ser justificadas pelas diferenças no grau de resistência entre as espécies, o que é demonstrado por vários autores (Bezerra et al., 1997; Martins-Souza et al., 2003; Coelho et al., 2004; Rosa et al., 2005). Além disso, o fato dos hemócitos de *B. tenagophila* serem mais eficientes na destruição dos esporocistos de *S. mansoni*, destruição esta comprovada por estudos histológicos (Martins-Souza, 1999), também explicaria as diferenças na marcação dos hemócitos no decorrer da infecção pelo *S. mansoni*, quando comparadas a *B. glabrata*.

Acredita-se que, assim como as lectinas, os produtos excretados e secretados pelos esporocistos estão relacionadas a ativação dos hemócitos (Bayne et al., 1980b; Bayne et al., 1984; Boehmler et al., 1996), e o fato dos caramujos estarem infectados, poderia levar a um aumento de receptores presentes na superfície dos hemócitos. A importância da resposta celular a infecção, na marcação dos hemócitos, pode ser comprovada pelos resultados observados na linhagem Taim de *B. tenagophila*, onde observamos uma diminuição no número de hemócitos circulantes após 5 horas de infecção. Esta diminuição pode ser devida aos hemócitos, efetivamente capazes de destruir o parasito, estarem migrando para o local da penetração do miracídio, (Bezerra et al., 1997), sugerindo que estes sejam marcados pela lectinas testadas, principalmente pela WGA.

A importância da ligação de lectinas à superfície dos hemócitos já foi demonstrada em outros trabalhos, em que, o tratamento de hemócitos de *B. glabrata* com ConA aumenta a capacidade destes de aderirem ao vidro (Yoshino, 1981).

A especificidade da ligação entre lectinas e a superfície dos hemócitos foi confirmada através do confronto *in vitro* do hemócito e esporocistos de *S. mansoni*. Relatos presentes na literatura demonstraram que a fagocitose de leveduras por hemócitos de *B. glabrata* pode ser inibida quando estes são incubados com carboidratos (Fryer et al., 1989). No presente trabalho, podemos observar que a adesão dos hemócitos, principalmente da

linhagem do Taim de *B. tenagophila*, a superfície dos esporocistos de *S. mansoni* pode ser inibida pelo carboidrato, sugerindo que a ligação entre os hemócitos e o tegumento do esporocisto se dá através da lectina. Além disso, os resultados demonstram que esta inibição é dose dependente.

Quando analisamos a adesão dos hemócitos ao tegumento do esporocisto, observamos mais uma vez que os hemócitos de *B. glabrata* não são eficientes no processo de encapsulamento do esporocisto, o que justifica o seu alto grau de susceptibilidade a infecção pelo *S. mansoni*, relatado por vários autores (Correa et al, 1979; Santos et al., 1979; Bezerra et al., 1997). Ao contrário, as linhagens de *B. tenagophila* apresentam maior grau de resistência a infecção pelo *S. mansoni* (Bezerra et al., Martins-Souza et al., 2003; Coelho et al., 2004; Rosa et al., 2005), conseqüentemente apresentam maiores índices de adesão celular. Além disso, nestas linhagens, a adição da fração solúvel da hemolinfa resultou em um aumento do número de hemócitos aderidos a superfície dos esporocistos, o que sugere haver na hemolinfa destas linhagens, fatores (lectinas e ou carboidratos) que potencializam o reconhecimento e encapsulamento do esporocisto. Tal hipótese é suportada por trabalhos como o de Zelck & Becker (1990).

Com relação a adição de carboidratos em concentrações menores, foi observado um aumento do número de células na superfície dos esporocistos, tanto na presença de hemócitos de *B. glabrata*, quanto de *B. tenagophila*. Acredita-se que, inicialmente, a presença de carboidrato proporcione uma maior interação entre a superfície dos hemócitos e o tegumento do esporocisto. Em contradição às concentrações mais elevadas de carboidratos, estes passariam a competir pelas lectinas presentes tanto na superfície dos hemócitos quanto no tegumento do esporocisto, bloqueando os sítios de ligação e impedindo a ligação dos hemócitos ao parasito.

Com relação à taxa de mortalidade dos esporocistos, esta já pode ser observada a partir de 6 horas de incubação e como era esperado mostrou-se praticamente inexistente em *B. glabrata* e com valores consideráveis nas linhagens Cabo Frio e Taim de *B. tenagophila*. Nestas linhagens, tanto a adição de carboidratos, quanto da fração solúvel da hemolinfa resultou em alterações na adesão celular e à morte dos esporocistos.

Os resultados obtidos neste estudo indicam haver uma correlação entre o número de células aderidas ao tegumento do esporocisto e sua mortalidade. Quando incubados com hemócitos de *B. glabrata*, os esporocistos apresentaram poucas células aderidas ao seu tegumento (ICA=1) e conseqüentemente praticamente não houve mortalidade. Mesmo a adição de carboidratos não alterou estes resultados. Acredita-se que os hemócitos desta espécie não sejam capazes de encapsular de maneira efetiva os esporocistos. Porém, na linhagem Taim de *B. tenagophila*, observamos esporocistos com mais de cinquenta hemócitos aderidos ao seu tegumento (IAC=3) e as maiores taxas de mortalidade. Quando a adesão dos hemócitos é inibida pelas altas concentrações de carboidratos, a mortalidade diminui significativamente.

Na linhagem de Cabo Frio, a adição da fração solúvel da hemolinfa e de carboidratos (N-acetilglicosamina e galactosamina) resultou em aumento da adesão dos hemócitos ao tegumento dos esporocistos e, conseqüentemente, em um aumento da taxa de mortalidade dos esporocistos. De acordo com dados divulgados em outros trabalhos, a hemolinfa possui alguns fatores que potencializam a interação entre os hemócitos e o esporocisto (Bayner et al, 1980 a,b; Granath & Yoshino, 1984; Fryer & Bayner, 1996; Adema et al, 1997; Martins-Souza, 1999). Dentre estes fatores, destaca-se a presença de carboidratos e lectinas. Com relação a linhagem do Taim, a presença da hemolinfa, juntamente com N-acetilglicosamina em maiores concentrações, parece inibir a adesão dos hemócitos ao tegumento dos

esporocistos e conseqüentemente, a morte destes. Acredita-se que na hemolinfa desta linhagem exista lectina semelhante a WGA. Isso seria justificado pela diminuição da adesão celular e da taxa de mortalidade dos esporocistos devida a adição de altas concentrações de N-acetilglicosamina e da hemolinfa da linhagem do Taim. A presença de WGA, na hemolinfa resgataria os carboidratos adicionados impedindo que estes potencializem a adesão celular e, conseqüentemente, a morte dos esporocistos. Além disto, o fato de não se observar esta inibição, quando a hemolinfa é adicionada na presença de Galactosamina, reforça a hipótese de que uma das lectinas presentes na hemolinfa de *B. tenagophila* do Taim seja a WGA.

A resistência da linhagem Taim de *B. tenagophila* foi, mais uma vez, confirmada através dos resultados obtidos neste trabalho, no qual foi observado que, quando os esporocistos são incubados com hemócitos na presença ou não da fração solúvel da hemolinfa, estes apresentam os maiores índices de adesão celular e taxa de mortalidade. Além dos hemócitos, o presente trabalho reforça a importância também da hemolinfa do Taim na destruição dos esporocistos de *S. mansoni*. A presença de hemolinfa potencializa a adesão dos hemócitos, a superfície dos esporocistos e aumentam a porcentagem de esporocistos mortos pelos hemócitos, quando estes são incubados na ausência de carboidratos. Tais resultados são concordantes com trabalhos anteriores (Martins-Souza, 1999; Martins-Souza, 2003).

## **6. Análise da interação dos hemócitos com antígenos e esporocistos de *S. mansoni*.**

Os mecanismos pelos quais os hemócitos destroem o parasito ainda não foram completamente elucidados. Dependendo do tamanho, os organismos (ou partículas) podem ser fagocitados pelos hemócitos ou encapsulados (como no caso de larvas de Digenea) e subsequentemente lesados por metabólitos secretados pelos hemócitos ativados (Adema et al., 1997a).

Um dos principais mecanismos envolvidos na morte do parasito mediada por células parece ser a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo hemócitos. Hemócitos de gastrópoda produzem ROS (Dikkeboom et al., 1988a) e este processo, semelhante a citotoxicidade oxidativa de macrófagos de mamíferos, é induzido em resposta à infecção por trematódeos parasitos (Dikkeboom et al., 1988b). Segundo Adema et al. (1991), a produção de radicais livres de oxigênio pode ser encontrada em muitas, mas não em todas espécies de moluscos investigadas. Simultaneamente, Shozawa et al., (1989) relatam que os hemócitos de *B. glabrata* produzem ROS.

O envolvimento direto de ROS na morte de trematódeos foi demonstrado por Adema et al., (1994), usando esporocistos de *T. ocellata* e hemócitos de *L. stagnalis*, bem como *S. mansoni* e *B. glabrata*. Neste estudo foi demonstrado que, quando a produção de ROS pelos hemócitos é inibida, a habilidade destes matarem o parasito é comprometida.

De acordo com Babior (1999), o “burst respiratório” das células fagocitárias e conseqüente produção de ROS, é resultado da ativação de um complexo NADPH oxidase na membrana plasmática de fagócitos.

Adicionalmente, muitos tipos de células fagocitárias possuem óxido nítrico sintase induzível (iNOS), na presença de iNOS a arginina é transformada em citrulina e esta óxido

nítrico (NO). Embora NO tenha atividade citotóxica local, ele é rapidamente reativo com  $O_2^-$  para formar oxidante mais reativo, peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Bayne et al., 2001). A toxicidade ou não de NO dependerá do balanço entre a produção de NO e ROS.

