

LUCIENE BARBOSA

CULTIVO PRIMÁRIO DO ÓRGÃO HEMATOPOIÉTICO
DE MOLUSCOS DO GÊNERO *Biomphalaria* :
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL
DAS CÉLULAS

2007

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ALUNA: LUCIENE BARBOSA

ORIENTADOR: DR. PAULO MARCOS ZECH COELHO

CO-ORIENTADORA: DR^A CONSUELO LATORRE FORTES-DIAS

COLABORADORA: MS. LUCIANA MARIA SILVA

Ao Dicélio,

pessoa iluminada,luz do meu caminho...

“Eu sei que as coisas mais importantes da vida não podem ser compradas, como o amor, a amizade e pequenos gestos de carinho compartilhados por duas pessoas.”

Faço- lhe uma promessa a de transformar nossos dias em momentos para serem Eternamente lembrados! Amo você.

Ao Guilherme e Beatriz, razão do meu viver, amo vocês.

A minha mãe, Arlete, pelo exemplo de vida, carinho e ajuda constante.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade da vida !!!!!

Ao Paulo Marcos Zech Coelho, pela orientação, paciência, tolerância, amizade, afeto e, principalmente, pela compreensão nos momentos difíceis. Desculpe-me se em algum momento te decepcionei, e se o fiz, não foi minha intenção, espero continuar contando sempre com você.....

À Consuelo Latorre Fortes-Dias, minha querida co-orientadora, pessoa maravilhosa que o destino colocou em meu caminho, obrigada pela preciosa ajuda ao trabalho e também pelo ouvido amigo nas horas difíceis....

À Luciana Maria Silva, por ter me recebido de portas e coração abertos, pelo otimismo e confiança, pelo apoio nos momentos mais difíceis, não do trabalho, mas da vida. Você mora no meu coração, muito obrigada! Não tenho palavras para lhe agradecer.

À Márcia Hermógenes, por estar sempre ao meu lado, na alegria, na tristeza e principalmente por compartilhar pequenos e grandes momentos comigo. Você é uma pessoa iluminada, amiga e com um coração tamanho família.

À Ana Carolina Mattos, colega que se tornou amiga, os momentos em que convivemos foram sempre repletos de alegrias, sorrisos e às vezes de lágrimas. Nunca te esquecerei, obrigada pelo carinho e pela ajuda, continue assim...

Ao Paulo Pimenta, pela valiosa colaboração.

Aos colegas do laboratório de Cultivo Celular: Ana Carolina, Flávio, Telma, Raul, Ronan, Rafael, Gisele, Fernanda, Laila, obrigada pelas horas agradáveis que passamos juntos, foi muito bom trabalhar com vocês!

Aos colegas do laboratório de Esquistossomose: Ana Karine, Daniela, Suedale, Vanessa, Áureo, Vanda, Neuza, pelo carinho que sempre me receberam e pela agradável convivência

Aos colegas do laboratório de Entomologia Médica, em especial, á Tati, Cris, Gustavo e Érica, muito obrigada pela paciência e presteza

À Rosilene Siray Bicalho, longe dos olhos mas sempre perto do meu coração,obrigada por tudo, e principalmente por ter acreditado na minha capacidade...

À Dília, Delza e Sueleny, pela boa vontade incondicional em me fornecer os caramujos, vocês são valiosas!

Aos funcionários do GIDE, pelo carinho constante: Alberto, José Carlos, Airton, Selma, Florence.

Ao Roney Elias, muito obrigada pela boa vontade demonstrada em todos os momentos.

Aos meus amigos: Cláudio, Jussara, Giovana, Guilherme, Iara, Janet, Carlos Alberto, Odília, obrigada por vocês fazerem parte da minha história e sempre torceram por mim!!!

Ao saudoso professor Hélio Martins de Araújo Costa (*in memoriam*) pela primeira oportunidade, pessoa digna, sempre que me recordo do senhor, a saudade e as lágrimas me vêm aos olhos, pessoas como o senhor jamais deveriam partir, o senhor tem cadeira cativa no meu coração!!!!

À secretária da Pós-Graduação, Sumara pela ajuda constante.

Aqueles, que por inveja,tentaram a todo custo me prejudicar,eu me tornei mais forte com isso e como diz um sábio pensamento: “ter problemas na vida é inevitável; ser derrotado por eles é opcional.” Eu venci !!!!

Finalmente, gostaria de agradecer a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, por terem compartilhado lágrimas sorrisos, palavras amigas alegrias e tristezas. Muito obrigada! ! !

“feliz é aquele que ensina o que sabe e aprende o que ensina...”

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVO GERAL	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. CARAMUJOS UTILIZADOS.....	33
4.2. PARASITO	34
4.3. INFECÇÃO DOS CARAMUJOS	34
4.4. CULTIVOS PRIMÁRIOS.....	35
4.5. MATERIAIS	35
4.6. UTILIZAÇÃO DO MEBENDAZOL	36
4.7. OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA HEMOLINFA DE <i>BIOMPHALARIA</i>	36
4.8. COLORAÇÃO POR AZUL DE METILENO	36
4.9. ANÁLISE CELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL UTILIZANDO LECTINAS CONJUGADAS COM FITC	37
4.10. OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE OVOS (SEA)	38
4.11. OBTENÇÃO E TRANSFORMAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE MIRACÍDIOS EM ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS	38
5. RESULTADOS	42
5.1. CULTIVO CELULAR	42
5.2. TIPOS CELULARES EM CULTURA.....	43
<i>B.glabrata</i>	43
<i>B. tenagophila do Taim e de Cabo Frio</i>	47
5.3. COMPORTAMENTO CELULAR EM CONTATO COM ANTÍGENOS DIVERSOS.....	48
<i>B.glabrata</i>	48
<i>B. tenagophila</i>	51
5.4. COMPORTAMENTO CELULAR EM CONTATO COM ESPOROCISTOS	54
<i>B. glabrata</i>	54
<i>B. tenagophila Taim</i>	57
<i>B. tenagophila Cabo Frio</i>	61

5.5. COMPORTAMENTO CELULAR EM CONTATO COM MIRACÍDIOS	63
<i>Experimento realizado com caramujos B. tenagophila do Taim e Cabo Frio e B. glabrata</i>	63
5.6. ANÁLISE DAS CÉLULAS ATRAVÉS MICROSCOPIA CONFOCAL UTILIZANDO LECTINAS CONJUGADAS COM FITC	63
WGA.....	63
<i>B. glabrata</i>	63
<i>B. tenagophila</i> Taim	64
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio.....	64
PNA.....	66
<i>B. glabrata</i>	66
<i>B. tenagophila</i> Taim	66
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio.....	66
LPL.....	68
<i>B. glabrata</i>	68
<i>B. tenagophila</i> Taim	68
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio.....	68
Con A.....	70
<i>B. glabrata</i>	70
<i>B. tenagophila</i> Taim	70
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio.....	70
Lyso Tracker.....	72
<i>B. glabrata</i>	72
<i>B. tenagophila</i> Taim	72
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio.....	72
Controle.....	74
<i>B. glabrata</i>	74
<i>B. tenagophila</i> Taim	74
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio.....	74
Aspecto Geral.....	76
<i>B. glabrata</i>	76
<i>B. tenagophila</i> Taim	76
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

Lista de Abreviaturas

APO	órgão produtor de amebócitos
VLS	Vitelo de desova de caramujo
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
PBS	Solução Salina
PBT	PBS/ Triton
BABB	Benzil álcool / benzilbenzoato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra acético
SEA	Antígeno Solúvel do Ovo
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
CON A	Concanavalin A, extraída de <i>Canavalia ensiformis</i> (Jack Bean)
PNA	Peanut agglutinin, aglutinina de <i>Arachis hypogaea</i>
WGA	Wheat germ, aglutinina de <i>Triticum vulgare</i>
LPL	Horseshoe crab, aglutinina de <i>Limulus polyphemus</i>

Resumo

Pela primeira vez conseguiu-se o cultivo primário do órgão hematopoiético de caramujos do gênero *Biomphalaria*

O objetivo geral desse trabalho foi obter cultura primária de células do órgão hematopoiético (APO) de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* (linhagens Cabo Frio, suscetível e Taim resistente ao *Schistosoma. mansoni*) e caracterizá-las funcional e morfológicamente. A cultura primária de tecido hematopoiético de *Biomphalaria* é original e através desta será possível obter as células hematopoiéticas em grandes quantidades e em meio definido. Esta nova metodologia permitirá estudar a morfogênese destas células, sua ultraestrutura, composição e comportamento frente a vários estímulos, inclusive frente a esporocistos.

Três tipos celulares morfológicamente distintos, nomeados de tipo I, II e III, cresceram na cultura. As células tipo I que predominam na cultura celular, são arredondadas com núcleo grande para o tamanho do citoplasma. As células tipo II possuem relativamente mais citoplasma que o tipo I. A presença de pseudópodes, também foi observada. O último tipo celular, denominado tipo III são refringentes e com núcleo não definido e menos abundante, inicialmente, que as outras. Divisão celular atípica foi observada, com núcleo duplicando sem citocinese.

Nas culturas realizadas com APO de caramujos infectados (após 24 horas de infecção) encontramos os mesmos tipos celulares encontrados nas culturas de APO sem infecção, ou seja, tipos I, II e III. Não observamos nada de diferente em relação às culturas de caramujos não infectados.

Em todos os experimentos em que as células da cultura foram colocadas em contato com Zimosan foi observado a dispersão das células em direção a essas partículas.

Em contato com LPS, foi observada com 72 horas nas culturas a presença de um envoltório celular que se assemelha a uma cápsula e células tipo III. As células de *B.tenagophila* de Cabo Frio apresentaram uma melhor resposta ao antígeno. Um fato interessante observado em todas as culturas realizadas com caramujos do gênero *Biomphalaria* foi a transformação das células tipo I em células tipo III, com 7 dias ou mais. Entretanto, quando as células da cultura foram

colocadas em contato com SEA ou LPS, as células tipo III surgem em 48 ou 72 horas respectivamente.

Não houve alterações celulares frente a miracídios, com todas as linhagens testadas. Fato que permite a inferência que os miracídios, ao contrário dos esporocistos não estimulam as células hemocitárias.

As células de todas as espécies estudadas foram positivas para as lectinas WGA, LPL, PNA. *B. glabrata* não teve células positivas para Con A, entretanto as duas linhagens de *B. tenagophila* estudadas apresentaram positividade para esta lectina.

Nas células de todas as linhagens estudadas foi possível a marcação de lisossomos.

Abstract

Primary culture of the hematopoietic organ from *Biomphalaria* snails was obtained for the first time.

The aim of this study was to perform primary culture of cells originating from the hematopoietic organ (APO) of *B. glabrata* and *B. tenagophila* snails (susceptible and resistant strains to *S. mansoni*, from Cabo Frio and Taim, respectively), as well as their functional and morphological characterization. The primary culture of the hematopoietic tissue from *Biomphalaria* snails is original, and by means of this culture it will be possible to obtain hematopoietic cells in mass scale, and in a defined culture medium. This new methodology will allow the study on the morphogenesis of these cells, their ultrastructure, composition and behavior in the presence of various stimuli, including sporocysts.

Three morphologically distinct cellular types, denominated types I, II and III, were developed into the culture medium. The cells type I, which were predominant in the cellular culture, are round shape and present a large nucleus in relation to the cytoplasm size. The cells type II are relatively endowed with a larger cytoplasm than the cells type I. The presence of pseudopodes was also observed. The last cellular type, denominated type III, was found to be refringent, and with an undefined and less abundant nucleus than the other ones, initially. Atypical cellular division was observed, with a duplicated nucleus without cytokinesis.

In the cultures carried out with APO from infected snails (24 h after infection), we were able to detect the same cellular types found in cultures performed with APO without infection, that is, types I, II and III. No difference could be observed in relation to the other cultures with uninfected snails.

In all the experiments in which the culture cells were put in contact with Zymosan, we were able to observe migration of the cells in direction of these particles.

When in contact with LPS, after 72 h it could be observed the presence of a cellular mantle that was similar to a capsule and type III cells. The cells from *B. tenagophila* Cabo Frio presented a better response to antigen. An interesting fact observed in all the cultures carried out with *Biomphalaria* snails was the

transformation of type I cells into type III cells, after 7 days or more. Nevertheless, when the culture cells are put into contact with SEA or LPS, type III cells appear after 48 or 72 h, respectively.

As far as miracidia were concerned, there were no cellular changes in all the tested lineages. This fact allows the inference that miracidia, differently from sporocysts, do not stimulate the hemocytary cells.

The cells related to all the studied species were positive for lectines WGA, LPL, and PNA. *B. glabrata* did not show positive cells for Con A, however, the two studied *B. tenagophila* lineages presented positivity related to this lectin.

It was possible to perform labelling of lysosomes in all the studied lineages.

1. Introdução

As esquistossomoses são causadas por helmintos trematódeos, digenéticos pertencentes ao gênero *Schistosoma* e são endêmicas em 76 países e territórios distribuídos pela África, Ásia e Américas (Engels *et al.*, 2002). As espécies de *Schistosoma*, que têm importância epidemiológica humana são: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852); *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904); *Schistosoma mekongi* (Voge, Brickner & Bruce, 1978); *Schistosoma intercalatum* (Fischer, 1934); *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907). Essas espécies chegaram às Américas durante o tráfico de escravos e com imigrantes orientais e asiáticos (nos quais foram detectados numerosos indivíduos parasitados pelo *S. haematobium* e *S. japonicum*), mas apenas o *S. mansoni* se instalou no Brasil, devido às condições propícias tais como a presença de hospedeiros intermediários adequados e condições ambientais semelhantes às da região de origem (Melo & Coelho, 2005). A necessidade e as condições de trabalho dos escravos nas plantações de cana-de-açúcar e posteriormente nas minas de ouro e diamante explicam, em grande parte, o processo de expansão da esquistossomose mansoni no Brasil. A falta de condições mínimas de higiene, o hábito de defecar próximo aos rios e riachos e a existência de instalações sanitárias com descarga direta em coleções aquáticas, associados à presença de caramujos suscetíveis à infecção criaram condições necessárias para que os parasitos transportados pelos escravos pudessem se reproduzir.

O *S. mansoni* é transmitido ao homem através do contato com águas infestadas por cercárias provenientes de caramujos infectados. Os vermes adultos se localizam no sistema vascular visceral de mamíferos, causando uma doença crônica e debilitante denominada esquistossomose mansoni. Essa doença é endêmica em 54 países localizados na América do Sul, Caribe, África e região

oriental do Mediterrâneo (Chitsulo *et al.*, 2000) e afeta cerca de 83 milhões de pessoas (Crompton, 1999) constituindo-se, assim, em um grande problema de saúde pública. A esquistossomose mansoni está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico, que gera falta de saneamento básico e a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalhos domésticos e/ou lazer (Katz & Peixoto, 2000). No Brasil estima-se que oito milhões de pessoas estejam infectadas e que trinta milhões estejam expostas ao risco da infecção, por residirem em regiões nas quais a transmissão ocorre (Katz, 1997).

Apesar dos avanços obtidos em relação aos métodos de controle, diminuindo a prevalência e morbidade, principalmente, pela quimioterapia em larga escala, a esquistossomose continua se expandindo, pelo deslocamento humano à procura de melhores fontes de trabalho, construção de barragens e implementação de sistemas de irrigação (Barreto, 1967; Magalhães *et al.*, 1973; Barbosa, 1986). Marques (1979) ressaltou a importância das migrações internas de portadores de esquistossomose, que contribuem para a instalação de novos focos estáveis da parasitose ou para a ocorrência de transmissão ocasional em certas localidades do nosso país, dependentes da existência de hospedeiros intermediários suscetíveis.

As áreas endêmicas no país localizam-se nos estados do Maranhão, Pará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Santa Catarina, Rio de Janeiro e mais recentemente no Rio Grande do Sul (Esteio). Em Minas Gerais, as áreas endêmicas estão localizadas no Norte de Minas, Campo das Vertentes, Oeste de Minas, Jequitinhonha, Vale do Mucuri, Vale do Rio Doce, Zona da Mata, e Região metropolitana de Belo Horizonte (Souza *et al.*, 2001).

O parasito necessita como hospedeiros intermediários de caramujos do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910) (Mollusca: Pulmonata, Planorbidae). No Brasil já foram descritas dez espécies e uma sub-espécie desse gênero. São elas: *B. glabrata* (Say, 1818); *B. tenagophila* (Orbigny, 1835); *B. straminea* (Dunker, 1848); *B. peregrina* (Orbigny, 1835); *B. schrammi* (Crosse, 1864); *B. kuhniana* (Clessin, 1883); *B. intermedia* (Paraense & Deslandes, 1962); *B. amazonica* (Paraense, 1966); *B. oligoza* (Paraense, 1974); *B. occidentalis* (Paraense, 1981) e *B. t. guaibensis* (Paraense, 1984). Somente as espécies *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* foram encontradas naturalmente infectadas e, portanto, consideradas transmissoras da esquistossomose mansoni no Brasil. As espécies *B. amazonica* (Paraense & Correa, 1985 e Correa & Paraense, 1971) e *B. peregrina* (Paraense & Correa, 1973), por terem sido infectadas experimentalmente, podem ser consideradas transmissoras em potencial desta doença.

B. glabrata é o mais importante hospedeiro intermediário do *S. mansoni*, ocorrendo em grande parte do território nacional, sendo que sua presença sempre coincide com a transmissão da esquistossomose (Paraense & Corrêa, 1963). Além disso, essa espécie já foi encontrada em ambientes naturais com taxas de positividade superiores a 80% (Coelho, 1995). Sua distribuição geográfica ocorre em faixa contínua abrangendo os Estados brasileiros situados entre Rio Grande do Norte e o Paraná, estando presente em algumas áreas do Pará, Maranhão, Piauí e, recentemente, em Esteio, RS (Carvalho *et al.*, 1998). É a espécie mais suscetível, apresentando altos níveis de infecção, tanto experimental como natural (Paraense & Corrêa, 1963) e se infecta com todas as linhagens geográficas de *S. mansoni*. Paraense (2001), mostrou a progressão dessa espécie do estado do Paraná em direção à fronteira com o Paraguai.

B. straminea é encontrada em quase todas as bacias hidrográficas do Brasil. É a espécie predominante no nordeste do país (Paraense, 1986; Paraense & Corrêa, 1989), sendo responsável por focos no Pará (Paraense *et al.*, 1984) e em Goiás (Goiânia) (Melo & Coelho, 2005). É a única transmissora da doença no Estado do Ceará (Souza & Lima, 1997). Apesar de apresentar taxas muito baixas de infecção natural, a densidade de *B. straminea* nos criadouros da região Nordeste é alta (Souza & Lima, 1997). Outro aspecto relevante é a alta especificidade dessa espécie no que concerne à relação parasito-hospedeiro, só se infectando com as cepas locais de *S. mansoni*.

B. tenagophila é encontrada, no Brasil, desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Paraense, 1970). Fora do país, na Argentina, Peru, Bolívia, Paraguai e Uruguai (Paraense, 2001). No Estado de Minas Gerais foram registrados exemplares infectados nas cidades de Jaboticatubas (Melo & Pereira, 1985), Itajubá (Souza & Lima, 1997) e na lagoa da Pampulha, em Belo Horizonte (Milward de Andrade, 1972). Além disso, essa espécie é responsável pela transmissão da doença em extensas áreas do Estado de São Paulo, tais como o vale do Paraíba e Tietê, sendo, também, encontrada naturalmente infectada em Cubatão (Ramos *et al.*, 1967), além de ser a única transmissora de um foco descoberto em São Francisco do Sul, no Estado de Santa Catarina (Bernardini & Machado, 1981).

Paraense & Corrêa (1987) ressaltaram a forma lenta, mas constante, pela qual a esquistossomose vem se expandindo no Brasil em todas as direções, principalmente nas regiões sudeste e sul e chamam atenção para o papel importante da *B. tenagophila* como vetora nestas regiões.

B. tenagophila apresenta grau variado de resistência à infecção por *S. mansoni*, sendo encontradas tanto linhagens altamente suscetíveis como totalmente resistentes (Coelho, 1995). Essa espécie apresenta também o notável fenômeno da adaptabilidade entre linhagens geográficas do caramujo e linhagens geográficas do *S. mansoni* (Corrêa *et al.*, 1979). Segundo Abdel-Malek (1950), em uma área endêmica podemos ter caramujos fisiologicamente distintos e estes caramujos podem não vir a transmitir a esquistossomose, mostrando a importância do processo de adaptabilidade do *S. mansoni* à linhagem local e vice-versa. Verifica-se, ainda, que, quando comparada à *B. glabrata* as taxas de infecção natural e sob condições laboratoriais de *B. tenagophila* são menores (Newton, 1953; Richards & Merrit, 1972).

Estudos realizados com *B. tenagophila* e *B. glabrata* têm demonstrado que nos exemplares suscetíveis à infecção os esporocistos desenvolvem-se com pouca reação tecidual do molusco. Por outro lado, em caramujos resistentes, a destruição dos parasitos está freqüentemente associada ao encapsulamento do organismo invasor por hemócitos (amebócitos) (Maldonado & Acosta-Matienzo, 1947; Files & Cram, 1949; Newton, 1952 e 1954; Brooks, 1953; Coelho, 1954, 1957, 1962; Tripp, 1961, 1970, 1974; Cheng & Snyder, 1962; Pan, 1963, 1965).

Sabe-se hoje que a suscetibilidade dos moluscos ao *S. mansoni* pode variar entre áreas geográficas, entre populações de uma mesma área, entre indivíduos de uma mesma população em moluscos de diferentes idades e frente a diferentes cepas geográficas do parasito (Richards, 1976, 1977, Richards & Shade, 1987).

A primeira evidência de que a suscetibilidade dos moluscos ao *S. mansoni* é condicionada por fatores genéticos, bem como por características etárias,

foi descrita por Newton (1953), trabalhando com *B. glabrata*. Richards (1973) confirmou os resultados de Newton (1953) ao demonstrar a possibilidade de caramujos jovens suscetíveis tornarem-se resistentes quando adultos. Richards & Merritt (1972), usando a mesma linhagem de caramujos utilizada por Newton (1953), concluíram que a suscetibilidade do molusco jovem é controlada por um conjunto de quatro ou mais caracteres, assinalando a presença de genes que condicionam a resistência também nos exemplares suscetíveis. Bastos *et al.* (1984), através da análise da relação parasito-hospedeiro, admitiram que o padrão genético do molusco é o fator de maior influência na suscetibilidade desses animais. Recentemente, Rosa *et al.* (2005) apresentaram fortes evidências que o caráter de resistência em *B. tenagophila* é determinado por dois genes, um deles dominante.

A necessidade de adaptação entre o molusco e o parasito foi demonstrada por Paraense & Corrêa (1963), constatando-se que as linhagens de *S. mansoni* isoladas de *B. glabrata* de Minas Gerais e aquelas isoladas de *B. tenagophila* de São Paulo apresentaram resistência cruzada. Com base neste fato, os autores demonstraram a existência de duas linhagens de *S. mansoni*: uma de Belo Horizonte (LE), adaptada à *B. glabrata*, e outra de São José dos Campos (SJ), adaptada à *B. tenagophila*. Os autores levantaram a hipótese de que para cada espécie de hospedeiro, o índice de infecção seria condicionado pela variação na frequência de genes responsáveis pela suscetibilidade e resistência, presentes em uma determinada população de molusco.

Os mecanismos ligados à resistência de *Biomphalaria* contra *S. mansoni* são complexos e necessitam de estudos mais aprofundados. Entretanto, alguns aspectos desses mecanismos já foram elucidados. Assim, Fryer & Bayne (1990), mostraram que substâncias provenientes do miracídio alteram a ação fagocitária dos

hemócitos de caramujos suscetíveis e resistentes. Esses autores mostraram, ainda, que hemócitos de *B. glabrata*, após três horas de infecção com miracídios de *S. mansoni* apresentavam capacidade fagocitária alterada. Os hemócitos de linhagens de *B. glabrata* resistentes ao *S. mansoni* estavam com a capacidade fagocitária exacerbada enquanto que os hemócitos de linhagens suscetíveis estavam com a capacidade fagocitária diminuída.

O sistema de defesa dos moluscos é diferente do sistema imune de mamíferos, pois faltam linfócitos, sistema de complemento, respostas a antígenos específicos e imunoglobulinas (Bayne,1983; Klein, 1989). Apesar dessas limitações, o sistema de defesa é capaz de discriminar, pelo menos grosseiramente, o próprio e o não próprio. O sistema é composto por um mecanismo celular, constituído pelos hemócitos e por fatores solúveis da hemolinfa, que agem juntos na destruição do não próprio.

Apesar de vários estudos caracterizarem a função e estrutura das células em gastrópodes, ainda não existe uma concordância entre o número e os tipos celulares nestes animais.

Existem quatro tipos diferentes de células de defesa no caramujo (Van Der Knaap & Loker ,1990), sendo três tipos representados por células fixas ou não circulantes e o outro representado por células circulantes. As células fixas e não circulantes são representadas por: células endoteliais bloqueadoras de antígenos, células reticulares e as células do poro. As células bloqueadoras de antígenos impedem a disseminação de microorganismos. As células reticulares estão presas aos tecidos por fibrilas extra celulares, além de possuírem uma alta capacidade de endocitar partículas de material não próprio. As células do poro estão ligadas às células reticulares e caracterizam-se por apresentar um papel seletivo na endocitose

de proteínas. Entretanto, ainda não está claro se algumas dessas células fixas agem na defesa de uma infecção por trematoda (Van Der Knaap & Loker, 1990).

As células circulantes, denominadas anteriormente de amebócitos, e hoje de hemócitos são encontradas na hemolinfa e são as principais células efetoras do sistema de defesa do caramujo, fagocitando, encapsulando e destruindo agentes infecciosos (Jeong *et al.*, 1983). Como o sistema circulatório é aberto, os hemócitos podem se mover livremente para dentro e fora dos tecidos (Van Der Knaap & Loker, 1990).

Sminia *et al.* (1983) consideraram que os gastrópodes possuem um único tipo de hemócito que expressam variações morfológicas, correspondentes a diferentes estágios de maturidade destas células. Assim, as células jovens seriam arredondadas e apresentariam uma grande atividade mitótica. Já as células maduras teriam prolongamentos citoplasmáticos e pouca atividade mitótica e seriam mais ativas na fagocitose. Joky *et al.* (1983) fizeram distinção de quatro tipos de hemócitos através de diferenças morfológicas e com a capacidade ou não de expressar receptores de lectinas na superfície celular.

Ottaviani (1992) sugeriu que a população de hemócitos circulantes de gastrópodes seja constituída por dois tipos: os hemócitos estrelados, que emitem pseudópodes, apresentam atividade fagocitária e aderem ao vidro e os hemócitos arredondados, que não apresentam atividade fagocitária e não aderem ao vidro. Os autores concluíram que os hemócitos arredondados apresentam características semelhantes às de linfócitos T de vertebrados, enquanto que os estrelados assemelham-se aos macrófagos.

Outros autores (Harris, 1975; Yoshino, 1976; Cheng & Guida, 1980; LoVerde *et al.*, 1982; Barraco *et al.*, 1993) também fizeram distinção de duas

subpopulações de hemócitos na hemolinfa de *Biomphalaria*: os granulócitos e os hialinócitos. Os hialinócitos medem de 5 a 8 micrômetros de diâmetro, apresentam contorno circular quando em contato com vidro liso, pouca tendência a formar pseudópodes e pouca estrutura lisossomal e, além disso, representam menos que 10% dos hemócitos em circulação (Barraco *et al.*, 1993). Segundo Jeong *et al.* (1983), eles não são evidentes no órgão hematopoiético ou órgão produtor de amebócitos, em inglês "amebocyte producing organ (APO)". Os granulócitos medem de 7 a 11 micrômetros de diâmetro, formam pseudópodes, são ativos em fagocitose e representam mais de 90% das células circulantes (Barraco *et al.*, 1993). Bezerra *et al.* (1997) mostraram que essas últimas são células fagocitárias e que se coram de vermelho neutro (Sigma).

