

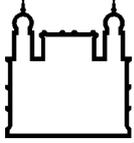
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CARACTERIZAÇÃO HEMOCITÁRIA DE UMA LINHAGEM RESISTENTE DE
Biomphalaria straminea (DUNKER, 1848) EXPOSTA A *Schistosoma mansoni*
SAMBON, 1907

THATIANE CRISTINA BARROS DA SILVA

Rio de Janeiro
Março de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

THATIANE CRISTINA BARROS DA SILVA

Caracterização hemocitária de uma linhagem resistente de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) exposta a *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientador (es): Prof. Dra. Silvana C. Thiengo
Prof. Dra. Ester Maria Mota

RIO DE JANEIRO
Março de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Thatiane Cristina Barros da

Caracterização hemocitária de uma linhagem resistente de
Biomphalaria straminea (Dunker, 1848) exposta a *Schistosoma mansoni*
Sambon, 1907 / Thatiane Cristina Barros da Silva. – Rio de Janeiro,
2016.

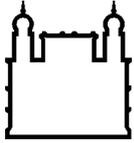
xx, 106 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 116-126

1. Interação *Biomphalaria-Schistosoma mansoni*. 2. Hemócitos. 3.
Lectinas. I. Título.

CDD 616.963



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: THATIANE CRISTINA BARROS DA SILVA

Caracterização hemocitária de uma linhagem resistente de *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) exposta a *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907

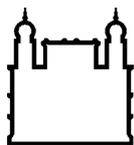
ORIENTADORAS: Prof. Dra. Silvana C. Thiengo
Prof. Dra. Ester Maria Mota

Aprovada em: 31/03/2016

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa - Presidente
(IOC/FIOCRUZ)
Profa. Dra. Mariana Gomes Lima (UFRRJ)
Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Jr. (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva (UFRRJ)

Rio de Janeiro, 31 de Março de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedico esta dissertação aos meus pais Alidéa Barros da Silva e Luiz Carlos da Silva

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha orientadora e chefe do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose-Malacologia, Dra. Silvana C. Thiengo pela oportunidade de aprender, pelo conhecimento que me transmitiu, pelo auxílio na confecção da dissertação, por sua amizade e companheirismo.

À minha co-orientadora, Dra. Ester Maria Mota, pelo conhecimento que me transmitiu, pelo auxílio na confecção da dissertação, por seu apoio incondicional, palavras sábias, amizade e carinho.

À Andréa Natividade da Silva por ser uma ótima amiga, ter me ensinado muitas coisas e ter me ajudado muito durante a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Marcelo Pelajo Machado, chefe do Laboratório de Patologia, por seus conselhos valiosos e pela oportunidade de estagiar em seu Laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Patologia – IOC/Fiocruz: Alexandra, Ana Paula, Bárbara, Dr. Henrique Lenzi (em memória), Fátima, Igor, Iolanda, Jéssica, Juliane, Leonardo, Luzia Barros, Luzia Caputo, Luciana, Márcia, Marcelo Barbosa, Pedro Paulo, Priscila, Sr. José Carvalho (em memória) e Yuli Maia por sua amizade, carinho e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Referência Nacional em Esquistossomose-Malacologia: Dra. Mônica Ammon Fernandez e Paulo César dos Santos por terem cedido os moluscos utilizados nos experimentos deste trabalho, por seu carinho, amizade e apoio.

À Marta Júlia Faro e por ter me ensinado a dissecar os moluscos utilizados neste experimento.

À Clélia Christina Mello Silva por ter me ensinado a coletar a hemolinfa dos caramujos.

Aos professores do Curso de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Biologia Parasitária, pelo seu apoio, ótimas aulas e ótimas instruções durante todo o curso.

Aos amigos da turma do Curso de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Biologia Parasitária, pelos momentos de descontração e apoio durante todo o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Alidéa Barros da Silva e Luiz Carlos da Silva que sempre me deram apoio e incentivo para seguir em frente mesmo diante dos altos e baixos da vida. Pai, você foi incansável, muito obrigada!

À minha avó Ruth Felipe da Silva (em memória) por sua atenção, apoio, amor e carinho.

Ao meu irmão Evandro Luís Barros da Silva, minha sobrinha Manuela Maia Barros da Silva, minha cunhada Michele Maia e sua filha Larissa Pilar Maia por seu apoio, amizade e carinho.

Às minhas tias e tios: Alcidéa de Barros, Alcides de Barros, Alcidir de Barros (em memória), Alcidiléa de Barros, Alcidinéa de Barros (em memória), Alcirema de Barros (em memória), Alda de Barros, Carmem Lúcia, Eva (em memória), Idalcina e Vera Lúcia pelo apoio, amor e carinho incondicionais.

Às minhas primas e primos: Alcidir Júnior, Anderson, Bruno Leonardo, Caíque, Carlos Augusto, Cawanny, Cleber, Christiany, Eduardo, Érika, João Gabriel, Marcos Vinícius, Thaís e Vitória por seu amor, atenção e carinho.

Às minhas amigas Gisele Moniz, Joice Cristina e Juliana Souza por seu amor, atenção, carinho e paciência.

À Valéria Lúcia Martinho (psicóloga) por sua amizade e seus conselhos inspiradores.

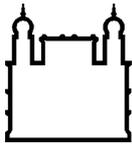
À Vilma Gomes Ferreira por sua amizade, atenção e carinho.

À Heloísa Brandão por ser uma ótima amiga, por seu apoio e por ter me dado a oportunidade de estagiar na Fundação Oswaldo Cruz.

À Maria dos Santos (tia da Heloísa), por sua amizade, carinho e apoio.

Agradeço a todas as pessoas envolvidas nesta minha caminhada e que tornaram este trabalho possível.

"Se podemos sonhar, também podemos tornar nossos sonhos realidade"
(Walt Disney).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO HEMOCITÁRIA DE UMA LINHAGEM RESISTENTE DE *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) EXPOSTA A *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907

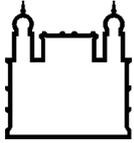
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Thatiane Cristina Barros da Silva

A esquistossomose mansônica ainda constitui um grave problema de saúde pública no Brasil e, portanto, o conhecimento dos diversos aspectos da interação *Schistosoma mansoni*-*Biomphalaria*, são pertinentes e relevantes como subsídios à medidas de controle e prevenção desta parasitose. Estudos *in vitro* têm mostrado que a suscetibilidade dos hospedeiros intermediários de *S. mansoni*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata* está relacionado à presença de lectinas. Importante transmissor da Esquistossomose no Brasil, *B. straminea* apresenta baixos índices de infecção em condições experimentais. Apesar disto, existem poucos estudos a respeito das características morfológicas e do comportamento *in vitro* dos hemócitos deste molusco frente à infecção por *S. mansoni*. Com o objetivo de caracterizar a resposta hemocitária de *B. straminea* (cepa Souza-PB) expostas a miracídios de *S. mansoni*, os moluscos foram expostos em massa e expostos individualmente a cinco miracídios. Exemplares de *B. glabrata* foram utilizadas como controle positivo. A hemolinfa foi coletada, corada em Azul de Tripán e os hemócitos foram contados em câmara de Neubauer. Alguns hemócitos foram colocados em placa de cultura para observação da interação das células com os parasitos e outros foram submetidos à marcação por lectinas fluoresceinadas de *Griffonia simplicifolia* e *Lens culinaris* conjugadas a FITC. As imagens foram obtidas e gravadas através de microscópio AxioObserver e câmera McR5 Zeiss. Os moluscos expostos em massa foram sacrificados logo após a penetração inicial do parasito (0 minuto), 24, 48, 72 horas e 30 dias após exposição (dpe). Moluscos expostos a cinco miracídios foram mortos após 0, 15, 30 e 45 minutos de exposição. Os órgãos foram fixados em formalina Millionig de Carson, incluídos em parafina e corados em HE. Após a exposição em massa verificou-se um aumento de 496,37% de células na hemolinfa de *B. straminea* e de 230,29% na hemolinfa de *B. glabrata* logo após a penetração dos miracídios. Na exposição por cinco miracídios houve um aumento de 78,14% de células na hemolinfa de *B. straminea* e de 36,36% na hemolinfa de *B. glabrata* logo após a penetração dos miracídios. A maioria das células encontradas na hemolinfa eram células blásticas e seu diâmetro foi em torno de 6µm para *B. straminea* e 7µm para *B. glabrata*. Hemócitos de *B. straminea* exibiram marcação mais intensa para lectina de *G. simplicifolia* nos tempos iniciais após a exposição, enquanto que aos 30 dias dpe as células estavam mais positivas para *L. culinaris*. Na análise histológica dos tempos iniciais, não foram observadas reações celulares nem parasitos mortos nos tecidos de ambos os hospedeiros. Entretanto, *B. glabrata* apresentou esporocistos secundários na região da massa cefalopédica aos 30 dias após a infecção. Concluímos que a resistência de *B. straminea* está associada a modulação de lectinas expressas nos hemócitos. Além do mais, verificamos que as células blásticas, as células precursoras de outros hemócitos, são as mais abundantes nos dois hospedeiros estudados.

Palavras-Chave: Interação *Biomphalaria*-*Schistosoma mansoni*; Hemócitos; Lectinas



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HAEMOCYTE CHARACTERIZATION OF A RESISTANT LINEAGE OF *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) EXPOSED TO *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Thatiane Cristina Barros da Silva

Schistosomiasis still remain as an important parasitic disease under the public health point of view. Thus, studies that involve the interaction between *Schistosoma mansoni*-*Biomphalaria* are pertinent and useful to the disease prevention and control. *In vitro* studies have shown that the susceptibility of *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*, intermediate hosts of *Schistosoma mansoni*, is related to the presence of lectins. As an important carrier of schistosomiasis in Brazil, *B. straminea* presents low infection rates under laboratory conditions. Despite of that, there are few studies regarding the morphological features and *in vitro* behavior of this mollusc's haemocytes challenged by *S. mansoni* miracidia. For this purpose, we analyzed the haemocyte response of *B. straminea* (Sousa – PB strain) challenged by the parasite, so the molluscs were put under mass exposure and individual exposure to five miracidia. *B. glabrata* molluscs were used as positive controls. The molluscs had their haemolymph drawn, the haemocytes were stained in Trypan Blue and counted in Neubauer chamber. Some haemocytes were put into cell culture plates in order to observe the interaction between the cells and the parasites and other cells were stained by FITC conjugated lectins from *Griffonia simplicifolia* and *Lens culinaris*. The images and films were made at the microscope AxioObserver with McR5 camera from Zeiss. The mass exposed molluscs were killed at 0 minutes (first penetration of the miracidia), 24, 48, 72 hours and 30 days after exposure (dae) and the five miracidia exposed molluscs were killed after 0, 15, 30 and 45 minutes. The organs were fixed in Carsons's Millonig Formalin, embedded in paraffin and stained with Hematoxylin and Eosin. After mass exposure, an increase of 496,37% in the haemolymph cells from *B. straminea* and an increase of 230,29% in the haemolymph cells from *B. glabrata* right after the miracidia penetration was observed. Most cells observed were blast cells and their diameter was 6µm for *B. straminea* and 7µm for *B. glabrata*. In the histological analysis of the earlier times, there were no cell reactions nor dead parasites found as the result of the exposure in both hosts tissues. Whereas at 30 dae *B. glabrata* shown parasites in its cephalopedal region. *B. straminea* haemocytes showed an intense staining for *G. simplicifolia* at the initial times of the exposure whereas 30 dae the cells were positive for *L. culinaris* lectin. Our conclusion is that *B. straminea* resistance to *S. mansoni* is associated with lectin modulation expressed by haemocytes and the fast response to miracidial penetration. Furthermore, we have seen that blast cells, precursor cells that origin other types of haemocytes, are more plentiful among both hosts studied.

Key words: *Biomphalaria*-*Schistosoma mansoni* Interaction; Haemocytes; Lectins.

ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 A Esquistossomose	21
1.2 Importância da Esquistossomose	23
1.3 Hospedeiros Intermediários	26
1.4 Ciclo Biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	31
1.5 Moluscos Hospedeiros de <i>Schistosoma mansoni</i>	32
1.6 Sistema Imune dos Moluscos	37
1.7 Relação <i>Biomphalaria straminea</i> – <i>Schistosoma mansoni</i>	41
1.8 Justificativa.....	42
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo Geral.....	43
2.2 Objetivos Específicos	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Moluscos Utilizados para a Infecção experimental.....	44
3.2 Infecção do Hospedeiro Definitivo e Obtenção dos Miracídeos	44
3.3 Infecção dos Moluscos	45
3.4 Coleta de Hemolinfa dos Moluscos	46
3.5 Contagem e Tipagem de Hemócitos.....	46
3.6 Citocentrifugado e Esfregaço.....	47
3.7 Transformação <i>in vitro</i> de Miracídeos em Esporocistos Primários.....	47
3.8 Interação Parasito-Hospedeiro.....	49
3.9 Marcação com Lectinas Fluoresceinadas.....	50
3.10 Histologia dos Moluscos	50
4 RESULTADOS	52
4.1 Contagem de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria glabrata</i> submetidas à exposição maciça	52
4.2 Contagem de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> e <i>Biomphalaria glabrata</i> expostas à cinco miracídeos	52

4.3 Aspectos citológicos da hemolinfa de <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> não expostas e expostas à <i>S. mansoni</i>	54
4.3.1 Animal Não Exposto (Controle)	54
4.3.2 24 horas após exposição	58
4.3.3 30 dias após exposição.....	61
4.4 Resultados dos aspectos imunocitológicos da exposição maciça de <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> por <i>S. mansoni</i>	64
4.4.1 <i>Lens culinaris</i>	64
4.4.1.1 Animal Não Exposto (Controle).....	64
4.4.1.2 24 horas após a exposição.....	67
4.4.1.3 48 horas após a exposição.....	70
4.4.1.4 72 horas após a exposição.....	73
4.4.1.5 30 dias após a exposição.....	76
4.5 Resultados dos aspectos imunocitológicos da exposição à cinco miracídios de <i>S. mansoni</i> em <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i>	79
4.5.1 <i>Lens culinaris</i>	79
4.5.1.1 0 minutos após a exposição	79
4.5.1.2 15 minutos após a exposição.....	82
4.5.1.3 30 minutos após a exposição.....	85
4.5.1.4 45 minutos após a exposição.....	86
4.6 Aspectos Imunocitológicos da exposição maciça de <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> à miracídios de <i>S. mansoni</i>	88
4.6.1 <i>Griffonia simplicifolia</i>	88
4.6.1.1 0 minutos após a exposição	88
4.6.1.2 24 horas após a exposição.....	91
4.6.1.3 48 horas após a exposição.....	92
4.6.1.4 72 horas após a exposição.....	93
4.6.1.5 30 dias após a exposição.....	94
4.7 Aspectos Imunocitológicos da exposição a cinco miracídios de <i>S. mansoni</i> em <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i>	96
4.7.1 <i>Griffonia simplicifolia</i>	96
4.7.1.1 0 minutos após a exposição	96
4.7.1.2 15 minutos após a exposição.....	98
4.7.1.3 30 minutos após a exposição.....	99
4.7.1.4 45 minutos após a exposição.....	100

4.8	Aspectos da interação parasito-hospedeiro entre os hemócitos de <i>B. straminea</i> e <i>B. glabrata</i> à esporocistos primários de <i>S. mansoni</i>	101
4.8.1	Animal Não Exposto (Controle).....	101
4.8.2	30 dias após exposição maciça	103
4.9	Aspectos histológicos da exposição maciça por <i>S. mansoni</i> em <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i>	106
4.9.1	24 horas após a exposição.....	106
4.9.2	30 dias após a exposição	106
5	DISCUSSÃO	109
6	CONCLUSÃO	115
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
8	ANEXO	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação da expansão da esquistossomose mansoni no Brasil. Fonte: Brasil, com adaptações feitas por Heloisa M. N. Diniz, 1998 <i>apud</i> Ministério da Saúde, 2014.....	25
Figura 2: Espécies hospedeiras de <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon, 1907, acervo do Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (A= <i>Biomphalaria glabrata</i> ; B= <i>Biomphalaria tenagophila</i> ; C= <i>Biomphalaria straminea</i>).	28
Figura 3: Distribuição espacial de <i>B. straminea</i> no Brasil. Fonte: Carvalho; Caldeira, 2004 <i>apud</i> Ministério da Saúde, 2014.	29
Figura 4: Distribuição espacial de <i>B. glabrata</i> no Brasil. Fonte Carvalho; Caldeira, 2004 <i>apud</i> Ministério da Saúde, 2014.....	30
Figura 5: Ciclo Biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon, 1907, acervo do Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz adaptado de Guaraldo (1981) e Barros da Silva (2014). Extraído de Ministério da Saúde, 2007.....	35

Prancha 1 - Figuras 1 e 2: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> animal controle corados com Giemsa 20%.	55
Prancha 2 - Figuras 1 à 6: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> animal controle corados com Giemsa 20%.	57
Prancha 3 - Figuras 1 e 2: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> após 24 horas de exposição em massa corados com Giemsa 20%.	59
Prancha 4 - Figuras 1 e 2: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> após 24 horas de exposição em massa corados com Giemsa 20%.	60
Prancha 5 - Figuras 1 à 3: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> aos 30 dias de exposição corados com Giemsa 20%.	62

Prancha 6 - Figuras 1 à 4: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> aos 30 dias de exposição corados com Giemsa 20%.....	63
Prancha 7 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> , animal controle, marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	65
Prancha 8 - Figuras 1, 2, 3 e 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> , animal controle, marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	66
Prancha 9 - Figuras 1, 2 e 3: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> após 24 horas de exposição maciça marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	68
Prancha 10 - Figuras 1 à 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> após 24 horas de exposição maciça marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	69
Prancha 11 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> após 48 horas de exposição maciça marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	71
Prancha 12 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> após 48 horas de exposição maciça marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 50µm.	72
Prancha 13 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> após 72 horas de exposição maciça marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	74
Prancha 14 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> após 72 horas de exposição maciça marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 50µm.	75

Prancha 15 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> após 30 dias de exposição maciça marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> . Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	77
Prancha 16 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> após 30 dias de exposição maciça marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> . Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	78
Prancha 17 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> após 0 minutos de exposição à 5 miracídeos (penetração inicial do miracídio) marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> . Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	80
Prancha 18 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> após 0 minutos de exposição à 5 miracídeos (penetração inicial do miracídio) marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> . Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	81
Prancha 19 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> após 15 minutos de exposição à 5 miracídeos marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> . Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	83
Prancha 20 - Figuras 1, 2, 3, e 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> após 15 minutos de exposição à 5 miracídeos marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> . Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	84
Prancha 21 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> após 30 minutos de exposição à 5 miracídeos marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> . Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	85
Prancha 22 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> após 45 minutos de exposição à 5 miracídeos marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> . Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	86
Prancha 23 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> após 45 minutos de exposição à 5	

miracídios marcados pela lectina de <i>Lens culinaris</i> . Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	87
Prancha 24 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> aos 0 minutos (penetração inicial dos miracídios) após exposição marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	89
Prancha 25 - Figuras 1, 2, 3 e 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> aos 0 minutos (penetração inicial do miracídio) após exposição marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	90
Prancha 26 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> 24 horas após exposição marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	91
Prancha 27 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> 48 horas após exposição marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	92
Prancha 28 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> 72 horas após exposição marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	93
Prancha 29 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> 30 dias após exposição marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	94
Prancha 30 - Figuras 1 à 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> 30 dias após exposição marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.	95
Prancha 31 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> 0 minutos após exposição à cinco	

miracídios marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	96
Prancha 32 - Figuras 1, 2, 3 e 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> 0 minutos após exposição à cinco miracídios marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	97
Prancha 33 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> 15 minutos após exposição à cinco miracídios marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	98
Prancha 34 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> 30 minutos após exposição à cinco miracídios marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	99
Prancha 35 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> 45 minutos após exposição à cinco miracídios marcados pela lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i> conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.....	100
Prancha 36 - Figuras 1 e 2: Relação parasito-hospedeiro entre hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> animal controle e esporocistos primários de <i>Schistosoma mansoni</i> . Escalas em 20µm.....	102
Prancha 37 - Figuras 1 e 2: Relação parasito-hospedeiro entre hemócitos de <i>Biomphalaria straminea</i> animal 30 dias após exposição e esporocistos primários de <i>Schistosoma mansoni</i> . Escalas em 20µm	104
Prancha 38 - Figuras 1 e 2: Relação parasito-hospedeiro entre hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> animal 30 dias após exposição e esporocistos primários de <i>Schistosoma mansoni</i> . Escalas em 20µm	105
Prancha 39 - Figuras 1 e 2: Histologia de <i>Biomphalaria straminea</i> apos 24 horas e 30 dias de exposição à <i>S. mansoni</i>	107
Prancha 40 - Figuras 1 e 2: Histologia de <i>Biomphalaria glabrata</i> apos 24 horas e 30 dias de exposição à <i>S. mansoni</i>	108

LISTA DE TABELAS

Quadro 1 - Expectativa de vida de *S. mansoni*, nas suas diferentes fases do ciclo biológico. Adaptado de Rey (2008) e Carvalho et al (2008) (Extraído de: Passos, 1998).....36

Tabela 1 - Contagem total dos hemócitos de *Biomphalaria straminea* e *B. glabrata* controles e expostos em massa à miracídios de *Schistosoma mansoni*Erro! Indicador não definido.

Tabela 3 - Lectinas usadas neste trabalho.....94

I. INTRODUÇÃO

1.1. A Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma*, cuja distribuição geográfica ocorre em 76 países da América do Sul, Ásia e África (WHO, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016) mais de 258 milhões de pessoas precisariam de tratamento para a esquistossomose em 2014 e mais de 61,6 milhões tenham sido tratadas para a doença nesse mesmo ano.

Existem sete espécies de *Schistosoma* que podem causar a esquistossomose no homem: *Schistosoma hematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma guineensis* (Le Roux, 1930), *Schistosoma intercalatum* (Fischer, 1934), *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), *Schistosoma malayensis* (Greer, Ow-Yang & Young, 1988), *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 e *Schistosoma mekongi* (Voge, Brickner & Bruce, 1978). Apenas o *S. mansoni* é encontrado no continente sul-americano (Barbosa, 2007; Neves, 2011; Noya et al, 2015).

No Brasil, esta doença é popularmente conhecida como "xistose", "barriga-d'água", "bilharzíase" ou "mal-do-caramujo" (Neves, 2011) e estima-se que há entre 25 e 30 milhões de pessoas vivendo em áreas com risco de transmissão, com aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas por *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (WHO, 2016).

A ausência de saneamento básico e acesso à água potável, estão entre os principais fatores que favorecem a transmissão da esquistossomose, pois a população das áreas endêmicas utiliza os recursos hídricos, onde vivem os moluscos infectados, inclusive para lazer, facilitando à exposição humana às cercárias. Portanto, tanto o saneamento básico quanto o controle dos caramujos estão entre as medidas de prevenção e controle da esquistossomose (Carvalho, 2008; Rey, 2011). A exemplo de controle de moluscos hospedeiros de *S. mansoni*, Mello-Silva et al (2011) relatou uma alternativa natural, ao testar a seletividade do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopilii* em moluscos expostos à *S. mansoni*.

Nos moluscos ocorre uma importante fase do ciclo do parasito que culmina com a eliminação de cercárias, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. Entretanto, o controle da esquistossomose é dificultado pelo desenvolvimento de projetos hídricos, como barragens, sistemas de irrigação e projetos de aquicultura que criam novos e, muitas vezes favoráveis, habitats para moluscos hospedeiros, oferecendo novas oportunidades para o contato humano com a água (Rey, 2011). Dessa forma, entender quais são os mecanismos que favorecem o sucesso do parasitismo no hospedeiro intermediário podem fornecer dados para intervenções ou interrupções neste processo, impedindo ou dificultando a infecção humana.

As três espécies do gênero *Biomphalaria* hospedeiras de *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835), apresentam diferentes mecanismos de resposta imune que afetam diretamente a eficiência da transmissão (Neves, 2011). Na espécie mais resistente, *B. straminea* demonstrou-se que os hemócitos, principais componentes do sistema imune dos moluscos, reconhecem, tornam-se ativos e encapsulam esporocistos primários, levando a maioria dos parasitos à morte. O processo de reconhecimento e ativação hemocitária parece estar relacionado à presença de lectinas na hemolinfa (Loker, 2004). Em moluscos, essas proteínas são sintetizadas por hemócitos e podem permanecer expressas na membrana destas células, funcionando como receptores citofílicos, ou serem secretadas. Hemócitos de *B. glabrata*, hospedeiro mais suscetível, embora não se ligue ou encapsule esporocistos *in vitro*, o faz quando a hemolinfa de moluscos resistentes está presente no ensaio (Richards e Renwranz, 1991). Aspectos morfológicos e funcionais dessas células, frente à infecção por parasitos digenéticos, não estão bem esclarecidos.

Este trabalho descreve os estudos histopatológico e citológico comparativos entre moluscos *B. straminea*, provenientes de Sousa (PB), município localizado na área de transposição do Rio São Francisco, e exemplares de *B. glabrata* provenientes de Ressaca, MG.

1.2. Importância da Esquistossomose no Brasil

A introdução e disseminação da esquistossomose no Brasil sempre esteve relacionada ao desenvolvimento econômico do país. O principal fator que contribui para a transmissão da esquistossomose numa comunidade é a contaminação de coleções aquáticas, principalmente por fezes humanas de pessoas infectadas que são depositadas na água, favorecendo a eclosão dos miracídios (Noya et al, 2015).