De maneira semelhante aos mamíferos, hemócitos de alguns moluscos podem gerar HOCl (Schlenk et al., 1991; Torreilles et al., 1997) e NO (Conte & Ottaviani et al., 1995; Torreilles & Guerin, 1999; Arumugam et al., 2000). Assim, os hemócitos têm um potencial para a produção de ambos, oxidantes altamente reativos ( $O_2^-$ ,  $-OH$ ,  $^1O_2$ , HOCl e  $ONOO^-$ ) e outros oxidantes (NO e  $H_2O_2$ ) (Bayne et al., 2001).

O objetivo deste trabalho é analisar comparativamente, a produção de radicais de nitrogênio por hemócitos circulantes de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* (Cabo Frio e Taim), sob o estímulo da infecção pelo *S. mansoni* e re-estímulo com antígenos solúveis de ovos ou esporocistos do parasito *in vitro*.

## **6.1. MATERIAL E MÉTODOS**

### **6.1.1. Caramujos**

Assim como nos demais capítulos, os caramujos utilizados pertencem às espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila*, ambas provenientes dos moluscários do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE) – ICB – UFMG. A linhagem de *B. glabrata* utilizada é proveniente da Lagoa da Pampulha – Belo Horizonte (MG), denominada linhagem BH. Enquanto que nas linhagens de *B. tenagophila*, os experimentos aqui reportados utilizam duas linhagens: Cabo Frio (CF) e Taim.

### **6.1.2. O Parasito**

Os caramujos acima referidos foram infectados com a cepa LE de *S. mansoni* que vem sendo mantida no GIDE por 35 anos.

### **6.1.3. Infecção de caramujos**

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *S. mansoni* da cepa LE são sacrificados entre 45 e 50 dias após infecção para obtenção de miracídios e os caramujos foram infectados de acordo com a técnica de Pellegrino & Katz, 1968 (com algumas modificações já citadas no capítulo 1).

### **6.1.4. Contagem diferencial de hemócitos e viabilidade**

Amostras da hemolinfa total recolhidas de cerca de 15 caramujos dos diferentes grupos experimentais, em diferentes períodos de infecção, foram diluídas 1\10 em CBSS pH 7.4 contendo 0,4% de Azul de Tripán. A diferenciação celular foi realizada levando-se em



consideração os diferentes tamanhos dos hemócitos. As células foram contadas em câmara de Neubauer e as células coradas de azul foram consideradas mortas (Martins-Souza, 1999).

#### **6.1.5. Análise da interação dos hemócitos com antígenos e esporocistos de *S. mansoni*.**

##### 7.1.5.1. Obtenção de antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni* - SEA

O antígeno dos ovos de *S. mansoni* foi obtido de acordo com a técnica modificada de Goes et al. (1989). Inicialmente, foram obtidos ovos do parasito, através da homegenização de fígados de camundongos com cerca de 45 dias de infecção, em liquidificador com salina 1,7%. O homogenato foi passado por várias peneiras de diâmetro de malhas diferentes (425, 106 e 45 µm), sendo os ovos retidos na ultima malha de 45µm. Em seguida a peneira foi lavada e os ovos foram concentrados através de centrifugação por 5 minutos a 2500 rpm.

Após os ovos serem isolados, estes foram triturados em virtiz por cerca de 40 minutos ou até que não se possa verificar a presença de ovos inteiros. Em seguida, o material é centrifugado a 13000g, a 4<sup>o</sup> C por 60 minutos e o sobrenadante foi dialisado por 48 horas em salina 0,9%. Após a diálise, foi feita a dosagem de proteínas pelo método de Lowry.

##### 6.1.5.2. Transformação de miracídios de *S. mansoni* em esporocistos *in vitro*

Os esporocistos foram obtidos a partir do isolamento de miracídios do fígado de hamsters com 45 a 50 dias de infecção com *S. mansoni* (Chaia, 1956) e mantidos em meio completo RPMI-1640, contendo 5 % de soro fetal bovino por 18 horas a 27 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> (Martins-Souza, 1999).

6.1.5.3. Quantificação dos radicais reativos de nitrogênio em hemócitos a partir da estimulação pela infecção por *S. mansoni* e reestimulação por SEA ou esporocistos.

Cerca de  $10^5$  hemócitos de caramujos normais e infectados pelo *S. mansoni*, após diferentes períodos de infecção, são incubados em CBSS suplementado com 1% de glutamina (2mM), 2% de aminoácidos, 1% de HEPES, 1% de antibiótico (penicilina e streptomina) e 10% de soro fetal bovino, na presença ou não de estímulos (50  $\mu$ g de SEA ou 100 esporocistos/  $10^5$  hemócitos) durante 18 horas a 27 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>.

Após a estimulação, uma amostra do sobrenadante foi recolhida para a quantificação da presença de nitrito. A dosagem de óxido nítrico foi realizada de forma indireta, medindo-se a concentração de nitrato de acordo com o método de Greene usando uma curva padrão com NaNO<sub>2</sub>. Resumidamente, 100 $\mu$ l do sobrenadante de cada amostra é colocada em contato com 100  $\mu$ l do reagente de Greiss (NEED-naphtyuletyleno-diamida-0,1% em água + sulfanilamida 1% em H<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> 2,5%). Em seguida, é realizada a leitura em leitor de ELISA a 540 nm e a concentração de óxido nítrico foi estimada de acordo com as concentrações de NaNO<sub>2</sub> da curva padrão.

#### **6.1.6. Análise estatística**

Os resultados foram estatisticamente analisados, utilizando-se análise de variância ou teste t de Student para os dados paramétricos e teste de Kruskal Wallis para dados não paramétricos.

## 6.2. RESULTADOS

### 6.2.1. Produção de NO

Hemócitos circulantes de *B. glabrata* e *B. tenagophila* são capazes de produzir NO, quando estimulados com antígenos de ovo de *Schistosoma* (SEA). Porém não há diferenças significativas na produção de NO, quando se comparam as duas espécies de *Biomphalaria* testadas (*B. glabrata* e *B. tenagophila*), nem nas duas linhagens de *B. tenagophila* (Cabo Frio e Taim). Além disso, o aumento significativo destes produtos no sobrenadante de cultura foi observado após 18 horas de incubação (figura 28).

Quando se observam períodos de incubação superiores a 18 horas, a medida de NO é comprometida pela contaminação do meio (dado não mostrado). A partir do que foi estabelecido durante a cinética de incubação, 18 horas foi o período estabelecido para se dosar os níveis de NO nos experimentos seguintes. O próximo passo foi estabelecer em que período da infecção pode-se obter os níveis mais elevados de NO.

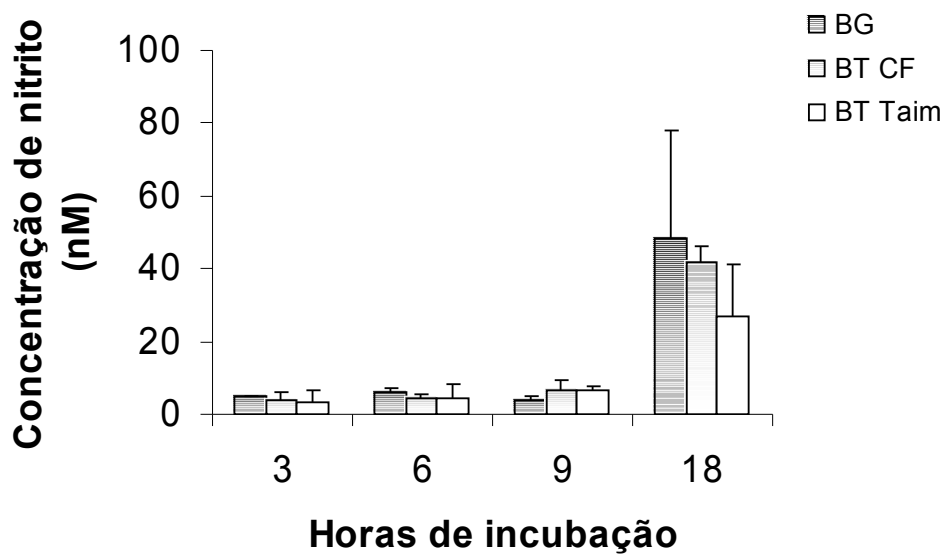


Figura 28: Cinética de incubação dos hemócitos de caramujos livres de infecção, estimulados com SEA, para medida de nitrito. BG: caramujos *B. glabrata*, BT-CF: caramujos *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio e BT-Taim: caramujos *B. tenagophila* da linhagem Taim. \* representa diferenças significativas entre os tempos de incubação.

Durante a infecção dos caramujos, podemos observar um aumento na produção de NO, nos períodos de 1, 3 e 7 dpi, sendo este aumento mais significativo no 1º dia de infecção, (figura 29). Entretanto, não se pode observar diferenças significativas na produção de NO, entre as linhagens de *B. tenagophila* e a espécie *B. glabrata*, apesar de uma leve tendência de aumento na espécie *B. glabrata*, principalmente após 1 dia de infecção e na linhagem Taim de *B. tenagophila*. Passados 20 dias de infecção, os níveis de NO, produzidos pelo hemócitos, tendem aos níveis dos hemócitos livres de infecção.

Os dados mostram resultados semelhantes aos que foram apresentados com o SEA, quando se utiliza esporocisto de *S. mansoni* transformados *in vitro* (dados não mostrados).