Matricon-Gondran & Letocart (1999), considerando o tamanho das células e características ultra-estruturais reconheceram três tipos de células: hemócitos de grande, de médio e de pequeno portes.

Os hemócitos são produzidos pelo órgão hematopoiético (APO). O APO é formado por uma pequena quantidade de ameboblastos primários em repouso nas células epiteliais próximas do pericárdio. Ele se localiza em um retículo frouxo formado por extensões de músculos lisos e por algumas células fibroblásticas (Jeong *et al.*, 1983). Após contato com os miracídios surgem mudanças morfológicas significativas no APO, grande quantidade de ameboblastos primários e secundários aparecem e muitas dessas células sofrem mitoses. Totalmente ativado esse órgão consiste de massas de células livres organizadas em zonas de progressiva maturação. As células da hemolinfa de caramujos que tiveram contato com os miracídios são mais largas que as que não tiveram esse contato (Jeong *et al.*, 1983).

O uso de transplante do APO e de outros órgãos já foi realizado por Sullivan (1990), Sullivan & Spence (1994, 1999), Sullivan *et al.* (1992, 1995, 1998) Barbosa (2001) e Barbosa *et al.* (2006). Sullivan & Spence (1994) e Sullivan *et al.* (1995) transferiram o APO de *B. glabrata* parcialmente resistente ao *S. mansoni* para caramujos suscetíveis, resultando na aquisição de uma certa resistência nos caramujos que receberam o transplante. Com uma abordagem inovadora, os trabalhos de Barbosa (2001) e Barbosa *et al.* (2006) consistiram no transplante do órgão hematopoiético de uma linhagem de *B. tenagophila* totalmente resistente (Taim) ao *S. mansoni* para uma altamente suscetível ao parasito (Cabo Frio) com a vantagem adicional de se comprovar o sucesso do transplante através da presença nos hemócitos da linhagem receptora do marcador molecular típico da linhagem resistente doadora do órgão. Estudos moleculares têm sido empregados com sucesso na identificação específica de moluscos do gênero *Biomphalaria* (Caldeira *et al.*, 1998, Spatz *et al.*, 1999; Vidigal *et al.*, 1998, 2000). Esses autores utilizaram a técnica de RFLP-PCR (Reação em cadeia da polimerase e análise de polimorfismos de restrição) usando as regiões ITS (ITS1, ITS2 e 5.8S) do gene do RNA ribossomal. Foi observado um perfil específico para cada uma das espécies estudadas, sendo que os melhores perfis (com número de bandas suficientes e melhor visualizadas) foram obtidos com a enzima de restrição *Ddel*. A espécie *B. tenagophila* apresentou dois fragmentos de 800 e 470 pares de base (pb), respectivamente. Já as populações dessa espécie, oriundas do Taim/RS, mostraram um fragmento adicional de 350 pb (em alguns casos com ausência da banda de 800pb). Rosa *et al.* (2004) mostraram que a banda de 350 pb, típica da linhagem Taim, é de gene dominante do RNA ribossomal e segue a genética mendeliana clássica.

Os resultados obtidos após exposição aos miracídios de *S. mansoni* mostraram uma taxa de infecção de 25% de eliminação de cercárias nos exemplares da linhagem Cabo Frio que receberam o transplante e 53% dos controles. O fato mais interessante foi a demonstração do marcador típico da linhagem Taim nos hemócitos dos caramujos transplantados que não eliminaram cercárias e ausência deste marcador nos hemócitos dos caramujos deste grupo transplantado que não eliminaram cercárias (insucesso no transplante). Um outro resultado adicional interessante verificado no experimento foi a comprovação de marcadores moleculares do *S. mansoni* nos exemplares transplantados (Cabo Frio) que não apresentaram a marca molecular do doador (Taim) nos seus hemócitos.

A resistência é específica para o APO, não ocorrendo com transplante de tecidos não hematopoiéticos, como manto, coração, glândulas de albumina, cérebro, glândula digestiva ou ovotestis (Sullivan *et al.*, 1995, Sullivan & Spencer, 1999) e essa resistência não é aumentada pelo transplante de dois APO's ou pelo transplante de APO de doadores de maior porte (Sullivan & Spencer, 1999; Vasquez & Sullivan, 2001). Barbosa *et al.* (2006) também mostraram que a presença de um APO adicional não aumentou o número de hemócitos circulantes. O mecanismo de transferência de resistência hipoteticamente envolve o APO produzindo hemócitos citotóxicos resultando em um hemócito quimera (Granath & Yoshino, 1984) ou fatores de resistência solúveis no plasma ou ambos (Sullivan & Spence, 1994). Vasquez & Sullivan (2001) mostraram a ocorrência de fatores de resistência no plasma de caramujos que receberam o APO e a falta destes fatores no plasma de caramujos que sofreram transplante de manto. Esses autores levantaram a hipótese do fator de resistência ser formado pelo receptor em resposta ao implante ou pelo próprio implante. A ausência de fator de resistência no plasma de caramujos que

receberam o manto sugere que a resistência é secretada pelo implante de APO ou provavelmente pelos hemócitos originados do APO.

A importância da fração solúvel da hemolinfa de *Biomphalaria* foi confirmada *in vivo* e *in vitro* através de estudos de transferência desta fração. Granath & Yoshino (1984) relataram que a transferência de plasma obtido de linhagens resistentes de *B. glabrata* para linhagens suscetíveis resultou em uma redução da taxa de infecção pelo *S. mansoni* nos receptores. Resultados semelhantes foram obtidos por Coelho & Bezerra (2006) e Pereira *et al.* (submetido) utilizando transferência *in vivo* de fatores solúveis da hemolinfa de *B. tenagophila* da linhagem Taim para a linhagem Cabo Frio. Malagueño *et al.* (1998) sugeriram que o plasma de *B. straminea* diminui a capacidade fagocítica de caramujos *B. glabrata* suscetíveis em contato com leveduras de *Saccharomyces sp.* Bayne *et al.* (1980) demonstraram que a transferência de plasma *in vitro* de *B. glabrata* resistente para *B. glabrata* suscetível aumenta a capacidade fagocítica dos hemócitos, demonstrando a interação entre fatores plasmáticos e hemócitos durante o encapsulamento e o processo de fagocitose, que ocorre poucas horas após a penetração do miracídio.

A resposta humoral nos moluscos ocorre de maneira diferente dos vertebrados. Em invertebrados, que não produzem imunoglobulinas, o reconhecimento é mediado por lectinas, que são proteínas com habilidade de se ligar a carboidratos de maneira específica e reversível. Elas são secretadas pelos hemócitos e podem estar solúveis na hemolinfa, opsonizando o objeto estranho, ou na superfície de hemócitos circulantes (Richards & Renwranz, 1991). A presença dessas lectinas no plasma dos caramujos, que têm receptores para carboidratos, os quais ocorrem também na superfície de esporocistos, sugere a base da interação

hemócito-esporocisto de *S. mansoni* (Fryer & Bayne, 1989; Richards & Renwartz, 1991). Vários autores têm demonstrado a presença de carboidratos, especialmente glicoproteínas e glicolipídeos, como os principais componentes do tegumento de miracídios e esporocistos de *S. mansoni* (Zelck & Becker, 1990; Uchikawa & Loker, 1991). Johnston & Yoshino (1996) demonstraram que uma grande variedade de glicoproteínas do tegumento de *S. mansoni* pode ser reconhecida por lectinas presentes na fração solúvel da hemolinfa de *B. glabrata*. Alguns autores sugerem que a resistência ou suscetibilidade de espécies ou linhagens de *Biomphalaria* a infecção por *S. mansoni* pode estar relacionada à presença ou ausência de determinadas lectinas na hemolinfa ou mesmo por diferenças quantitativas em algumas lectinas. Moléculas com atividade imunológica, funcional e/ou biológica semelhante à interleucina1 (IL-1) têm sido detectadas ou isoladas em caramujos (Granath *et al.*, 1994) e podem estar associadas à ativação dos hemócitos (Hughes *et al.*, 1991; Raftos *et al.*, 1992); estimulação da proliferação celular (Raftos *et al.*, 1991 e 1992); aumento da fagocitose (Beck *et al.*, 1993; Burke & Watkins, 1991) e produção de superóxidos (Granath *et al.*, 1994).

Caramujos de linhagens suscetíveis de *B. glabrata* têm significativamente menos proteínas semelhantes a IL1 no seu plasma do que os de linhagens resistentes. Além disso, caramujos resistentes mantêm quantidades significativamente mais altas dessa proteína após exposição ao *S.mansoni* quando comparados às linhagens suscetíveis (Granath *et al.*, 1994). Foi verificado que a inoculação da proteína recombinante humana de interleucina-1 (rhIL-1 β) em caramujos *B. glabrata* suscetíveis resulta em uma rápida ativação e produção de superóxidos equivalentes aos níveis encontrados em caramujos resistentes; e conseqüentemente em uma redução altamente significativa do número de cercarias

produzidas por estes caramujos (Connors et. al.;1995). Connors *et al.* (1998) demonstraram que a diminuição na produção de cercárias, observada em *B. glabrata* suscetíveis inoculados com rhIL-1 β , é conseqüência da elevada mortalidade observada de esporocistos primários. Embora a hemolinfa livre de células recolhida de caramujos tratados com rhIL-1 β tenha sido capaz de matar esporocistos de *S.mansoni*, testes *in vitro* mostraram que rhIL-1 β , *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. Justificativa

A cultura primária de tecido hematopoiético de *Biomphalaria* é original e através desta será possível obter as células hematopoiéticas em grandes quantidades e em meio definido. Esta nova metodologia permitirá estudar a morfogênese destas células, sua ultra-estrutura, composição e comportamento frente a vários estímulos, facilitando estudos de interação parasito-hospedeiro *in vivo* e *in vitro*.

Somando ao que foi dito anteriormente temos em nossos laboratórios caramujos totalmente resistentes ao *S.mansoni* (*B. tenagophila* do Taim), que, seguramente apresentam hemócitos com comportamento peculiares frente a esporocistos em comparação com os hemócitos de linhagens suscetíveis (de outras espécies, como da própria). São poucos os trabalhos envolvendo a interação *S.mansoni* / *B. tenagophila* e esta abordagem seguramente enriquecerá o assunto sobre esta espécie, importante na transmissão da doença em extensas áreas do sudeste e sul do País.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Obter cultura primária de células do órgão hematopóietico (APO) de moluscos *B. glabrata* e *B. tenagophila* (linhagens Cabo Frio e Taim) e caracterizá-las funcional e morfológicamente.

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e padronizar o processo de cultivo *in vitro* do órgão hematopóietico (APO) de moluscos *B. glabrata*;
- aplicar a metodologia desenvolvida para cultivo do órgão hematopóietico a moluscos *B. tenagophila* (linhagem suscetível - Cabo Frio e resistente - Taim - ao *S. mansoni*);
- desenvolver e padronizar o processo de cultivo *in vitro* de um órgão controle (ovotesti) de moluscos do gênero *Biomphalaria*;
- caracterizar morfológicamente as células no órgão hematopóietico de moluscos do gênero *Biomphalaria* em crescimento nas culturas através de microscopia confocal utilizando lectinas conjugadas com FITC;
- verificar o comportamento celular quando em contato com esporocistos e miracídios;
- verificar o comportamento celular quando em contato com antígenos solúveis de ovos de *S. mansoni* (SEA), Zimosan, LPS
- comparar as células obtidas no cultivo primário com as células da hemolinfa.
- verificar a presença de lisossomos nas células órgão hematopóietico, através da marcação com Lyso Tracker Red.
- verificar possíveis diferenças morfológicas nas células do órgão hematopóietico de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados com *S. mansoni* quando comparadas com as células do órgão hematopóietico de moluscos não infectados.

4. Material e Métodos

4.1. Caramujos Utilizados

A linhagem de *B. glabrata*, usada neste trabalho, foi originária do bairro Barreiro de Cima, em Belo Horizonte, mantida há mais de 30 anos no Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz. Foram utilizadas duas linhagens de *B. tenagophila*: uma da região de Cabo Frio, Rio de Janeiro, altamente suscetível à cepa SJ de *S. mansoni* (Santos *et al.*, 1979) e a outra da região do Taim, Rio Grande do Sul, totalmente resistente ao *S. mansoni* (Corrêa *et al.*, 1979; Santos *et al.*, 1979; Bezerra *et al.*, 1997, Coelho *et al.*, 2004). As linhagens de *B. tenagophila* foram isoladas pelo Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE-UFMG) e os espécimes usados são de colônias mantidas no Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz por mais de três anos. Os caramujos são mantidos à temperatura ambiente, em aquários com água corrente, terra adicionada de carbonato de cálcio como substrato, iluminação artificial por um período médio de 10 horas diárias e alimentados com alface e ração para camundongo.

Antes da dissecação, esses animais eram divididos em grupos (de acordo com o diâmetro da concha) e mantidos em beckers com 250 ml de água bidestilada. Em função da alta frequência de larvas de helmintos foram adicionados 2,5 mg/ml de mebendazol por cerca de 48 horas, até que os caramujos apresentassem fezes esbranquiçadas. Após esse tratamento, as conchas eram limpas com uma gaze umedecida com álcool 70% e os caramujos eram transferidos para a capela de fluxo laminar, onde a concha era limpa novamente

Foram utilizados 322 caramujos *B. glabrata*, 168 *B. tenagophila* do Taim e 141 *B. tenagophila* Cabo Frio.

4.2. Parasito

Foi utilizada a cepa LE de *S. mansoni* que vem sendo mantida no Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz por mais de 35 anos.

4.3. Infecção dos caramujos

Após 50 dias de infecção, hamsters infectados com a cepa LE de *S. mansoni* foram sacrificados por fratura cervical para obtenção de miracídios (Pellegrino & Katz, 1968). O fígado dos animais foi retirado e triturado em liquidificador com salina 0,85%, por dois minutos. A mistura foi colocada em um cálice de sedimentação, passando primeiramente por gaze, a fim de reter as partículas maiores; em seguida completou-se o volume para 1L com salina 0,85%. O cálice com a mistura foi mantido no escuro, por 30 minutos, para sedimentação.

Após esse período, o sobrenadante foi descartado, restando aproximadamente 200ml de líquido. Completou-se o volume para 1L novamente, agora com água sem cloro. O cálice continuou no escuro, por mais 20 min. Este procedimento foi realizado mais uma vez até a obtenção de um líquido mais limpo e com miracídios quase prontos para eclosão.

Após o descarte do sobrenadante, na última lavagem, o líquido e o sedimento, foram colocados em um balão volumétrico e expostos à luz artificial (apenas a parte superior exposta) para que ocorresse a eclosão dos miracídios. Após 15 min já era possível ver os miracídios nadando. Amostras do material foram recolhidas e dez miracídios contados com auxílio de microscópio estereoscópico.

Os caramujos foram colocados em placas de cultura de seis poços e em seguida colocados em contato com os miracídios para realização da infecção individual. A placa foi mantida sob luz artificial por aproximadamente 3 horas. Após esse período os caramujos foram colocados em beckers com água e após 24 horas foi feita a cultura dos órgãos hematopoiéticos (conforme técnica descrita a seguir).

4.4. Cultivos primários

A concha dos moluscos foi aberta com ajuda de uma tesoura. As partes moles retiradas com auxílio de pinça cirúrgica e colocadas em placas de Petri. O órgão hematopoiético (APO) foi removido como descrito por Sullivan (1990) e colocado em 0,5 ml de PBS para manutenção da umidade. Em seguida, o APO foi cortado em pequenos fragmentos, que foram semeados em placas de 12 e 24 poços contendo 500µl e 250µl de meio de cultura, respectivamente. As placas foram incubadas a 15 °C ou 20°C em estufa B.O.D. Após adesão, por tensão superficial, dos fragmentos (24 ou 48h depois) os volumes de meio de cultura por poços foram duplicados pela adição de meio novo. Foi realizado uma cultura controle utilizando o ovotestis dos caramujos. O ovotestis foi retirado e a cultura foi feita nas mesmas condições descritas para o APO.

Os meios de cultivo testados foram Ham's F-10, Ham's F-12, CMRL1415 e RPMI-1640, contendo 10% de soro fetal bovino, 4 mg/ml de fungizon e 10 mg/ml de gentamicina. Foram testados colágenos de cascavel (*Crotalus durissus terrificus*) e de cauda de rato (*Rattus norvegicus*) (Duarte *et al.*, 1999), poly-L-lysine e ágar como substratos para auxiliar a adesão celular. A poly-L-lysine foi preparada de acordo com as instruções do fabricante e o ágar foi usado a 3% em solução nutritiva de vitelo de desova dos caramujos (VLS). Nesse caso, os fragmentos do APO foram explantados, em placas de 12 poços, sobre uma camada de ágar de 2-3 mm de espessura e adicionados 250µl de meio de cultura por placa. Foram também testados promotores de crescimento ou diferenciação celular como insulina (8,3 µg/ml), selenito de sódio (30mg/ml), putrescina (0,3µg/ml), transferrina (5µg/ml) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (0,1 mg/ml). As células da cultura primária tiveram sua viabilidade celular determinada após uma semana de cultivo, após tratamento com azul de tripan, que penetra apenas em células mortas. A contagem de células viáveis e não viáveis foi feita em câmara de Neubauer.

4.5. Materiais

Mebendazol (100mg/comprimido) foi obtido da fábrica de medicamentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). O soro fetal bovino foi obtido de um estoque do Laboratório de Cultivo Celular da FUNED, cuja produção (própria) foi

descontinuada ou alternativamente com o mesmo produto adquirido da Gibco Limited (Paisley, Scotland). O meio de cultura CMRL 1415 foi preparado a partir de componentes individuais (Morton, 1970). Os meios Ham's F-10 (N6635), Ham's F-12 (N6760) e RPMI-1640 (R6504) foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (Sigma Co.). As placas foram adquiridas da Costar Co. e poly-L-lysine (P9155), selenito de sódio (S9133), putrescina (P5780), progesterona (P6149) e fator de crescimento epidérmico (EGF E1257), lectinas, penicilina/estreptomicina, RPMI 1640, gentamicina (Garamox, 80mg/Hipolabor), garrafas de 25cm², tubos plásticos de 50 ml (Falcon) foram adquiridos da Sigma Co. Todas as soluções, plásticos e vidrarias utilizados eram estéreis.

4.6. Utilização do mebendazol

Os caramujos foram divididos em grupos de acordo com o tamanho da concha. Foram colocados 5 exemplares de caramujos em beakers contendo 80ml de água e adicionamos 25mg, 50mg, 75mg e 1 comprimido inteiro para determinar a dose a ser utilizada.

4.7. Obtenção de células da hemolinfa de *Biomphalaria*

A hemolinfa de 10 caramujos (200µl/ indivíduo) foi retirada da região cardíaca (Bezerra *et al.*, 1997; Bezerra, 1998) com auxílio de seringa com agulha de insulina. Após digestão enzimática com o mesmo volume de solução 0,025% tripsina-0,02% EDTA por 10 min à temperatura ambiente, a solução foi centrifugada a 3000 rpm por 2 min. O sedimento celular foi ressuspenso em 200µl de PBS.

4.8. Coloração por azul de metileno

As células da cultura primária e da hemolinfa foram coradas com azul de metileno 1% em água destilada, usando partes iguais da suspensão celular e do corante em lâmina. Após aquecimento suave em chama do bico de Bunsen, as lâminas foram cobertas com lamínulas e examinadas ao microscópio.

4.9. Análise celular do APO por microscopia confocal

O APO foi lavado 3 vezes em PBS (solução salina) 1X e em seguida fixado em paraformaldeído 4% por 24 horas. Após esse período foi lavado 5 vezes em PBS 1X e em PBS/Triton 0,2% (PBT) por 15 minutos. Em seguida foi incubado por 2 horas com a lectina (1:100) desejada e com Lyso Tracker Red DND. Após esse período foi lavado 3 vezes em PBT por 5 minutos. Incubado em Topro-3 (1:1000), *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte foi lavado 3 vezes em PBT por 5 minutos e desidratado em série crescente de metanol (25%, 50%, 75% e 100% de MeOH) por 10 minutos cada. Em seguida o órgão foi transferido para 1:2 BABB (benzil álcool/ benzilbenzoato) *overnight*, para diafanização.

Através de lectinas conjugadas com FITC

As seguintes lectinas foram usadas: Con A, PNA, WGA, LPL.

Essas lectinas possuem as seguintes características:

- Con A: conhecida como Concanavalin A, é extraída de *Canavalia ensiformis* (“*Jack Bean*”) possui afinidade por resíduos terminais de α -D-mannosyl (α -man) e α -D-glucosyl (α -glc);
- PNA: aglutinina de *Arachis hypogaea* (“*Peanut agglutinin*”) que apresenta afinidade por resíduos terminais de β -galactosyl (β -gal) e (1 \rightarrow 3) N-acetyl-galactosamine ((1 \rightarrow 3)galNAc);
- WGA: aglutinina de *Triticum vulgare* (“*Wheat germ*”); apresenta afinidade por N-acetyl- β -D-glucosaminy e por oligômeros de N-acetyl- β -D-glucosamine ((glcNAc)₂);
- LPL: aglutinina de *Limulus polyphemus* (“*Horseshoe crab*”) com afinidade por D-hexosaminas N-acetiladas como: N-acetyl-D-galactosamine(galNAc), N-acetyl-D-glucosamine(glcNAc) e ácido N-acetyl-neuramínico (NeuNAc).

Utilizando Lyso Tracker Red DND

Lyso Tracker Red DND é um marcador específico para lisossomos de células de mamíferos, Dietl *et al.* (1996).

4.10. Obtenção de Antígenos Solúveis de Ovos (SEA)

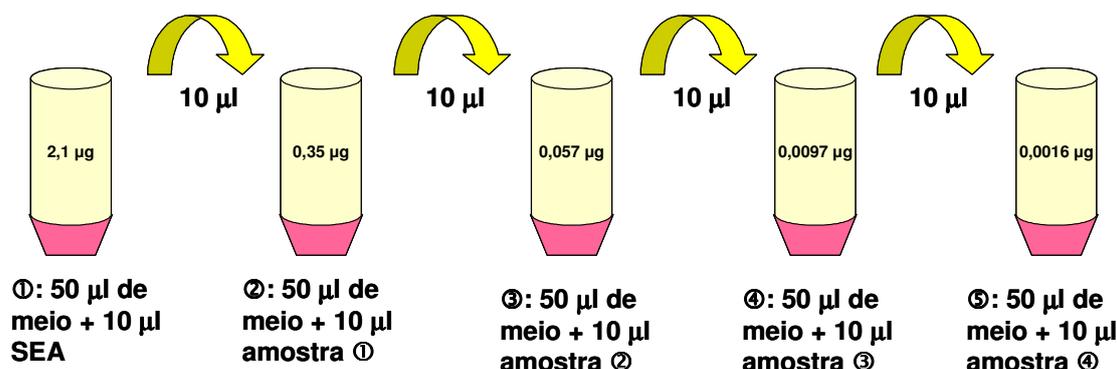
O SEA foi obtido de acordo com a técnica modificada de Goes *et al.*, (1989). Inicialmente, ovos do parasito foram obtidos a partir de fígados de camundongos com cerca de 50 dias de infecção. Os fígados foram retirados e colocados em tubo de centrífuga, com 1ml de salina 1,7%. O tubo de centrífuga foi acondicionado em um béquer com gelo e levado ao triturador de tecidos (Virtis) por 40 minutos. Foi usado o microscópio óptico para verificar a existência ou não de ovos inteiros. Em seguida o material foi centrifugado a 14000 rpm por 60 minutos e dialisado a 4 °C por 48 horas em salina 0,9%. Após a diálise foi feita a dosagem das proteínas pelo método de Lowry.

O SEA foi utilizado em concentrações variadas, obtidas por diluição seriada, conforme esquema abaixo:

Passo 1: Adição de 10µl SEA (concentração de 0,21 mg/ml) a Eppendorf contendo 50 µl de meio CMRL 1415 (em banho de gelo).

Passo 2: transferência de 10µl meio + SEA entre os Eppendorf's (todos em gelo), conforme diagrama, gerando concentrações diversas.

Passo 3: aplicação de 50 µl de cada diluição na cultura de células.



4.11. Obtenção *in vitro* de miracídeos

Dez camundongos infectados com 100 cercárias da cepa LE de *S. mansoni* foram sacrificados, aos 50 dias de infecção, por deslocamento cervical. Com auxílio de pinça e tesoura, tiveram as vísceras expostas e o fígado retirado. O fígado foi mantido em salina 0,85% não heparinizada, contendo 10% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma Co) por 30 minutos, à temperatura ambiente, em capela de fluxo laminar. Após esse período, os fígados foram triturados e lavados,

seguindo-se a técnica descrita por Pelegrino & Katz (1968), foram feitas modificações para obtenção de miracídio estéril, resumidamente: os fígados, em salina 0,85% não heparinizada, foram triturados em um béquer usando-se um pistilo de vidro (estéril). O líquido, contendo os fígados já triturados, foi “filtrado” com ajuda de uma gaze estéril, colocado em um cálice estéril e o volume completado com salina estéril 0,85%, não heparinizada, para 1litro. O líquido foi deixado no escuro, a temperatura ambiente, por 30 minutos, para sedimentar. Após a sedimentação, o sobrenadante foi retirado, com auxílio de bomba de vácuo e o volume novamente completado para 1L, agora com água sem cloro estéril. O líquido foi deixado sob as mesmas condições da lavagem anterior, no entanto, por 20 minutos. Este último procedimento foi realizado duas vezes. Após as três lavagens, o sedimento restante foi colocado em balão volumétrico e coberto com papel alumínio, de maneira que apenas uma pequena parte da abertura do balão permanecesse descoberta. O balão foi exposto à luz artificial, favorecendo, assim, a eclosão e a visualização dos miracídios, devido ao fototropismo positivo.

Ao final desse procedimento, os miracídios foram utilizados da seguinte maneira: contou-se 10 μ l 3 vezes para obter-se uma média de miracídios (média de 6 miracídios); em seguida colocou-se na placa de 24 poços, de modo que a 1^a coluna recebeu 10 μ l, a 2^a 20 μ l, a 3^a 30 μ l, a 4^a 40 μ l, a 5^a 50 μ l e a 6^a colunas foram controles. Cada volume foi feito, pelo menos, em duplicata. A análise foi realizada após o contato e após 24 e 48 horas.

4.12. Obtenção e transformação *in vitro* de miracídios em esporocistos primários

Dez camundongos infectados com 100 cercárias da cepa LE de *S. mansoni* foram sacrificados, aos 50 dias de infecção, por deslocamento cervical. Com auxílio de pinça e tesoura, tiveram as vísceras expostas e o fígado retirado. O fígado foi mantido em salina 0,85% não heparinizada, contendo 10% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma Co) por 30 minutos, à temperatura ambiente, em capela de fluxo laminar. Após esse período, os fígados foram triturados e lavados, seguindo-se a técnica descrita por Pelegrino & Katz (1968), foram feitas modificações para obtenção de esporocisto estéril, resumidamente: os fígados, em salina 0,85% não heparinizada, foram triturados em um béquer usando-se um pistilo

de vidro (estéril). O líquido, contendo os fígados já triturados, foi “filtrado” com ajuda de uma gaze estéril, colocado em um cálice estéril e o volume completado com salina estéril 0,85%, não heparinizada, para 1litro. O líquido foi deixado no escuro, a temperatura ambiente, por 30 minutos, para sedimentar. Após a sedimentação, o sobrenadante foi retirado, com auxílio de bomba de vácuo e o volume novamente completado para 1L, agora com água sem cloro estéril. O líquido foi deixado sob as mesmas condições da lavagem anterior, no entanto, por 20 minutos. Este último procedimento foi realizado duas vezes. Após as três lavagens, o sedimento restante foi colocado em balão volumétrico e coberto com papel alumínio, de maneira que apenas uma pequena parte da abertura do balão permanecesse descoberta. O balão foi exposto à luz artificial, favorecendo, assim, a eclosão e a visualização dos miracídios, devido ao fototropismo positivo.