A contaminação fecal dos ambientes aquáticos dulcícolas é o principal componente do processo de transmissão da esquistossomose e de outras parasitoses de veiculação hídrica. Portanto, é nesta etapa do ciclo de transmissão que as ações de controle teriam efeito mais eficaz e duradouro, impedindo o parasito de alcançar o ambiente aquático e , portanto, inviabilizando seu desenvolvimento biológico. As intervenções que visam impedir a contaminação fecal do meio ambiente são extremamente complexas, envolvendo fatores ligados às práticas culturais, ao estilo e condições de vida de determinadas populações (Carvalho, 2008).

Existem, pelo menos, duas vias clássicas de contaminação fecal dos ambientes aquáticos:

a) Individual: ocorre quando as pessoas defecam ao ar livre e as fezes são carregadas pelas chuvas, atingindo as coleções d'água. Esta prática é fortemente enraizada na cultura rural, devido à histórica carência de saneamento, abastecimento de água e informação (Carvalho, 2008).

b) Coletiva: ocorre quando o resíduo de esgotos residenciais é diretamente lançado nas coleções hídricas. Esta é uma prática coletiva de ocorrência usual em localidades periurbanas e/ou favelizadas, cujas populações não tem acesso à rede de esgotamento sanitário (Carvalho, 2008)

O clima de país tropical permite, na maioria dos estados brasileiros, as condições necessárias para a transmissão da doença. Assim, existe uma incrível variedade de habitats aquáticos, que funcionam como criadouros de moluscos. Por outro lado, a eclosão do miracídio, penetração deste no molusco, evolução das formas parasitárias no caramujo, emergência e

penetração de cercárias são também fortemente dependentes dessas duas variáveis (temperatura e luminosidade) (Neves, 2011).

Outro fator que contribui para a disseminação da esquistossomose é a migração da população menos favorecida, que tende a migrar para a periferia de centros urbanos, à procura de melhores condições de vida, novas fronteiras agrícolas e/ou atividades de garimpo, dentre outras (Neves, 2011). Estas migrações associadas à manutenção dos mesmos costumes sanitários contribuíram para a implantação de novos focos de transmissão da doença em áreas urbanas.

A migração das populações rurais de áreas endêmicas de esquistossomose para os grandes centros urbanos reduziu a transmissão da doença nessas áreas, onde o percentual da população rural brasileira diminuiu de 70,5% para 15% em 2013 (Noya et al, 2015; World Bank, 2016).

Mudanças ecológicas, demográficas e melhores condições socioeconômicas podem ser os fatores mais importantes para o controle da esquistossomose (Noya et al, 2015).

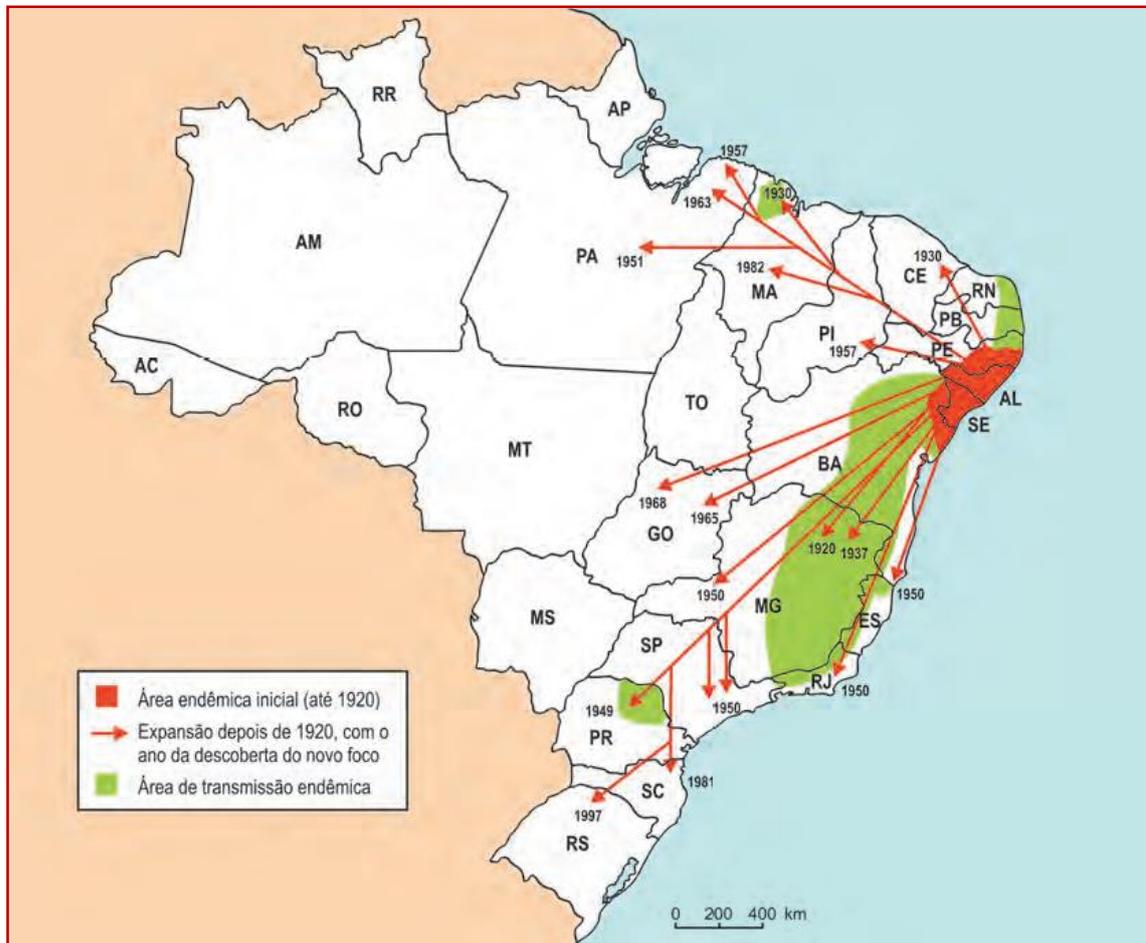


Figura 1 - Representação da Expansão da Esquistossomose mansônica no Brasil. Fonte: Brasil, com adaptações feitas por Heloisa M. N. Diniz, 1998 *apud* Ministério da Saúde, 2014.

1.3. Hospedeiros Intermediários no Brasil

No Brasil, 11 espécies do gênero *Biomphalaria* já foram identificadas. Dentre estas, *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* são as responsáveis pela transmissão da esquistossomose no país.

Das três espécies de *Biomphalaria* transmissoras de *S. mansoni*, *B. glabrata* é a principal hospedeira, por apresentar altos níveis de infecção e ter sua distribuição, no Brasil, quase sempre associada a ocorrência da esquistossomose (Ministério da Saúde, 2014). De acordo com Neves (2011) já foi registrada em ambientes naturais com taxas de positividade de até 80% e um exemplar infectado pode eliminar até 18 mil cercárias por dia. Trata-se do maior molusco da família Planorbidae, sua concha podendo atingir 40mm de diâmetro e 11mm de largura, com seis a sete giros. Apresenta-se com uma borda arredondada com tendências para a direita e o lado direito ligeiramente côncavo, com o giro central profundo, e o esquerdo formando uma cavidade rasa. A sutura encontra-se bem marcada em ambos os lados (Paraense, 1975). A principal característica da sua anatomia interna é a presença de uma crista renal pigmentada, localizada ao longo da superfície ventral do tubo renal, em indivíduos adultos e uma linha pigmentada em indivíduos jovens. À medida que o animal cresce, ergue-se uma prega longitudinal sobre essa linha, formando a crista renal (Thiengo et al, 2012).

A distribuição de *B. glabrata* está quase sempre associada à distribuição da esquistossomose. É encontrada numa faixa contínua em quase todos os estados brasileiros situados entre o Rio Grande do Norte e o Paraná, estando presente em algumas áreas do Pará e Maranhão, havendo apenas uma população reportada no Piauí. Está ausente no estado do Ceará (Carvalho et al, 2008).

A concha adulta de *B. tenagophila* alcança cerca de 35 mm de diâmetro e 11 mm de largura na abertura. Suas outras características são: sete a oito giros mais acentuadamente no lado esquerdo; lado esquerdo ligeiramente mais côncavo que o direito; sutura bem marcada em ambos os lados; periferia arredondada, tendendo para a direita. Em comparação com *B. glabrata*, apresenta maior largura, principalmente do lado esquerdo e abertura mais larga. A anatomia de *B. tenagophila* é quase idêntica a de *B. glabrata*, diferindo

apenas pela ausência da crista renal ou da linha pigmentada. A sua distribuição está mais restrita ao sul do Brasil, sendo encontrada desde o sul da Bahia, leste do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (Neves, 2011). *B. tenagophila* é encontrada na natureza com baixas taxas de infecção, colonizando coleções hídricas permanentes, uma vez que esses moluscos seriam incapazes de resistir à dessecação (Carvalho et al, 2008). Segundo Mello-Silva et al (1998) há isolamento geográfico, mas não reprodutivo, uma vez que seus experimentos mostraram que o cruzamento interespecies entre *B. glabrata* e *B. tenagophila* é possível, porém a fertilidade e fecundidade dos indivíduos decaem, após várias gerações, até o nascimento de descendentes estéreis.

B. straminea, a menor das três espécies, apresenta concha com até 16 mm de diâmetro, seis milímetros de largura, cinco giros e paredes laterais arredondadas. A principal característica da anatomia interna é a presença de um enrugamento transversal nas paredes dorsal e esquerda da vagina, ausente em *B. glabrata*. O rim não apresenta crista. Encontrada em quase todas as bacias hidrográficas do Brasil, é a espécie predominante no Nordeste do país, tendo sido também responsável por focos em Fordlândia, no Pará, e em Goiânia. Apesar de apresentar taxas muito baixas de infecção a densidade desse molusco nos criadouros do Nordeste é bastante alta (Neves, 2011). As conchas dos moluscos hospedeiros de *S. mansoni* no Brasil são mostrados na figura 2.

A distribuição das espécies do gênero *Biomphalaria* presentes neste trabalho é mostrada nas Figuras 3 e 4.

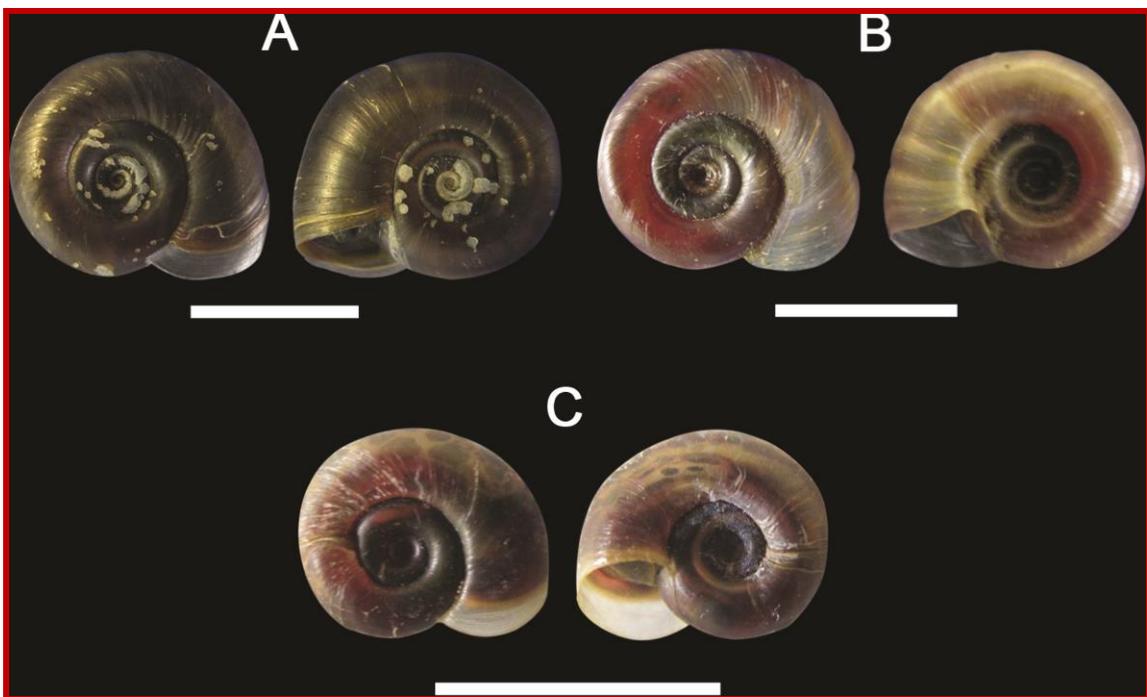


Figura 2 - Espécies hospedeiras de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, acervo do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose-Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (A= *Biomphalaria glabrata*; B= *Biomphalaria tenagophila*; C= *Biomphalaria straminea*). Escalas 1cm.



Figura 3 - Distribuição espacial de *Biomphalaria straminea* no Brasil. Fonte: Carvalho; Caldeira, 2004 *apud* Ministério da Saúde, 2014.



Figura 4 - Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata* no Brasil. Fonte Carvalho; Caldeira, 2004 *apud* Ministério da Saúde, 2014.