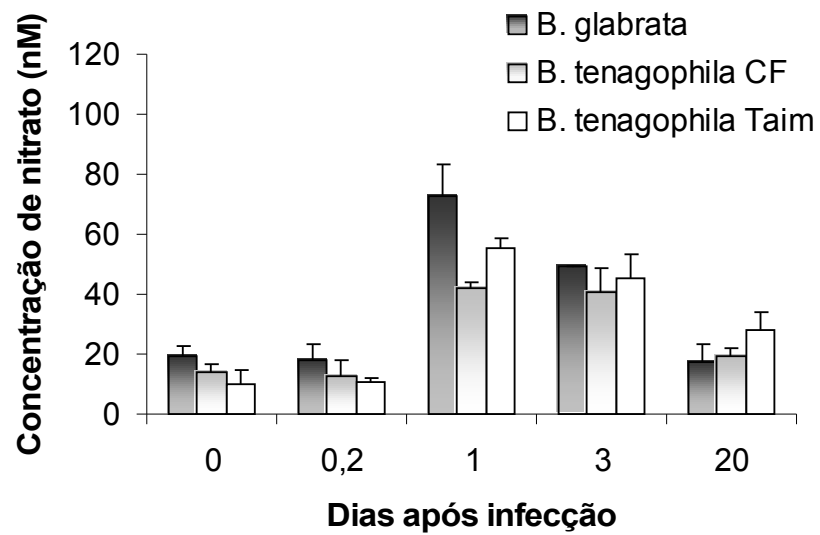


Figura 29: Cinética da produção de Nitrato pelo hemócitos circulantes de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* das linhagens Taim e Cabo Frio, durante a infecção pelo *S. mansoni* sob reestímulo de SEA. \* representa diferenças significativas entre os tempos de infecção.

### 6.3. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que os hemócitos de caramujos *Biomphalaria* são sensíveis tanto aos antígenos solúveis do ovo de *S. mansoni*, quanto ao esporocisto transformado *in vitro*.

Ao contrário do que se esperava, foi observada a produção de NO, tanto em espécies e linhagens suscetíveis ao *S. mansoni*, como é o caso da *B. glabrata* e da linhagem Cabo Frio de *B. tenagophila*, quanto na linhagem resistente: a linhagem Taim de *B. tenagophila*. Esses dados sugerem que a produção de NO não esteja diretamente ligada à resistência ao *S. mansoni*. Hahn et al., (2001) demonstram a presença de diferentes metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio envolvidos no processo de encapsulamento e morte de esporocistos de *S. mansoni* por hemócitos de linhagens resistentes de *B. glabrata*. A ausência de diferenças significativas entre os níveis de NO, produzidos pelo hemócitos de *B. glabrata* e pelas linhagens Cabo Frio e Taim de *B. tenagophila*, poderia ser justificada devido ao fato de, neste estudo, ter se medido apenas os níveis de NO, sendo desconsiderado os ROS.

Os dados aqui apresentados, também sugerem que o período de incubação torna-se importante para a quantificação dos níveis de NO. A partir da cinética da produção de NO, pode-se concluir que 18 horas de incubação dos hemócitos, com seus devidos estímulos, apresenta-se com o melhor período para se realizar a dosagem de NO, uma vez que neste período tem-se uma quantidade considerável de NO, com o mínimo de interferência de contaminação.

Durante as primeiras 24 horas de infecção, a produção de NO pelos hemócitos circulantes apresenta níveis mais elevados. De acordo com a literatura, é neste período que os hemócitos se encontram ativados e migram para o local de penetração do parasito. Segundo

Bayne et al., (1980) o fato de estar ativado não implica na destruição do parasito, o que justificaria a presença de altos níveis de NO na espécie e na linhagem suscetível utilizadas no presente estudo.

Com relação ao tipo de estímulo, no que diz respeito ao tempo de incubação e o período de infecção, os resultados mostram-se semelhantes, tanto com a utilização do antígeno solúvel de ovos, quanto esporocistos transformados *in vitro*.. Apesar disso, os dados mostraram que os esporocistos de *S. mansoni*, estimulam melhor os hemócitos, quando comparado aos antígenos solúveis de ovos (SEA), por apresentarem níveis mais elevados de NO no sobrenadante de cultura. O fato de se utilizar os esporocistos transformados *in vitro*, na incubação com hemócitos circulantes, representa a situação mais próxima da realidade do que acontece durante a infecção *in vivo*, o que justificaria os níveis mais altos de NO na presença de esporocistos.

Os dados obtidos no capítulo 2, sugerem que a quantidade de células aderidas ao tegumento do esporocisto, está diretamente relacionada à taxa de mortalidade dos esporocistos; porém neste capítulo observamos que os maiores níveis de NO foram produzidos pelos hemócitos de *B. glabrata*, e estes por sua vez não aderem ao tegumento do esporocisto. Tal fato reforça a hipótese de que o NO não seja o principal responsável no mecanismo de morte do parasito. Outros fatores podem estar relacionados de uma maneira mais direta, como é o caso dos ROS, peroxinitrito e outros oxidantes superóxidos (Hahn et al., 2001). Além disso, acredita-se que a toxicidade do NO e conseqüente destruição do parasito, seja resultado do balanço entre a produção de ROS e de NO.



## 7. CONCLUSÕES

A população de hemócitos circulantes isoladas de *Biomphalaria* apresenta duas subpopulações, pela análise em citometria de fluxo, que são denominadas hemócitos pequenos e hemócitos grandes. Estas duas populações de hemócitos circulantes são detectadas tanto na espécie *B. glabrata*, quanto nas linhagens Cabo Frio e Taim de *B. tenagophila*. Entretanto, a proporção de hemócitos pequenos e grandes difere significativamente entre *B. glabrata* e *B. tenagophila*.

A infecção pelo *S. mansoni* não acarreta alteração no perfil dos hemócitos circulantes de *B. glabrata*, porém leva as alterações marcantes no perfil de hemócitos circulantes de *B. tenagophila* sendo estas observadas de maneira mais intensa e rápida na linhagem Taim de *B. tenagophila*.

A inoculação de sílica acarreta diminuição da proporção hemócitos pequenos de *B. tenagophila* e esta redução se mantém por 72 h após a infecção pelo *S. mansoni*. Além disso, a inoculação de sílica acarreta alteração na granulosidade dos hemócitos, principalmente na linhagem Taim de *B. tenagophila*.

Os hemócitos circulantes de *B. glabrata* e *B. tenagophila* são especificamente marcados pela lectinas ConA, PNA, SBA e WGA conjugadas com FITC. Porém, a proporção de hemócitos marcados, o tipo celular e a intensidade desta marcação, são diferentes em cada espécie e linhagens testadas. Em *B. tenagophila*, é observada uma maior proporção de células

marcadas por lectinas, sendo detectado marcação intensa em hemócitos pequenos, médios e grandes, especialmente por WGA e PNA.

A infecção pelo *S. mansoni* induz alteração na proporção de células marcadas pelas lectinas. Especificamente, é detectado aumento na proporção de hemócitos circulantes de *B. glabrata* marcados por ConA e WGA, enquanto que, 5 h após a infecção, é observada uma diminuição no número de hemócitos marcados por todas as lectinas testadas (ConA, PNA, SBA e WGA), na linhagem do Taim de *B. tenagophila*. Este período coincide com aquele em que os hemócitos (granulócitos) migraram para o local de penetração do parasito.

Ensaio *in vitro* demonstraram que o nível de adesão dos hemócitos ao tegumento do parasito está associado ao grau de susceptibilidade do molusco. Os maiores índices de adesão celular são observados na linhagem Taim de *B. tenagophila*. A ligação dos hemócitos da linhagem Cabo Frio, ao tegumento de esporocistos de *S. mansoni*, foi potencializada através da adição de carboidratos N-acetilglicosamina e Galactosamina e da fração solúvel da hemolinfa. Já em relação à adesão celular de hemócitos da linhagem do Taim, esta é potencializada em baixas concentrações de carboidratos e inibida nas concentrações mais altas, mesmo na presença da fração solúvel da hemolinfa.

As taxas de mortalidade corroboram com os dados da adesão celular, em que observamos, na linhagem Cabo Frio de *B. tenagophila*, aumento da mortalidade dos esporocistos, quando se adiciona carboidratos e fração solúvel da hemolinfa. Ao passo que na

linhagem Taim, a adição de altas concentrações de carboidratos resulta em redução significativa da taxa de mortalidade dos esporocistos.

Os hemócitos circulantes de *Biomphalaria*, infectados ou não pelo *S. mansoni*, são capazes de produzir NO, na presença de antígenos solúveis de ovos (SEA) de *S. mansoni* ou de esporocistos transformados *in vitro*.

Os resultados obtidos demonstram a importância da interação do componente celular e dos fatores solúveis da hemolinfa na destruição do parasito nas linhagens resistentes.

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDEL-MALEK, E. T. Susceptibility of the *Biomphalaria boissyi* to infection with certain strains of *Schistosoma mansoni*, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30: 887-894, 1950.

ADEMA, C. M. & LOKER, E. S. Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. In: B. FRIED AND T. K. GRACZYK (Eds.). *Advances in trematode biology*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 229-264, 1997a.

ADEMA, C. M., HARRIS R. A. & VAN DEUTEKOM-MULDER, E. C. A comparative study of hemocytes from six different snails: morphology and functional aspects. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 24-32, 1992.

ADEMA, C. M., VAN DER KNAAP. W. P. W. & SMINIA, T. Molluscan haemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Crit. Rev. Aquat. Sci.*, 4: 201-203, 1991.

ADEMA, C. M., VAN DEUTEKOM-MULDER, E. C., VAN DER KNAAP. W. P. W. & SMINIA, T. NADPH-oxidase activity - the probable source of reactive oxygen intermediate generation in hemocytes of the gastropod *Lymnaea stagnalis*. *J. Leukocyte Biol.*, 54: 379-383, 1993.

ADEMA, C. M., VAN DEUTEKOM-MULDER, E. C., VAN DER KNAAP, W. P. W. SMINIA, T. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* hemocytes: role of oxygen radicals. *Parasitology* 109: 479-485, 1994.

ADEMA, C. M.; ARGUELLO, D. F.; STRICKER, S. A. & LOKER, E. S. A time-lapse study of interactions between *Echinostoma paraensei* intramolluscan larval stages and adherent hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Helix aspersa*. *J. Parasitol.*, 80: 719-727, 1997b.