Os miracídios foram coletados em tubos Falcon de 50ml (aproximadamente 8 tubos) e mantidos no gelo por aproximadamente 30 minutos. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e mantido 5ml do líquido em cada tubo. Os líquidos contendo os miracídios foram então transferidos para um único tubo e mantidos novamente por 30 minutos no gelo. Parte do sobrenadante foi retirada, restando, mais uma vez, 5ml de líquido contendo os miracídios.

O cultivo/transformação dos miracídios foi realizado em meio de cultura RPMI – 1640 pH 7,4 (Sigma Co) suplementado com 5% (v/v) de soro bovino fetal inativado (SBF) e 20µg/ml de antibiótico gentamicina (Garamox). Em garrafas de 25cm² próprias para cultura de células, foi adicionado 1ml do líquido contendo os miracídios para 15ml do meio de cultura já suplementado. As garrafas foram mantidas fechadas, em estufa incubadora B.O.D., a 26°C, por 24 horas. Passado esse período, as garrafas foram retiradas da B.O.D., observadas em microscópio invertido (Zeiss), para verificar a liberação da placa ciliar miracidiana, o que caracteriza a transformação.

O conteúdo das garrafas foi transferido para dois tubos plásticos de 50ml e estes, mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, retirou-se o sobrenadante, mantendo-se, aproximadamente, 5ml em cada tubo. Todo o líquido foi transferido para um único tubo e o volume completado para 50ml, com meio de cultura RPMI – 1640 (Sigma Co) não suplementado, em temperatura ambiente. O tubo foi mantido por mais 30 minutos sob as mesmas condições anteriores. Após os 30 minutos, o sobrenadante foi retirado, permanecendo apenas

5ml do líquido contendo os esporocistos. Ao final desse procedimento, os esporocistos foram utilizados da seguinte maneira: contou-se 10µl 3 vezes para obter-se uma média de esporocistos (média de 6 esporocistos); em seguida colocou-se na placa de 24 poços, de modo que a 1ª coluna recebeu 10µl, a 2ª 20µl, a 3ª 30µl, a 4ª 40µl, a 5ª 50µl e a 6ª colunas foram controles. Cada volume foi feito, pelo menos, em duplicata. A análise foi realizada após o contato e após 24 e 48 horas.

4.13. Zimosan e LPS

LPS foi utilizado 1mg/ml e o Zimosan foi doado sem dados da concentração.

5. Resultados

5.1. Cultivo celular

Para desenvolver e padronizar o processo de cultivo *in vitro* do APO, foi usado inicialmente apenas caramujos *B.glabrata* pelo fato desses serem mais abundantes no Centro de Pesquisas René Rachou. Após padronização começamos a utilizar os caramujos *B. tenagophila* do Taim e de Cabo Frio.

Inicialmente foram feitas culturas com caramujos cujo diâmetro da concha variava entre 1mm e 40 mm (tabela 1). Cultivos foram obtidos somente com diâmetro de concha entre 12mm e 18mm, uma vez que os menores eram difíceis de serem dissecados e os maiores apresentavam uma grande contaminação por endoparasitas

Grupos	Diâmetro da concha (mm)	Cultivo Primário do APO
1	1 - 7	-
2	8 - 9	-
3	10 - 11	-
4	12 - 13	+
5	14 - 16	+
6	17 - 18	+
7	19 - 22	-
8	23 - 29	-
9	30 - 40	-

Tabela 1- Cultivos primários do APO de caramujos *B. glabrata*, agrupados pelo diâmetro das conchas

Dos meios testados, o mais eficiente para a manutenção das células em cultura foi o CMRL1415 suplementado com insulina, transferrina, selenito de sódio, putrescina, EGF e soro fetal bovino. Sob essa condição, a viabilidade celular média foi de 75%, após uma semana em cultura. Na ausência de EGF e de soro fetal bovino não houve dispersão celular. A partir da segunda semana, observamos o aparecimento gradual de sinais de morte celular, como a presença de granulações no citoplasma e inchaço, seguidos por lise. A sobrevivência das células foi de duas semanas. Os meios RPMI-1640 e Ham's F12, apresentaram pouca dispersão celular e nos outros nenhuma dispersão foi observada. Não foram observadas diferenças

no padrão de crescimento na presença ou ausência dos substratos de adesão testados.

Inicialmente não foi possível manter, nem por 24 horas, as culturas primárias devido a grande contaminação por helmintos e protozoários. Os caramujos foram limpos com detergente, hipoclorito de sódio, álcool absoluto e a combinação entre eles, sem sucesso. Após 3 meses de tentativas, os caramujos foram tratados com anti-helmíntico. Após o tratamento com mebendazol foi observado uma redução de 90% na contaminação das culturas celulares. A partir desse momento as culturas foram mantidas por mais tempo e como elas não estavam contaminadas, foi possível trabalhar com as células, e começar com a outra linhagem de caramujo.

A temperatura ideal para o crescimento celular foi de 15°C, a qual favoreceu a dispersão celular dos explantes. Em culturas mantidas a 15°C por uma semana e transferidas para 20°C, a quantidade de células observadas caiu para 5% em 24h e após 48h não existia mais nenhuma célula viva. Nas culturas já iniciadas com 20°C não foi observada dispersão celular.

5.2. Tipos celulares em cultura

B.glabrata

As células desprenderam-se e migraram facilmente do explante de APO, ficando em suspensão, sendo desnecessário qualquer tratamento enzimático. Logo após fragmentar o APO e colocá-lo na placa de cultura já foi possível observar células migrando (fig. 1).

Três tipos celulares morfologicamente distintos, nomeados de tipo I, II e III, cresceram na cultura (fig. 2). As células tipo I, (fig. 2 ① e ②) que predominam na cultura celular, são arredondadas com núcleo grande para o tamanho do citoplasma. As células tipo II (fig. 2 ① e ②) possuem relativamente mais citoplasma que o tipo I. A presença de pseudópodes, também foi observada (fig.2 ③). O último tipo celular, denominado de tipo III (fig. 2 ②) é refringente e com núcleo não definido e menos abundante, inicialmente, que as outras. Divisão celular atípica foi observada, com núcleo duplicando sem citocinese (fig.2 ④)

Células semelhantes ao tipo II foram encontradas também na hemolinfa (fig. 2 ⑤ e ⑥ respectivamente). Foi possível manter algumas células tipo III por até 62 dias (fig. 3).

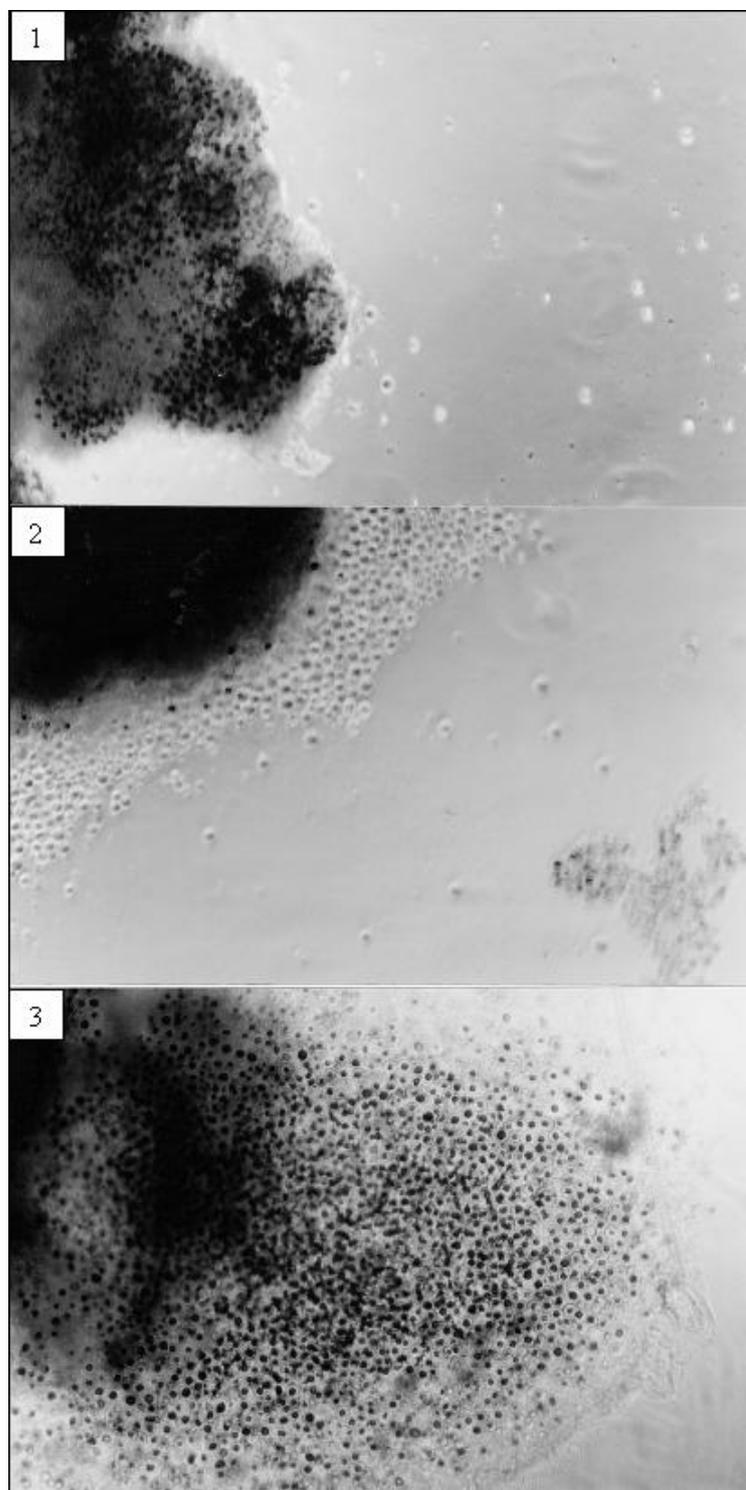


Fig. 1. Dispersão de células do explante de APO de *B. glabrata* em cultura. Aumento de 100x. Tempo em cultura:

1. Imediatamente após o início da cultura do APO: poucas células dispersando.
2. 4 horas depois: observa-se uma maior dispersão.
3. 36 horas depois: quase todas as células já dispersaram.

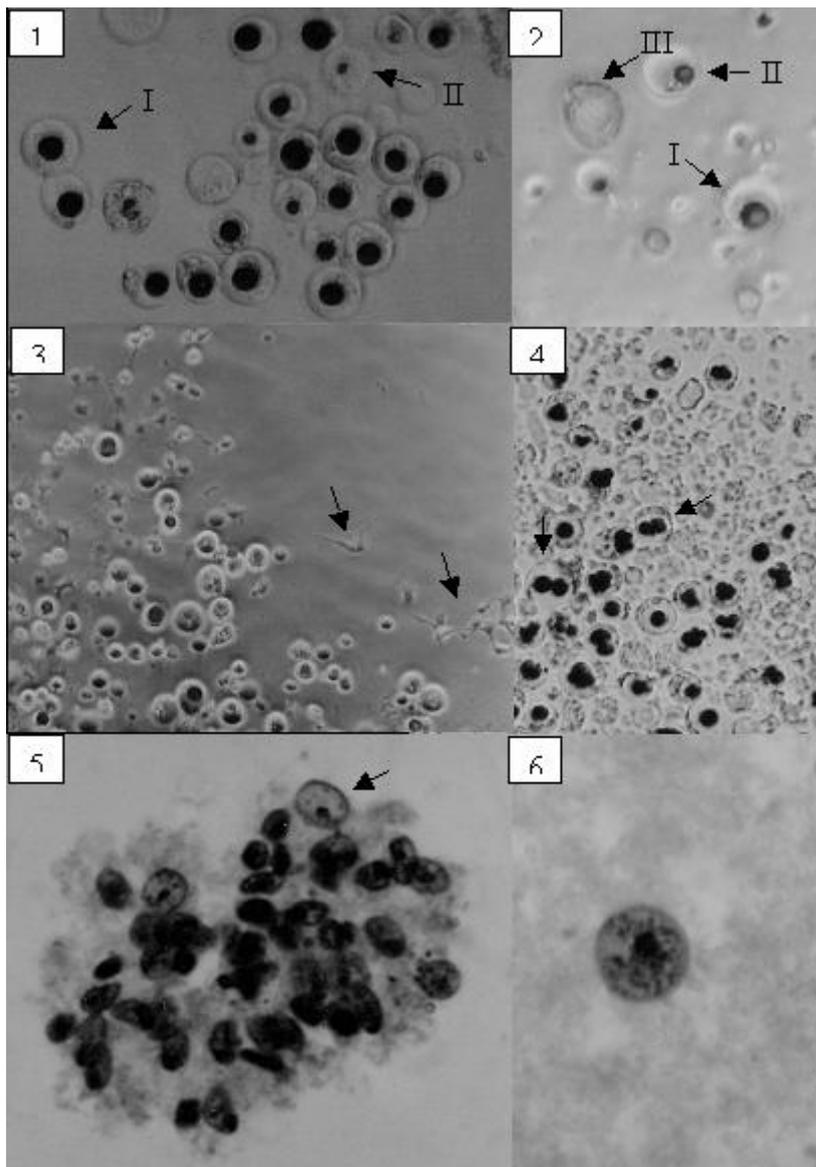


Fig. 2. Tipos celulares encontrados na cultura primária do APO e na hemolinfa de caramujos *B. glabrata*.

1. Células tipos I e II em cultura com predominância da primeira. Aumento: 400x.

2. Células tipos I, II e III em cultura. Aumento: 400x.

3. Pseudópodes emitidos pelas células em cultura. Aumento: 200x.

4. Células binucleadas em cultura. Aumento: 200x.

5. Células tipo II (indicada pela seta) na cultura do APO. Aumento: 400x.

6. Célula circulante similar na hemolinfa de *B. glabrata*, após fixadas e coradas com azul de metileno. Aumento: 1.000x.

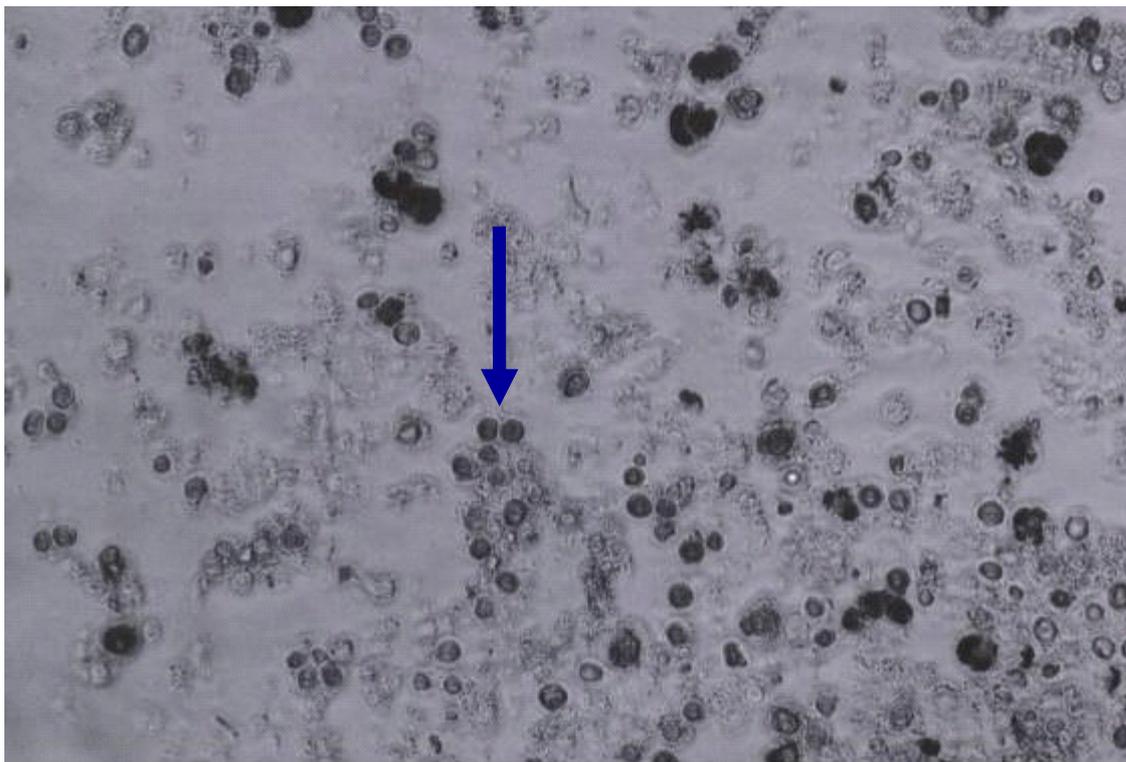


Fig. 3. Cultivo primário do APO de caramujos *B. glabrata* mostrando células tipo III mantidas em cultura por 62 dias. Aumento: 400x.

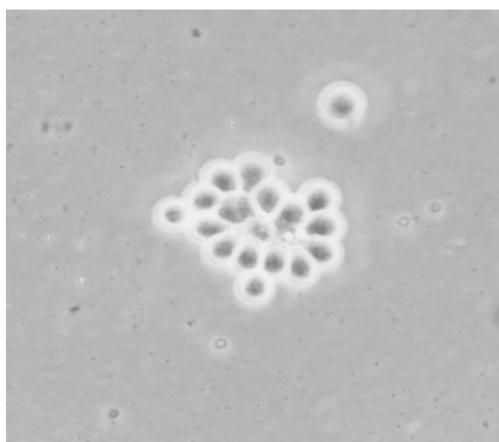


Fig. 4. Cultura primária do ovotesti de *B. glabrata* usado como controle. Células em cachos e fortemente aderidas. Aumento: 200x.

Na cultura primária do ovotesti (controle) as células crescem em cachos e fortemente aderidas (fig. 4).

B. tenagophila do Taim e de Cabo Frio

O comportamento das culturas foi muito semelhante ao observado para *B. glabrata*. As células também se desprenderam e migraram facilmente do explante de APO, ficando em suspensão, sendo desnecessário qualquer tratamento enzimático. Logo após fragmentar o APO e colocá-lo na placa de cultura já foi possível observar algumas células migrando (fig. 5). Os tipos celulares I, II e III também foram encontrados (fig. 6)

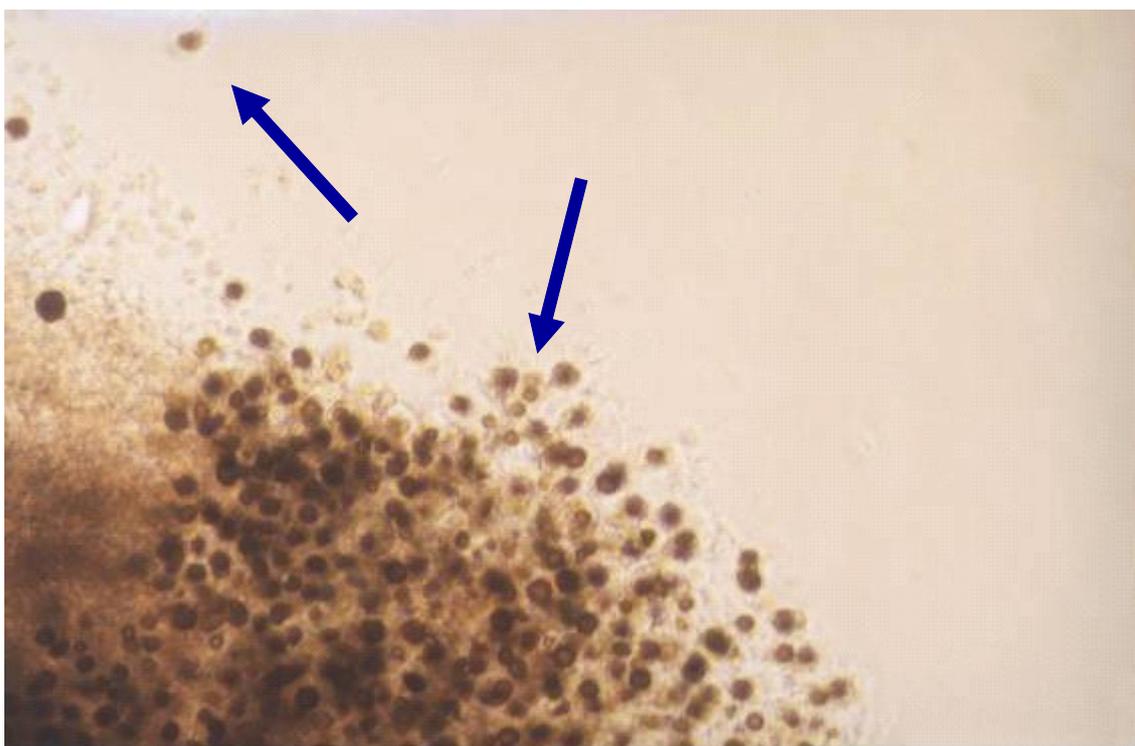


Fig. 5. Dispersão de células do explante de APO de *B. tenagophila* Cabo Frio em cultura. Aumento: 200x. As setas apontam algumas células migrando imediatamente após o início da cultura.

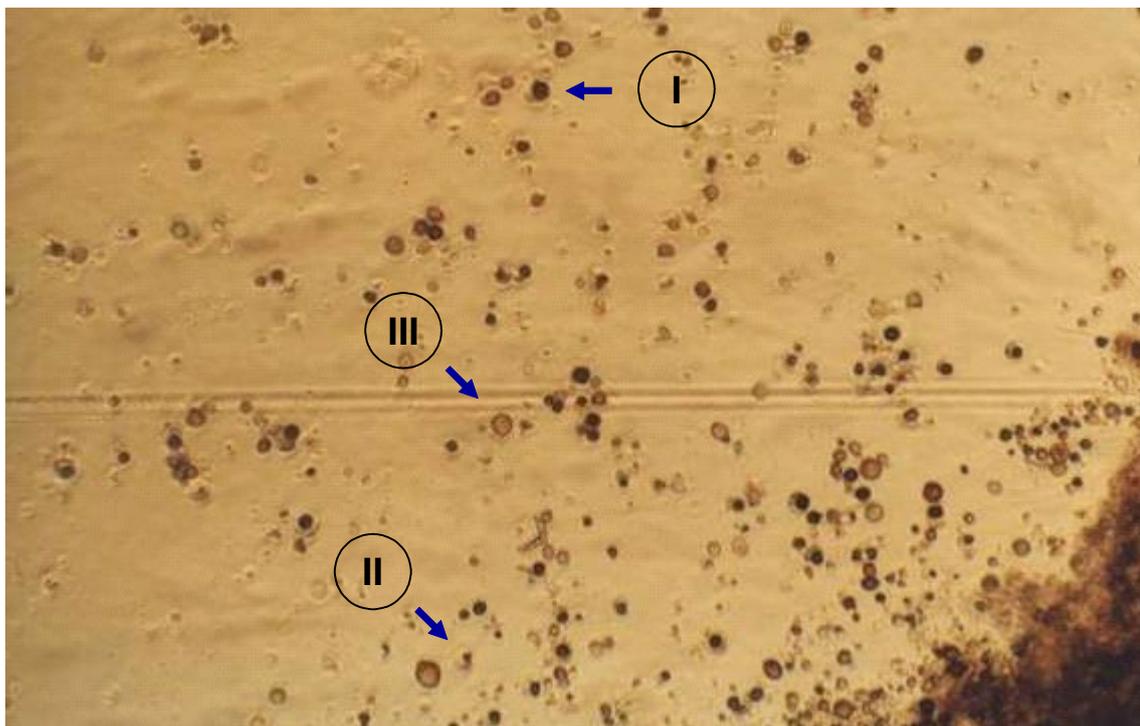


Fig. 6. Tipos celulares I, II e III encontrados na cultura primária do APO de caramujos *B. tenagophila* Taim. Aumento: 40x.

5.3. Comportamento celular em contato com antígenos diversos

B. glabrata

Em todos os experimentos nos quais foram utilizados Zimosan foi observada a dispersão das células em direção a essas partículas (fig. 7).

Quando as células foram colocadas em contato com SEA foi observado muito *debri* no meio (fig. 8-A), células com um envoltório celular que se assemelha a uma cápsula (fig. 8-B, seta grande) e núcleo em divisão (fig. 8-B, setas pequenas).

Nas culturas realizadas com APO de caramujos infectados (após 24 horas de infecção) encontramos os mesmos tipos celulares encontrados nas culturas de APO sem infecção, ou seja, tipos I, II e III. Não foram observadas diferenças em relação às culturas de caramujos não infectados.

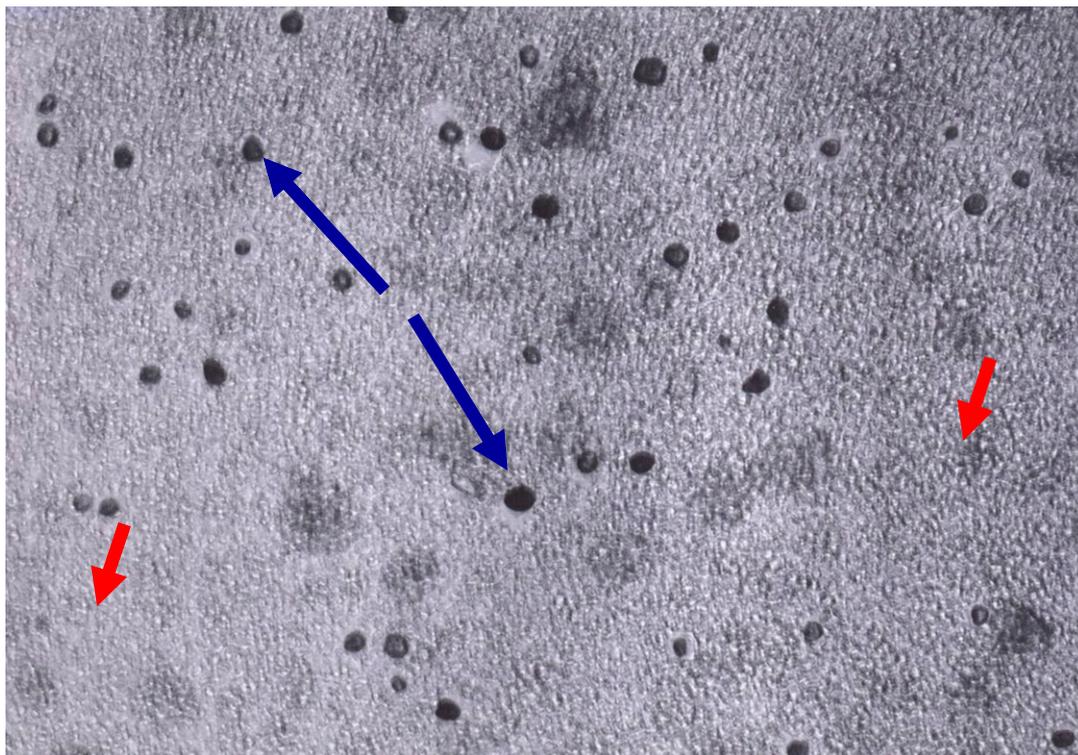


Fig. 7. Dispersão das células (setas grandes) da cultura primária do APO de caramujos *B. glabrata* em direção às partículas de Zimosan (setas pequenas). Aumento: 100x.