1.4. Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni*

Os vermes adultos de *S. mansoni* vivem no sistema porta-hepático intestinal do hospedeiro vertebrado e do homem (Carvalho et al, 2008; Neves, 2011; WHO, 2016). Os esquistossômulos quando chegam ao fígado apresentam um ganho de biomassa exponencial e após atingirem a maturação sexual, em torno de 25 dias, migram para os ramos terminais da veia mesentérica inferior, principalmente na altura da parede intestinal do plexo hemorroidário, onde se desenvolvem em machos e fêmeas adultos e acasalam. Em torno do 35º dia, a fêmea inicia a postura dos ovos, que são ovais e possuem um espinho lateral característico (Carvalho et al, 2008).

O ovo, por sua vez, libera uma grande variedade de imunógenos, conhecidos coletivamente como "antígenos solúveis do ovo" (SEA, do inglês *soluble egg antigen*) e mediam as respostas imunológicas envolvidas com a migração tecidual, agregação plaquetária, adesão ao endotélio vascular, passagem para a luz intestinal, formação de granulomas e processos relacionados à angiogênese (Carvalho et al, 2008).

Dos ovos em contato com a água eclodem os miracídios e para que ocorra a eclosão há a necessidade de luz (fototropismo positivo) e temperatura ideais, pois os miracídios possuem fototropismo positivo. Uma vez fora do ovo, o miracídio estimulado pelo muco do molusco liberado na água, irá nadar até encontrar um hospedeiro intermediário suscetível, onde irá penetrar e sofrer mudas até chegar a forma infectante para o vertebrado, a cercária. A combinação dos intensos movimentos do miracídio e da ação enzimática constituem os elementos que permitem a penetração da larva nos tecidos do molusco (Neves, 2011).

Após penetrar nas partes expostas do caramujo, sofrem intensas modificações morfo-fisiológicas e transformam-se em esporocistos primários que por sua vez, também sofrem mitoses podendo gerar outros esporocistos primários ou secundários. Os esporocistos secundários irão originar as cercárias que serão liberadas na água através do tegumento do caramujo. A liberação de cercárias só ocorre em presença de luz e temperatura por volta dos 26°C. Se a temperatura for mais alta ou mais baixa que esta, ou se a

luminosidade não for suficiente, a liberação de cercárias é inibida (Carvalho et al, 2008) (Figura 5).

O hospedeiro definitivo se infecta ao entrar em contato com a água de rios, lagos, etc, contendo as cercárias. Estas irão penetrar na pele ou mucosas, podendo vir a perder ou não a cauda que lhes dava mobilidade na água. Uma vez dentro do vertebrado o parasita passa a ser denominado de esquistossômulo (Carvalho et al, 2008) (Quadro 1). Dentro do vertebrado, o trematódeo continua sua migração através da pele até chegar à circulação sanguínea. Uma vez na circulação, o esquistossômulo a utiliza como veículo, podendo passar por todo o corpo, inclusive coração e pulmões até chegar a seu habitat definitivo (Neves, 2011).

1.5. Desenvolvimento intramolusco de *Schistosoma mansoni*

Após a penetração no caramujo o miracídio perde seu revestimento epitelial ciliado e permanece nas proximidades do local de penetração (Rey, 2008), que por sua vez, pode ser qualquer área das partes expostas do caramujo, sendo, porém, a base dos tentáculos e o pé os locais preferidos. Inicialmente, o esporocisto apresenta movimentos amebóides, que diminuem com o tempo, até a completa imobilidade da larva. As células germinativas, em número de 50 a 100, iniciam, então, um intenso processo de multiplicação (poliembrionia), fazendo com que, após 72 horas, a larva, chamada esporocisto primário, esporocisto-mãe ou, simplesmente, esporocisto I, dobre de tamanho (Neves, 2011). A parede do corpo compreende, externamente, uma membrana plasmática e, internamente uma camada sincicial. Grandes células germinativas isoladas, ou agrupadas, podem estar incluídas na parte do corpo ou livres no meio líquido que preenche o esporocisto (Rey, 2008). Os maciços celulares diferenciam-se para constituir os esporocistos secundários. Em condições ideais de temperatura, entre 25 e 28°C, ocorre a formação dos esporocistos secundários, que se inicia a partir do 14º dia após a penetração do miracídio. Esta evolução pode ser significativamente retardada em temperaturas abaixo de 20°C (Neves, 2011).

O esporocisto primário aumenta em comprimento, forma, constrictões e curvaturas, apresenta movimentos de expansão ou contração e, rompe-se para liberar 20 a 40 esporocistos secundários. Estes migram para as regiões da glândula digestiva e do ovoteste do molusco, onde continuam a crescer. Quando maduros, estes esporocistos secundários tem uma parede mais grossa e cavidade germinativa mais estreita que os esporocistos primários, exibindo na extremidade anterior uma protuberância móvel e um poro para a eliminação de cercárias. As células germinativas acumulam-se no outro extremo da cavidade, permanecendo em constante multiplicação. Pouco a pouco, os aglomerados celulares vão se diferenciando em cercárias (Rey, 2008).

A migração dos esporocistos secundários inicia-se em torno do 18º dia de infecção do molusco, com a migração ocorrendo ativamente através dos seus tecidos. A saída dos esporocistos do local de penetração do miracídio, onde a maioria se desenvolve, até a glândula digestiva, leva de dois a três dias. A localização final dos esporocistos será nos espaços intertubulares da glândula digestiva, local onde há maior quantidade de nutrientes (Neves, 2011).

A formação completa da cercária, até sua emergência para o meio aquático, pode ocorrer num período de 27 a 30 dias, em condições ideais de temperatura (cerca de 28°C). Um único miracídio pode gerar de 100 a 300 mil cercárias, e cada miracídio já leva definido o sexo das cercárias que serão produzidas (Neves, 2011). A vida do miracídio dura entre 8 a 12 horas, depois disso se não encontrar um hospedeiro, ele morre (Carvalho et al, 2008).

Quando um caramujo infectado é retirado da água e levado a um estado de anidrobiose, a evolução do parasito interrompe-se por igual período, retomando seu curso assim que o planorbídeo voltar às condições normais de vida (Rey, 2011).

Moluscos infectados por uma grande carga parasitária de miracídios de *S. mansoni* podem sofrer castração parasitária ou morrer em consequência das destruições causadas na glândula digestiva ou em outros órgãos (Rey, 2011; Faro et al, 2013). A reação dos tecidos do molusco contra os parasitos (formação de granulomas e lise) tem lugar desde os primeiros dias de infecção e é tanto mais intensa quanto mais resistente ao parasitismo mostrar-se a

espécie ou variedade de *Biomphalaria* à cepa de *Schistosoma* em causa. De acordo com Rey (2011) os moluscos hospedeiros mais suscetíveis ao *S. mansoni* praticamente não reagem à presença dos esporocistos desse parasito em seus tecidos.

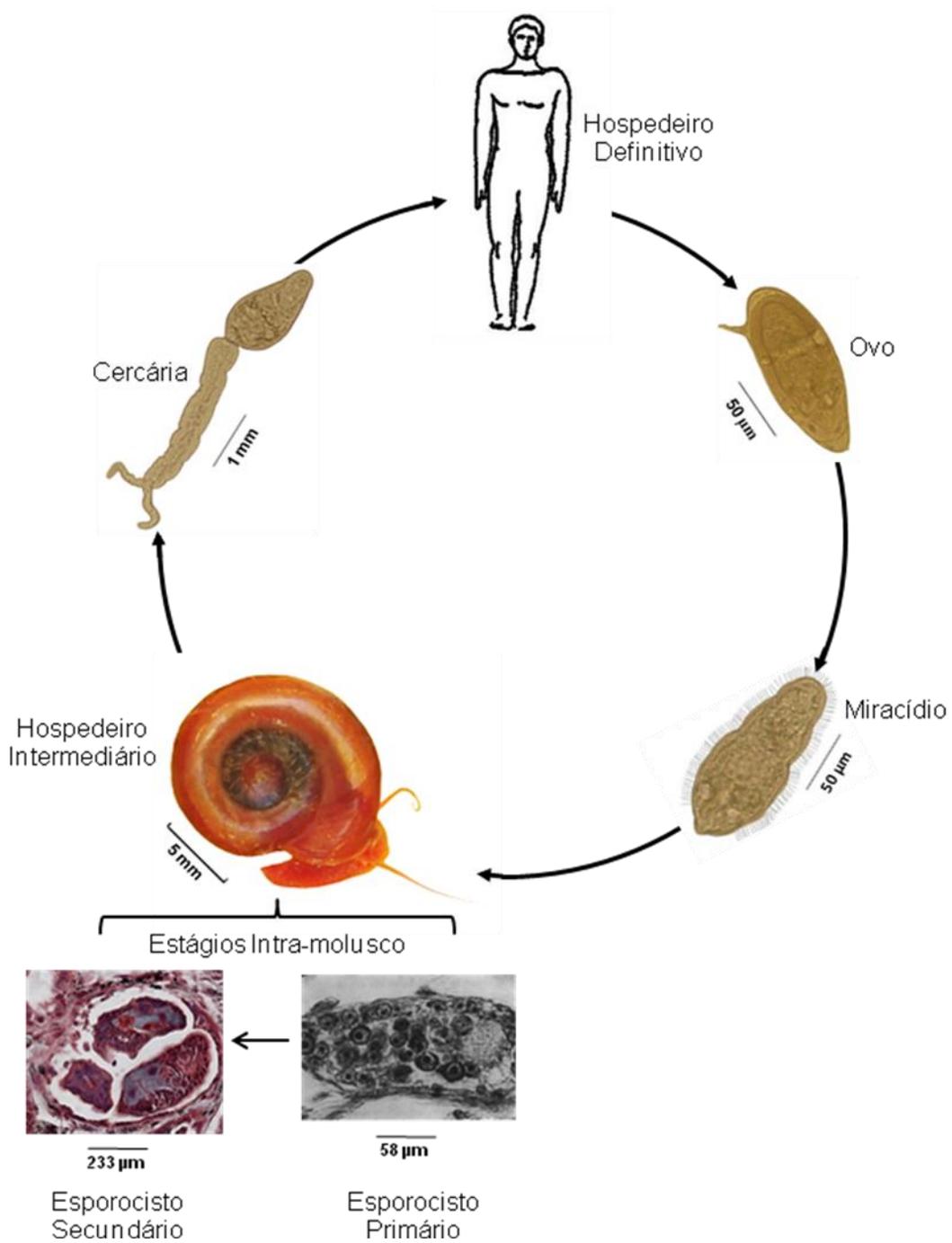


Figura 5 - Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, acervo do Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose-Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, adaptado de Guaraldo (1981) e Barros da Silva (2014). Extraído de Ministério da Saúde, 2007.

Quadro 1 - Expectativa de vida de *S. mansoni*, nas suas diferentes fases do ciclo biológico. Adaptado de Rey (2011) e Carvalho et al (2008).

Ovo Imaturo	Até sete dias para maturação. A postura pode começar no 30º dia após a infecção (d.a.i.) e a partir do 40º d.a.i., podem ser encontrados ovos nas fezes, recomeçando o ciclo.
Ovo Maduro	Dentro do hospedeiro, até 20 dias.
Miracídio	Dentro do ovo, em fezes sólidas, sem exposição direta da luz, até cinco dias. Depois da eclosão do ovo, no meio aquoso, com temperatura adequada, até 24 horas. Segundo Rey (2008), entre 24°C e 28°C cerca de metade morre nas primeiras oito horas de vida livre e os restantes entre 8 e 12 horas.
Esporocisto Primário	Cerca de duas semanas até se transformar em esporocisto secundário. Resultam, aproximadamente, de cada esporocisto primário de 20 a 40 esporocistos secundários.
Esporocisto Secundário	Três a quatro semanas até a formação de cercárias. Segundo Rey (2008), os esporocistos secundários, depois de produzirem cercárias por um tempo, podem voltar a formar novas gerações de esporocistos capazes de retomar a produção de novas cercárias e este processo pode levar até mais de oito meses. É importante destacar que cada miracídio pode gerar até 300.000 cercárias e que o molusco começa a eliminá-las por volta da quinta semana.
Cercária	Até dois dias na água, embora a infectividade caia rapidamente. Leva entre dois a 15 minutos para penetrar na pele, segundo Carvalho (2008).
Esquistossômulo	É formado logo após a penetração na pele do hospedeiro vertebrado. Segundo Carvalho (2008), em 27 dias, depois da penetração na pele, pode transformar-se em verme adulto.
Verme Adulto	Pode viver de seis a 10 anos, segundo Rey (2008). Embora existam relatos de pacientes eliminando ovos até 30 anos após sair da área endêmica.