ALLAM B, ASHTON-ALCOX KA, FORD SE. Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs. *Fish Shellfish Immunol.* 13: 141-58, 2002.

AMEN, R. I.; ATEN, J. A.; BAGGEN, J. M. C.; MEULEMAN, E. A.; DE LANGE-DEKLERK, E. S. M. & SMINIA T. *Trichobilharzia ocellata* in *Lymnaea stagnalis*: A flow cytometric approach to study its effects on hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 59: 95-98, 1992.

AMEN, R. I.; TIJNAGEL, J. N.; VAN DER KNAAP, W. P.; MEULEMAN, E. A., de LANGE-DE KLERK, E. S. & SIMINIA, T. Effects of *Trichobilharzia* on hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 15: 105-115, 1991.

ARUMUGAM, M., ROMESTAND, B., TORREILLES, J. & ROCH, P. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. *Eur.J. Cell Biol.*, 79: 513-519, 2000.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 93: 1464-1476, 1999.

- BAKER F. C. General Morphology. In: *The Molluscan Family Planorbidae*. University of Illinois Press, 1945.
- BARRACO, M. A.; STEIL, A. A. & GARGIONI, R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 88: 73-83, 1993.
- BASCH , P. F. Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.*, 39: 150-169, 1976.
- BAYNE, C. J. Molluscan immunobiology. In: , SALEUDDIN, A. S. M. & WILBUR, K. M., (Ed.). *The Mollusca*. New York: Academic Press, 1983. Vol. 5, Physiology, Part 2. p. 407.
- BAYNE, C. J. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *BioScience*, 40: 723-731, 1990.
- BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M. & DEWAN, P. C. Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *J. Parasitol.*, 66: 413-419, 1980a.
- BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M. & DEWAN, P. C. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.*, 50: 409-416, 1980b.
- BAYNE, C. J.; HAHN, U. & BRENDER, R. C. Mechanisms of molluscan host resistant and of parasite strategies for survival. *Parasitol.* 123: 159-167, 2001.
- BAYNE, C. J.; LOKER, E. S.; YUI M. A. & STEPHENS J. A. Immune-recognition of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts may require specific receptors on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Parasitol. Immunol.*, 6: 519-528, 1984.
- BAYNE, C. J. & YOSHINO, T. P. Determinants of compatibility in mollusk-trematode parasitism. *American Zoologist.*, 29: 399-407, 1989.
- BECK, G. & HABICHT, G. S. Isolation and characterization of a primitive IL-1-like protein from invertebrate, *Asterisa forbesi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 7429-7433, 1986.
- BECK, G., O'BRIEN, R. F. & HABICHT, G. S. Invertebrate cytokines: the phylogenetic emergence of interleukin 1. *BioEssays* 11: 62-67, 1989.
- BECK, G., O'BRIEN, R. F., HABICHT, G. S., STILLMAN, D. L., COOPER, E. L. & RAFTOS, D. A. Invertebrate cytokines III: Invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. *Cell. Immunol.*, 146: 284-299, 1993.
- BEZERRA, F. S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M.; MARTINS, R. L. & COELHO, P. M. Z. Quantification of the number and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 39: 197-201, 1997.

BOEHMLER, A. M.; FRYER, S. E. & BAYNE C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by *Biomphalaria glabrata* hemolymph *in vitro*: alteration of hemocyte behavior after poly-L-lysine treatment of plastic and the kinetics of killing by different host strains. *J. Parasitol.*, 82: 332-335, 1996.

BOYER, O. O. M. O. Characterization of immunoreactive TNF $\alpha$  molecules in the gastropod *Biomphalaria glabrata*. *Develop. Comp. Immunol.*, 18: 211-218, 1994.

BROOKS, C. P. A comparative study of *Schistosoma mansoni* in *Tropicorbis glabratus*. *J. Parasitol.*, 39: 159-163, 1953.

BROUSSEAU P, PELLERIN J, MORIN Y, CYR D, BLAKLEY B, BOERMANS H, FOURNIER M. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. *Toxicology.*, 142:145-56, 2000.

BRUMPT, E. Confirmation des observations de A. Lutz sur les lésions tentaculaires de *Planorbis glabratus* (*P. guadelon pensis*) déterminées par l'évolution des miracidies de *S. mansoni*. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 133: 625-628, 1940.

BURKE, R. D. & WATKINS, R. F. Stimulation of starfish coelomocytes by interleukin-1. *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, 180: 579-584, 1991.

CARDENAS W, JENKINS JA, DANKERT JR. A flow cytometric approach to the study of crustacean cellular immunity. *Invertebr Pathol.*, 76:112-119, 2000.

CARDENAS W, DANKERT JR, JENKINS JA. Flow cytometric analysis of crayfish haemocytes activated by lipopolysaccharides. *Fish Shellfish Immunol.* 17:223-233, 2004.

CARVALHO, O. S.; NUNES, I. M. & CALDEIRA, R. L. First report of *Biomphalaria tenagophila* in the State of Rio Grande do Sul, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93: 39-40, 1998.

CASTILLO, M. G. & YOSHINO, T. P. Carbohydrate inhibition of *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell adhesion to primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.*, 125: 513-525, 2002.

CHAIA, G. Técnica para concentração de miracidios. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, 8: 355-357, 1956.

CHERNIN, E. Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snails. *J. Parasitol.*, 56: 287-296. 1970.

CHERNIN, E. Some host-finding attributes of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23: 320-327, 1974.

CHIEFFI, P. P. Susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* de cepas de *Biomphalaria tenagophila* originárias os Estados de São Paulo e Paraná. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 17: 92-96, 1975.

COELHO, M. V. & BARBOSA, F. S. Qualidades de vetor dos hospedeiros de *Schistosoma mansoni* no Nordeste do Brasil. 3 - Duração da infestação e eliminação de cercárias em *Tropicorbis centimetralis*. *Publicações Avulsas do Instituto Aggeu Magalhães*, 5: 21-30, 1956.

COELHO, M. V. Aspectos do desenvolvimento de formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis migrican*. *Rev. Bras. Biol.*, 17: 325-337, 1957.

COELHO, M. V. Suscetibilidade de *Australorbis tenagophilus* à infecção por *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 4: 289-295 1962.

COELHO, P. M. Z. Resistência e suscetibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In: BARBOSA, F. S. *Tópicos em Malacologia Médica*, Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1995. 208-217.

COELHO, P. M.; CARVALHO, O. S.; ANDRADE, Z. A.; MARTINS-SOUSA, R. L.; ROSA, F. M.; BARBOSA, L.; PEREIRA, C. A.; CALDEIRA, R. L.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; GODARD, A. L.; MOREIRA, L. A.; OLIVEIRA, G. C.; FRANCO, G. R.; TELES, H.M. & NEGRAO-CORREA, D. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 99:109-11, 2004.

CONNORS, V. A.; DE BURON, I. & GRANATH, W. O. Jr. *Schistosoma mansoni*: interleukin-1 increases phagocytosis and superoxide production by hemocytes and decreases output of cercariae in schistosome-susceptible *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol* 80: 139-148, 1995.

CONNORS, V. A.; DE BURON, I.; JOURDANE, J.; THERON, A.; AGNER, A. & GRANATH, W. O. Jr. Recombinant human interleukin-1-mediated killing of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts in *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol.* 84: 920-926, 1998.

CONTE, A. & OTTAVIANI, E. Nitric oxide syntetase activity in molluscan hemocytes. *FEBS Letres.*, 365: 120-124, 1995.

CORRÊA, M. C. R.; COELHO, P. M. Z. & FREITAS, J. R. Susceptibilidae de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* – (LE – Belo Horizonte – MG e SJ – São José dos Campos – SP). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 21: 72-76, 1979.

DAVIDS, B. J. & YOSHINO T. P. Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes. *Dev Comp Immunol.* 22:39-53, 1998.

- DIKKEBOOM, R., BAYNE, C. J., VAN DER KNAAP, W. P. W. & TIJNAGEL, J. M. Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitol. Res.*, 75: 148-154, 1988a.
- DIKKEBOOM, R., VAN DER KNAAP, W. P. W., VAN DEN BOVENKAMP, W., TIJNAGEL, J. M. G. H. & BAYNE, C. J. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 509-520, 1988b.
- DIKKEBOOM, R.; TIJNAGEL, J. M. G. H. & van der KNAAP, W. P. W. Monoclonal antibody recognized hemocytes subpopulations in juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*: functional characteristics and binding. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 17-32, 1988c.
- DOUGLAS, J. S.; HUNT, M. D. & SULLIVAN J. T. Effects of *Schistosoma mansoni* infection on phagocytosis and killing of *Proteus vulgaris* in *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *J. Parasitol.*, 79: 280-283, 1993.
- ESPÍNDOLA, K. S.; MACHADO, M. M. & HOFMANN, P. R. Natural and experimental infection of planorbids from the Island of Santa Catarina (Brazil). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.*, 34: 289-294, 1992.
- FAUST, E. C. & HOFFMANN, W. A. Studies on schistosomiasis mansoni in Puerto Rico. I – The extramamalian phases on lyfe-cycle. *Puerto Rico J. Pub. Health Trop. Med.*, 10: 1-47, 1934.
- FILES, V. S. & CRAM, E. B. A study on the comparative susceptibility of snails vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 35: 555-560, 1949.
- FRANCESCHI, C.; COSSARIZZA, A.; MONTI, D. & OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda pulmonata): implications for the evolution of natural killer cells. *Eur J Immunol.* 489-493, 1991.
- FRYER, S. E. & BAYNE, C. J. Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by absorbed plasma components. *Develop. Comp. Immunol.*, 20: 23-337, 1996.
- FRYER, S. E., HULL, C. J. & BAYNE, C. J. Phagocytosis of yeast by *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate specificity of receptors and a plasma opsonin. *Dev. Comp. Immunol.*, 13: 9-16, 1989.
- GOEDKEN M. & De GUISE S. Flow cytometric as tool to quantify oyster defense mechanisms. *Fish Shellfish Immunol.* 16:539-552, 2004.
- GOES, A. M.; ROCHA, R. S.; GAZZINELLI, G. & DOUGHTY, B. L. Production and characterization of human monoclonal antibodies against *Schistosoma mansoni*. *Parasit. Immunol.* 11: 695-711, 1989.