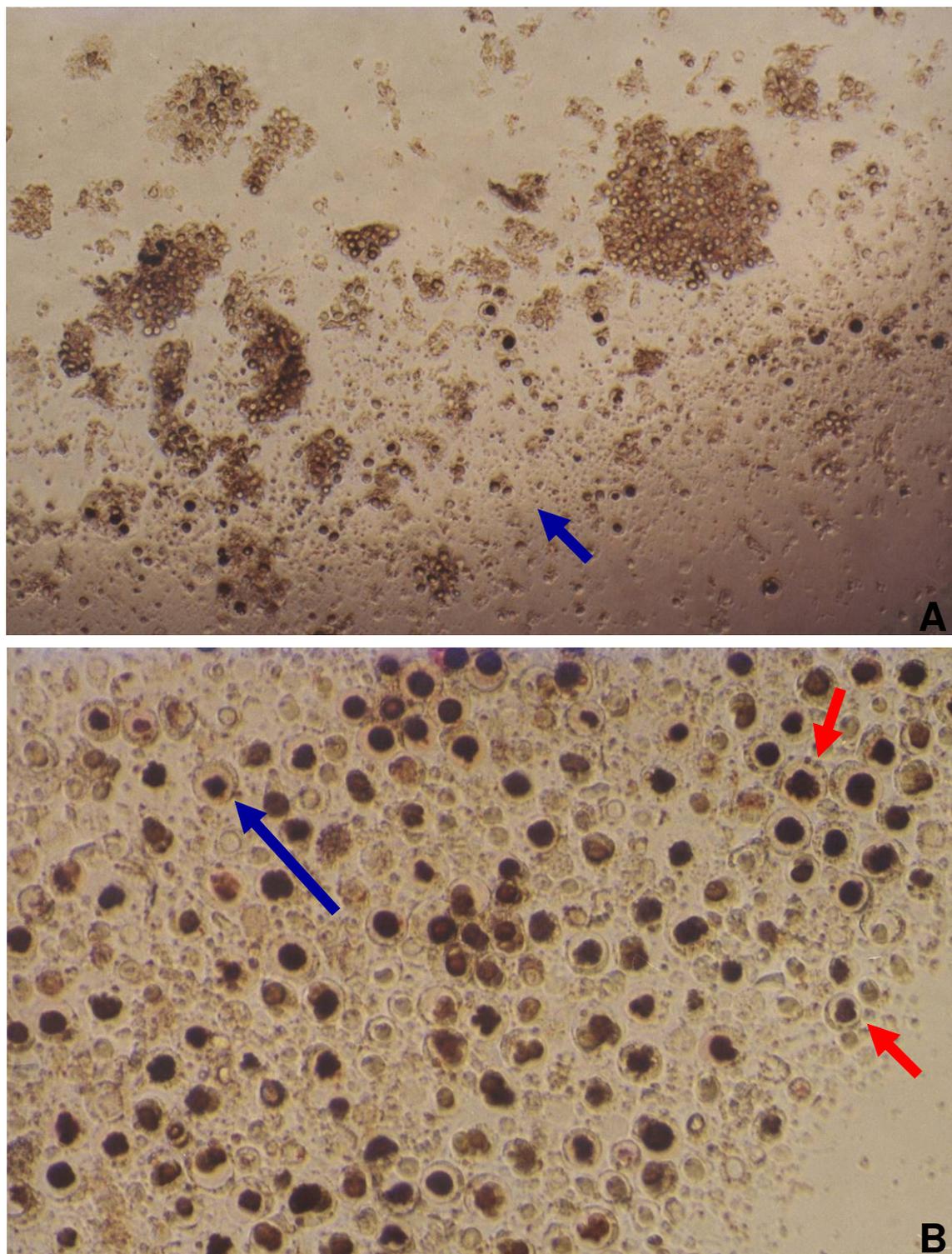


Fig. 8. Cultivo primário APO de caramujo *B. glabrata* em contato com SEA. Aumento: 200x.

A. grande quantidade de *debr*i celular.

B. seta grande: células com um envoltório celular que se assemelha a uma cápsula. Setas pequenas: células com núcleo em divisão.

B. tenagophila

Em todos os experimentos nos quais foram utilizados Zimosan foi observada a dispersão das células em direção a essas partículas (fig. 9-A e 9-B).

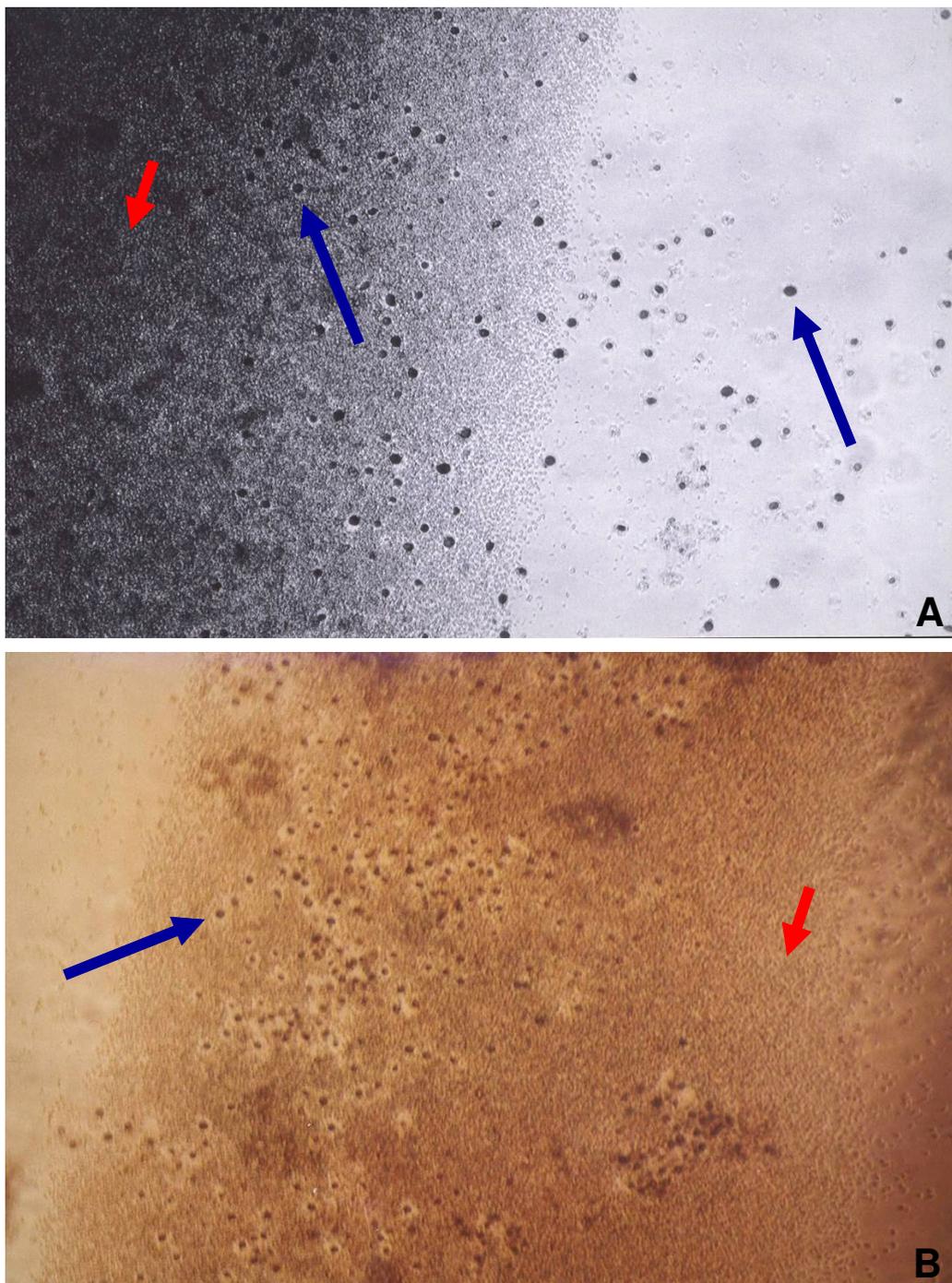


Fig. 9. Dispersão das células da cultura primária do APO em caramujo *Biomphalaria* (setas grandes) em direção às partículas de Zimosan (setas pequenas). Aumento: 100x.
A. *B. tenagophila* Taim.
B. *B. tenagophila* Cabo Frio.

Em contato com LPS, foi observada com 72 horas nas culturas a presença de um envoltório celular que se assemelha a uma cápsula (fig. 10, seta grande) e células tipo III (fig. 10, seta pequena). Essas modificações estavam presentes nas espécimes do Taim e do Cabo Frio, entretanto as células de *B.tenagophila* de Cabo Frio apresentaram uma melhor resposta ao antígeno.

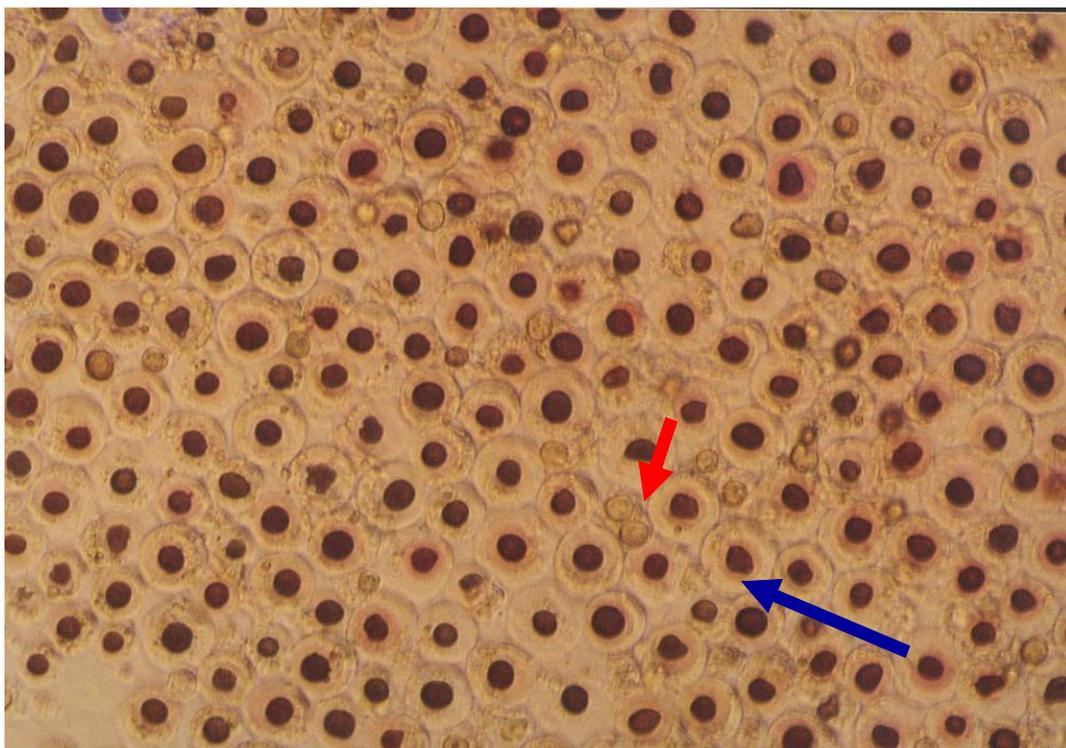


Fig. 10. Cultivo Primário do APO de caramujo *B. tenagophila* Cabo Frio em contato com LPS. Aumento: 200x.
Seta pequena: indica a presença de células tipo III.
Seta grande: indica a presença de um envoltório celular.

Em contato com SEA foram feitas as mesmas observações encontradas em *B. glabrata*.

Nas culturas realizadas com APO de caramujos infectados (após 24 horas de infecção) foram encontrados os mesmos tipos celulares observados nas culturas de APO sem infecção, ou seja, tipos I, II e III.

Um fato interessante observado em todas as culturas realizadas com caramujos do gênero *Biomphalaria* foi a transformação das células tipo I em células tipo III, com 7 dias ou mais (Fig 11-A). Entretanto, quando se colocam as células da cultura em contato com SEA ou LPS, as células tipo III surgem em 48 ou 72 horas respectivamente (fig. 11-B).

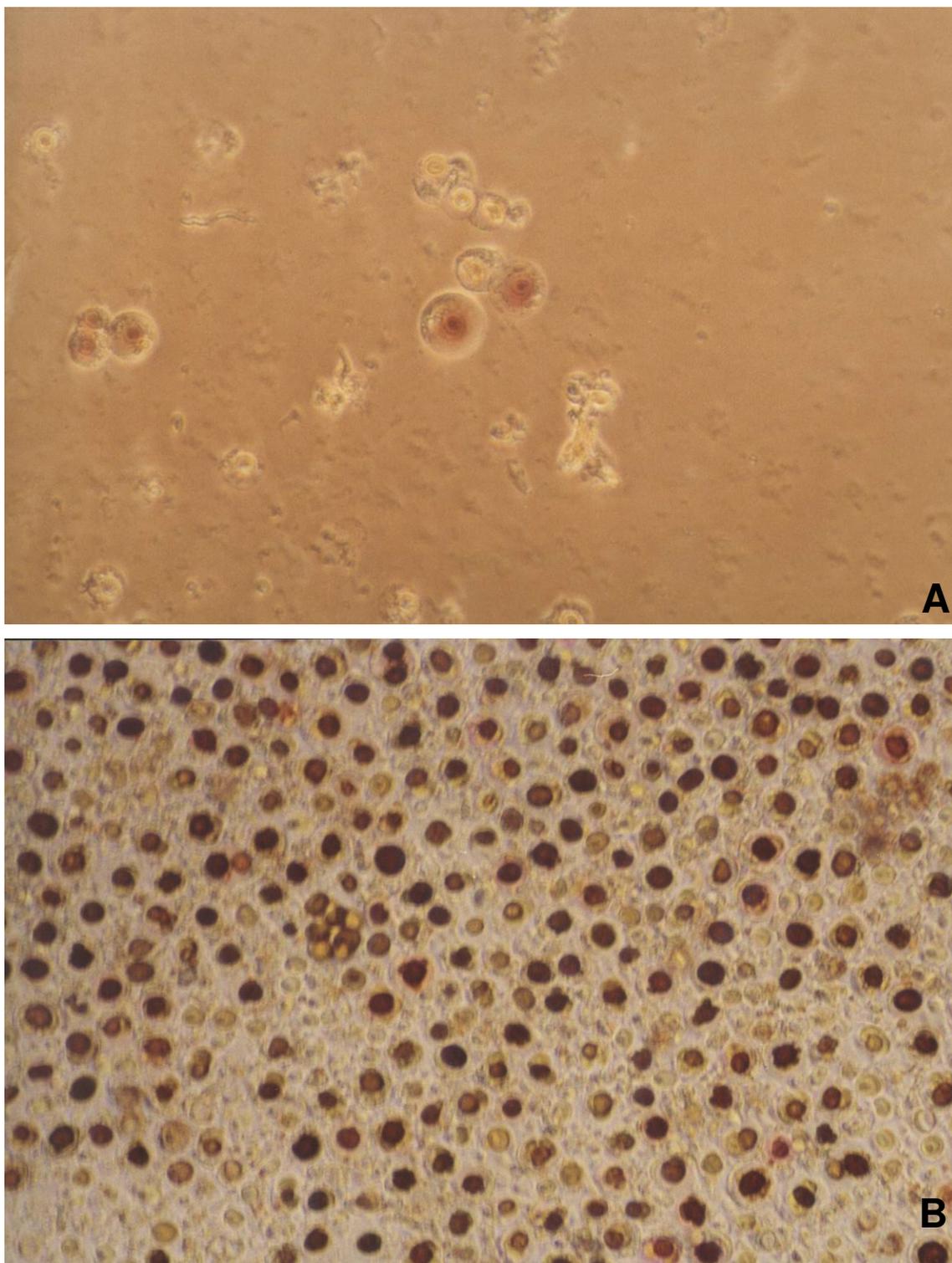


Fig. 11. Cultivo Primário do APO de caramujos *Biomphalaria*. Aumento: 200x.

A. Transformação das células tipo I de *B. tenagophila* em células tipo III após 7 dias ou mais.

B. Transformação das células tipo I de *B. glabrata* em células tipo III após 48 horas de contato da cultura com SEA.

5.4. Comportamento celular em contato com esporocistos

B. glabrata

Células tipo I se aglomeram formando uma extensa rede (fig. 12-A) e já se observam células aderidas ao esporocisto (fig. 12-B) logo após contato.

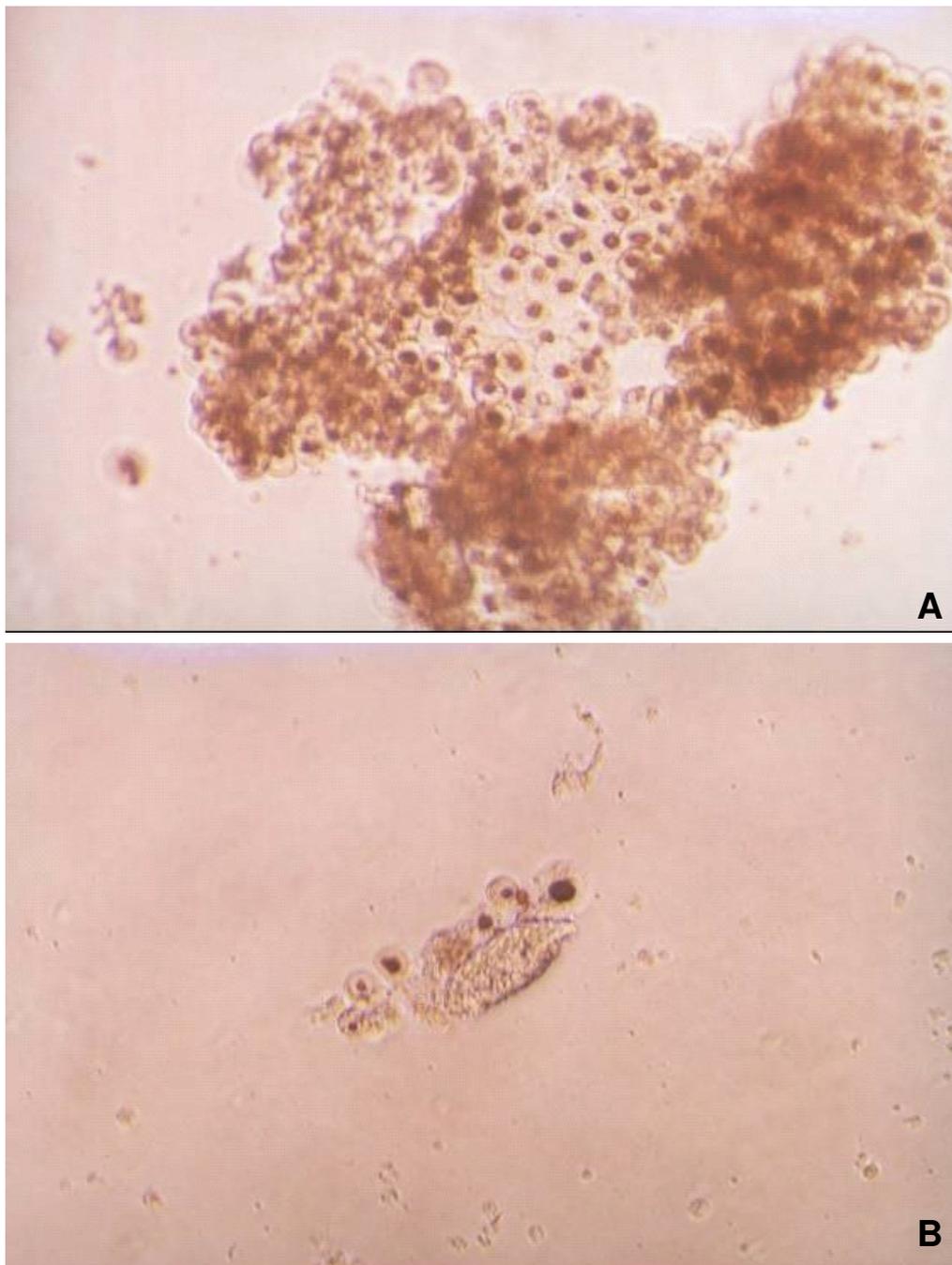


Fig. 12. Cultivo Primário do APO de caramujos *B. glabrata* logo após contato com esporocistos (30 μ l). Aumento: 200x.

A. As células tipo I se aglomeram formando uma extensa rede.

B. Células aderidas ao esporocisto.

Após 24 horas de contato, células tipo I que formaram rede estão próximas dos esporocistos (fig. 13-A). Também foram observadas muitas células tipo I e II com núcleo em divisão e os esporocistos livres entre elas com bastante movimento (fig. 13-B). Presença de células tipo III.

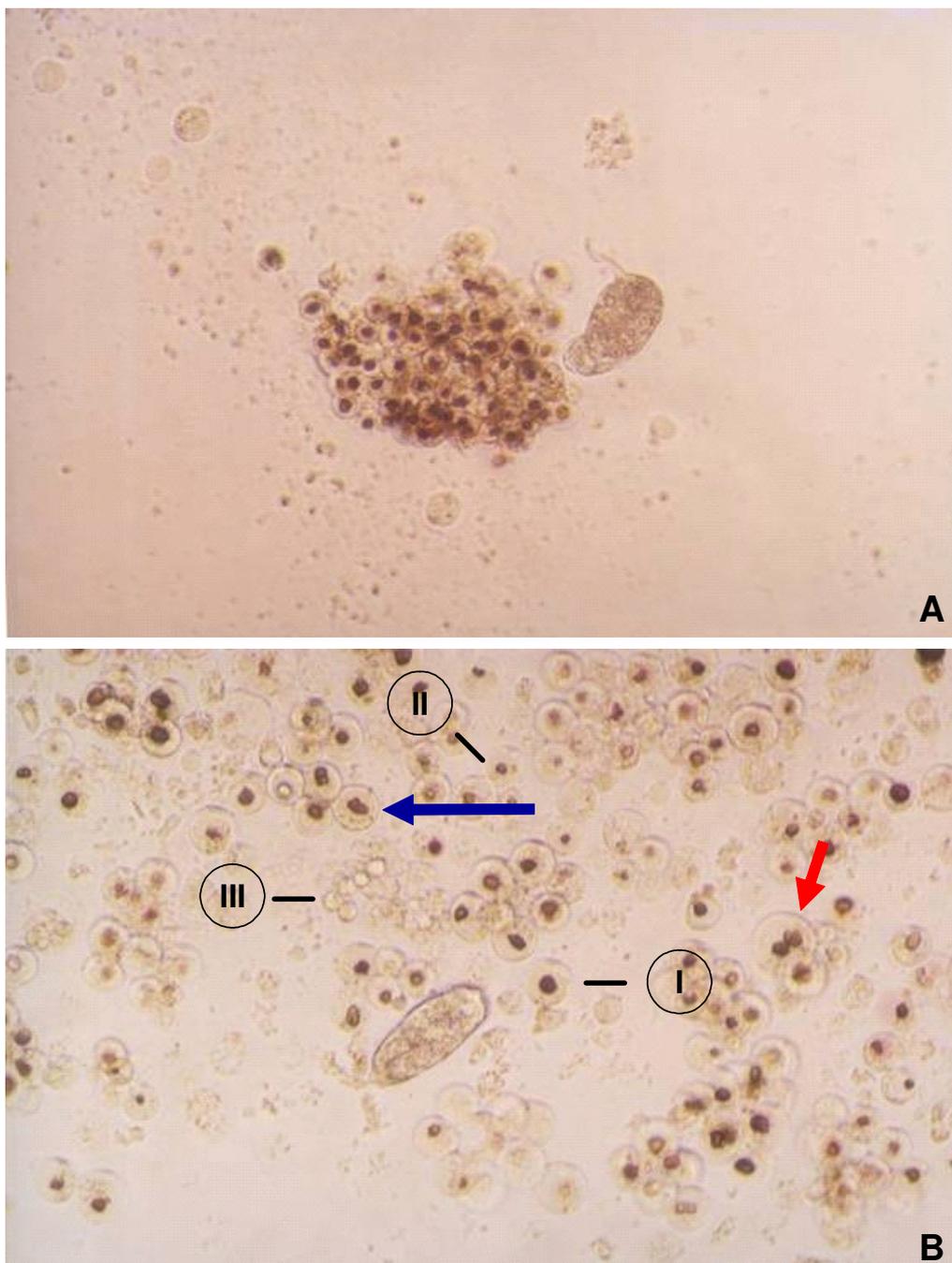


Fig. 13. Cultivo Primário do APO de caramujos *B. glabrata* após 24 horas de contato com esporocistos (18 esporocistos). Aumento: 200x.

A. As células que formaram rede estão próximas ao esporocisto.

B. Esporocisto vivo entre as células. Células tipos I, II e III. Células tipo I com núcleos em divisão (seta grande). Células tipo II com núcleos em divisão (seta pequena).

Após 48 horas, observa-se a presença de células em rede e de células livres ao redor do esporocisto, que permanece vivo

Em um outro experimento, esporocistos foram colocados em contato com células de *B. glabrata* que já estavam uma semana em cultura, e já apresentavam células tipo III (fig.14-A). Após 24 horas de contato, os esporocistos estavam vivos no meio das células tipo III e do tipo I (fig. 14-B) com movimento ativo.

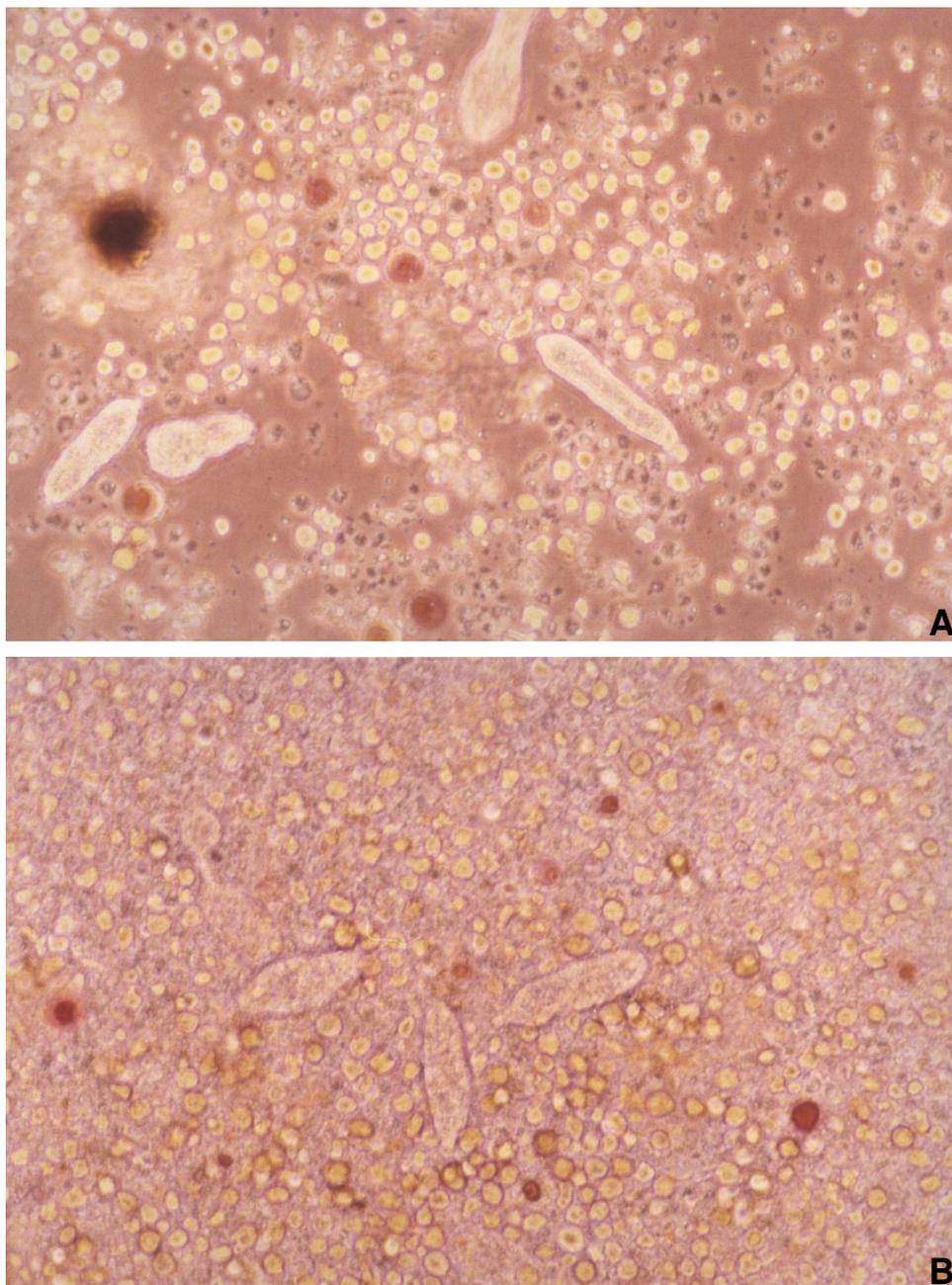


Fig. 14. Cultivo Primário do APO de caramujo *B. glabrata* mantidos por uma semana em cultura. Aumento: 200x.