1.6. Sistema de Defesa Interno dos Moluscos

O sistema imune dos moluscos, assim como de outros invertebrados consiste da imunidade inata, que pode ser considerada uma forma ancestral da imunidade presente nos vertebrados (Neves, 2011). Barreiras externas de moluscos (conchas, muco, epitélio), constituem a primeira linha de defesa contra patógenos e parasitos. Quando estas barreiras são ultrapassadas, uma segunda linha de defesa interna, envolvendo componentes celulares e solúveis da hemolinfa, começa a atuar. Alguns autores denominam os elementos ou substâncias solúveis da hemolinfa de componentes humorais, já identificados, como: enzimas lisossomais, lectinas, aglutininas, proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs), lectinas do tipo C, toxinas formadoras de poros, tal qual a biomphalisina e peptídeos antimicrobianos (Lavine e Strand, 2002; Zanker, 2010; Galinier et al, 2013). Tais componentes ajudam no reconhecimento de patógenos e parasitos ligando-se a estes, promovendo ou estimulando sua eliminação através da opsonização ou da morte direta (Sokolova, 2009).

Os hemócitos são os principais componentes efetores do sistema imune dos moluscos, sendo responsáveis pelo reconhecimento e fagocitose de antígenos não próprios, inclusive microorganismos invasores, como vírus e bactérias, ou por encapsular estruturas maiores, como helmintos, e então destruí-las (Van Der Knaap, 1990; de Jong et al, 2001; Hahn et al, 2001). Tal processo inclui várias etapas: reconhecimento, adesão, ingestão, destruição ou encapsulamento e eliminação final de células ou materiais estranhos (Ottaviani, 2006). De fato, os hemócitos produzem e secretam proteínas proteolíticas, que são fatores solúveis da hemolinfa que opsonizam e agregam antígenos não próprios para facilitar a fagocitose (Richards e Renwartz, 1991). A superfície dos hemócitos contém vários ligantes para lectinas que são heterogêneos entre as espécies e cepas (Martins-Souza, 2006; 2011). Tipos distintos de hemócitos expressam receptores específicos para lectinas em sua superfície celular (Joky et al, 1983). A resistência de caramujos do gênero *Biomphalaria* à infecção por *S. mansoni* é diretamente proporcional à capacidade de seus hemócitos, em suspensão na hemolinfa, de envolverem as formas parasitárias recém penetradas, formando um encapsulamento em torno desta e terminando por destruí-la (Neves, 2011). Segundo Boswell (1986) e Bayne (1980),

esporocistos previamente tratados com a lectina Concanavalina A eram encapsulados, mas não eram mortos nos caramujos resistentes à infecção. Meuleman et al (1987) mostraram que o processo de encapsulação ocorre tanto nas cepas suscetíveis quanto nas cepas resistentes, mas só resulta em morte parasitária na cepa resistente. Outros autores teorizam que é necessário reconhecimento específico para ocorrer a encapsulação e resposta citotóxica efetiva (Loker, 1990). Azevedo et al (2006) discutiram que hemócitos são capazes de responder ao estímulo local sem a ação imediata dos fatores solúveis que ficam localizados em outras regiões do hospedeiro.

Em invertebrados, que não produzem imunoglobulinas, o reconhecimento é mediado por lectinas (Neves, 2011). As lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas de natureza não enzimática que não pertencem a superfamília das imunoglobulinas. Reconhecem e se ligam especificamente a carboidratos (Barondes, 1988), podendo também reconhecer proteínas, enzimas e imunoglobulinas. Elas desempenham um importante papel no reconhecimento célula-célula e são consideradas como possíveis participantes nas interações imunes entre o caramujo e o trematódeo, em um sistema onde não existem anticorpos (Horák, 1997).

Segundo Knaap e Loker (1990), a infectividade do parasito envolve os seguintes mecanismos imunológicos: (i) mimetismo molecular, quando os parasitos compatíveis sintetizam e expõem moléculas que são reconhecidas como “self” pelos hemócitos do molusco; (ii) mascaramento molecular no qual o parasito compatível adquire moléculas do hospedeiro ou passivamente ou via receptores específicos, e não é reconhecido pelo sistema imune do molusco; (iii) ausência de reconhecimento, onde o parasito compatível possui moléculas que não são reconhecidas pelos hemócitos do hospedeiro; (iv) produção de epítomos não reconhecíveis, onde o parasito compatível sintetiza epítomos capazes de lhe conferir proteção; e (v) mecanismo de interferência, quando o parasito produz e excreta produtos capazes de interferir na ação do sistema imune do molusco.

Nas espécies do gênero *Biomphalaria*, as respostas do sistema de defesa interno às larvas de trematódeos são parcialmente dependentes da capacidade dos hemócitos reconhecerem moléculas do tegumento do esporocisto, levando

à ativação celular e produção de metabólitos de oxigênio e nitrogênio altamente tóxicos que são associados a mortalidade parasitária (Hahn et al 2000, 2001; Bender et al, 2005; Bayne, 2009; Moné et al 2010). Nesse contexto, o primeiro passo na ativação desse mecanismo de defesa é o reconhecimento do parasito pelos hemócitos. A caracterização morfológica dos hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* foi apresentada por Cavalcanti et al (2011), que estudaram exemplares não expostos.

O tegumento dos esporocistos de *S. mansoni* é composto de moléculas altamente glicosiladas (Yoshino, 1977; Uchikawa & Loker, 1991; Johnston & Yoshino, 1996) que se ligam a proteínas solúveis da hemolinfa de *B. glabrata* de uma forma carboidrato dependente (Johnston & Yoshino, 1996). Além do mais, foi demonstrado que glicoproteínas excretadas/secretadas pelos esporocistos de *S. mansoni* também se ligam aos hemócitos via receptores ligantes de carboidrato (Johnston & Yoshino, 2001). Dessa forma, a ligação carboidrato-lectina poderia mediar funcionalmente a associação dos hemócitos ao tegumento do trematódeo (Van der Knaap & Loker, 1990; Johnston & Yoshino, 2001; Bayne, 2009). Conseqüentemente, essa ligação poderia ser um fator determinante da suscetibilidade de *Biomphalaria* à infecção por *S. mansoni*. As lectinas mais conhecidas presentes na hemolinfa de *B. glabrata* são membros de uma família de proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs) (Adema et al, 1997; Zhang et al, 2008). FREPs são lectinas dependentes de cálcio que contém um ou dois domínios N-terminais parecidos com o das imunoglobulinas e um domínio fibrinogênio C-terminal. Essas lectinas são reguladas depois da infecção pelo trematódeo e associadas a moléculas portadoras de glicanos liberadas pela larva do parasito (Zhang et al, 2008; Hanington et al, 2010a, b; Moné et al, 2010). Trabalhos recentes demonstraram que o FREP3 de *B. glabrata* tem propriedades opsônicas contra hemócitos e que a depleção de FREP3 resultou numa alteração da resistência do caramujo à infecção pelo parasito *Echinostoma paraensei* (Hanington et al, 2010b). Entretanto, os FREPs não foram identificados em outras espécies de *Biomphalaria* e suas funções no reconhecimento e destruição de parasitos ainda não foi bem definido (Bayne, 2009).

Apesar de não dispor das mesmas lectinas utilizadas por Martins-Souza et al (2006) ao caracterizar hemócitos de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, as lectinas utilizadas neste estudo ligam-se aos mesmos carboidratos que as lectinas usadas por estes autores (ver tabela em anexo).

Segundo Cavalcanti et al (2011), os moluscos do gênero *Biomphalaria* possuem cinco tipos de hemócitos: as células blásticas, os granulócitos, os hialinócitos tipo I, hialinócitos tipo II e hialinócitos tipo III.

As células blásticas possuem o formato esférico, exibem um núcleo grande, localizado centralmente e citoplasma restrito a uma pequena área ao redor do núcleo. Seu diâmetro variou entre 3-5 μ m para *B. glabrata* e 4-5 μ m para *B. straminea*. Estas células possuem características comuns a células jovens ou de células precursoras de outros hemócitos (Cavalcanti, 2011).

Os granulócitos são células polimórficas, cujo formato pode variar de esférico à fusiforme, contendo um variado número de grânulos basofílicos em seu citoplasma, que podem estar localizados na periferia ou no centro da célula. O tamanho destas células varia entre 7-8 μ m para *B. glabrata* e 6-7 μ m para *B. straminea*. Em *B. straminea*, esta autora encontrou nucléolo evidente e grânulos em diferentes estágios de formação (Cavalcanti, 2011).

Os hialinócitos tipo I, apresentam perfil polimórfico com o núcleo central ou deslocado. A membrana deste hemócitos apresenta filopódios/pseudópodes e seu diâmetro varia entre 7-12 μ m para *B. glabrata* e 5-8 μ m para *B. straminea*. (Cavalcanti, 2011).

Os hialinócitos tipo II, são descritas como ovais possuindo núcleo excêntrico sem nucléolo proeminente e citoplasma homogêneo com a presença de vesículas e ribossomos livres. Estas células medem entre 9-10 μ m para *B. glabrata* e para *B. straminea* (Cavalcanti, 2011).

Os hialinócitos tipo III, são consideradas as maiores células encontradas na hemolinfa com diâmetro variando entre 10-12 μ m para *B. glabrata* e 9-11 μ m para *B. straminea*. São células cujo formato varia de esférico à oval, com núcleo grande e esférico que pode estar localizado de forma central ou excêntrica (Cavalcanti, 2011).

1.7. Relação *Biomphalaria straminea* – *Schistosoma mansoni*

Estudos epidemiológicos mostram que a suscetibilidade de *B. straminea* ao *S. mansoni* é a mais baixa das três espécies hospedeiras desse trematódeo no Brasil, variando (dependendo da população do molusco e da cepa do parasito) de 1,2% a 12,8% (Fernandez e Pieri, 2001; Fernandez e Thiengo, 2002). A taxa de infectividade mais alta nesta espécie de molusco foi encontrada em uma população de Juiz de Fora, MG: 28,6% (Massara et al, 2002).

A compreensão do mecanismo de resistência de parte da população de *B. straminea* ao *S. mansoni* vem sendo estudada, mas ainda há poucas informações a respeito da razão de ocorrer esse comportamento resistente em parte da população desse molusco. Segundo Fernandez e Pieri (2001) a imaturidade do sistema imune, peculiar a indivíduos muito jovens, influencia na infectividade do mesmo. Assim, os espécimes suscetíveis e futuros mantenedores do ciclo natural teriam de ser ainda expostos em tenra idade aos miracídios.

O mecanismo de resistência é um caráter genético dominante, o que pode explicar porque apenas uma pequena porcentagem da população de *B. straminea* mantém o ciclo deste trematódeo (Florence et al, 2005). Estudos mostram que esse perfil com padrão dominante pode ser transferido ao espécime suscetível ou a seus hemócitos *in vitro* através de alo enxerto de APO (*Amebocyte Producing Organ*) ou pela transferência de hemolinfa de indivíduos resistentes (Barbosa et al, 2006; Pereira et al, 2008).

No presente trabalho descrevemos as características da citologia dos hospedeiros intermediários *Biomphalaria straminea* da cepa Sousa, Paraíba e *Biomphalaria glabrata* da cepa Ressaca, Minas Gerais, não expostos e após a exposição por *Schistosoma mansoni*. É abordado o papel de algumas lectinas durante a resposta imune dos hospedeiros, assim como a relação parasito-hospedeiro, onde as células dos moluscos foram desafiadas pelos parasitos.

1.8. Justificativa

Em termos de helmintoses relevantes para a Saúde Pública, a esquistossomose constitui uma das principais endemias negligenciadas que acometem a população de baixa renda, principalmente no nordeste do país, onde *Biomphalaria straminea* é o principal transmissor nessa região. Sua importância como hospedeiro aumenta com a implementação de grandes projetos hídricos e a possibilidade de irrigação de novas áreas do nordeste setentrional, como é o caso da transposição do Rio São Francisco. Entretanto, estudos envolvendo a interação parasitária *B. straminea*-*S. mansoni* são escassos devido a aspectos da biologia desse hospedeiro, entre eles a resistência à infecção.

Estudos de resistência à infecção podem sugerir a existência de um padrão molecular que confere resistência ao *S. mansoni* e pode estar presente total ou parcialmente nos planorbídeos hospedeiros. A identificação de algumas destas moléculas presentes na interação hemócito/esporocisto já tem sido realizada. Com lectinas, por exemplo, Martins-Souza et al (2006) observaram diferentes proporções de marcação ao examinar hemócitos de *B. glabrata* suscetível e de uma cepa resistente de *B. tenagophila* (Taim) após a exposição à miracídios.

Ao estudarmos experimentalmente uma população de *B. straminea* de Souza, PB, registrada como área endêmica da esquistossomose, encontramos uma população com um perfil de baixa infectividade. A partir deste achado resolvemos caracterizar aspectos morfológicos dos descendentes de indivíduos com este perfil resistente. A caracterização de um perfil morfológico e enzimático relacionado ao comportamento resistente ao *S. mansoni* pode contribuir para o entendimento desse processo e ainda verificar se este é comum nas espécies e cepas com este padrão.

II. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento da relação *Biomphalaria straminea*-*Schistosoma mansoni*, através de estudo imunocitológico e histopatológico envolvendo a participação de lectinas em hemócitos de *B. straminea* expostas ao *S. mansoni*, visando a obtenção de um perfil fenotípico que caracterize o comportamento resistente de uma população de *B. straminea* oriunda de Souza-PB.