GRAEFF-TEIXEIRA, C.; dos ANJOS, C.B.; de OLIVEIRA, V. C.; VELLOSO, C. F.; da FONSECA, M. B.; VALAR, C.; MORAES, C.; GARRIDO, C. T. & do AMARAL, R.S. Identification of a transmission focus of *Schistosoma mansoni* in the southernmost Brazilian State, Rio Grande do Sul. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 94: 9-10, 1999.

GRANATH, W. O. JR. & YOSHINO T. P. Characterization of molluscan phagocyte subpopulations based on lysosomal enzyme markers. *J. Exp. Zoology*, 205-226, 1983.

GRANATH, W. O. JR. & YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.*, 58: 188-193, 1984.

GRANATH, W. O. JR.; CONNORS, V. A., & TARLETON, R. L. Interleukin-1 activity in hemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: Presence, differential expression, and biological function. *Cytokine*, 6: 21-27, 1994.

GUARALDO, A. M. A.; MAGALHÃES, L. A.; RANGEL, H. A. & PAREJA, G. Evolução dos Esporocistos de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). *Rev. Saúde Pública*, 15: 436-448, 1981.

HAHN, U. K., BENDER, R. C. & BAYNE, C. J. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. *Dev. Comp. Immunol.*, 24: 531-541, 2000.

HAHN, U. K.; BENDER R. C. & BAYNE C. J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol.* 87: 778-785, 2001.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J. & WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil: oxidants myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017, 1998.

HARRIS, K. R. The Fine Structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 266-446, 1975.

HUGHES, T. K. JR., SMITH, E. M., CHIN, R., CADET, P., SINISTERRA, J., LEUNG, M. K., SHIPP, M. A., SCHARRER, B. & STEFANO, G. B. Interaction of immunoreactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusk, *Mytilus edulis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 4426-4429, 1990.

HUGHES, T. K.; SMITH, E. M.; BARNETT, J. A.; CHARLES, R., & STEFANO, G. B. LPS stimulated invertebrate hemocytes: A role for immunoreactive TNF and IL-1. *Develop. Comp. Immunol.*, 15: 117-122, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estimativa de população 1997, (mimeo)/IBGE, Rio de Janeiro, 1997.

- JAROSZESKI, M. J. & RADCLIFF G. Fundamentals of Flow Citometry. *Molecular Biotechnology*. 11: 38-53, 1999.
- JOHNSTON, L. A. & YOSHINO, T. P. Analysis of lectin and snail plasma binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol*: 469-479, 1996.
- JOHNSTON, L. A. & YOSHINO, T. P. Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. *J Parasitol.*, 87: 4 786-793, 2001.
- JOKY, A.; MATRICON-GONDRAN, M. & BENEX, J. Fine structural differences in the Amoebocytes of *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.*, 7: 669-672, 1983.
- JOURDANE, J.; THERON, A. & COMBES, C. Demonstration of several sporocysts generations as a normal pattern of reproduction of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica.*, 37: 177-182, 1980.
- KAGAN, I. G. & GEIGER, S. J. The susceptibility of three strains of *Australorbis glabratus* to *Schistosoma mansoni* from Brazil and Puerto Rico. *J. Parasitol.*, 51: 622-627, 1965
- KLOETZEL, K. Observações sobre o tropismo do miracídio do *Schistosoma mansoni* pelo molusco *Australorbis glabratus*. *Rev. Soc. Bras. Biol.*, 18: 223-232, 1958.
- KUHN K, H. Mitotic activity of the hemocytes in the tick *Ixodes ricinus* (Acari; Ixodidae). *Parasitol Res.* 82:511-517, 1996.
- LIE, K. J.; HEYNEMAN, D. & JEONG, K. H. Studies on resistance in snails. 4. induction of ventricular capsules and changes in ameocyte-producing organ during sensitization of *Biomphalaria glabrata* snails. *J. Parasitol.* 62: 286-291, 1976.
- LIE, K. J., JEONG, K. H. & HEYNEMAN, D. Molluscan host reactions to helminthic infection. In: SOULSBY, E. J. L. *Protozoa, Arthropods and Invertebrates*. Boca Raton, Florida, USA: CRC-Prees INC, 1987. 211-270.
- Lo VERDE, P. T., GHERSON, J. and RICHARDS, C. S. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: fine structure. *Dev. Comp. Immunol.*, 31: 999, 1982.
- LODES, M. J. & YOSHINO, T. P. The effect of Schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocytes motility. *J. Invertebr. Pathol.*, 75-85, 1990.
- LOKER, E. S. On being a parasite in invertebrate host: a short survival course. *J. Parasitol.*, 80: 728-747, 1994.
- LOKER, E. S., BAYNE. C. J. & YUI. M. A. *Echinostoma paraensei*: Hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of echinostome mediated inference with host snail resistance to *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.*, 62: 149-154, 1986.

LOKER, E. S., YUI. M. A. & BAYNE. C. J. *Schistosoma mansoni*: Agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.*, 58: 56-62, 1984.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo observações, feitas no Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 11: 121-155, 1919.

LUTZ, A. Observações sobre a evolução do *S. mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Ciênc.*, 1: 41-48, 1917.

MAKINO, R.; TANAKA, T.; IIZUKA, T.; ISHIMURA, Y. & KANEGASAKI, S. Stoichiometric conversion of oxygen to superoxide anion during the respiratory burst in neutrophils. Direct evidence by a new method for measurement of superoxide anion with diacetyldeuteroheme-substituted horseradish peroxidase. *J Biol Chem*. 261: 1444-1447, 1986.

MALDONADO, J. F. & ACOSTA-MATIENZO, J. Evolution del *Schistosoma mansoni* dentro de su hosped intermediario, el caracol *Australorbis glabratus*. *Puerto Rico J. Pub. Health Trop. Med.*, 22: 374-404, 1947.

MARTINS-SOUZA, R. L. Fatores associados à resistência de *Biomphalaria tenagophila* na infecção por *Schistosoma mansoni*. 1999. 83 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A.; COELHO, P. M. Z. & NEGRÃO-CORRÊA D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. *Parasitol Res* 91: 500-507, 2003.

MARTINS-SOUZA, R. L.; NEGRÃO-CORRÊA, D.; BEZERRA, F. S. M. & COELHO, P. M. Z. Anesthesia of *Biomphalaria spp.* (Mollusca, Gastropoda): Sodium Pentobarbital is the drug of choice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 391-392, 2001.

MATRICON-GONDRAN, M. & LETORCART M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria Glabrata* – I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 74: 224-234, 1999.

McKERRROW, J. H.; JEONG, K. H. & BECKSTEAD J. H. Enzyme histochemical comparison of *Biomphalaria glabrata* amebocytes with human granuloma macrophages. *J. Leukoc Biol.*, 37: 341-347, 1985.

MELO, A. L. & COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, D. P.; MELO, A. LI.; GENARO, O. & LINARDI, P. M. *Parasitologia Humana*. 10ª ed. São Paulo, Atheneu, 174-193, 2002.

MELO, A. L. & PEREIRA, L. H. On the finding of *Biomphalaria tenagophila* naturally infected with *Schistosoma mansoni* in the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 27: 99-101, 1985.

- MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. & CORREA, M. C. R. Sobre o encontro de *Biomphalaria tenagophila* naturalmente infectada com *Schistosoma mansoni* no Município de Jaboticatubas, MG. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, 7, 1982, Porto Alegre. *Anais*: 180.
- MILWARD DE ANDRADE, R. Primeiro encontro de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) no lago da Pampulha, Belo Horizonte, MG. *Cienc. Cult.*, 24: 375, 1972.
- MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; HUBERT, F.; SALZET, M. & ROCH, P. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J Biol Chem.* 275: 12954-12962, 2000.
- MOORE, D. V. & SANDGROUND, J. H. The relative egg producing capacity of *Schistosoma mansoni*, and *Schistosoma japonicum*. *Am. J. Med. Hyg.*, 5: 831-840. 1956.
- NEWTON, W. L. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 38: 362-366, 1952.
- NEWTON, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasitol.*, 2: 242-57, 1953.
- NODA, S. & LOKER, E. S. Phagocytic activity of hemocytes of M-line *Biomphalaria glabrata* snails: effect of exposure to the trematode *Echinostoma paraensei*. *J. Parasitol.*, 75: 261-269, 1989.
- NÚÑEZ, P. E., MOLENAAR, M. J., LAGEWEG, W., LI, K. W. & JONG-BRINK, M. Excretory-secretory products of *Trichobilharzia ocellata* and their modulating effects on the internal defense system of *Lymnaea stagnalis*. *Parasitol*, 114: 135-144, 1997.
- OLIVER, L. & MAO, C. P. The early larval stages of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 in the snail host, *Australorbis glabratus* (Say, 1818). *J. Parasitol.*, 35: 267-275, 1949.
- OTTAVIANI, E. Immunorecognition in the gastropod molluscs with particular reference to the freshwater snail *Planorbis corneus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). *Boll. Zool.*, 59: 129-139, 1992.
- OTTAVIANI, E., FRANCHINI, A., CASSANELLI, S. & GENEDANI, S. Cytokines and invertebrate immune responses. *Biol Cell*, 85: 87-91, 1995.
- OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A. & FRANCESCHI, C. Presence of several cytokine-like molecules in molluscan hemocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 195: 984-988, 1993.
- PAN, C. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis galbratus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 14: 931-976, 1965.
- PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 64: 822-826, 1978.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Probable extension of schistosomiasis to southernmost Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82: 577, 1987.