A. Logo após contato com esporocistos (18 esporocistos): não houve reação por parte das células tipo I e já era visível a presença de células tipo I e tipo III.

B. Após 24 horas de contato (18 esporocistos): esporocistos vivos entre as células tipo I e tipo III.

B. tenagophila Taim

Da mesma forma como observado para *B. glabrata*, células tipo I se aglomeram formando uma extensa rede (fig. 15-A), migram em direção ao esporocisto e já se observam células ao redor do esporocisto (fig.15-B).

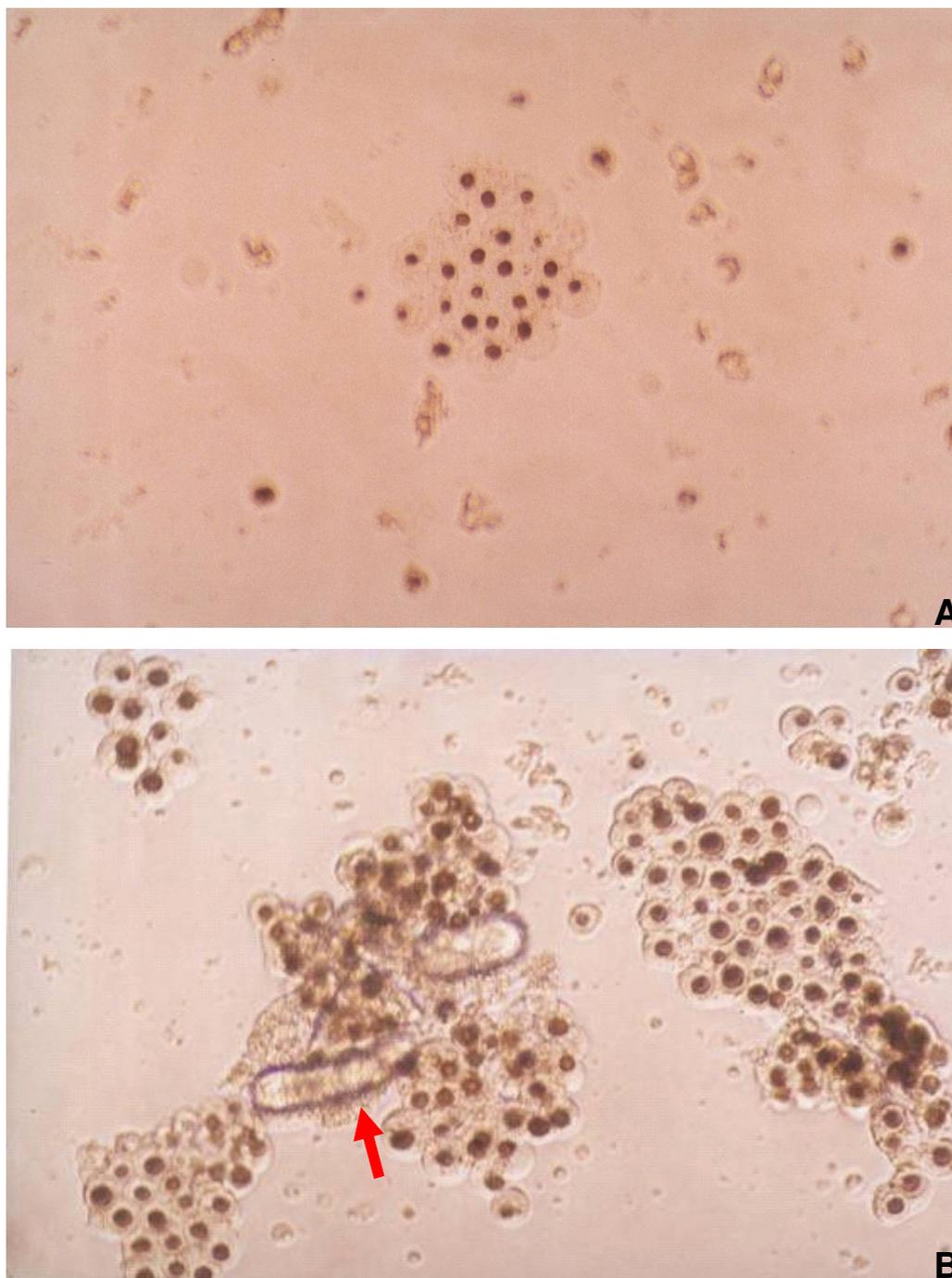


Fig. 15. Cultivo Primário APO de caramujo *B. tenagophila* Taim logo após contato com esporocistos (18 esporocistos). Aumento: 200x.

A. As células se aglomeram formando uma rede.

B. As células aglomeradas em rede aderidas ao esporocisto (seta).

Após 24 horas de contato, observa-se células com dois núcleos ao redor do esporocisto e muito *debris* no meio, semelhante ao verificado nas células em presença do SEA (fig.16-A, seta azul). Foram observadas células aderidas ao esporocisto (fig.16-B) e células tipo I aglomeradas (fig. 16-C). Ao redor das células observa-se um material denso (provável secreção celular) em forma de gel (fig.17-A, seta vermelha) e os esporocistos presos nesse material geliforme (fig.17-B e 17-C, setas vermelhas) apresentavam pouco movimento.

Após 48 horas de contato, esporocistos apresentaram-se mortos (sem movimento) entre as células (fig.18, seta azul).

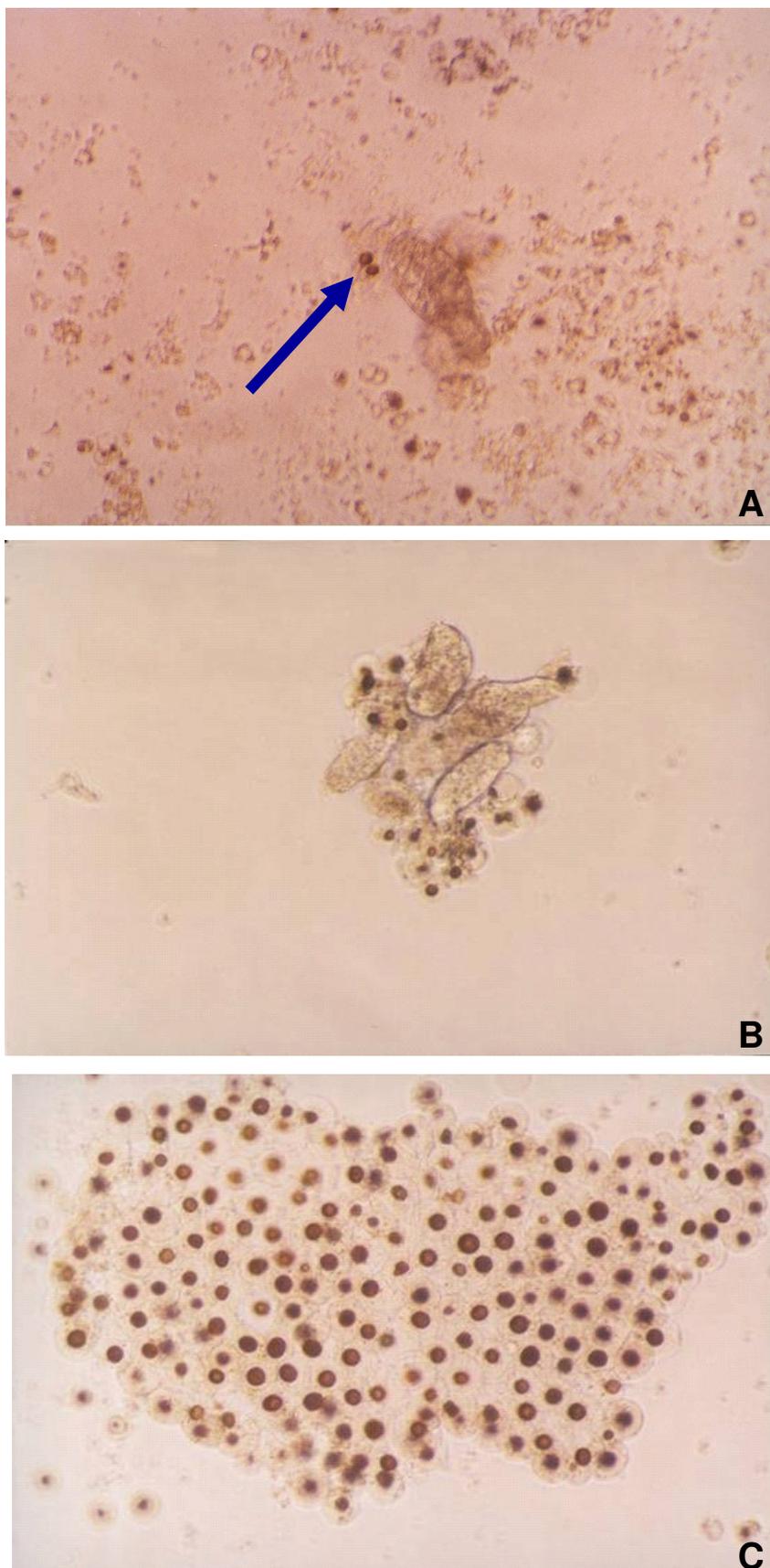


Fig. 16. Cultivo Primário APO de caramujo *B. tenagophila* do TAIM após 24 horas de contato com esporocistos (18 esporocistos). Aumento: 200X.

A. Seta azul: célula com 2 núcleos ao redor do esporocisto e excesso de debris.

B. Células aderidas ao esporocisto.

C. Ainda se observam células tipo I aglomeradas em rede.

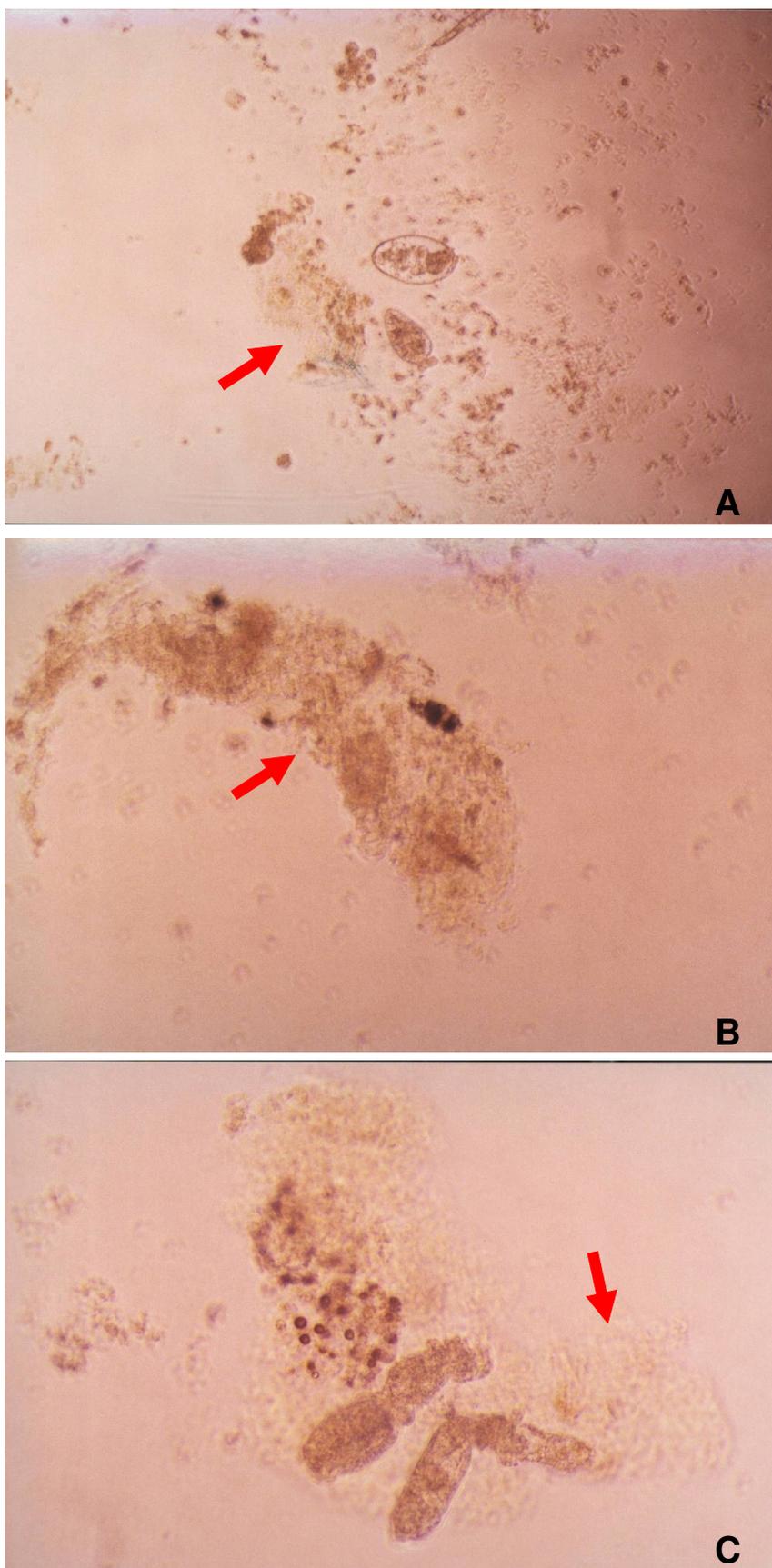


Fig. 17. Cultivo Primário APO de caramujo *B. tenagophila* do Taim após 24 horas de contato com esporocistos (18 esporocistos). Aumento: 200x

A. Seta: observa-se ao redor das células um material denso em forma de gel.

B. Seta: esporocisto preso no material geliforme.

C. Seta: esporocisto preso no material geliforme.

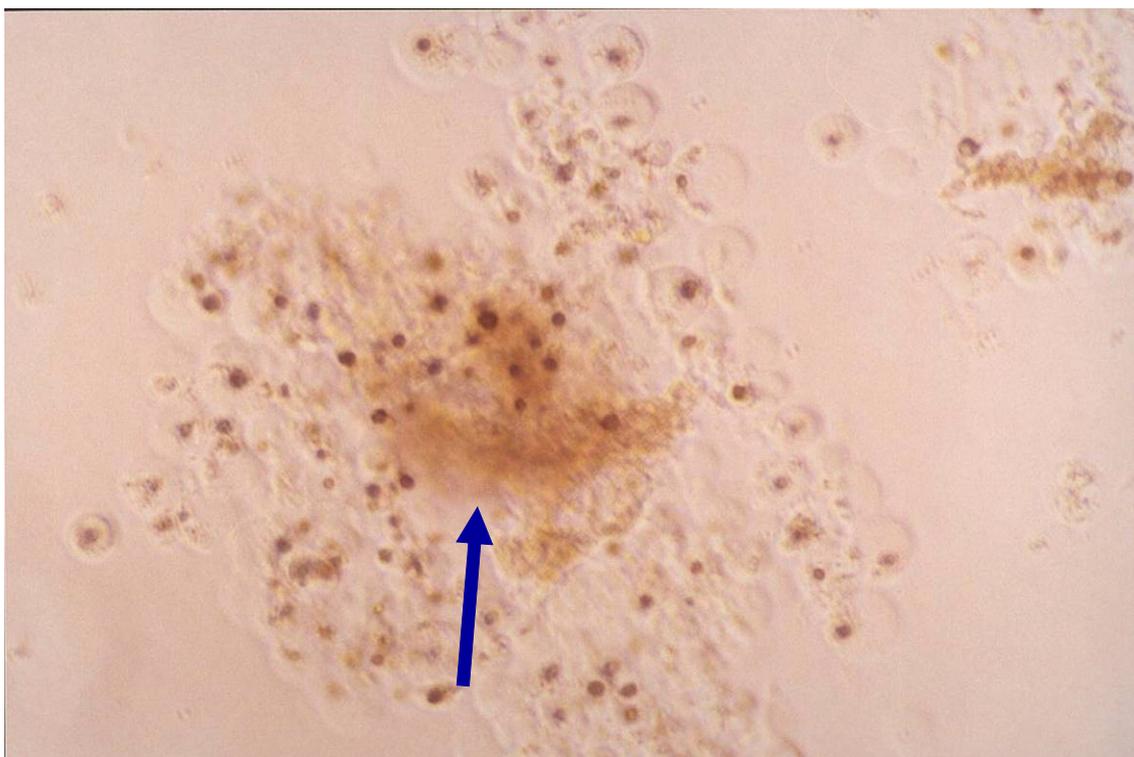


Fig. 18. Cultivo Primário APO de caramujo *B. tenagophila* do TAIM após 48 horas de contato com esporocistos (18 esporocistos). Aumento: 200x. Observam-se os esporocistos sem movimento (mortos e degenerados) entre as células (seta).

B. tenagophila Cabo Frio

Da mesma forma como observado para *B. glabrata*, células tipo I se aglomeram, logo após o contato com os esporocistos, formando uma extensa rede de células. Próximo aos esporocistos foram observadas células e estes apresentavam bastante movimento. Não existem células tipo III.

Após 24 horas ainda se observam células em rede, porém em menor quantidade que nos outros experimentos (fig.19-A), células ao redor do esporocisto (fig.19-B). Presença de células tipo III (fig.19-A).

Após 48 horas poucas e pequenas redes, esporocisto mortos e vivos entre as células (fig. 20).

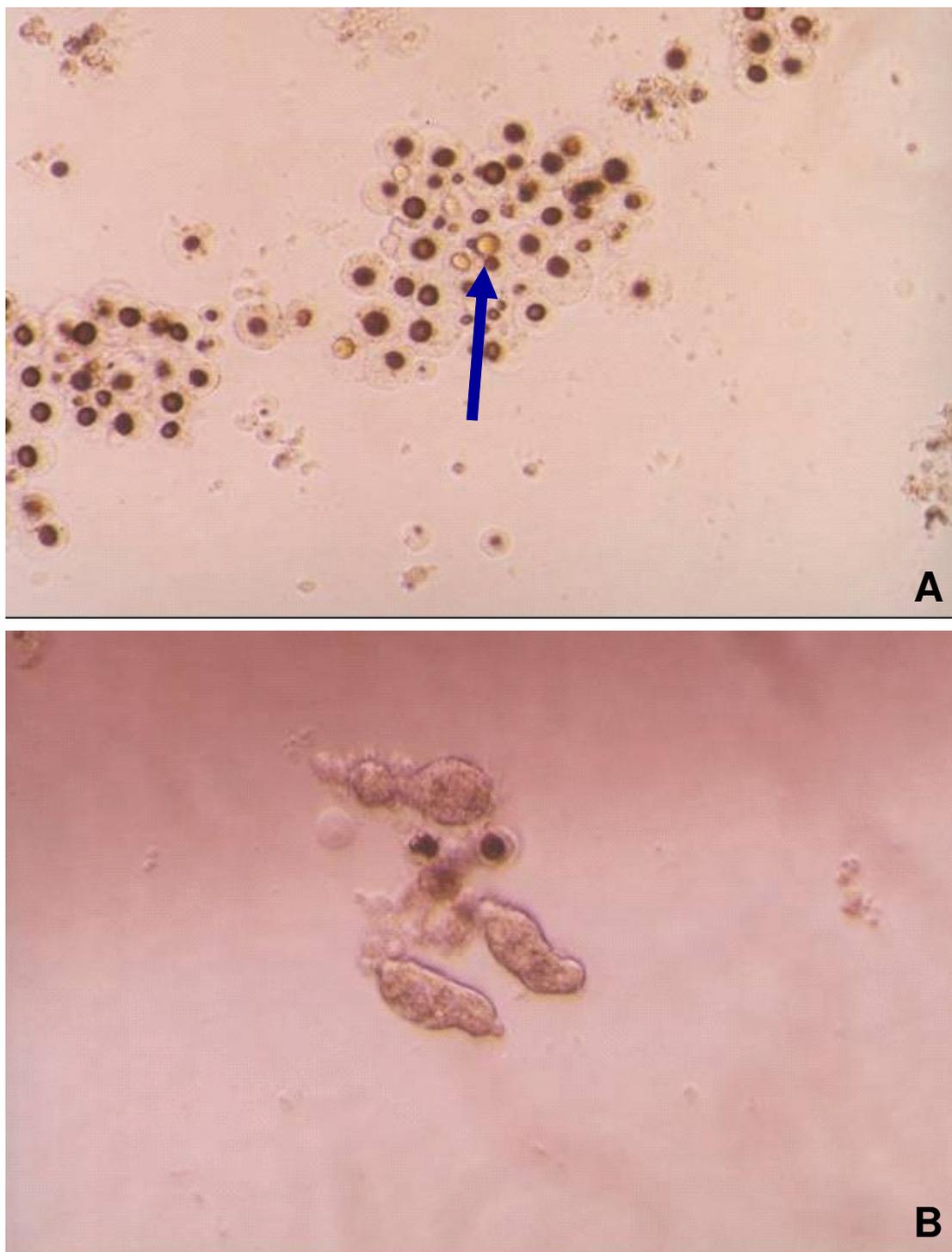


Fig. 19. Cultivo Primário APO de caramujo *B. tenagophila* Cabo Frio após 24 horas de contato com esporocistos (18 esporocistos). Aumento: 200x.

A. Células aglomeradas em rede . Observa-se a presença de células tipo III (seta).

B. Células aderidas ao esporocisto.

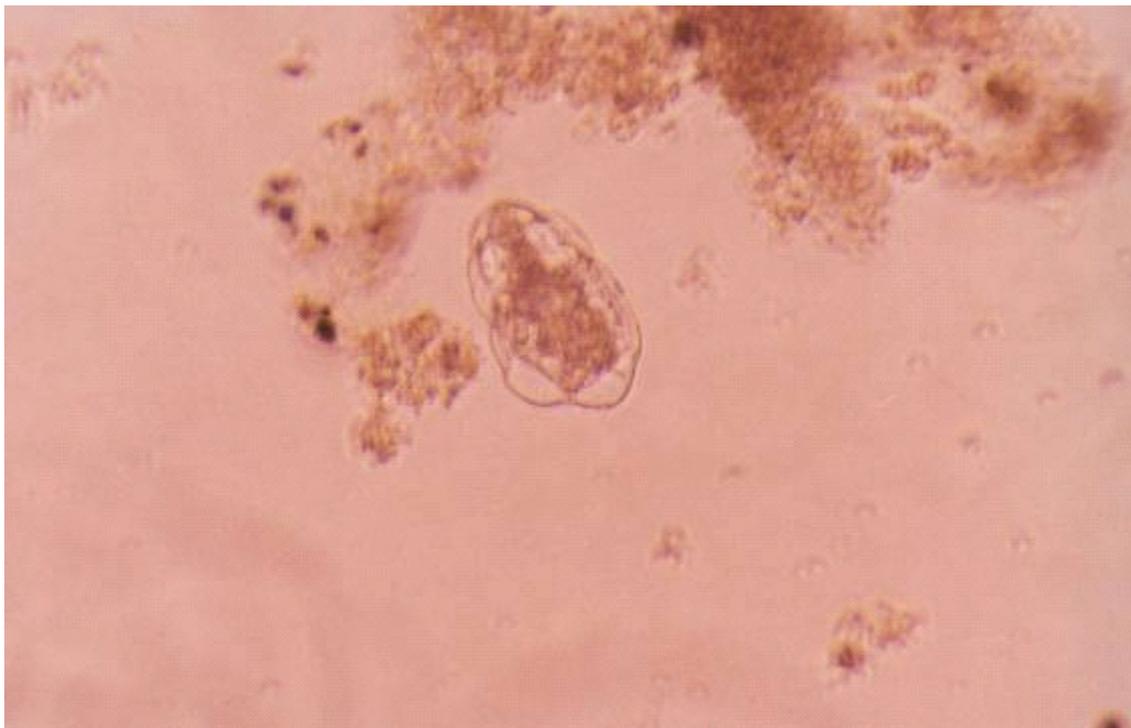


Fig. 20. Cultivo Primário APO de caramujo *B. tenagophila* Cabo Frio após 48 horas de contato com esporocistos (18 esporocistos). Aumento: 400x. Observa-se a presença de esporocistos vivos entre as células.

5.5. Comportamento celular em contato com miracídios

Experimento realizado com caramujos *B. tenagophila* do Taim e Cabo Frio e *B. glabrata*.

Não houve resposta das células de nenhum dos caramujos testados frente a miracídios. Não houve nenhuma alteração visível nas células, elas permaneceram idênticas as células de cultura que não receberam qualquer estímulo.

5.6. Análise das células através microscopia confocal utilizando lectinas conjugadas com FITC

WGA

B. glabrata

Na figura 21-A é possível observar o aspecto geral do órgão hematopoiético, em pequeno aumento, corado pela lectina. É possível observar

septos de tecidos não corados (setas). Na figura 21-B observa-se o alinhamento de células. O citoplasma celular dos hemócitos foram corados pela lectina mostrando os esboços das células (setas brancas). Observa-se também a forte reação na matriz extracelular (setas amarelas) e os núcleos arredondados e de diferentes tamanhos e sem coloração.

B. tenagophila Taim

Na figura 22-A é possível observar o aspecto geral do órgão hematopoiético, em pequeno aumento, corado pela lectina. É possível observar septos de tecidos não corados (setas) de maneira semelhante ao órgão do *B. glabrata*.

Na figura 22-B observa-se que as células foram coradas uniformemente porém mais fracamente do que os órgãos do *B. glabrata* e do *B. tenagophila* Cabo Frio. Nota-se também a fraca reação na matriz extracelular (setas amarelas).

B. tenagophila Cabo Frio

Na figura 23-A é possível observar o aspecto geral do órgão hematopoiético, em pequeno aumento, corado pela lectina. Pode-se observar uma coloração da lectina mais forte na região da superfície do órgão (setas brancas)

A figura 23-B mostra uma reação intermediária quando comparada nos aspectos gerais com *B. glabrata* e com *B. tenagophila* Taim. Observa-se também uma fraca reação na matriz extracelular contrastando (setas amarelas) com uma forte reação “granulosa” mostrando organelas citoplasmáticas (setas brancas).