2.2. Objetivos Específicos

a) Verificar possíveis alterações na composição celular, através da contagem e caracterização morfológica de hemócitos circulantes, em *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata* experimentalmente infectadas por *Schistosoma mansoni*.

b) Verificar a presença de lectinas nos hemócitos em cultura de *B. straminea* e de *B. glabrata* desafiados pelos parasitos;

c) Conhecer aspectos *in vitro* da interação *S. mansoni*-*B. straminea* e *B. glabrata* através da cultura de hemócitos destes moluscos desafiados por esporocistos primários de *S. mansoni*;

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Moluscos Utilizados para a Infecção experimental

Foram utilizados exemplares de *B. straminea* provenientes da cepa Sousa (PB) e *B. glabrata* provenientes da cepa Ressaca (MG), providas pelo Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose-Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. A partir do 30º dia de infecção, os moluscos foram expostos à luz de 60 Watts para verificar a liberação de cercárias.

3.2. Infecção do Hospedeiro Definitivo e Obtenção dos Miracídios

Camundongos Swiss Webster são utilizados na manutenção do ciclo do *S. mansoni* (cepa BH – Belo Horizonte, Minas Gerais) mantido nos Laboratórios de Patologia e Laboratório de Referência Nacional para Esquistossomose-Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz. Animais com cinco dias de vida foram infectados com 70 cercárias via percutânea. Eles foram colocados em poços de cultura de células com espaço para seis animais contendo uma lâmina d'água com as larvas que penetraram através da pele. Após o desmame, com aproximadamente 21 dias de idade, os machos e fêmeas foram separados para evitar a procriação.

O exame parasitológico de fezes foi feito a partir do 30º dia pós-infecção a partir da técnica de sedimentação espontânea (Lutz, 1919) a fim de detectar a presença dos ovos do parasita. Uma vez confirmada presença dos ovos vivos, os sedimentos foram expostos à luz de 60 Watts, durante 15 minutos, para que ocorresse a eclosão dos miracídios que foram utilizados para infectar os moluscos.

3.3. Exposição dos Moluscos

Foram utilizadas *B. straminea* da cepa Sousa (PB), cujos diâmetros das conchas variaram entre 2mm e 5mm e *B. glabrata* da cepa Ressaca (MG), cujos diâmetros das conchas variaram entre 5mm e 8mm. Moluscos de ambas as espécies foram expostos em massa e individualmente à miracídeos da cepa BH de *S. mansoni*.

Para realizar a exposição em massa, os moluscos foram acondicionados em placas de Petri contendo os parasitos. A exposição individual à cinco miracídeos foi realizada a partir da contagem dos parasitos que foram acondicionados em Erlenmeyer de 125ml coberto com papel alumínio após a sedimentação. Os miracídeos foram capturados com pipetas de vidro e contados em placas de 24 poços. Após a contagem os moluscos foram colocados nos poços contendo os miracídeos. Doze moluscos de cada espécie foram usados como controles.

Os moluscos foram dispostos em grupos de quatro animais cada. Três grupos de moluscos expostos em massa foram sacrificados no início do período pré-patente, após 24 horas e outro grupo, de 12 moluscos, foi sacrificado no início do período patente que correspondeu à 30 dias após a infecção. Nestes grupos foram efetuados os seguintes procedimentos: contagem e identificação morfológica de hemócitos, marcação por lectinas, interação parasito-hospedeiro e histologia. Após 30 dias de exposição, tanto *B. straminea* quanto *B. glabrata* foram expostas à luz de 60 Watts para emissão de cercárias a fim de confirmar a infecção.

Para complementar o estudo dos hemócitos através da marcação por lectinas, outros grupos de moluscos foram expostos. Um foi sacrificado após 0 minuto (momento inicial da penetração do miracídio, realizado através de observação no microscópio estereoscópico), 48 e 72 horas após exposição em massa (4 moluscos/tempo) e outro grupo foi sacrificado após 0 minuto, 15, 30 e 45 minutos após exposição individual por cinco miracídeos (4 moluscos/tempo).

Após a exposição, as placas ainda contendo os moluscos foram observadas para constatar a presença de miracídeos, porém nenhum parasito foi avistado. Os animais foram colocados em aquários de vidro com as

medidas: 20cm de diâmetro, 10cm de altura, 5mm de espessura e com capacidade para dois litros de água. Os animais foram mantidos nos aquários e alimentados com alface *ad libitum*.

Para realizar a interação parasito-hospedeiro, os miracídios foram coletados de acordo com Jurberg et al (2008) e também foram contados em placas de 24 poços.

3.4. Coleta de Hemolinfa dos Moluscos

Para averiguar as mudanças celulares decorrentes da exposição, a hemolinfa foi extraída de moluscos com 60 dias de vida, tanto expostos quanto controles, constituindo um *pool*. Os animais tiveram o coração perfurado por uma agulha 26,5G em uma seringa de 1ml (insulina). A hemolinfa foi acondicionada em tubos Eppendorf em banho de gelo.

3.5. Contagem e Tipagem de Hemócitos

Os Eppendorfs contendo a hemolinfa dos moluscos foram centrifugados a 100rpm durante 10 minutos na centrífuga Rotina 380R Hettich Lab Technology. Uma alíquota de 10 μ l de hemolinfa foi corada com 10 μ l de Azul de Tripán para contagem em câmara de Neubauer a fim de avaliar o número de hemócitos. As células foram contadas em Microscópio Óptico Axio Skop com câmera AxioCam HRc da Zeiss.

Foi adicionada Formalina neutra 10% com Sacarose 30% (Malagueño et al, 1998) à hemolinfa restante na proporção 1:1 para preservar os hemócitos para uso posterior.

Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão e submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para análises intraespecíficas e teste Mann-Whitney para análises interespecíficas no mesmo período ($\alpha = 5\%$). Todas as análises foram conduzidas no software GraphPadPrism (GraphPad V.4.00, Prism, GraphPad, vol. 3.02 Prism inc.).

Este procedimento foi realizado tanto para os moluscos expostos em massa quanto para os expostos individualmente.

3.6. Citocentrifugado e Esfregaço

Após a contagem, os hemócitos foram ressuspensos e em seguida submetidos ao processo de citocentrifugação na centrífuga Cellspin I Tharmac. Em virtude do tamanho do molusco, o volume total de hemolinfa de *B. straminea* variou entre 10µl e 50µl, portanto metade do volume da hemolinfa desse molusco foi usado, enquanto que para *B. glabrata* foi usada uma alíquota de 100µl de hemolinfa. As alíquotas foram inseridas em funis de plástico e estes foram acoplados a suportes de metal contendo um papel de filtro em contato com uma lâmina histológica. Os hemócitos foram submetidos à 500rpm durante 10 minutos.

Para fazer o esfregaço, 50µl da hemolinfa da *B. glabrata* e o restante do volume de hemolinfa de *B. straminea* foram estendidos sobre uma lâmina e deixados secar em temperatura ambiente durante 24 horas e em seguida montadas em goma de damar.

Os hemócitos contidos nas lâminas de citocentrifugado e de esfregaço foram corados em Giemsa 20% para realizar a tipagem (Malagueño et al, 1998) e fotografados através do Microscópio Óptico Axio Skop com câmera AxioCam HRc da Zeiss. Outras lâminas foram submetidas à imunofluorescência para a identificação de carboidratos através de lectinas fluoresceinadas.

3.7. Histologia dos moluscos

Após a coleta de hemolinfa, os moluscos foram removidos das conchas a partir do esmagamento entre duas placas de vidro. Os resíduos de concha foram removidos e os corpos preservados em Formalina Millionig de Carson (Carson et. al, 1973) para posterior processamento histológico. Este procedimento ocorreu com *B. straminea* e *B. glabrata* após 24 horas e 30 dias de exposição em massa. Animais controles não expostos foram utilizados para

comparação com possíveis lesões teciduais causadas pelo parasitismo nos moluscos expostos.

As partes moles dos moluscos foram fixadas por um tempo mínimo de 24 horas. Em seguida o material foi clivado, removido do fixador e lavado em água corrente por uma hora. Após a lavagem, foi imerso sequencialmente em cubas contendo álcool etílico nas seguintes concentrações: 20%, 30%, 50%, 70% e 95% durante 30 minutos cada banho. Logo após, foram colocados em cubas contendo álcool butílico a 100% por 30 minutos, 40 minutos e uma hora, cada banho. Posteriormente, o material foi impregnado em parafina durante duas horas. Foi feita a inclusão dos moluscos em blocos de parafina utilizando-se o aparelho de autoinclusão Shandon Histocentre 2. Utilizando-se o micrótomo Leica RM 2135 Rotary, foram feitos, em cada bloco, cortes de 5µm de espessura os quais foram aderidos a lâminas histológicas, onde foram realizadas a coloração de hematoxilina e eosina descrita abaixo.

As lâminas foram colocadas em suportes de vidro e passaram por um processo para remoção da parafina seguido de hidratação e que consiste em: três banhos em xilol absoluto, três banhos em álcool absoluto, um banho em álcool 95%, um banho em álcool 70% e um banho em água destilada. Cada banho com duração de três minutos. Após a hidratação do tecido, as lâminas foram embebidas no corante Hematoxilina de Mayer por 20 minutos. Após a imersão no corante, as lâminas foram deixadas sob água corrente por 25 minutos a fim de remover o excesso. Em seguida, elas foram embebidas em álcool 70% por três minutos e depois foram colocadas no corante Eosina durante três minutos. Após a imersão em eosina, as lâminas foram desidratadas em série alcoólica crescente, composta por: uma vez em álcool 70%, uma vez em álcool 95%, álcool 100% (3 vezes durante 3 minutos cada), clarificadas em xilol absoluto (3 vezes durante 3 minutos cada) e montadas em goma de Damar (Tolosa, 2003).

3.8. Transformação *in vitro* de Miracídios em Esporocistos Primários

Após a realização da sedimentação espontânea (Lutz, 1919) para obtenção de miracídios, o material foi acondicionado em Erlenmeyer e foi realizada a contagem dos parasitos em placa de 24 poços através de microscópio estereoscópico. Foram utilizados 100 miracídios para a conversão. Os miracídios foram transferidos para um tubo Falcon de 50ml e incubados no gelo por 30 minutos para decantação dos mesmos. O sobrenadante foi aspirado, deixando-se aproximadamente 1,5ml no tubo.

Antes da incubação dos miracídios em meio de cultura RPMI-1640 (LGC Biotecnologia BR30011-05), o fluxo laminar foi limpo com etanol 70% e esterilizado com luz ultravioleta (UV) por 15 minutos. Um dos dois tubos contendo o meio, outro tubo estéril vazio de 50ml, soro fetal bovino (SFB) e penicilina/estreptomicina, suporte para tubos, pipetas de 1000µl e 200µl com as respectivas ponteiras foram levados para o fluxo laminar e deixados sob UV por 10 minutos, trocando os lados e deixando-os sob UV por mais 10 minutos.

O meio de cultura final foi preparado colocando 14,1ml do meio RPMI no tubo vazio, 750µl de SFB inativado (5%) (WL Imunoquímica) e 150µl de penicilina/estreptomicina (100µg/ml) (Sigma P0781). Após homogeneizar o meio final, este foi colocado em garrafa de cultura estéril de 25mm². A este foi adicionado a solução de 1,5ml contendo os 100 miracídios.

A garrafa foi incubada em estufa BOD com temperatura entre 26-28°C por 24 horas. Em seguida a garrafa de cultura foi deixada à temperatura ambiente por 1 hora. O conteúdo foi transferido para um tubo Falcon de 15ml e centrifugado 2000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado deixando o volume de 1ml aproximadamente. A solução foi ressuspensa no fluxo laminar com meio RPMI-1640 sem SFB e antibióticos e novamente centrifugado à 2000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado deixando o volume de 3ml. A amostra foi homogeneizada e dividida em três poços na placa de cultura de 24 poços, onde em cada poço foi adicionado 5µl de lectinas conjugadas a FITC (*Lens culinaris*, *Arachis hypogea* e *Griffonia simplicifolia* – diluição 1/200) A placa teve ainda um poço adicionado com o

sobrenadante para controle negativo. A placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 30 minutos e observada em microscópio de epiluminescência. O material foi fixado em solução de paraformaldeído a 4% em PBS e estocado a 4°C. Protocolo de acordo com Mattos et al (2011).

3.9. Interação parasito-hospedeiro

Para avaliar a capacidade de encapsulação dos hemócitos, os mesmos foram desafiados pelos parasitos em cultura. Para tal, após a contagem na câmara de Neubauer e centrifugação, o sobrenadante foi aspirado, deixando-se o volume de 30µl de hemolinfa de *B. glabrata* e o volume total da hemolinfa de *B. straminea*. Os hemócitos foram suspensos em CBSS (Chermin, 1963) suplementado com 2% de aminoácidos essenciais, 5% de soro fetal bovino e 2% de antibióticos penicilina/estreptomicina. O volume de CBSS foi proporcional ao volume de hemolinfa, ou seja, 1:1.