PARAENSE, W. L. & CORRÊA, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 5: 15-22, 1963.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq. Museu Nacional*, 55: 105-128, 1975.

PARAENSE, W. L. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: *Modernos conhecimentos sobre a esquistossomose mansônica*. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina, 1986, 117-128.

PARAENSE, W. L. Planorbídeos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*. In: AS CUNHA, *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Sarvier & USP, 1970, 13-20.

PARAENSE, W. L. The Schistosome Vectors in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 7-16, 2001.

PARKS, D. R., BRYAN, V. M., OI, V. M., OI, V. T. & HERZENBERG, L. A. Antigen specific identification and cloning of hybridomas with a Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS). *PNAS*, 76: 1962, 1979.

PELLEGRINO, J. & KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Adv. Parasitol.*, 6: 233-290, 1968.

PEREIRA, L. H.; VALADARES, T. E.; da CUNHA, M. L. & CORREA, M. C. Recovery of young daughter sporocysts from snails infected with *Schistosoma mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 78: 563, 1984.

RAFTOS D. A, STILLMAN DL, COOPER EL. In vitro culture of tissue from the tunicate *Styela clava*. *In Vitro Cell Dev Biol.*, 26:962-970, 1990.

RAFTOS, D. A., COOPER, E. L., HABICHT, G. S. & BECK, G. Invertebrate cytokines :Tunicate cell proliferation stimulated by an interleukin-1-like molecule. *Proced. Nat. Acad. Sci. USA*, 88: 9518-9522, 1991.

RAFTOS, D. A., COOPER, E. L., STILLMAN, D. L., HABICHT, G. S. & BECK, G. Invertebrate cytokines II: Release of interleukin-1-like molecules from tunicate hemocytes stimulated with zymosan. *Lymphok. Cytok. Res.*, 11: 235-240, 1992.

RAFTOS D. A, HUTCHINSON A. Cytotoxicity reactions in the solitary tunicate *Styela plicata*. *Dev Comp Immunol.* 19: 463-471, 1995.

RENWRANTZ, L. R. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity, in: LACKIE, A. *Immune Mechanisms in Invertebrate Vectors*, Ed., London: Symposium of the Zoological Society of London, Clarendon Press, Oxford, 1986. 81.

RICHARDS, C. S. & RENWRANTZ, L. R. Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca<sup>2+</sup> dependent, GalNac-specific lectin and a Ca<sup>2+</sup> independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognizes activated homologous opsonins. *J. Comp. Physiol.*, 161: 43, 1991.

RICHARDS, C. S. & SHADE, P. C. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. *Parasitol.*, 73: 1146-1151, 1987.

RICHARDS, C. S. Bulbous head growths of *Biomphalaria glabrata*: genetic studies. *J. Invertebr. Pathol.*, 22: 278-282, 1973.

RICHARDS, C. S. Genetics of the host-parasite relationship between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. Genetics aspects of host-parasite relationships. *Symposia of British Society for Parasitol.*, 14: 45-54, 1976 a.

RICHARDS, C. S. *Schistosoma mansoni*: Susceptibility reversal with age in the snails host *Biomphalaria glabrata*. *Exp. Parasitol.*, 42: 165-168, 1977.

RICHARDS, C. S. Variation in infectivity for *Biomphalaria glabrata* in strains of *Schistosoma mansoni* from the same geographic area. *Bull. WHO*, 54: 706-707, 1976b.

ROSA, F. M., GODARD, A. L., AZEVEDO, V. & COELHO, P. M. *Biomphalaria tenagophila*: dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* in descendants of crossbreedings between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 100:19-23, 2005.

ROWLEY, A. F. The evolution of inflammatory mediators. *Mediators of Inflammation*, 5: 3-13, 1996.

SANTOS, M. B. L.; FREITAS. J. R.; CORREIA, M. C. R. & COELHO, P. M. Z. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RGS, Cabo Frio, RJ, e Belo Horizonte. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 21: 281-286, 1979.

SAPP, K. K. & LOKER, E. S. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: In vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. *J. Parasitol.*, 86: 1020-1029, 2000a.

SAPP, K. K. & LOKER, E. S. Mechanisms underlying digenean-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. *J Parasitol* 86:1012-1019, 2000b.

SCHARRER, B.; PAEMEN, L.; SMITH, E. M.; HUGHES, T. K.; LUI, Y.; POPE, M. & STEFANO, G. B. The presence and effects of mammalian signal molecules in immunocytes of the insect *Leucophaea maderae*. *Cell Tissue Res*. 283: 93-97, 1996.

SCHLENK, D.; MARTINEZ, P. G. & LIVINGSTONE, D. R. Studies on myeloperoxidase activity in the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 99C: 63-68, 1991.

SHOZAWA, A., SUTO, C. & KUNADA, N. Superoxide production by the hemocytes of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*, stimulation by miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Zoolog. Science*, 6: 1019-1022, 1989.

SILVA, R. E. da; MELO, A. L. de & PEREIRA L. H. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* de uma mesma região a duas cepas de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*, 36: 409-415, 1994.

SMINIA, T. Structure and function of blood cells of gastropods, In: *Invertebrate Blood Cell*. Eds. New York : Acad. Press, 1981. 191.

SOUZA, C. P. & LIMA, L. C. *Moluscos de interesse parasitológico do Brasil*. 1ª ed. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa "René Rachou"/Fiocruz, 1990. 76.

SOUZA, C. P., BORGES, C. C.; SANTANA, A. G. & ANDRADE, Z. A. Comparative histology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 92: 517-522, 1997.

SOUZA, C. P., CUNHA, R. C. P. & ANDRADE, Z. A. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 87: 201-206, 1995.

SOUZA, C. P.; ARAUJO, N.; CARVALHO, O. S. & FREITAS, J. R. Potencial of *Biomphalaria tenagophila* from Pampulha lake, Belo Horizonte, MG as lot of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 82: 67-70, 1987.

SOUZA, C. P.; CALDEIRA, R. L; DRUMMOND, S. C.; MELO, A. L.; GUIMARÃES, C. T.; SOARES, D. & CARVALHO, O. Geographical distribution of *Biomphalaria* snails in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 293-302, 2001.

STANDEN, O. D. The effect of temperature, light, and salinity upon the hatching of the ova of *S. mansoni*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 45: 225-241, 1951.

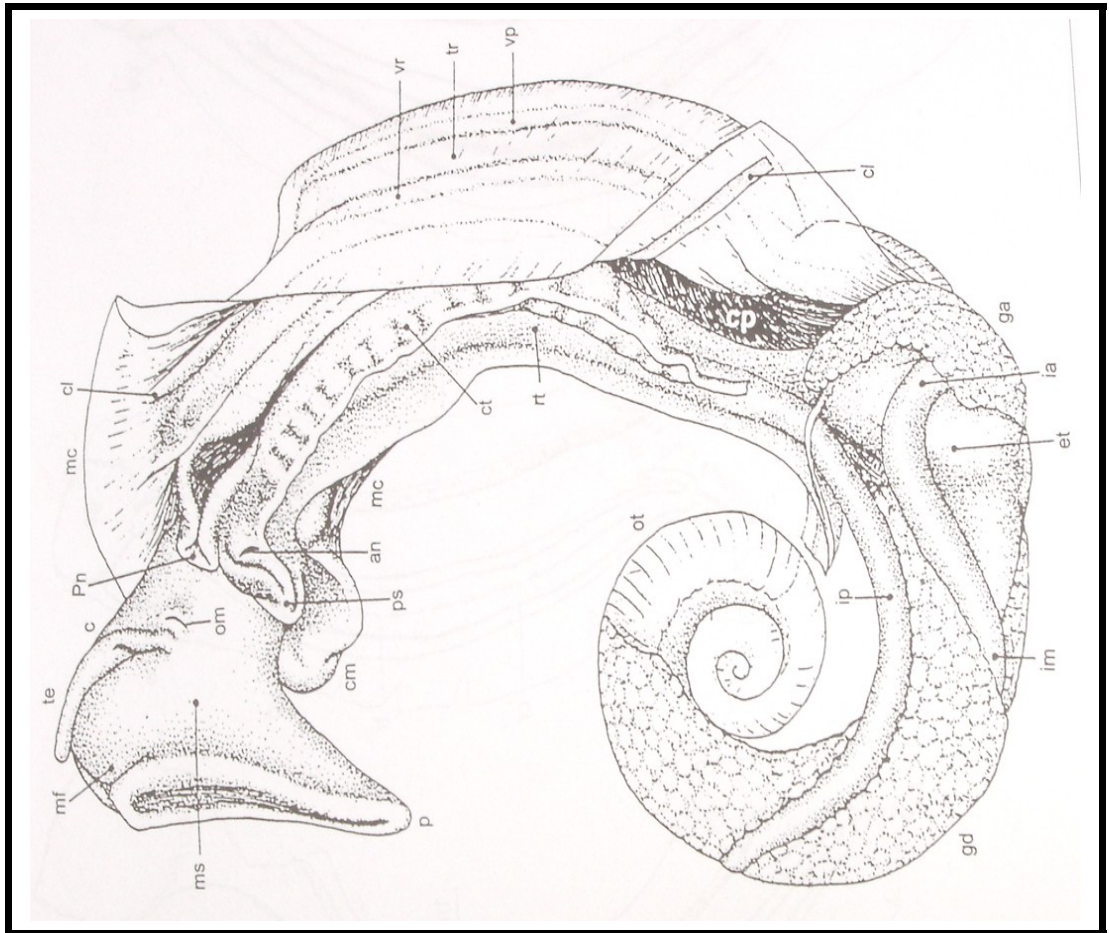
SULLIVAN, J. T.; PIKIOS, S. S. & ALONZO, A. Q. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol.* 90: 92-96, 2004.

SULLIVAN, J. T. & SPENCE, J.V. Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte-producing organ. *J Parasitol.* 80: 449-453, 1994.