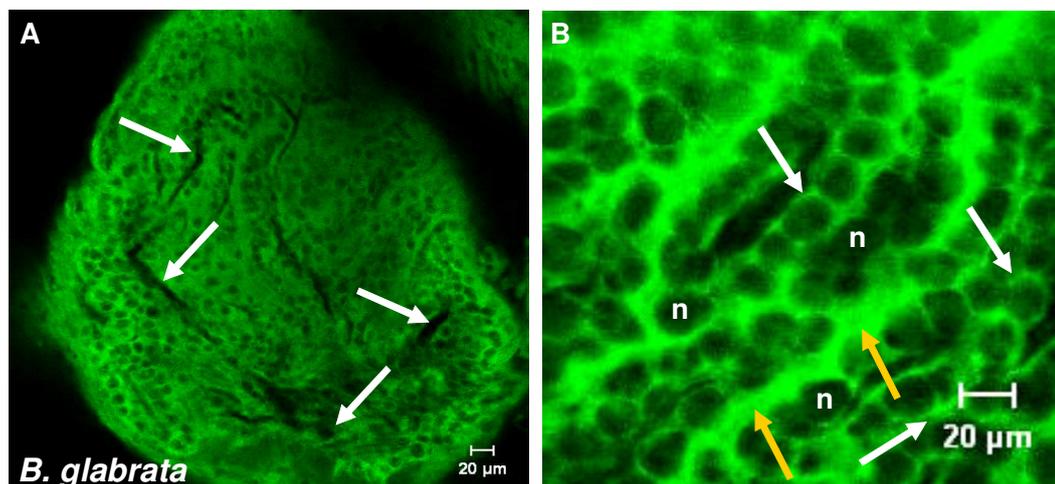


Fig. 21. WGA - *B. glabrata*

- A. Septos de tecidos não corados (setas brancas).
 B. Alinhamento de células. Citoplasma celular dos hemócitos corado pela lectina (setas brancas). Forte reação na matriz extracelular (setas amarelas) e núcleos arredondados de diferentes tamanhos e sem coloração (n).

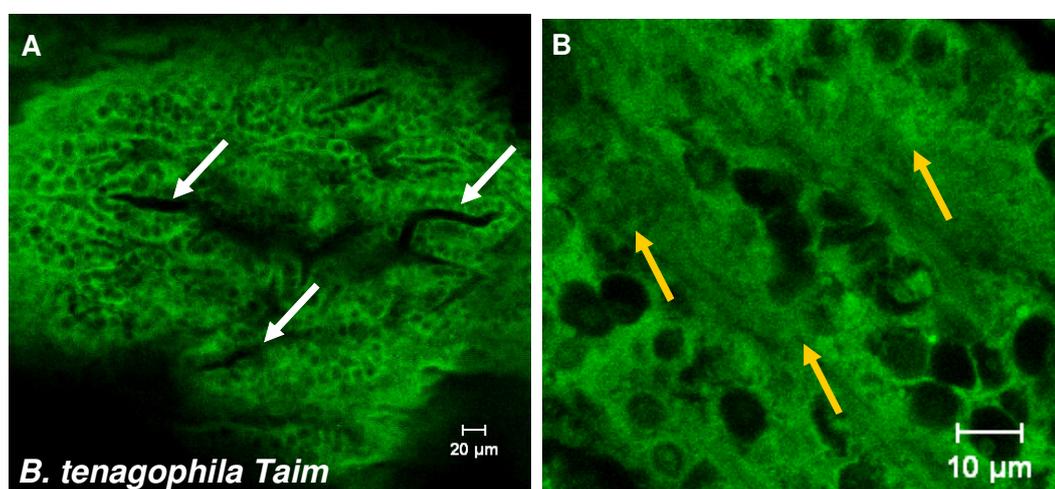


Fig. 22. WGA - *B. tenagophila* Taim

- A. Septos de tecidos não corados (setas brancas)
 B. Células coradas uniformemente e fraca reação na matriz extracelular (setas amarelas).

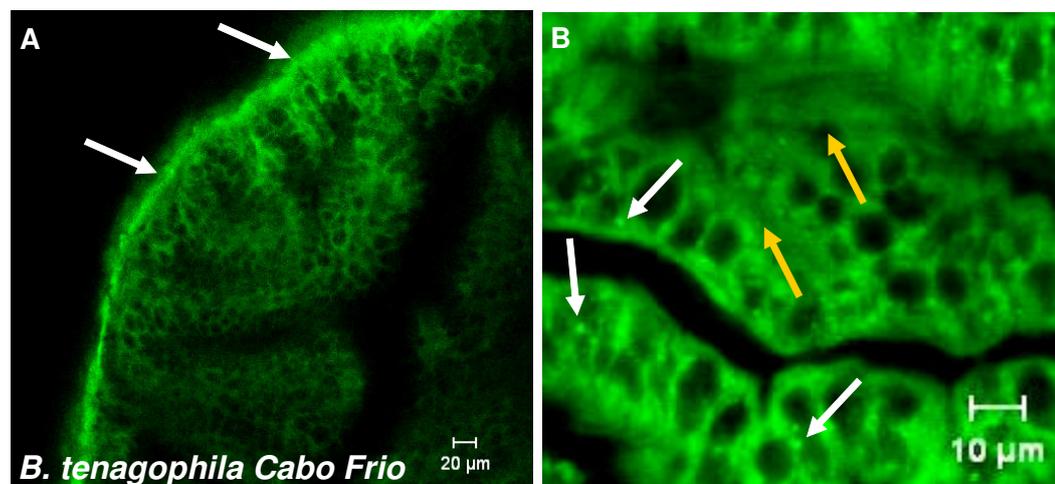


Fig. 23. WGA - *B. tenagophila* Cabo Frio

- A. Coloração da lectina mais forte na região da superfície do órgão (setas brancas) .
 B. Fraca reação na matriz extracelular (setas amarelas) contrastando com uma forte reação "granulosa" mostrando organelas citoplasmáticas (setas brancas).

PNA

B. glabrata

Na figura 24-A observa-se o aspecto geral do órgão corado pela lectina. É possível observar a coloração granular e não uniforme do órgão completamente distinta de *B. tenagophila* Taim e de *B. tenagophila* Cabo Frio.

A figura 24-B mostra um alinhamento perfeito das células. O citoplasma celular dos hemócitos e a matriz extracelular (setas amarelas) foram coradas de maneira similar, porém o citoplasma celular apresenta granulações (setas brancas).

B. tenagophila Taim

Na figura 25-A temos um pequeno aumento do órgão mostrando aspecto geral corado fracamente em algumas regiões contrastando com outras fortemente coradas completamente diferente do *B. glabrata*, porém similar ao *B. tenagophila* Cabo Frio.

Na figura 25-B é possível observar grupos de células vizinhas fracamente coradas (setas brancas) nos seus citoplasmas contrastando com outras fortemente coradas (setas amarelas).

B. tenagophila Cabo Frio

Na figura 26-A observa-se algumas células fortemente coradas entremeadas com a maioria das células fracamente positivas com vários grânulos citoplasmáticos não corados. No aspecto geral, o órgão é completamente diferente do *B. glabrata*, porém similar ao *B. tenagophila* Taim.

Na figura 26-B é possível observar a existência de células variando a coloração, desde células fracamente coradas (setas amarelas), células com aspectos intermediários (seta vermelha) de coloração e células fortemente coradas (seta branca). Além disto, percebe-se que as células positivas estão com os citoplasmas bastante delineados.

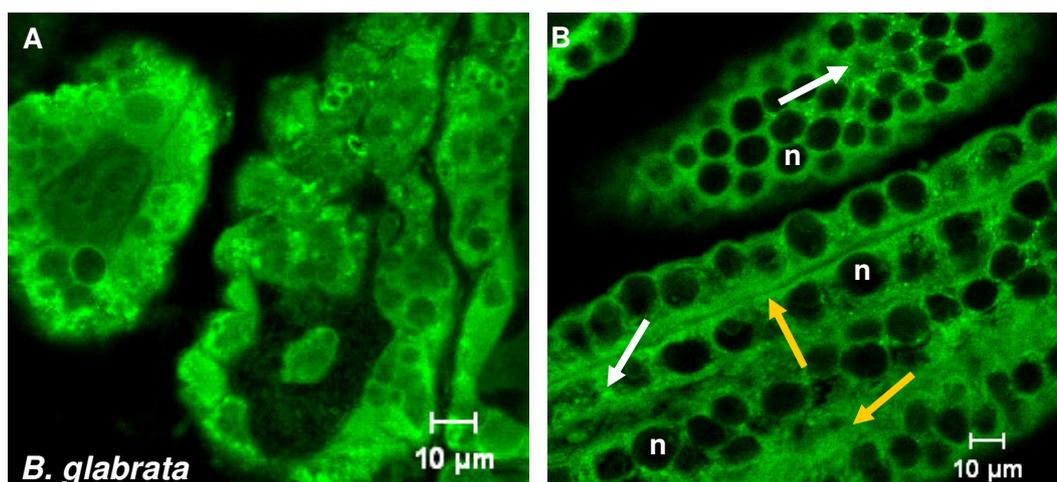


Fig. 24. PNA - *B. glabrata*

A. Coloração granular e não uniforme do órgão hematopoético.

B. Alinhamento perfeito das células. Citoplasma celular dos hemócitos e a matriz extracelular (setas amarelas) corados de maneira similar. Citoplasma celular apresenta granulações (setas brancas). (n) = núcleo.

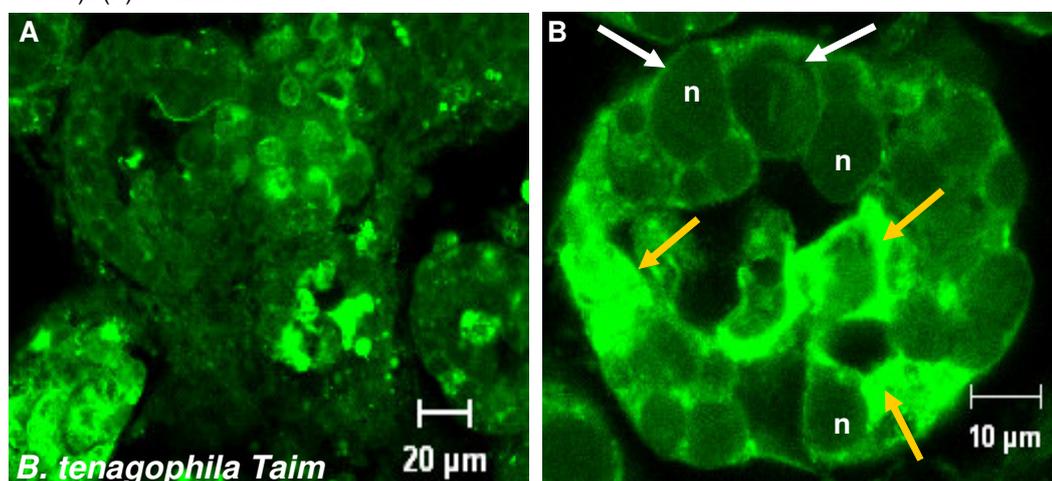


Fig. 25. PNA - *B. tenagophila* Taim

A. Aspecto geral corado fracamente em algumas regiões contrastando com outras fortemente coradas.

B. Grupos de células vizinhas fracamente coradas (setas brancas) nos seus citoplasmas contrastando com outras fortemente coradas (setas amarelas).

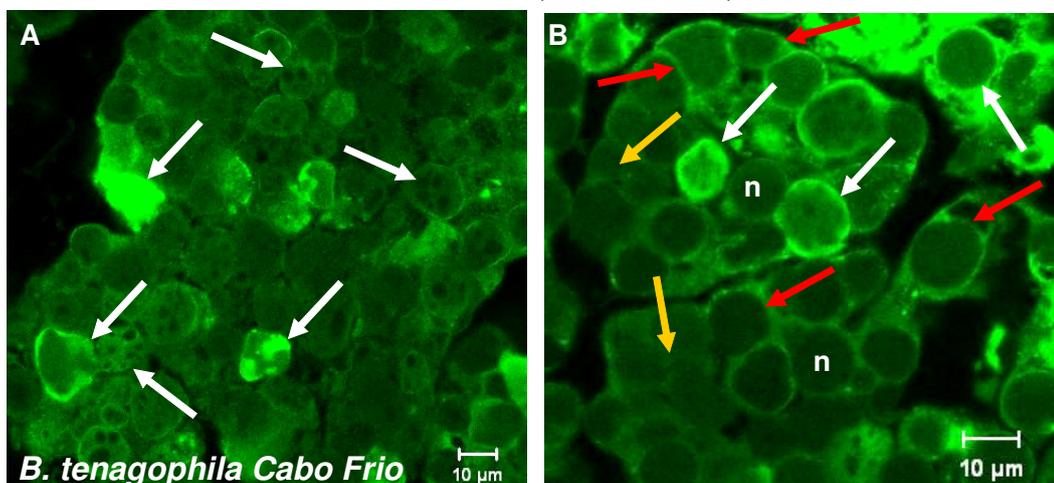


Fig. 26. PNA - *B. tenagophila* Cabo Frio

A. Algumas células fortemente coradas entremeadas com a maioria das células fracamente positivas com vários grânulos citoplasmáticos não corados.

B. Células variando a coloração, desde células fracamente coradas (setas amarelas), células com aspectos intermediários de coloração (setas vermelhas) e células fortemente coradas (setas brancas). As células positivas estão com os citoplasmas bastante delineados.

LPL

B. glabrata

Na figura 27-A observa-se o alinhamento das células. O citoplasma celular dos hemócitos e a matriz extracelular foram corados de maneira similar. Em alguns locais é possível observar granulações no espaço entre as células e a matriz (setas brancas).

Na figura 27-B é possível observar células com citoplasma bem delineado e corado (setas brancas). As granulações (setas amarelas) entre as células e a matriz estão bem evidentes.

B. tenagophila Taim

Na figura 28-A observa-se algumas células coradas entremeadas com a maioria das células fracamente positivas e algumas com citoplasma bem delineado (setas brancas). É possível observar septos de tecidos não corados (setas amarelas).

Na figura 28-B é possível observar a maioria das células fracamente coradas (setas vermelhas) entremeadas com células fracamente positivas (setas brancas). Observam-se septos de tecidos não corados (setas amarelas).

B. tenagophila Cabo Frio

Na figura 29-A observa-se algumas células fortemente coradas (setas brancas) entremeadas com a maioria das células fracamente positivas com vários grânulos citoplasmáticos não corados (setas vermelhas). No aspecto geral, o órgão é completamente diferente do *B. glabrata*, porém similar ao *B. tenagophila* Taim. Observam-se septos de tecidos não corados (setas amarelas).

Na figura 29-B é possível observar a existência de células variando a coloração, desde células fracamente coradas (setas amarelas), células com aspectos intermediários (seta vermelha) de coloração e células fortemente coradas (seta branca). Também é possível perceber a presença de grânulos citoplasmáticos não corados e corados. Observam-se septos de tecidos não corados.

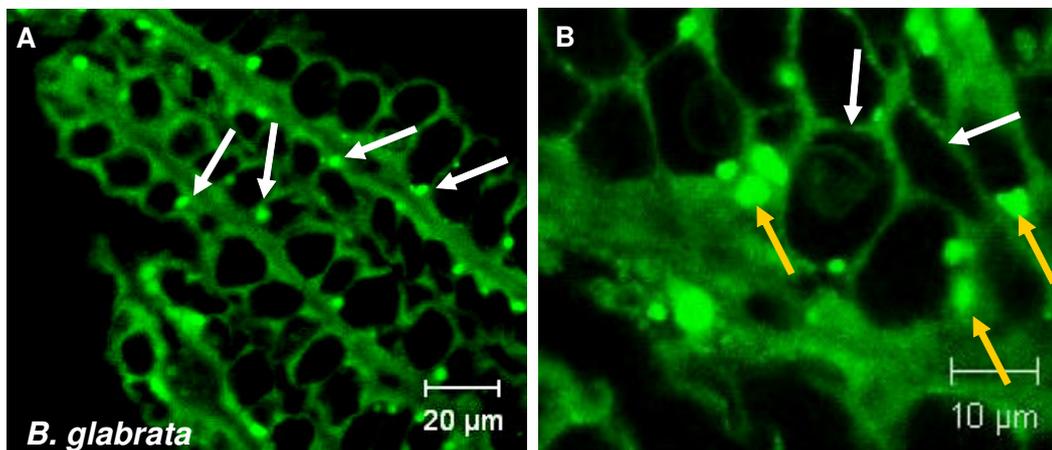


Fig. 27. LPL - *B. glabrata*

- A. Alinhamento das células. O citoplasma celular dos hemócitos e matriz extracelular corados de maneira similar. Granulações no espaço entre as células e a matriz (setas brancas).
- B. Células com citoplasma bem delineado e corado (setas brancas). Estão bem evidentes as granulações no espaço entre as células e a matriz.

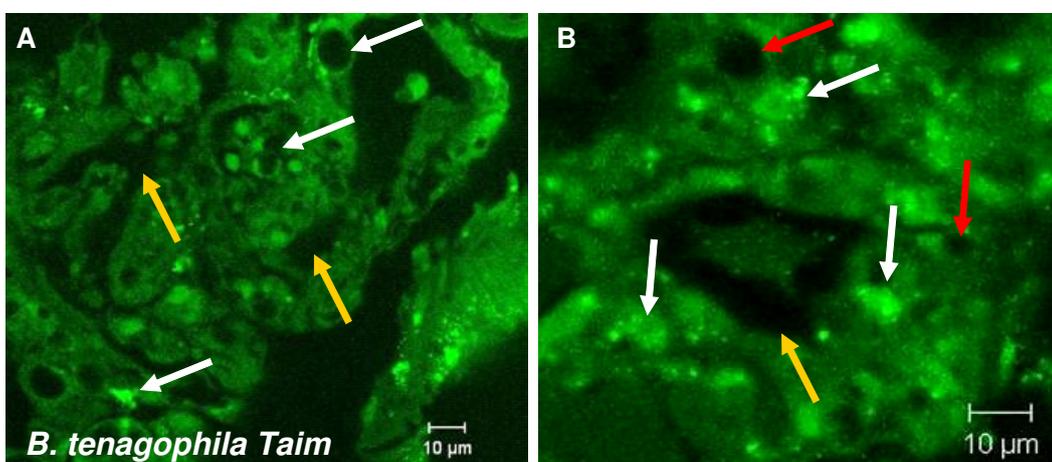


Fig. 28. LPL - *B. tenagophila* Taim

- A. Algumas células coradas entremeadas com a maioria das células fracamente positivas e outras com citoplasma bem delineado (setas brancas). Septos de tecidos não corados (setas amarelas).
- B. Maioria das células fracamente coradas (setas vermelhas) entremeadas com células fracamente positivas (setas brancas). Septos de tecidos não corados (setas amarelas).

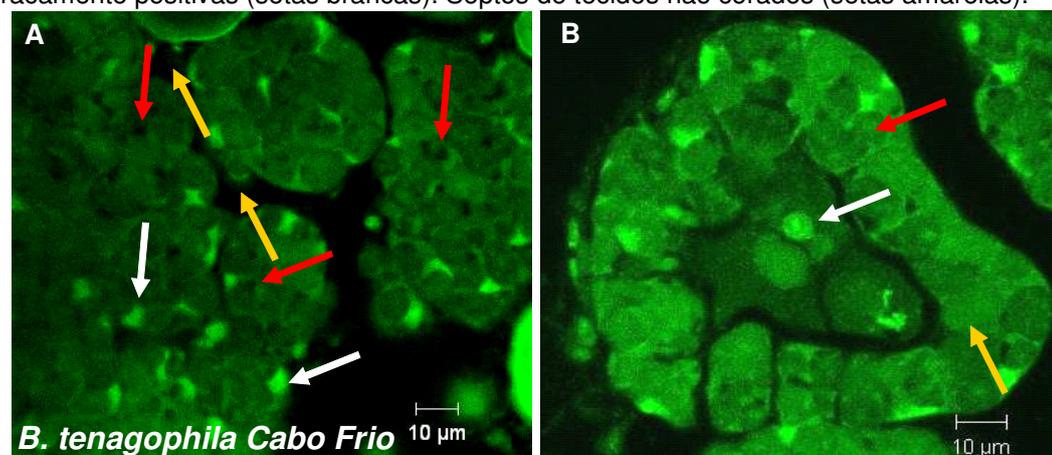


Fig. 29. LPL - *B. tenagophila* Cabo Frio

- A. Algumas células fortemente coradas entremeadas com a maioria das células fracamente positivas com vários grânulos citoplasmáticos não corados (setas vermelhas). Septos de tecidos não corados (setas amarelas).
- B. Células variando a coloração, desde células fracamente coradas (seta amarela), células com aspectos intermediários de coloração (seta vermelha) e células fortemente coradas (seta branca). Presença de grânulos citoplasmáticos não corados e corados. Observam-se septos de tecidos não corados.

Con A

B. glabrata

Na figura 30-A e B observa-se uma reação negativa do órgão para com a lectina.

B. tenagophila Taim

Na figura 31-A é possível observar o aspecto geral do órgão corado pela lectina. É possível observar septos de tecidos não corados (setas brancas) de maneira similar ao órgão do *B. tenagophila* Cabo Frio e bem diferente do *B. glabrata*

Na figura 31-B é possível observar a existência de células coradas (seta amarela), com os citoplasmas bastante delineados. Células não coradas (seta vermelha). Nota-se também a presença de núcleos arredondados de diferentes tamanhos e sem coloração (setas brancas).

B. tenagophila Cabo Frio

Na figura 32-A é possível observar o aspecto geral do órgão corado pela lectina. É possível observar septos de tecidos não corados (setas brancas) de maneira similar ao órgão do *B. tenagophila* Taim e bem diferente do *B. glabrata*.

Na figura 32-B nota-se a presença de granulações na matriz extracelular (setas amarelas) e também a presença de núcleos arredondados de diferentes tamanhos (setas brancas).

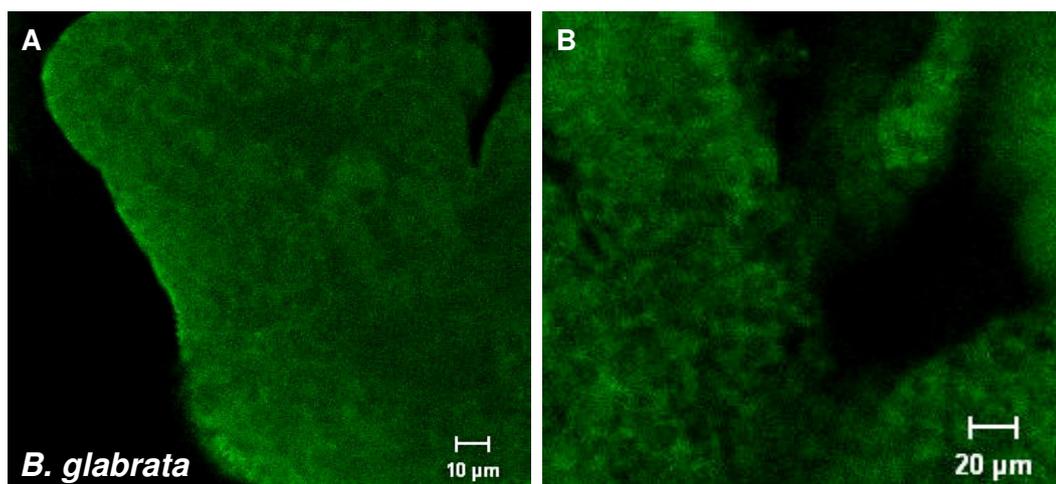


Fig. 30. Con A - *B. glabrata*
A e B Reação negativa do órgão para com a lectina.

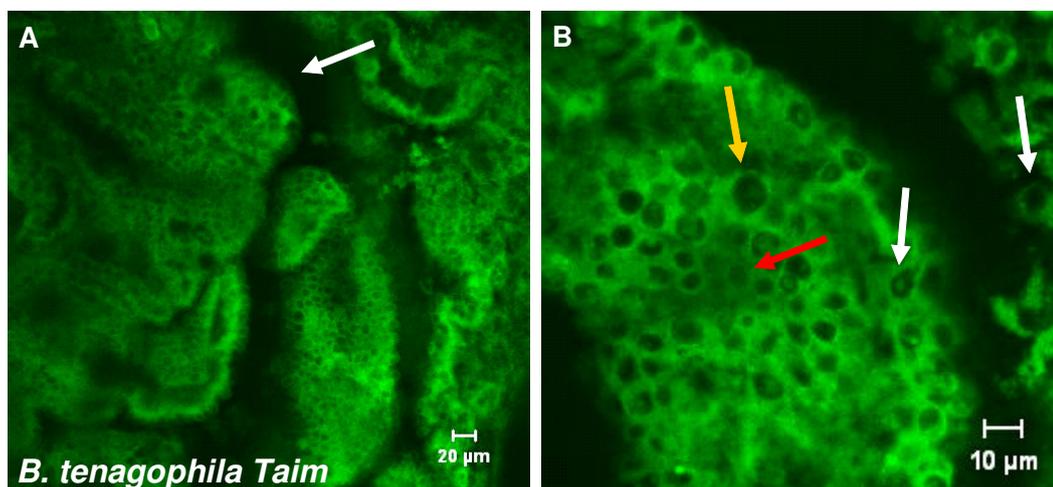


Fig. 31. Con A - *B. tenagophila* Taim
A. Septos de tecidos não corados (seta branca).
B. Células coradas (seta amarela), com os citoplasmas bastante delineados. Células não coradas (seta vermelha). Presença de núcleos arredondados de diferentes tamanhos e sem coloração (setas brancas).

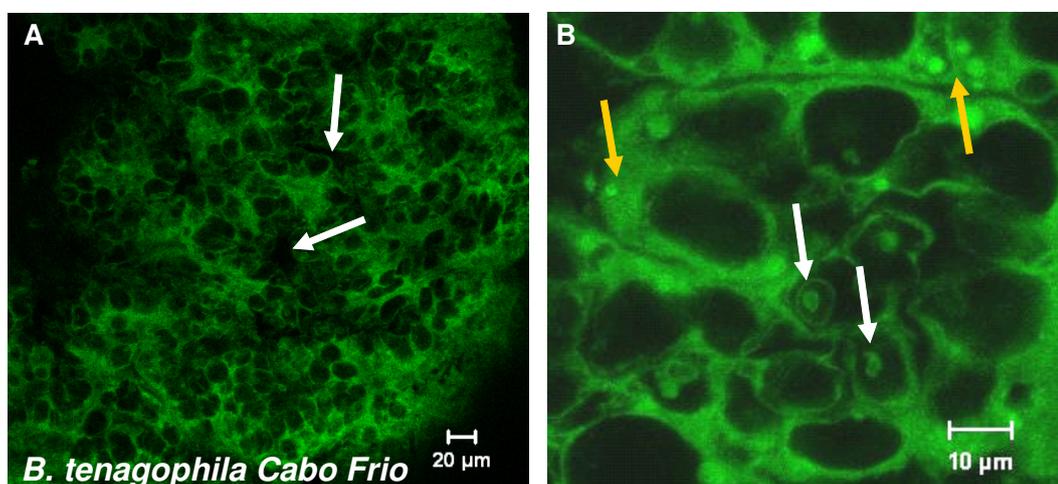


Fig. 32. Con A - *B. tenagophila* Cabo Frio
A. Septos de tecidos não corados (setas brancas).
B. Granulações na matriz extracelular (setas amarelas) e presença de núcleos arredondados de diferentes tamanhos (setas brancas).

Lyso Tracker Red

B. glabrata

Na figura 33-A é possível observar a existência de lisossomos na maioria das células (setas brancas).