Os esporocistos foram centrifugados à 2000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado até o volume de 1ml. A este volume foi adicionado o meio RPMI sem suplementos e foi novamente centrifugado, deixando 1ml.

Os parasitos foram acondicionados em placa de 24 poços com fundo de lamínula e esta foi levada à estufa de CO₂ à 37°C por 30 minutos e logo após os hemócitos foram adicionados e a interação foi fotografada durante 6 horas em Microscópio de Epiluminescência Axio Observer Z.1 com câmera AxioCam MRc5 da Zeiss.

3.10. Marcação com Lectinas Fluoresceinadas

As lâminas foram lavadas em tampão PBS 0,01M pH 7.4 por 10 minutos e em seguida foi feita a revelação antigênica em tampão TUF (Target Unmasking Fluid – Pan Path Z000R0000 – 3x concentrado) aquecido em microondas a 95°C, no qual as lâminas foram mantidas por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada (duas vezes) e em PBS por 15 minutos. O citocentrifugado foi submetido a banho em Triton X-100 Sigma T-

9284 0,05% em PBS por 10 minutos. O citocentrifugado foi incubado com solução de bloqueio de ligações inespecíficas feita a partir de: 8% de soro fetal bovino, 1% de leite em pó desnatado (de cabra ou Molico) e 2,5% de albumina bovina, diluídos em PBS ligeiramente aquecido a 0,01M com pH entre 7.2 e 7.6 por 15 minutos.

As lectinas fluoresceinadas (FITC) 1 – *Griffonia simplicifolia* (syn. *Bandeiraea simplicifolia*) (DC) Baill e 2 – *Lens culinaris* Medik (1:200 respectivamente) e incubados “overnight” a 4°C em câmara úmida.

As lâminas foram lavadas em PBS (três vezes por 3, 5 e 7 minutos cada) e em seguida foi adicionado o marcador de DNA, DAPI (Invitrogen D1306 1306699) na concentração 1:5000 durante 1 minuto e, logo após as lâminas foram lavadas em PBS da mesma forma descrita acima.

Por último, as lâminas foram montadas com Pro Long Gold (Invitrogen P36935), secaram em temperatura ambiente durante 24h e foram armazenadas a -8°C, onde permaneceram até o momento da observação. As lâminas foram observadas e fotografadas em Microscópio de Epiluminescência Axio Observer Z.1 com câmera AxioCam MRc5 da Zeiss.

As lectinas usadas neste trabalho são produtos da Sigma-Aldrich, com as seguintes especificações: *Griffonia simplicifolia* (syn. *Bandeiraea simplicifolia* - FITC conjugado): L9381 e *Lens culinaris* (FITC conjugado): L9262.

IV. RESULTADOS

4.1. Resultado da Exposição dos Moluscos

Ao longo de 2015, foram expostos cerca de 200 exemplares de *B. straminea*, os quais ao final de 30 dias, foram submetidos ao estímulo luminoso para verificação de emissão de cercárias, visando a confirmação da infecção. Entretanto não ocorreu liberação de parasitos, resultado que corrobora o caráter de resistência dessa população em relação ao *S. mansoni*. Dessa forma, as análises complementares propostas neste estudo, englobando os elementos celulares e da cinética dos períodos iniciais da infecção foram abordados a fim de caracterizar o comportamento celular apresentado por este molusco.

B. glabrata utilizada como controle positivo eliminou cercárias a partir de 30 dias.

4.2. Contagem Total de Hemócitos

4.2.1. Contagem de hemócitos de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata* submetidas à exposição em massa

Em termos biológicos, verificou-se um aumento de 510,62% de células na hemolinfa de *B. straminea* e uma diminuição de 57,46% de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata*, 24 horas após a exposição. Após 30 dias de exposição, os hemócitos de *B. straminea* apresentaram um aumento de 317,87% em relação ao controle não exposto. Porém, *B. glabrata*, aos 30dpi apresentou aumento de 187,72% no número de hemócitos da hemolinfa quanto comparado ao controle não exposto (Tabela 1). A mortalidade dos moluscos utilizados neste estudo é mostrada na Tabela 2.

Em termos estatísticos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos analisados.

Tabela 1 - Contagem total dos hemócitos de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata* controles e expostos em massa à miracídios de *Schistosoma mansoni*.

Tabela 1: Contagem de Hemócitos				
Total de Células/Tempo de Exposição				
Espécie	Animais não expostos (Controle)	24 horas	30 dias	
<i>Biomphalaria straminea</i> cepa Sousa (PB)	828	4228	2632	
<i>Biomphalaria glabrata</i> cepa Ressaca (MG)	8226	3500	15442	

* Em termos estatísticos, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos analisados.

4.3. Aspectos citológicos da hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea* não expostas e expostas à *S. mansoni*.

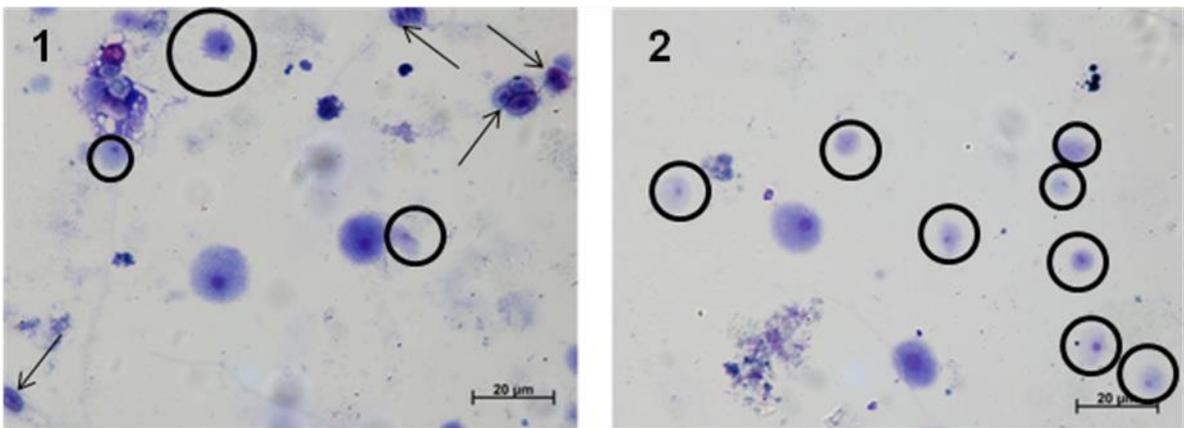
4.3.1. Animais não expostos (Controle)

B. straminea: Foram observados hialinócitos tipo II, com núcleo lobulado e citoplasma basofílico possuindo 6 μ m de diâmetro (setas pretas) (Prancha 1 - Figura 1). As células mais abundantes observadas na hemolinfa foram as células blásticas, apresentando-se como células pequenas de núcleo excêntrico e citoplasma neutro com os diâmetros variando entre 3 e 4 micrômetros (círculos) (Prancha 1 - Figuras 1 e 2). Os hialinócitos tipo III mostraram-se como células grandes, as maiores encontradas, o núcleo excêntrico e citoplasma neutro, com seu diâmetro variando entre 13 e 14 micrômetros (Prancha 1 - Figuras 1 e 2).

B. glabrata: Foram observados hialinócitos tipo I, possuindo núcleo central a ligeiramente excêntrico, com citoplasma neutro, acidofílico ou basofílico, havendo a presença de filópodos. Os diâmetros das células variaram entre 7 μ m e 9 μ m (setas azuis) (Prancha 2 - Figura 1, 3 e 4). Outros hialinócitos tipo I com o citoplasma basofílico ocupando um grande volume da célula também foram observadas (Prancha 2 - Figura 5).

As células mais abundantes da hemolinfa, as células blásticas, apresentaram-se de forma bem polimórfica, com um citoplasma mais eosinofílico e núcleo lobulado, podendo ser esférica ou oval, com 6 μ m de diâmetro para o hemócito esférico e 7 μ m de diâmetro para o hemócito oval (Prancha 2 - Figuras 2, 3, 4 e 5). Os granulócitos possuíam diâmetro de 8 μ m, o núcleo central e citoplasma com grânulos acidófilos e uma das células apresentou degranulação (círculo verde) (Prancha 2 - Figuras 3 e 6).

PRANCHA 1



Prancha 1 - Figuras 1 e 2: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* animal controle corados com Giemsa 20%.

Figura 1: Hialinócitos tipo II (setas), células blásticas (círculos) e hialinócitos tipo III.

Figura 2: Células blásticas (círculos) e hialinócitos tipo III.

Prancha 2

Figura 1: Hialinócito tipo I apresentando filopódios (seta azul);

Figura 2: Vários hialinócitos tipo I apresentando suas diferentes formas;

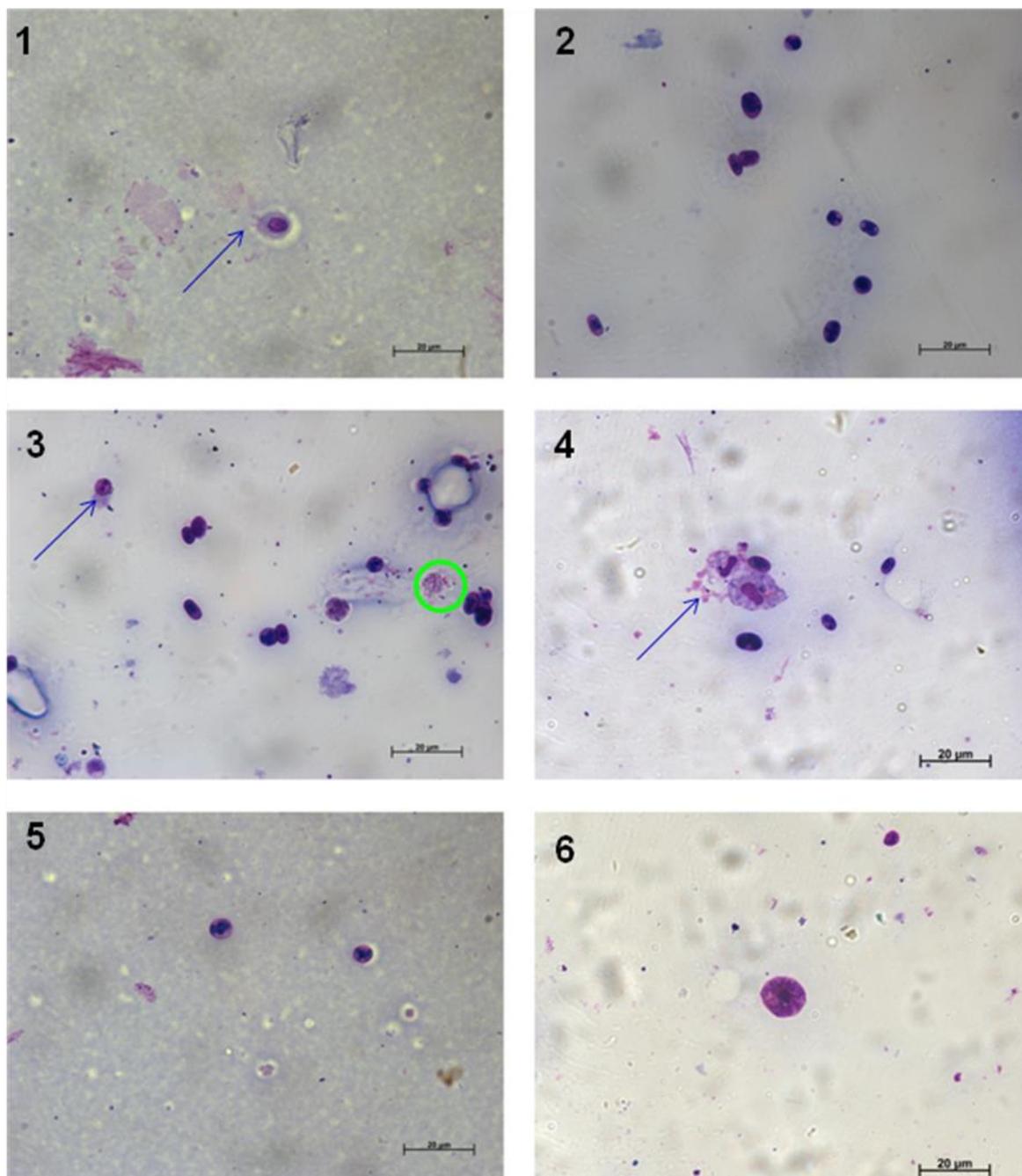
Figura 3: Células blásticas, hialinócito tipo I apresentando filopódios (seta azul), vários outros hialinócitos tipo I, granulócito e granulócito degranulado (círculo verde);

Figura 4: Presença de hialinócitos do tipo I, com um deles emitindo filopódios (seta azul);

Figura 5: Hialinócitos do tipo I;

Figura 6: Granulócito.