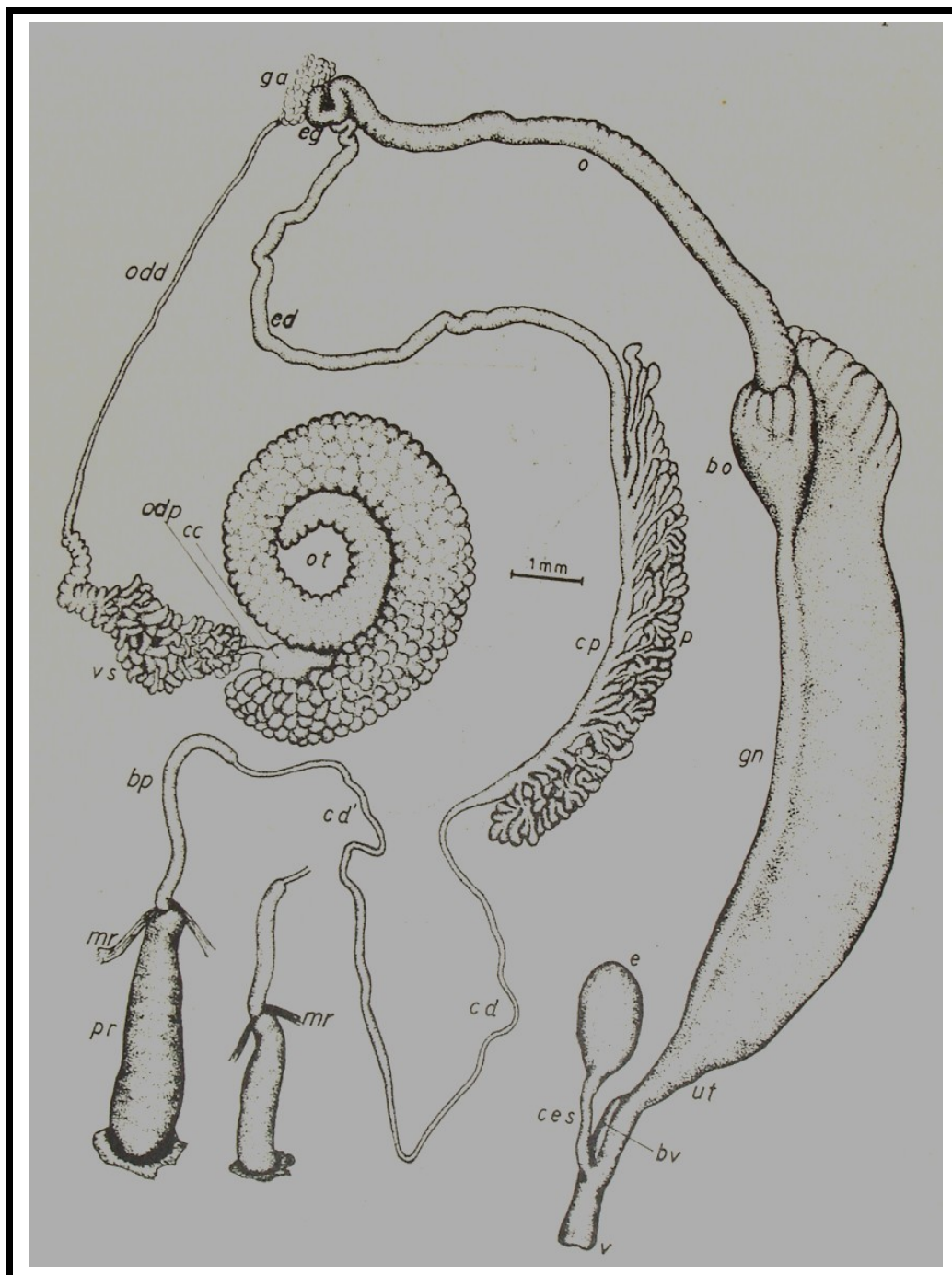
SULLIVAN, J. T.; SPENCE, J. V. & NUNEZ, J. K. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts in *Biomphalaria glabrata* implanted with amoebocyte-producing organ allografts from resistant snails. *J Parasitol.* 81: 829-833, 1995.

- SULLIVAN, J. T. & SPENCE, J. V. Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol.* 85:1065-1071, 1999.
- TIROUVANZIAM R, DAVIDSON CJ, LIPSICK JS, HERZENBERG LA. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) of *Drosophila* hemocytes reveals important functional similarities to mammalian leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 2912-2917, 2004.
- TORREILLES, J. & GUERIN, M. C. Production of peroxynitrite by zymozan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes *in vitro*. *Fish Shellfish Immunol.* 85:1065-1071, 1999.
- TORREILLES, J.; GUERIN, M. C. & ROCH, P. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. *Dev Comp Immunol* 21: 267-275, 1997.
- UCHIKAWA, R. & LOKER, E. S. Lectin-binding properties of surfaces of *in vitro*-transformed *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* sporocysts. *J. Parasitol.* 77, 742-748, 1991.
- VAN DER KNAAP, W. P. W. & LOKER, E. S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitol. Today*, 6: 175-182, 1990.
- VAN DER KNAAP, W. P.; BOERRIGTER BARENDSSEN, L. H.; VAN DER HOEVEN, D. S. & SMINIA, T. Immunocytochemical demonstration of a humoral defense factor in blood cells (Amoebocytes) of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res.*, 219: 291-296, 1981.
- WILLOTT E, TRENCZEK T, THROWER LW, KANOST MR. Immunochemical identification of insect hemocyte populations: monoclonal antibodies distinguish four major hemocyte types in *Manduca sexta*. *Eur. J. Cell. Biol.*, 65:417-23, 1994.
- YOSHINO, T. P. The ultrastructure of circulating hemolymph cells of the marine snail *Cerithidea californica* (Gastropoda: Prosobranchiata), *J. Morphol.*, 150: 148, 1976.
- YOSHINO, T. P. & VASTA, G. R. Parasite-invertebrate host immune interactions. In: *Invertebr. Imm. Responses*, Heidelberg: Springer-Verlag., 2, 1996.
- ZELCK, U. & BECKER, W. Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* Tissue. *J. Invertebr. Pathol.*, 55: 93-99, 1990.
- ZELCK, U. & BECKER, W. *Biomphalaria glabrata*: Influence of calcium, lectins and plasma factors on *in vitro* phagocytic behavior of hemocytes of non infected or *Schistosoma mansoni* infected snails. *Exp. Parasitol.*, 75: 126-136, 1992.

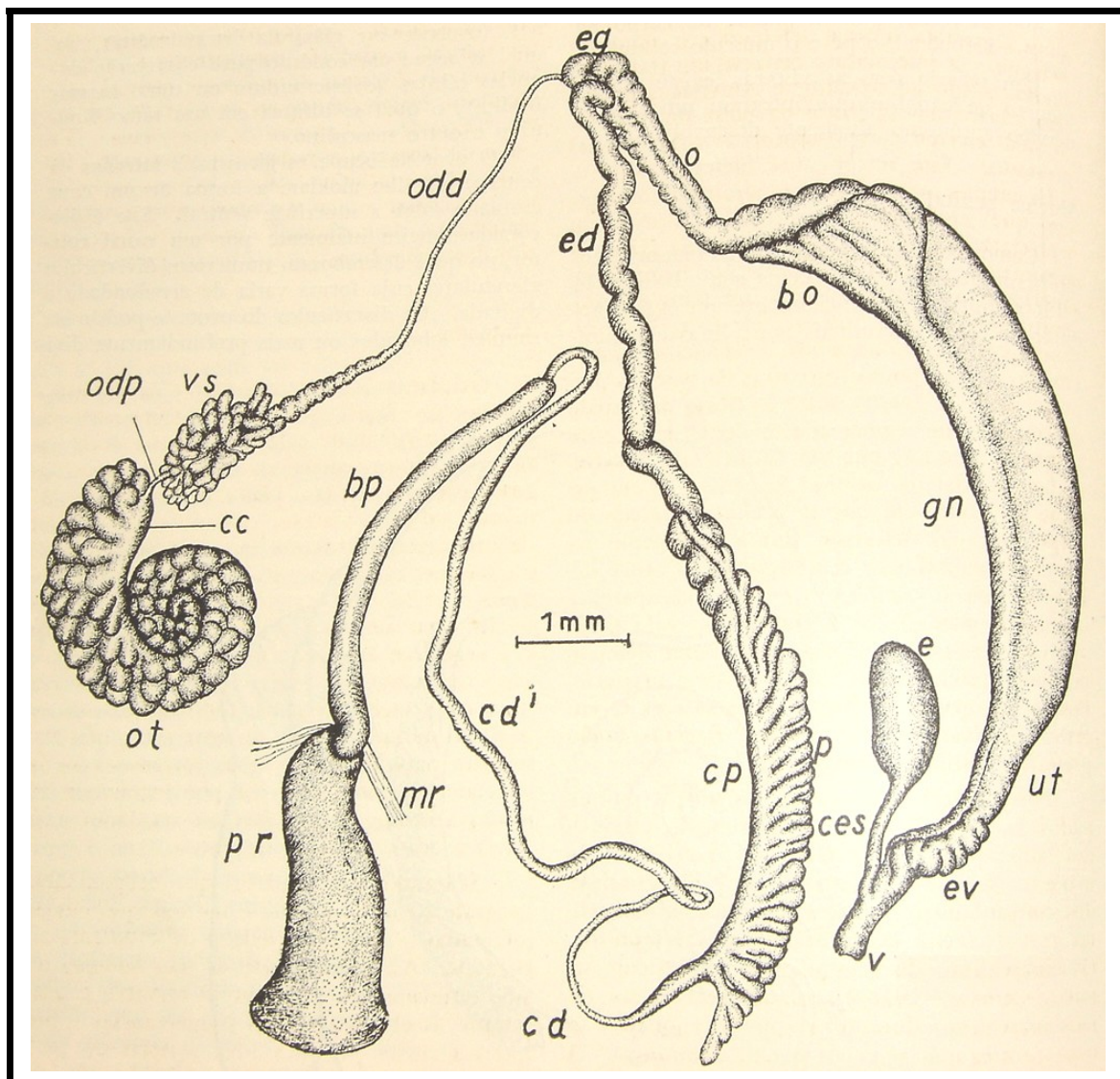




Anexo 1: Parte mole de *Biomphalaria*, vista do lado esquerdo, com manto parcialmente levantado. an: ânus, c: cabeça, cl: crista dorsolateral, cm: colar do manto, cp: cavidade pulmonar, ct: crista retal, et: estômago, ga: glândula de albúmen, gd: glândula digestiva, ia: intestino anterior, im: intestino médio, ip: intestino posterior, mc: músculo columelar, mf: mufla, ms: massa cefalopodal, om: orifício genital masculino, ot: ovoteste, p: pé, pn: pneumóstoma, os: pseudobrânquia, rt: reto, te: tentáculo, tr tubo renal, vp: veia pulmonar, vr veia renal, Fonte: Paraense, 1975.