Na figura 33-B observa-se a existência de lisossomos em algumas células (setas vermelhas). Nota-se também a presença de núcleos arredondados de diferentes tamanhos (setas brancas).

B. tenagophila Taim

Na figura 34-A é possível observar a existência de lisossomos em algumas células (setas brancas).

Na figura 34-B observam-se detalhes dos lisossomos (setas brancas).

B. tenagophila Cabo Frio

Na figura 35-A é possível observar a existência de lisossomos em algumas células (setas brancas), porém em quantidade maior que *B. tenagophila* Taim.

Na figura 35-B observa-se a existência de lisossomos em algumas células (setas vermelhas). Nota-se também a presença de núcleos arredondados de diferentes tamanhos (setas brancas).

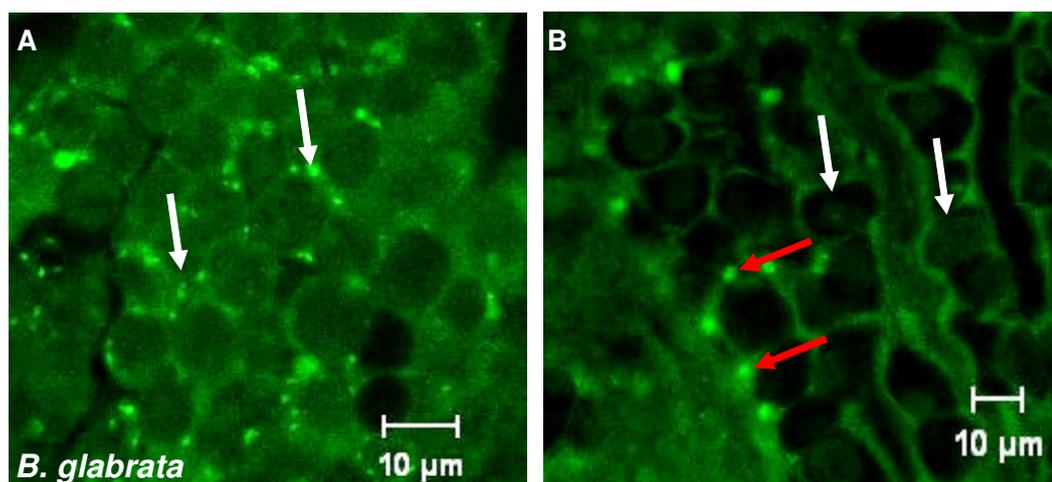


Fig. 33. Lysotracker - *B. glabrata*

A. Existência de lisossomos na maioria das células (setas brancas).

B. Existência de lisossomos em algumas células (setas vermelhas). Presença de núcleos arredondados de diferentes tamanhos (setas brancas).

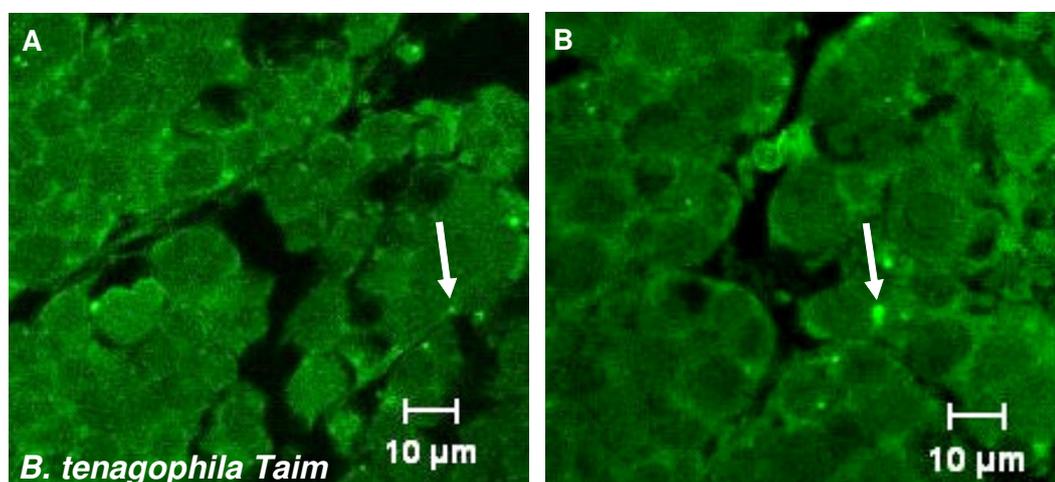


Fig. 34. Lysotracker - *B. tenagophila* Taim

A. Existência de lisossomos em algumas células (seta branca).

B. Detalhes dos lisossomos (seta branca).

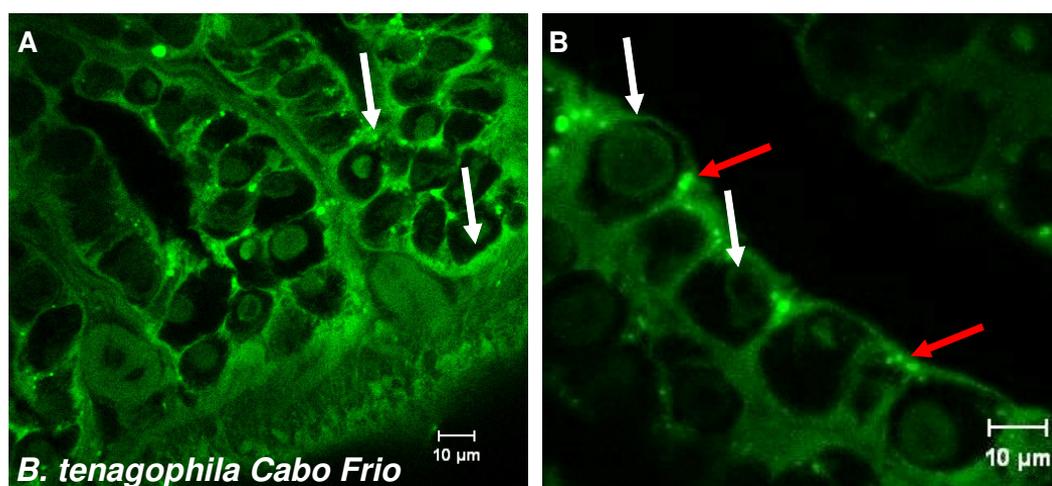


Fig. 35. Lysotracker - *B. tenagophila* Cabo Frio

A. Existência de lisossomos em algumas células (setas brancas).

B. Existência de lisossomos em algumas células (setas vermelhas). Presença de núcleos arredondados de diferentes tamanhos (setas brancas).

Controle

B. glabrata

Na figura 36-A observa-se o aspecto geral do órgão mostrando a auto fluorescência, a presença de septos não fluorescentes (seta branca) e a organização celular. Assemelha-se ao *B. tenagophila* Cabo Frio.

B. tenagophila Taim

Na figura 36-B observa-se o aspecto geral do órgão mostrando a auto fluorescência e a presença de septos não fluorescentes (seta branca).

B. tenagophila Cabo Frio

Na figura 36-C observa-se o aspecto geral do órgão mostrando a auto fluorescência, a presença de septos não fluorescentes (seta vermelha) e a organização celular com núcleos arredondados e de diferentes tamanhos (seta branca). Assemelha-se ao *B. glabrata*.

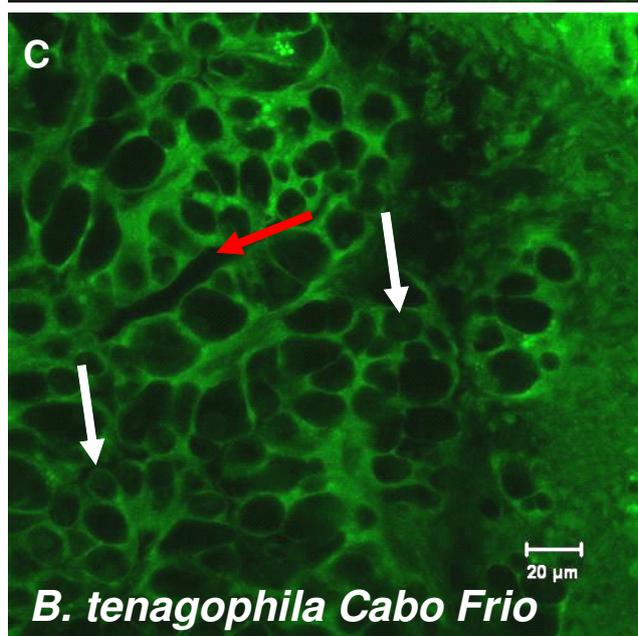
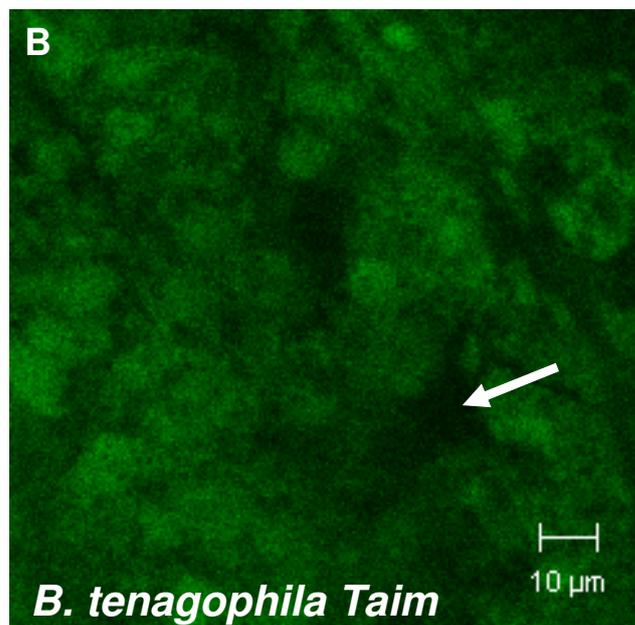
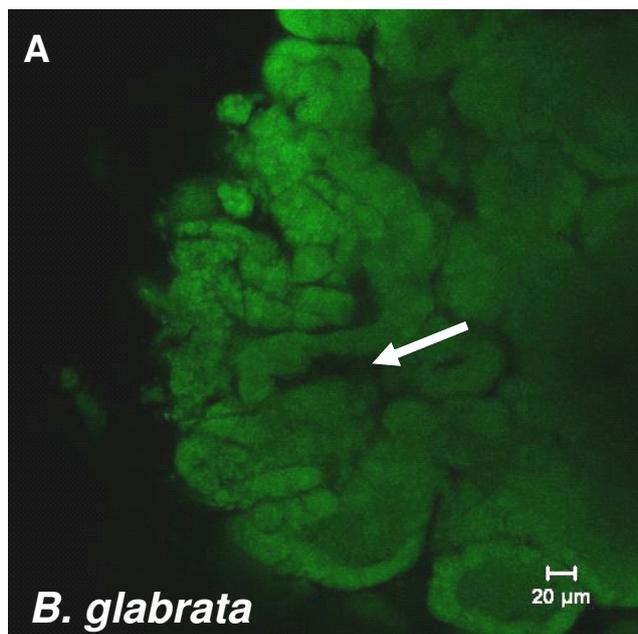


Fig. 36. Controle

- A. *B. glabrata*. Auto fluorescência, a presença de septos não fluorescentes (seta branca) e a organização celular.
- B. *tenagophila* Taim. Auto fluorescência e a presença de septos não fluorescentes (seta branca).
- C. *B. tenagophila* Cabo Frio. Auto fluorescência, a presença de septos não fluorescentes (seta vermelha) e a organização celular com núcleos arredondados e de diferentes tamanhos (setas brancas).

Aspecto Geral

B. glabrata

Na figura 37-A observa-se o pequeno aumento do órgão corado pela lectina WGA, a qual praticamente corou todo o órgão mostrando os aspectos gerais do tecido inclusive núcleo corado (n) com Topro-3, um marcador nuclear de cor marrom avermelhado. Nota-se o espaço entre as células mostrando material fibroso fortemente corado provavelmente representando parte do tecido conjuntivo presente no órgão (asteriscos).

Na figura 37-B observam-se detalhes do órgão corado pela lectina WGA mostrando regiões fluorescentes do órgão (asteriscos) e os núcleos corados (n) com Topro-3. Notam-se septos entremeados no meio do órgão sem reatividade (setas).

B. tenagophila Taim

Na figura 37-C observa-se pequeno aumento do órgão corado pela lectina WGA, a qual praticamente corou todo o órgão, porém fracamente (setas). Notam-se os núcleos corados em marrom avermelhados (n) característico do Topro-3. Notam-se também os septos de tecido não corados (setas azuis).

Na figura 37-D observa-se detalhes da marcação das células pela WGA (setas) evidenciando o citoplasma celular e os núcleos (n) em marrom avermelhados. Os septos são vistos não corados (setas azuis).

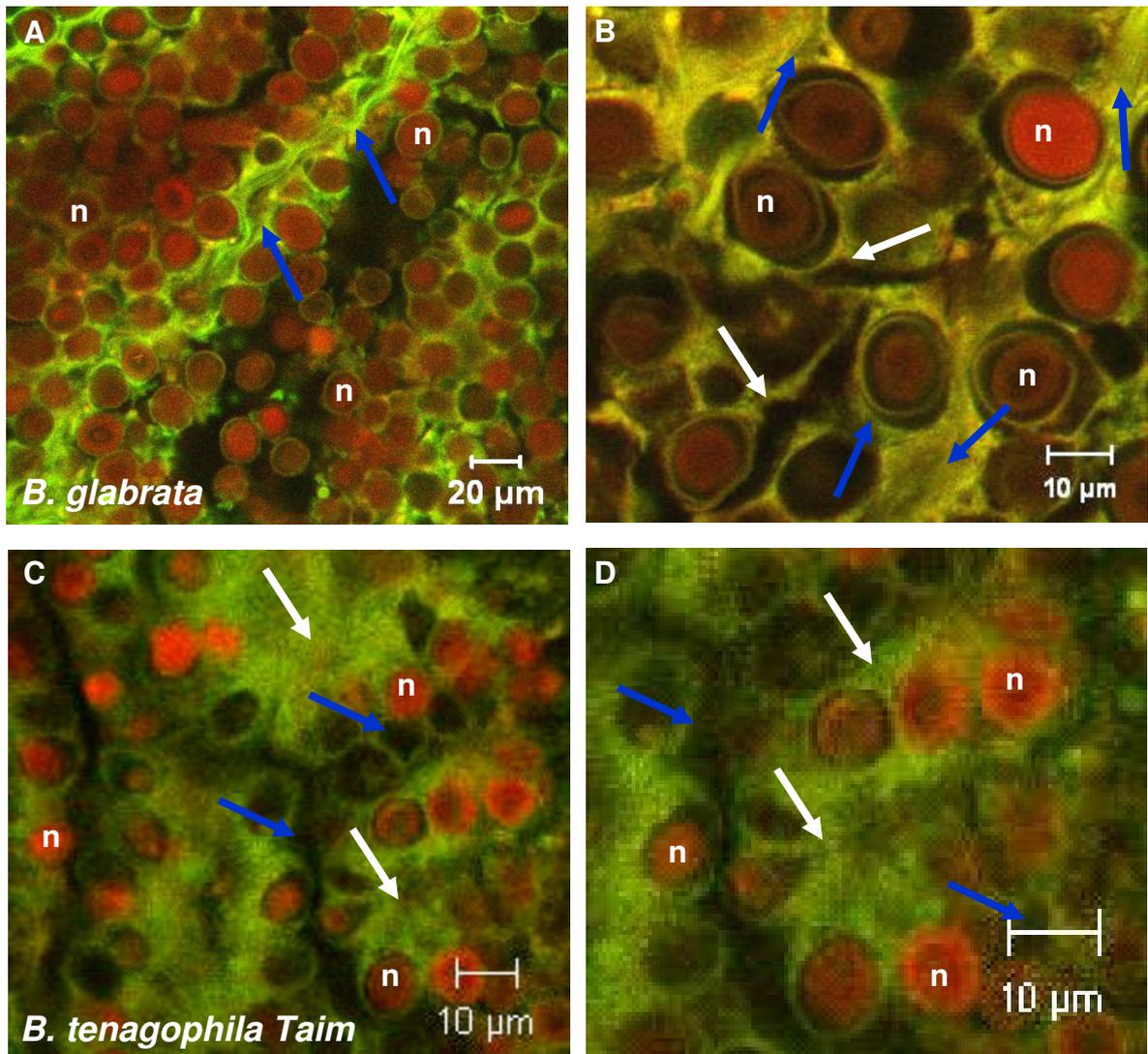


Fig. 37. **Aspecto Geral**

B. glabrata –

- A. Praticamente todo o órgão corado. Aspectos gerais do tecido, inclusive núcleo corado (n) com Topro-3. Nota-se o espaço entre as células mostrando material fibroso fortemente corado (setas azuis).
- B. Regiões fluorescentes do órgão (setas azuis) e os núcleos corados (n) com Topro-3. Septos entremeados no meio do órgão sem reatividade (setas brancas).

***B. tenagophila* Taim**

- C. Praticamente todo o órgão corado, porém fracamente (setas brancas). Núcleos corados em marrom avermelhado (n) característico do Topro-3. Septos de tecido não corados (setas azuis).
- D. Detalhes da marcação das células pela WGA (setas brancas) evidenciando o citoplasma celular e os núcleos (n) em marrom avermelhado. Os septos são vistos não corados (setas azuis).

Todos os órgãos hematopoiéticos foram positivos para WGA. Em *B. glabrata* observamos uma reação mais nítida da lectina quando comparado com *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio.

Todos os órgãos hematopoiéticos foram positivos para PNA. EM *B. tenagophila* Cabo Frio observamos uma reação mais nítida da lectina quando comparado com *B. tenagophila* Taim e *B. glabrata*.

Todos os órgãos hematopoiéticos foram positivos para LPL. Em *B. glabrata* observamos uma reação mais nítida da lectina quando comparado com *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio.

B. glabrata foi negativa para Con A. Em *B. tenagophila* Taim observamos uma reação mais nítida da lectina quando comparado com *B. tenagophila* Cabo Frio.

6. Discussão

Inicialmente foram feitas culturas com caramujos cujo diâmetro da concha variava entre 1mm e 40mm. Nos moluscos com concha de tamanho inferior a 10 mm, o insucesso deveu-se à dificuldade em se retirar o APO com segurança, pois não se utiliza microscópio estereoscópico para este procedimento. Já os espécimes mais velhos (diâmetro de concha superior a 19mm) apresentaram alta carga parasitária (leveduras, bactérias, helmintos e protozoários) não responsiva ao tratamento empregado com mebendazol.

A heterogeneidade da população de hemócitos circulantes na hemolinfa de caramujos do gênero *Biomphalaria* vem sendo demonstrada por vários autores, sendo levados 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 & Letocart, 1999; Johnston & Yoshino, 2001 e Martins-Souza *et al.*, 2003). Entretanto não existe um consenso em relação ao número de tipos celulares presentes na hemolinfa ou ao critério para diferenciação dos mesmos (Sminia, 1981).

Nas culturas celulares do APO foram encontrados 3 tipos celulares distintos, tipos I, II e III. Os tipos I e II são semelhantes às células que ocorrem na hemolinfa de *Biomphalaria*. As células tipo I são morfológicamente semelhantes aos hialinócitos da hemolinfa (Van Der Knaap & Loker, 1990), são arredondadas com núcleo grande para o tamanho do citoplasma. As do tipo II são morfológicamente semelhantes à descrição dos granulócitos da hemolinfa (Van Der Knaap & Loker, 1990), possuem relativamente mais citoplasma que o tipo I e também foram observados pseudópodes, reportados como uma importante habilidade dos granulócitos. Baseado nos aspectos morfológicos encontrados e no tamanho do núcleo em relação ao citoplasma, esses achados vão ao encontro do trabalho de Joky *et al.* (1993) que afirmaram que os hemócitos de *Biomphalaria* se originam no APO e não se diferenciam na hemolinfa e nem derivam uns dos outros. O último tipo celular, denominado de tipo III era refringente e com núcleo não definido e menos abundante, inicialmente, que os outros.

Amen *et al.* (1991) descrevem os hialinócitos como precursores 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 e à medida que a população de granulócitos se reestabelecia, era observado um aumento considerável na população de hialinócitos, sugerindo que os hialinócitos possam estar envolvidos na reposição do nível de granulócitos. Esses achados não vão ao encontro do observado nas culturas do APO, pois em todas as culturas realizadas sempre foram encontrados os 2 tipos celulares, ou seja o tipo I e o tipo II.

Fato interessante, que ocorreu nas culturas primárias, foi a transformação das células tipo I em tipo III e a grande capacidade de permanecerem em cultura por mais de 60 dias, sugerindo ter ocorrido um amadurecimento celular. O encontro de células aderidas e com pseudópodes emitidos corroboram os achados de Sminia (1981), segundo o qual os granulócitos da hemolinfa quando em contato com superfícies de plástico ou vidro, achatam-se e emitem pseudópodes.

Não foi necessário o tratamento enzimático para dispersão celular, pois as células se desprenderam facilmente dos explantes de APO. No primeiro dia de cultura já era possível observar células dispersas no meio, confirmando os achados de Lynn (2001) quanto à facilidade de obtenção de hemócitos.

Devido à falta de dados para se cultivar tecidos hematopoiéticos de invertebrados, o modelo utilizado foi o de estudos com vertebrados, nos quais a proliferação das células e sua diferenciação são geradas por hormônios, fatores de crescimento, citocinas, receptores de superfície e genes. Embora alguns autores tenham afirmado que, em geral, culturas de invertebrados são insensíveis a muitos dos fatores que afetam sistemas de vertebrados (Slack, 2000; Nishino & Mitsuhashi, 1995; Watt & Hogan, 2000). Lebel *et al.*, (1996) mostraram um efeito positivo de promotores de crescimento de vertebrados, em culturas de células de invertebrados, como por exemplo, soro fetal bovino e fator de crescimento epidérmico (EGF). Essa observação foi confirmada nas culturas primárias do APO, onde os dois promotores facilitaram o crescimento celular.

Por se tratar do cultivo primário do APO, partiu-se do princípio que seriam cultivadas células de invertebrados similares às células tronco de vertebrados e esperava-se que, como células tronco, as culturas permanecessem viáveis por tempo indeterminado, o que não ocorreu.

Lynn (2001) chama a atenção para a dificuldade de se obter crescimento celular de hemócitos *in vitro*, atribuído principalmente, à baixa taxa de proliferação celular (Lebel *et al.*, 1996).

Existe uma grande controvérsia quanto ao local onde as células de defesa dos caramujos são produzidas. Parece-nos claro que são produzidas em uma região denominada órgão produtor de amebócitos (APO). Fato comprovado pelo transplante do APO de caramujos totalmente resistentes (*B. tenagophila* Taim) para caramujos altamente suscetíveis (*B. tenagophila* Cabo Frio) (Barbosa, 2001; Barbosa *et al.*, 2006), onde os autores obtiveram uma significativa diferença de positividade entre caramujos transplantados e seus respectivos controles. Entretanto, quando se transplantaram órgãos como manto, coração, rim, glândulas de albumina e ovotestis não houve transferência de resistência.

Lie *et al.* (1976) mostraram que o tecido conectivo da porção sacular do rim, próximo da artéria renal é um local onde freqüentemente se encontra uma concentração de hemócitos. As células produzidas no APO passam pelo coração e outros tecidos e ainda apresentam capacidade de se dividir e produzir novos focos de hemócitos, como os observados na parede interna do átrio. Esses autores afirmaram que o APO produz células rapidamente e que as células encontradas na porção sacular dos rins apresentam células em divisão e que a população de células nesse local é bem menor que no APO. Recentemente, baseado em achados morfológicos, Souza & Andrade (2006) apontaram para uma origem multicêntrica dos hemócitos, a partir do endotélio dos espaços vasculares.

Durante vários meses foram testados meios diferentes enriquecidos de maneiras diversas, até que se conseguiu um meio ideal, onde a sobrevivência celular era maior e também ocorria uma maior dispersão celular, pois, segundo Mitsuhashi (2001), há vários fatores que afetam o crescimento das células na cultura e um desses fatores é a composição do meio.

O fato de não ocorrer nenhuma modificação nas células da cultura do APO em contato com os miracídios já era esperado por nós. Primeiramente porque as células, mesmo as da hemolinfa, não têm contato com o miracídio, pois quando esse penetra nas partes moles do caramujo perde a placa ciliada e se transforma em esporocistos. Acredita-se que os receptores de superfície estão abaixo das placas ciliares, assim, eles não são reconhecidos pelos hemócitos.

Araque *et al.* (2003) relataram que ao colocar miracídios em contato com hemócitos da hemolinfa houve uma interação, ressaltando três aspectos: dispersão dos hemócitos em direção aos miracídios, emissão de extensão citoplasmática dos hemócitos; confluência dos hemócitos para os miracídios para imobilizá-los

totalmente. Isto não foi observado, provavelmente porque os autores utilizaram os miracídios após incubação por 90 minutos a 27°C, o que pode ter ocasionado a perda da placa ciliada. Os resultados obtidos nesse trabalho coincidem com os publicados e observou-se ao microscópio que os hemócitos envolvem totalmente os esporocistos com as extensões citoplasmáticas, antes de imobilizá-los. Este fenômeno foi claramente observado com as células em contato com os esporocistos transformados *in vitro*.

O papel dos hemócitos na destruição de parasitos tem sido bastante estudado. Segundo, Bahgat *et al.* (2002), essas células possuem função análoga aos macrófagos de mamíferos. Essas células são capazes de montar uma resposta citotóxica contra os parasitos (Ratcliffe *et al.*, 1985; Loker *et al.*, 1992) e estão evidentemente envolvidas na destruição dos esporocistos (Bayne *et al.*, 1980).

Em caramujos resistentes, os hemócitos são capazes de encapsular e destruir esporocistos primários *in vivo* e *in vitro* (Bayne *et al.*, 1980, Loker *et al.*, 1992). Em contraste, hemócitos de caramujos suscetíveis que não reagem aos esporocistos primários *in vivo*, são capazes de atacar a superfície do esporocisto “*in vitro*” (Bahgat *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 2003). Esses achados vão ao encontro dos experimentos realizados com caramujos suscetíveis, *B. glabrata* e *B. tenagophila* de Cabo Frio, onde observou-se uma resposta das células aos esporocistos. Entretanto, ao contrário da resposta dos hemócitos de caramujos resistentes, a encapsulação de caramujos suscetíveis não é citotóxica para os esporocistos e esses continuam vivos, não afetados pelos hemócitos aderentes (Castilho & Yoshino, 2002).

Uma possível explicação para a diferente reação dos hemócitos de caramujos resistentes e suscetíveis frente aos esporocistos é que essas células diferem em relação aos receptores de superfície, originando hemócitos incapazes de reconhecer e/ou reagir bioquimicamente com o parasito (Coustau & Yoshino, 1994).

Os hemócitos são capazes de fagocitar bactérias e pequenas partículas estranhas, além de encapsular os esporocistos (Bayne *et al.*; 1980). Fato semelhante foi observado ao se colocar as células do cultivo primário do APO de caramujos *Biomphalaria* em contato com Zimosan e Sea. Acredita-se na existência de receptores nas células que seriam capazes de reconhecer e destruir pequenos antígenos.

As lectinas estão incluídas como importante mediadores internos na defesa dos moluscos contra patógenos (Olafsen, 1986; Renwranz, 1986; Vasta &

Ahmed, 1996; Horák & Van der Knaap, 1997). A interação de lectinas com carboidratos também possui um importante papel neste sistema de defesa (Fryer *et al.*, 1989). Van der Knaap & Loker (1990) descreveram a importância das lectinas como sendo responsáveis pela ligação entre os hemócitos e esporocistos de *S. mansoni*.

O tegumento do esporocisto de *S. mansoni* é outro fator de fundamental importância para o reconhecimento dos hemócitos, pois através do tegumento os hemócitos reconhecem, encapsulam e destroem os esporocistos após invasão em caramujos resistentes (Bayne & Yoshino, 1989; Loker, 1994). Acredita-se que o principal mecanismo de ligação dos hemócitos ao tegumento dos esporocistos se dê 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 os hemócitos presentes no órgão hematopoiético de caramujos *Biomphalaria* apresentam uma variedade de receptores em sua superfície, o que se justifica pela marcação de várias lectinas (Con A, WGA, PNA, LPL).

O papel exato dos resíduos de carboidratos no reconhecimento ou não dos esporocistos pelos caramujo hospedeiro ainda é desconhecido (Zelck & Becker 1990).

Vários receptores de lectinas têm sido mostrados como ocorrendo na superfície de esporocistos de *S. mansoni* (Zelck & Becker, 1990). Alguns autores mostram que a galactose, glucose, mannose, N-acetil - galactosamina e N-acetil-glucosamina encontram-se presentes na porção terminal dos miracídios (Yoshino *et al.*, 1977), nas cercárias (Linder, 1985) e na superfície de vermes adultos (Simpson & Smithers, 1980; Hayunga & Sumner, 1986).

A presença de diversas lectinas em esporocistos transformados *in vitro* ou presentes em cortes histológicos de tecidos de caramujos também já foi descrita, utilizando-se marcadores fluorescentes específicos (Yoshino *et al.*, 1977; Zelck & Becker, 1990; Uchikawa & Loker, 1991; Johnston & Yoshino, 1996).

A mannose, glucose e a, N-acetil – galactosamina estão presentes nos esporocistos em culturas *in vitro* (Yoshino *et al.*, 1977). Esses resultados vão ao encontro deste trabalho onde observou-se que as células do APO apresentaram receptores de superfície para as lectinas usadas (Con A, WGA, PNA, LPL).

LysoTracker é um marcador acidotrópico, específico para lisossomos e compartimentos ácidos em células vivas. Diversos trabalhos já utilizaram o marcador LysoTracker para demonstrar a presença e a ausência desses compartimentos ácidos nas diferentes fases evolutivas de *S.mansoni*.

Carneiro-Santos *et al.* (2001) demonstraram a presença dessas organelas em esquistossômulos e a ausência em cercárias, dados confirmadas por Al-Adhami *et al.* (2003, 2005). Neste último trabalho foi mostrado, ainda, que os miracídios não revelam a presença de vesículas quando expostos ao LysoTracker demonstrando que nesta fase do ciclo do parasito essas vesículas também não estão presentes. Os autores sugerem que os lisossomos estejam envolvidos em processos de sobrevivência e adaptação dos esquistossômulos ao seu novo ambiente (hospedeiro vertebrado), o que explicaria o desenvolvimento dessas organelas imediatamente após a transformação das cercárias em esquistossômulos.

O mesmo pode ocorrer durante a transformação do miracídio em esporocistos. Durante esta transformação ocorrem mudanças metabólicas que podem levar ao surgimento dessas vesículas ácidas. Provavelmente estas estruturas exercem um papel fundamental na sobrevivência e na adaptação dos esporocistos no seu novo ambiente (hospedeiro invertebrado). Outro evento que pode ocorrer durante essas transformações é a autofagia. Trata-se de um processo utilizado pelas células para eliminar componentes celulares desnecessários durante a diferenciação celular (De Duve & Wattiaux, 1966). Sabe-se que esses componentes celulares sem função são capturados e degradados pelos lisossomos para posterior eliminação (Jans *et al.*, 2004). Dessa forma, sugere-se que, durante a transformação, tanto de cercárias para esquistossômulos quanto de miracídio para esporocistos, ocorra um estímulo do processo de autofagia, levando ao desenvolvimento dessas vesículas ácidas.

Lisossomos têm sido descritos em células que encapsulam parasitos em caramujos (Harris & Cheng, 1975; Cheng & Garrabrant, 1977). Vários autores mostraram que os hemócitos liberam enzimas lisossomais quando desafiados com material não próprio (Cheng *et al.*, 1975; Cheng & Yoshino, 1976; Cheng *et al.*, 1977). Bayne *et al.* (1980) afirmaram que faltam evidências ultraestruturais de que os hemócitos liberam enzimas lisossomais na superfície dos esporocistos.

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 resistentes e suscetíveis ao *S. mansoni* apresentam reação para as três enzimas testadas isoladamente e para fosfatase ácida e esterase não específica testadas simultaneamente. Porém, na linhagem resistente, a quantidade de hemócitos contendo grânulos de fosfatase ácida e esterase não específica foi significativamente maior do que a quantidade de hemócitos com grânulos de peroxidase.

Neste trabalho foi mostrada a presença de lisossomos nas células do APO de caramujos *Biomphalaria* uma vez que essas células foram tratadas com LysoTracker que é um marcador específico para lisossomos e compartimentos ácidos em células vivas e obteve-se um resultado positivo.

7. Conclusões

Foi estabelecida a metodologia para cultivar células do órgão hematopoiético de caramujos *Biomphalaria*.

O órgão hematopoiético apresenta uma estrutura organizada e não representa um mero aglomerado de células.

Foi possível determinar dois tipos básicos de células no APO. Um terceiro tipo aparece após semanas de cultura ou em 24 horas após contato com SEA, LPS e esporocistos.

As células de *B. tenagophila* Taim, *B. tenagophila* Cabo Frio e *B. glabrata* foram positivas para as lectinas: WGA, LPL, PNA.

B. glabrata não teve células positivas para Con A, entretanto as duas linhagens de *B. tenagophila* estudadas apresentaram positividade para esta lectina.

Nas células de todas as linhagens estudadas foi possível a marcação de lisossomos.

O comportamento *in vitro* de células de cultura de *B. tenagophila* do Taim com esporocistos recém transformados de *S.mansoni* mostrou uma intensa aglomeração em torno do parasito, com formação de uma massa gelatinosa e resultando em morte dos esporocistos entre 24 a 48 horas.

No confronto de células de cultura de *B. glabrata* com esporocistos verificou-se pouca adesão celular em torno dos parasitos, que sobreviveram por vários dias nas culturas.

Os melhores resultados frente aos esporocistos em ordem crescente de importância foram *B. tenagophila* Taim, *B. tenagophila* Cabo Frio e *B. glabrata*.

8. Referências Bibliográficas

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.

AL-ADHAMI, B. H.; THORNHILL, J.; AKHKHA, A.; DOENHOFF, M. J.; KUSEL, J. R. The properties of acidic compartments in developing schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology.**; 127(3): 253-264, 2003.

AL-ADHAMI, B. H.; NOBLE, C.; SHARAF, O.; THORNHILL, J.; DOENHOFF, M. J.; KUSEL, J. R. The role of acidic organelles in the development of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their response to signalling molecules. **Parasitology**; 130(3): 309-322, 2005.

AMEN,RI; TIJNAGEL, LN; VAN DER KNAAP, WPW; MEULEMAN, EA de LANGE-DE KLERK, ES; SMINIA, T . Effects of *Trichobilharzia* on hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. **Develop. Comp. Immunol.**,15: 105-115, 1991.

ARAQUE, W.; BARRIOS,E. E.; RODRIGUEZ, P.; DELGADO, V. S.; FINOL, H. J. Ultrastructural Study of the in Vitro Interaction between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* Miracidia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98 (7): 905-907, 2003.

BAHGAT, M.; DOENHOFF, M.; KIRSCHFINK, M.; RUPPEL, A. Serine protease and phenoloxidase in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* snails with varying susceptibility to infection with the parasite *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Res.**, 88: 489-494, 2002.

BARBOSA, F. S. As interações *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e as perspectivas do controle biológico dos moluscos transmissores da esquistossomose In: Reis, F. A. **Modernos conhecimentos sobre a esquistossomose mansoni**. Biblioteca da Academia Mineira de Medicina. P. 109-115, 1986.

BARBOSA, L. **Transferência de resistência ao *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria tenagophila*. por transplante do órgão hematopoiético de**

linhagem resistente (Taim, RS) para linhagem suscetível (Cabo Frio, RJ)
2001.40f. Dissertação (Mestrado) _ Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

BARBOSA, L.; CALDEIRA, R. L.; CARVALHO, O. S.; VIDIDAL, T. H. D. A. JANNOTTI-PASSOS, L. K.; COELHO, P. M. Z. Transference of Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. **Parasite Immunol.**, 28: 209-212, 2006.

BARRACO, M. A.; STEIL, A. A.; GARGIONI, R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 88(1): 73-83, 1993.

BARRETO, M.P. Movimentos migratórios e sua importância na epidemiologia de doenças parasitárias no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 1: 91-102, 1967.

BASTOS, O. de C.; SCHIAVOLETO, R. J. G.; RIBEIRO, M. L. J. F. Suscetibilidade de *Biomphalaria tenagophila* do Estado de São Paulo à infecção por linhagens de *Schistosoma mansoni* da Baixada Maranhense (Maranhão, Brasil). **Rev. Saúde Pública**, 18: 355-358, 1984.

BAYNE, C. J. Molluscan Immunobiology. In: SALEUDDIN, A. S. M.; Wilbur, K. M. **The mollusca**. New York: Academic Press, 1983. Vol. 5, Physiology, Part 2. p.407.

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, 1980.

BAYNE, C. J., BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P.C. Macrophage like hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. **J. Parasitol.**; 66:413-419, 1980.

BAYNE, C. J., YOSHINO, T. P. Determinants of compatibility in mollusk-trematode parasitism. **American Zoologist**. 29: 399-407, 1989.

BECK, G.; O'BRIEN, R. F.; HABICHT, G. S.; STILLMAN, D. L.; COOPER, E. L.; RAFTOS, D. A. Invertebrate cytokines III: Invertebrate 1-like molecules stimulated phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. **Cell. Immunol.**, 146: 284-299, 1993.

BERNADINI, O. J.; MACHADO, M. M. Esquistossomose mansoni em Santa Catarina: isolamento do *Schistosoma mansoni* no primeiro foco de transmissão ativa em São Francisco do Sul. Nota prévia. **Arch. Catarin. Med.**, 10: 213, 1981.

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 (4): 197-201, 1997.

BEZERRA, F. S. M. **Fatores ligados a susceptibilidade e resistência ao *Schistosoma mansoni* (Sambon,1907), de linhagens geográficas de *Biomphalaria glabrata* (Say,1818) e *Biomphalaria tenagophila*(Orbigny,1835).** 1998. 91 f.Tese (Doutorado) — Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

BROOKS, C .P. A comparative study of *Schistosoma mansoni* in and *Australorbis glabratus*. **J. Parasitol.**; 39:.159-165, 1953.

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

CALDEIRA, R. L.; VIDIGAL, H. D. A.; PAULINELLI, S. T.; SIMPSON, A. J. G.; CARVALHO, O. S. Molecular identification of similar species of the Genus *Biomphalaria* (Molusca: Planorbidae) determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93 (suppl. I): 219-225, 1998.

CARNEIRO-SANTOS, P.; THORNHILL, J. Á.; DOENHOFF, M. J.; HAGAN, P.; KUSEL, J. R. Acidic vesicles of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res.**; 87(12): 1001-1006, 2001.

CARVALHO, O. S.; NUNES, I. M.; CALDEIRA, R. L. First report of *Biomphalaria glabrata* in the State of Rio Grande do Sul, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93(1): 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.

CHENG, T. C.; CHORNEY, M. J.; YOSHINO, T. P. Lysozyme-like activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challenged with bacteria. **J. Invertebr. Pathol.**, 29: 170-174, 1977.

CHENG, T. C.; SNYDER, R. W. Studies on host parasite relationships between *larval trematodes and their hosts*. I. A review. II. The utilization of the host's glycogen by the intramolluscan larvae of *Glypthelminis pennsylvaniensis* and associated phenomena. **Trans. Amer. Microsc. Soc.**, 81: 209-228, 1962.

CHENG, T. C.; YOSHINO, T. P. Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) challenged with bacteria. **J. Invertebr. Pathol.**, 28: 143-146, 1976.

CHENG, T. C.; GARRABRANT, T. A. Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol.**, 7: 467-470, 1977.

CHENG, T. C.; GUIDA, V. G. Hemocytes of *Bulinus truncatus rohlfsi* (Mollusca: Gastropoda). **J. Invertebr. Pathol.**, 35: 158, 1980.

CHENG, T. C.; RODRICK, G. E.; FOLEY, D. A.; KOEHLER, S. A. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. **J. Invertebr. Pathol.**, 25: 261-265, 1975.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.;SAVIOLLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop.**, 77: 41-51, 2000.

COELHO, M. V. Ação das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. **Publ. avul. Inst. Aggeu Magalhães**, 3: 39-53, 1954.

COELHO, M. V. Aspectos do desenvolvimento de formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. **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 susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In: BARBOSA, F. S. **Tópicos em Malacologia Médica**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1995. cap. 4, p.203-218.

COELHO, J. R., BEZERRA, F. S. M. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 101 (1): 111-112, 2006.

COELHO, P. M. Z.; CARVALHO, O. S.; ANDRADE, Z. A. MARTINS-SOUZA, R. L.; ROSA, F. M.; BARBOSA, L.; PEREIRA, C. A. J.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; GODARD, A. L. B.; MOREIRA, L. A. ; OLIVEIRA, G. C.; FRANCO, G. R.; TELES, H. M. S.; NEGRÃO-CORRÊA, D. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* Interaction: Premises for a New Approach to Biological Control of Schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99: 109-111, 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.

CORREA, L. R.; PARAENSE, W. L. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 13: 387- 390, 1971.

CORRÊA, M. C. R.; COELHO, P. M. Z.; FREITAS, J. R. Susceptibilidade 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 (2): 72-76, 1979.

COUSTAU, C.; YOSHINO, T. P. Surface membrane polypeptides associated with hemocytes from *Schistosoma mansoni* – susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). **J. Invertebr. Pathol.**, 63: 82-89, 1994.

CROMPTON, D. W. T. How much human helminthiasis is there in the world? **J. Parasitol.** 85: 397-403, 1999.

DUARTE, M. M.; MONTES de OCA, H.; DINIZ, C. R.; FORTES-DIAS, C. L.. Primary culture of venom gland cells from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon.**; 37: 1673-1682, 1999.

DE DUVE, C.; WATTIAUX, R. Functions of lysosomes. **Annu. Rev. Physiol.**; 28: 435-492, 1966.

DIETL, P.; HALLER, T.; WIRLEITNER, B.; FRIEDRICH, F. Two different store-operated Ca²⁺ entry pathways in MDCK cells. **Cell Calcium.**, 20(1): 11-9, 1996.

ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of Schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop.**, 82: 139-146, 2002.

FILES, V. S.; CRAM, E. B. A study on the comparative susceptibility of snails vectors to strains of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, 35(6): 555-560, 1949.

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

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

FRYER, S. E.; BAYNE, C. J. *Schistosoma mansoni* modulation of phagocytosis in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, 76: 45-52, 1990.

GOES, A. M., ROCHA, R. S.; GAZZINELLI, G.; DOUGHTY, B. L. Production and characterization of human monoclonal antibodies against *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol.**, 11 (6): 695-711, 1989.

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

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

GRANATH Jr, W. O.; 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.

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

HARRIS, K. R.; CHENG, T. C. The encapsulation process in *Biomphalaria glabrata* experimentally infected with the metastrongylide *Angiostrongylus cantonensis*: enzyme histochemistry. **J. Invertebr. Pathol.**, 26: 367-374, 1975.

HAYUNGA, E. G.; SUMNER, M. P. Characterization of surface glycoproteins on *Schistosoma mansoni* adult worms by lectin affinity chromatography. **J. Parasitol.**, 72: 283-291, 1986.

HORÁK, P.; VAN DER KNAAP, W. P. W. Lectins in snail-trematode immune interactions. **Fol. Parasitol.**, 44: 161-172, 1997.

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.

JANS, R.; SARTOR, M.; JADOT, M.; POUMAY, Y. Calcium entry into keratinocytes induces exocytosis of lysosomes. **Arch. Dermatol. Res.**; 296(1): 30-41, 2004.

JEONG, K. H.; LIE, K. J.; HEYNEMAN, D. The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Dev. Comp. Immunol.**; 7: 217-228, 1983.

JOHNSTON, L. A.; YOSHINO, T. P. Analysis of lectin and snail plasma – binding glycopeptides associated with tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol.**, 112: 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.

KATZ, N. Vacina polivalente anti-helminto. Biotecnologia: Ciência e desenvolvimento, Brasília, ano I ,n.2, p.34-35, 1997

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev .Soc. Bras. Med. Trop.**, 33(3): 303-308, 2000.

KLEIN, J. Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? **Scan. J. Immunol.**, 29: 499-505, 1989.

LEBEL, J. M.; GIARD, W.; FAVREL, P.; BOUCAUD-CAMOU, E.. Effects of different vertebrate growth factors on primary cultures of hemocytes from the gastropod mollusk, *Haliothis tuberculata*. **Biol. Cell.**; 86: 67-72, 1996.

LIE, K. J.; HEYNEMAN, D.; YAU, P. The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, 61: 574, 1975.

LIE, K. J.; HEYNEMAN, D.; JEONG, K. H. Studies on resistance in snails. 4. Induction of ventricular capsules and changes in the amebocyte-producing organ during sensitization of *Biomphalaria glabrata* snails. **J. Parasitol.**, 62 (2): 286-291, 1976.

LIE, K. J.; JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. Molluscan host reactions to helminthic. In: SOULSBY, E. J. L. **Protozoa, Arthropods and Invertebrates**. Boca Raton, Flórida, USA: CRC-Prees INC, 1987. p. 211-270.

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

LYNN, D. E. Novel techniques to establish new insect celllines. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, 37: 319-321, 2001.

LoVERDE, P. T.; GHERSON, J.; RICHARDS, C. S. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: Fine Structure. **Dev. Comp. Immunol.** 31: 999, 1982.

LOKER, E. S.; CIMINO, D. F.; HERTEL, L. A. Excretory-secretory products of *Echinostoma paraensi* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions. **J. Parasitol.**, 78: 104-115, 1992.

LOKER, E. S. On being a parasite in invertebrate host: a short survival course. **J. Parasitol.**, 80: 728-747, 1994.

MAGALHÃES, L. A.; DIAS, L. C. S., PIZA, J. T.; TAKAKU, L.; PEREIRA, A. A. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose mansônica na região da Represa de Americana, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Públ, São Paulo.** 7: 21-28, 1973.

MALAGUEÑO, E.; ALBUQUERQUE, C.; CASTRO, C. M. M. B.; GADELHA, M.; IRMÃO, J. I.; SANTANA, J. V. Effect of *Biomphalaria straminea* plasma in the phagocytosis of *Biomphalaria glabrata* hemolymph cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 93(suppl.1): 301-302, 1998.

MALDONADO, J. F.; ACOSTA-MATIENZO, J. The development of *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Australorbis glabratus*. **Puerto Rico J. Health Trop. Med.**, 22: 331-373, 1947.

MARQUES, A. C. Migrações internas e as grandes endemias. **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, 31: 137-158, 1979.

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.

MATRICON-GONDRAN, M., LETOCART, M. Internal defenses of snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. **J. Invertebr. Pathol.**, 74: 224-234, 1999.

MELO, A. L.; PEREIRA, L. H. On the finding of *Biomphalaria tenagophila* naturally infected with *Schistosoma mansoni* in State of Minas Gerais, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 27 (2): 99-101, 1985.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana** 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 193-212.

MILWARD DE ANDRADE, R. Primeiro encontro de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) no lago da Pampulha, Belo Horizonte, MG. **Cienc. e Cult.** 24: 375, 1972.

MITSUHASHI, J. Development of highly nutritive culture media. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, 37: 330-337. 2001.

MORTON, H. J. A survey of commercially available tissue culture media. **In vitro** 6: 89-108, 1970.

NEWTON, W. L. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. **J. Parasit.** 38: 362- 366, 1952.

NEWTON, W. L. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. **Exp. Parasitol.**, 2: 242- 257, 1953.

NEWTON, W. L. Tissue responses to *Schistosoma mansoni* in second generation snails from a Cross between two strains of *Australorbis glabratus*. **J. Parasitol.**, 40: 352-355, 1954.

NISHINO, H.; MITSUHASHI, J. Effects of some mammalian growth-promoting substances on insect cell cultures. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, 31: 822-823, 1995.

OLAFSEN, J. A. Invertebrate lectins: biochemical heterogeneity as a possible key to their biological function. In: BREHELIN, M. **Immunity in Invertebrates**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1986. p.94-111.

OSMAN, A. M.; GOMAA, M.; SAAD, A. H. Biomphalaria *Alexandrina*: cellular responses of susceptible and resistant snails to *Schistosoma mansoni* infection. **J. Egypt Soc Parasitol.**; 33 (3): 805-827, 2003.

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.

PAN, C. T. Generalized and focal tissue response in the snail *Australorbis glabratus*, infected with *Schistosoma mansoni*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 113: 475-485, 1963.

PAN, C. T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, 14: 931-976, 1965.

PARAENSE, W. L. Planorbídeos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni*. In: Cunha, A. C. **Esquistossomose mansoni**. São Paulo: EDUSP, 1970. cap. 2, p. 13-30

PARAENSE, W. L.; Suscetibility of Biomphalaria peregrina from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 15: 127-130, 1973.

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

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

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 5 (1): 15-22, 1963.

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Further experiments on susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 80: 259-262, 1985.

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Probable extension of schistosomiasis mansoni to southernmost Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82: 277, 1987.

PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. A potential vector of *Schistosoma mansoni*. In Uruguay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 84: 281-288, 1989.

PARAENSE, W. L.; SOUZA, P. E. F. P.; BRAUN, R. F. Novos focos de transmissão do *Schistosoma mansoni* no Estado do Pará **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 79: 389-391, 1984.

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

RAFTOS, D. A.; COOPER, E. L.; HABICHT, G. S.; BECK, G. Invertebrate cytokines : Tunicate cell proliferation stimulated by interleukin-1-like molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 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: 35-240, 1992.

RAMOS, A. S.; RUIVO, M.; D'ANDRETTA JR, C. *Biomphalaria tenagophila* naturalmente infetada pelo *Schistosoma mansoni* em Cubatão, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 9(6): 374-377, 1967.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGERALD, S. W.; RHODES, C. P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Int. Rev. Cytol.**, 97: 183-350.

RENWRANTZ, L. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. In: Lackie, A. M. Immune Mechanisms in Invertebrate Vectors. Zoological Society of London Symposia.56. Oxford,UK: Clarendon Press, 1986.p. 81-93.

RICHARDS, C. S. Susceptibility of adult *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* infection. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 22: 748-756, 1973.

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

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

RICHARDS, C. S.; MERRIT, J. W. J. Genetic factors in the susceptibility of juvenile *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni*. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, .21: 425-434, 1972.

RICHARDS, C. S.;RENWRANTZ, L. R. Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca^{2+} dependent, GalNac-specific lectin and a Ca^{2+}

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*. **J. Parasitol.**, 73: 1146-1151, 1987.

ROSA, F. M.; CALDEIRA, R. L.; CARVALHO, O. S., GODARD, A. L. B.; COELHO, P. M. Z. Dominant Character of the Molecular Marker of a *Biomphalaria tenagophila* Strain (Mollusca: Planorbidae) Resistant to *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99 (1): 85-87, 2004.

ROSA, F. M.; GODARD, A. L. B.; AZEVEDO, A. COELHO, P. M. Z. *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(1): 19-23, 2005.

SANTOS, M. B. L.; FREITAS, J. R.; CORREA, M. C. R.; COELHO, P. M. Z. Susceptibilidade ao *Schistosoma mansoni* de "híbridos" de *Biomphalaria tenagophila* do Taim, RS, Cabo Frio, RJ, e Belo Horizonte. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 21 (6): 281-286, 1979.

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

SLACK, J. M.. Stem cells in epithelial tissues. **Science** 287: 1431-1433, 2000.

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

SMINIA, T.; VAN DER KNAAP, W. P. W.; VANASSELT, L. A. Blood cell types and blood cell formation in gastropod molluscs. **Dev. Comp. Immunol.**, 7: 665-668, 1983.

SPATZ, L.; VIDIGAL, H. D. A.; CALDEIRA, R. L.; NETO, E. D.; CAPPA, S. M. G.; CARVALHO, O. S. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. **J. Moll. Stud.** 65: 143-149, 1999.

SOUZA, C. P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil.** Centro de Pesquisa "René Rachou"/Fiocruz, Belo Horizonte, 1^a ed., Ed. Fundação Oswaldo Cruz, 76p, 1997.

SOUZA, C. P. CALDEIRA, R. L.; DRUMMOND, S. C.; MELO, A. L.; GUIMARÃES, C. T.; SOARES, D. M.; CARVALHO, O. S. Geographical distribution *Biomphalaria* snails in the State of Minas Gerais, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 96 (3): 293-302, 2001.

Souza, S. S.; Andrade, Z. A. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 101 (suppl.1): 213-218, 2005.

SULLIVAN, J. T. Long-term survival of heterotopic allografts of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). **Trans. Am. Microsc. Soc.**, 109 (1): 52-60, 1990.

SULLIVAN, J. T.; ANDREWS, J. A.; CURRIE, R. T. Heterotopic heart transplants in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata): fate of allografts. **TRANS. Am. Microsc. Soc.**, 111: 1-15, 1992.

SULLIVAN, J. T.; SPENCE, J. V. Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte-producing organ. **J. Parasitol.**, 80 (3): 449-453, 1994.

SULLIVAN, J. T.; SPENCE, J. V.; NUNEZ, J. K., Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts in *Biomphalaria glabrata* implanted with Amoebocytes-Producing Organ allografts from resistant snails. **J. Parasitol.**, 81(5): 829-833, 1995.

SULLIVAN, J. T.; GALVAN, A. G.; LARES, R. R. Comparison of several types of allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). **J. Invertebr. Pathol.**, 71: 1-8, 1998.

SULLIVAN, J. T.; SPENCE, J. V. Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. **J. Parasitol.**, 85 (6): 1065-1071, 1999.

TRIPP, M. R. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. **J. Parasitol.**, 47: 747-751, 1961.

TRIPP, M. R. Defense mechanism of molluscs. **J. Reticuloendothel. Soc.**, 7: 173-182, 1970.

TRIPP, M. R. Molluscan immunity. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 234: 23-27, 1974.

UCHIKAWA, R.; LOKER, E. S. Lectin-binding properties of the surfaces of in 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 (6): 175-182, 1990.

VASQUEZ, R. E.; SULLIVAN, J. T. Hematopoietic allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*. **Dev. Comp. Immunol.**, 25: 561-564, 2001.

VASTA, G. R.; AHMED, H. *Animal lectins as cell surface receptors: current status for invertebrate species*. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, 17: 158-182, 1996.

VIDIGAL, T. H. D. A., SPATZ, L., NUNES, D. N., SIMPSON, A. J. G., CARVALHO, O. S., DIAS NETO, E. *Biomphalaria spp*: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction

enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. **Exp. Parasitol.**, 89: 180-187, 1998.

VIDIGAL, T. H. D. A., CALDEIRA, R. L.; SIMPSON, A. J. G., CARVALHO, O. S. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 95(1): 57–66, 2000.

WATT, F. M., HOGAN, B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science** 287: 1427-1430, 2000.

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.; Cheng, T. C.; Renwranz, L. R. Lectin and human blood group determinants of *Schistosoma mansoni*: alteration following *in vitro* transformation of miracidium to mother sporocyst. **J Parasitol.**; 63(5): 818-824, 1977.

ZELCK, U.; BECKER, W. Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* tissue. **J. Invertebr. Pathol.**,55: 93-99, 1990.