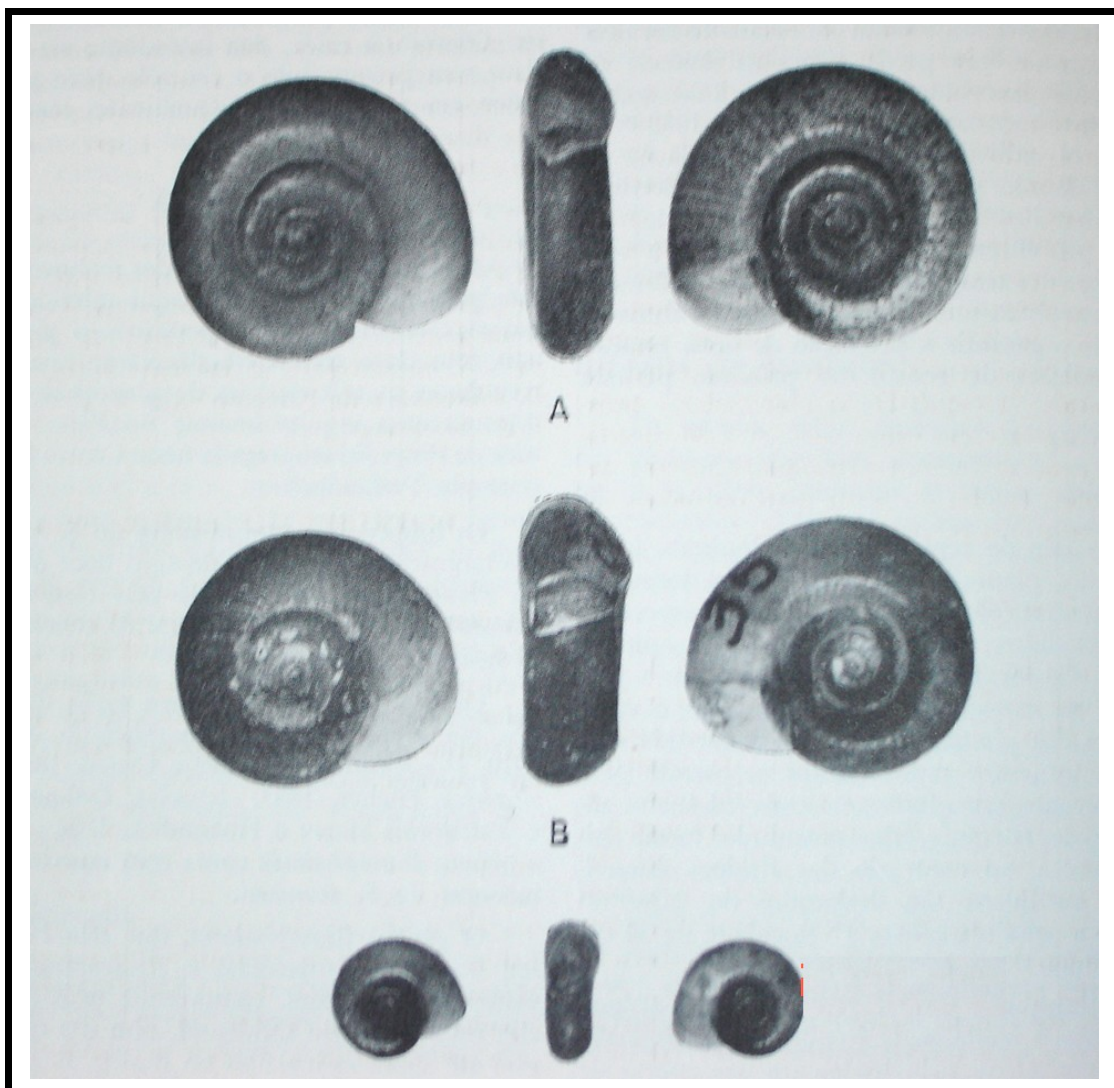


Anexo 2: Sistema genital de *Biomphalaria glabrata*. bo: bolsa do oviduto, bp: bainha do pênis, bv: bolsa vaginal, cc: canal coletor do ovoteste, cd: segmento proximal do canal deferente, cd': segmento distal do canal deferente, ces: canal da espermateca, cp: canal prostático, e: espermateca, ed: espermiduto, eg: encruzilhada genital, ga: glândula do albúmen, gn: glândula nidamental, mr: músculo retrator complexo peniano, o: oviduto, odd: segmento distal do ovispermiduto, ot: ovoteste, p: próstata, pr: prepúcio, ut: útero, v: vagina, vs: vesícula seminal. Fonte: Cunha, 1970.

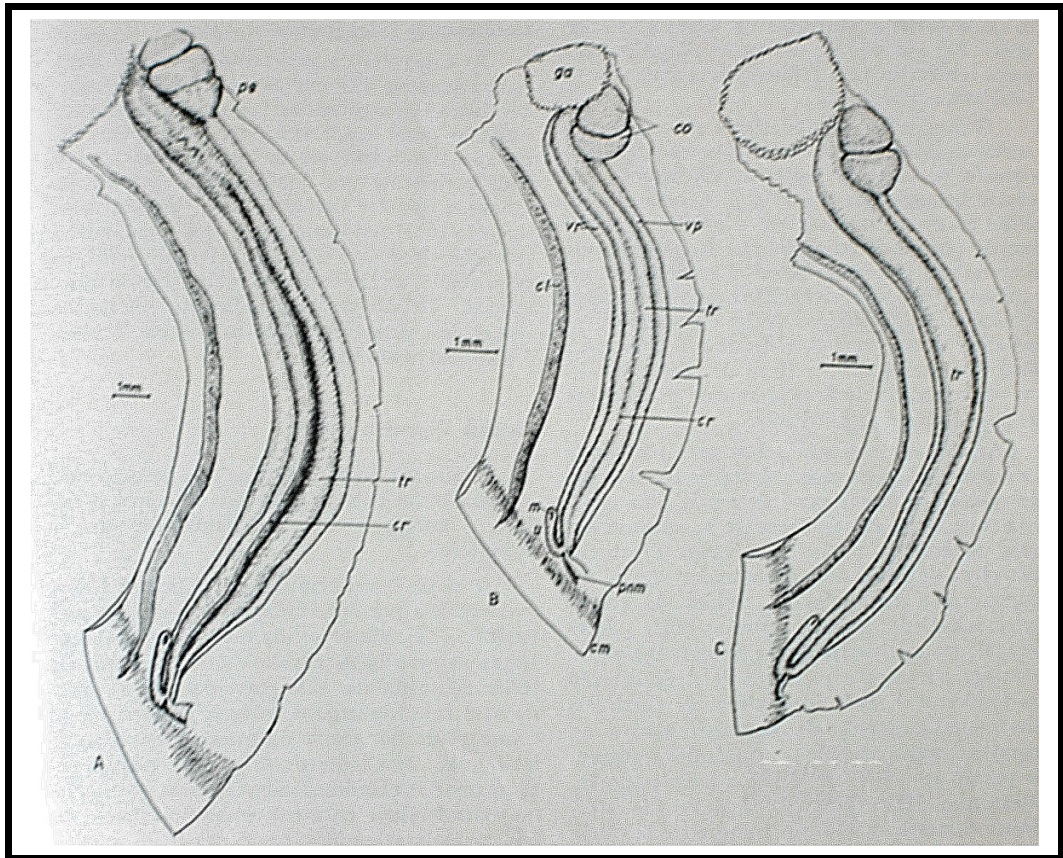


Anexo 3: Sistema genital de *Biomphalaria straminea*. ev: enrugamento vaginal; outras abreviaturas como no anexo 2. Fonte: Cunha, 1970





Anexo 4: Conchas de *Biomphalaria glabrata* (A), *B. tenagophila* (B) e *B. straminea* (C). (x2). Fonte: Cunha, 1970



Anexo 5: Órgãos do manto de *Biomphalaria*, situados no teto da cavidade pulmonar. Em A, aparece a crista renal pigmentada (cr) de *B. glabrata* adulta; em B, a linha pigmentada (cr) no lugar da futura crista em *B. glabrata* jovem com 9mm de diâmetro; em C o tubo renal liso de *B. straminea* adulta. O mesmo aspecto liso e escassamente pigmentado observa-se nas outras espécies de *Biomphalaria*. cl: crista lateral no manto, cm: colar ou borda do manto, co: coração, cr: crista renal ou linha pigmentada, ga: glândula do albúmen, m: meato do ureter, pe: pericárdio parcialmente retirado, pn: pneumóstoma, tr: tubo renal, u:ureter, vp:veia pulmonar vr: veia renal. Fonte: Paraense, 1970



Anexo 6: Distribuição geográfica de caramujos *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* no continente sul americano. Fonte: Paraense, 2001