PRANCHA 2



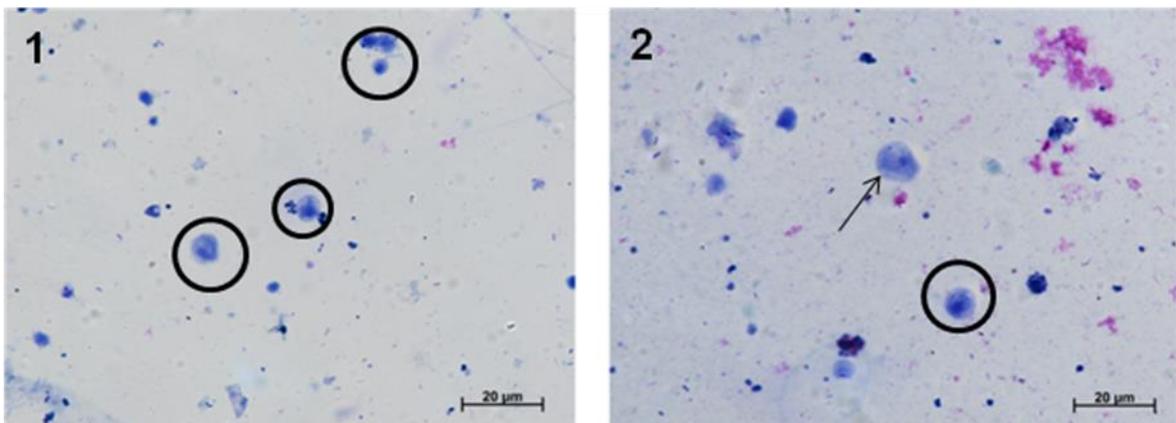
Prancha 2 - Figuras 1 à 6: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* animal controle corados com Giemsa 20%.

4.3.2. 24 horas após exposição

B. straminea: Havia células blásticas medindo entre 3 e 6 micrômetros, com os núcleos excêntricos e citoplasma basofílicos (círculos) (Prancha 3 - Figuras 1 e 2). Também foram encontrados hialinócitos tipo III medindo entre 10 e 12µm de diâmetro, com os núcleos excêntricos e citoplasma basofílico (seta) (Prancha 3 - Figura 2). Estes foram os únicos tipos de hemócitos encontrados na lâmina.

B. glabrata: Foram encontrados granulócitos, apresentando núcleo ligeiramente excêntrico, com citoplasma acidofílico exibindo grânulos basofílicos e acidofílicos, com diâmetro variando entre 10 e 14µm (Prancha 4 - Figura 1). Alguns chegaram a apresentar nucléolos, com o diâmetro atingindo até 20µm (seta) (Prancha 4 - Figura 2). Também houve a presença de hialinócitos tipo II, possuindo, aproximadamente, 13µm de diâmetro e cujo núcleo ocupava grande parte da célula e o citoplasma acidofílico estava restrito a uma pequena porção (círculo) (Prancha 4 - Figura 2).

PRANCHA 3

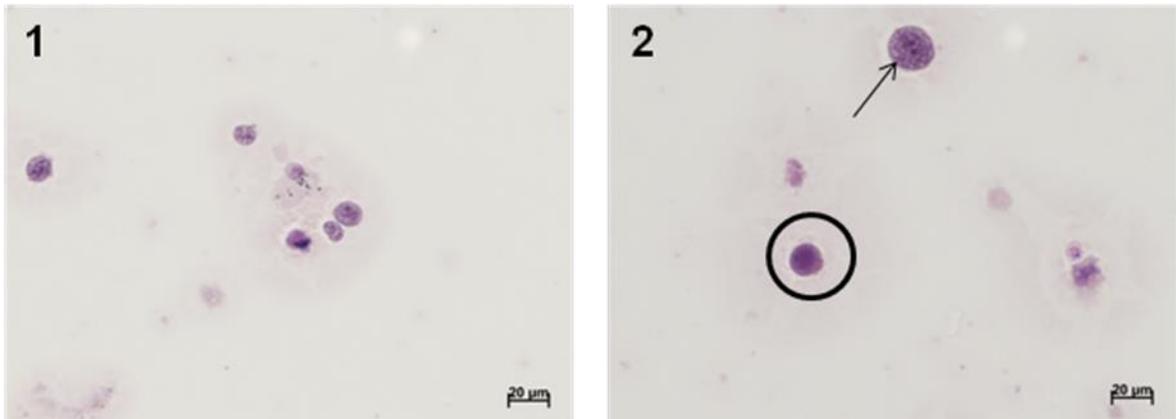


Prancha 3 - Figuras 1 e 2: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* após 24 horas de exposição em massa corados com Giemsa 20%.

Figura 1: Presença de células blásticas (círculos);

Figura 2: Hialinócitos tipo I (círculo) e hialinócito tipo III (seta).

PRANCHA 4



Prancha 4 - Figuras 1 e 2: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após 24 horas de exposição em massa corados com Giemsa 20%.

Figura 1: Presença de granulócitos;

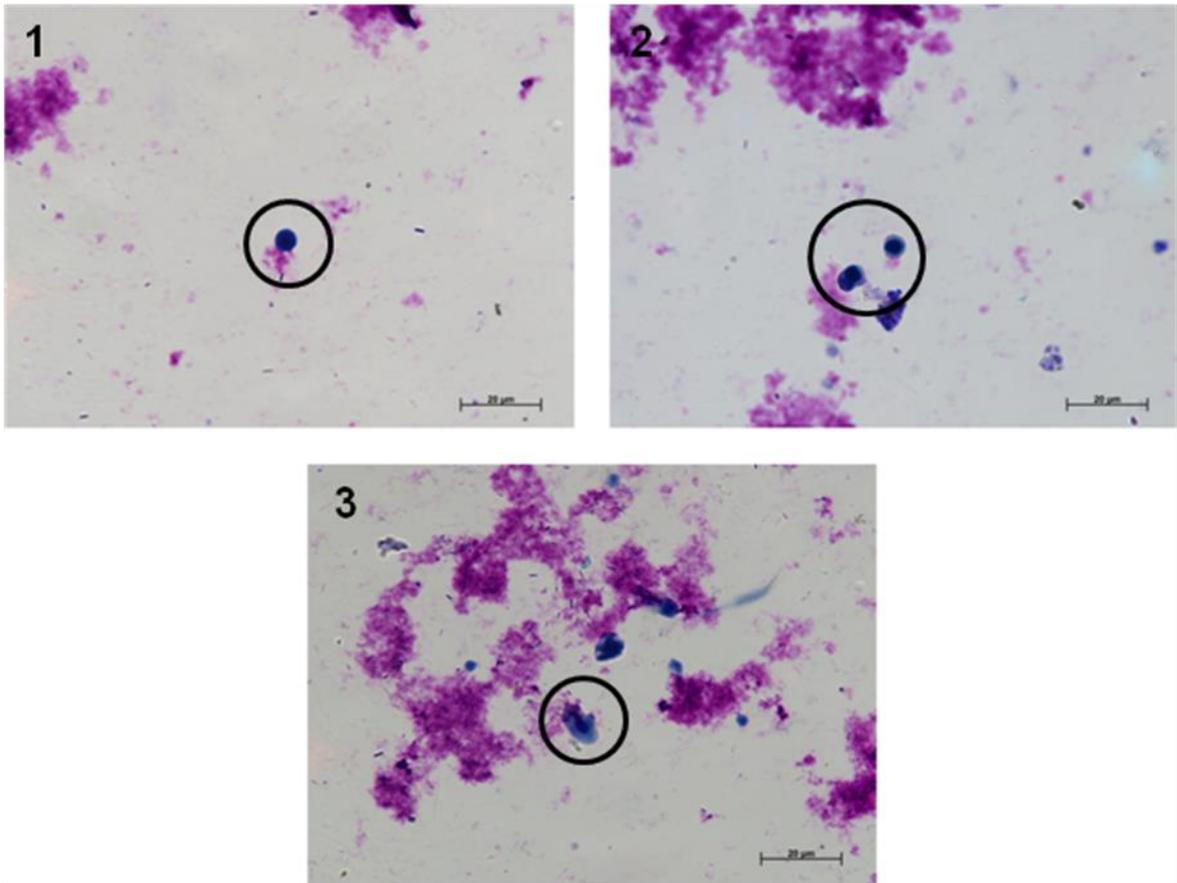
Figura 2: Hialinócitos tipo II (círculo) e granulócito apresentando nucléolo (seta).

4.3.3. 30 dias após exposição

B. straminea: As células mais abundantes da hemolinfa foram as células blásticas com seus núcleos bem condensados ocupando mais da metade da célula e citoplasma basofílico possuindo diâmetro de 5,45 μ m (círculo preto) (Prancha 5 - Figura 1). Foram observados hialinócitos tipo I, de núcleo condensado com uma fina faixa equivalente ao citoplasma, apresentando grânulos em seu interior e com o diâmetro de 9,11 μ m (círculo) (Prancha 5 - Figura 2). Outras células observadas foram os hialinócitos tipo II que mostraram-se ovais, com núcleo condensado e citoplasma basofílico, medindo 9 μ m de diâmetro e 3 μ m de diâmetro de núcleo (círculo) (Prancha 5 - Figura 3).

B. glabrata: O tipo celular mais abundante encontrado foram as células blásticas com seus núcleos bem condensados ocupando mais da metade do corpo da célula e citoplasma basofílico com diâmetro de 4 μ m. Houve a presença tanto células isoladas quanto grumos (círculos) (Prancha 6 - Figuras 1, 2 e 4). Os granulócitos possuíam diâmetro de 7 μ m, o núcleo lobulado e citoplasma acidófilo (círculo) (Prancha 6 - Figura 3).

PRANCHA 5



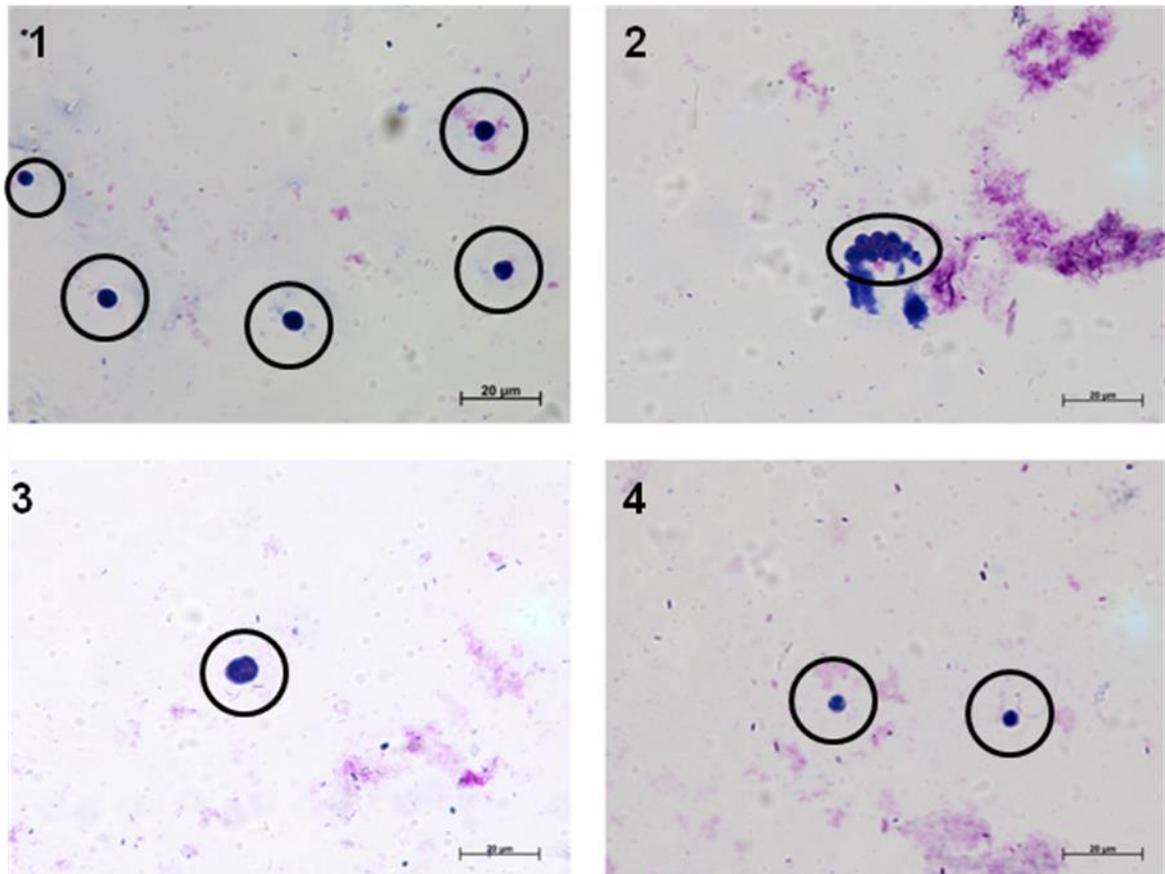
Prancha 5 - Figuras 1 à 3: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* aos 30 dias de exposição corados com Giemsa 20%.

Figura 1: Célula blástica (círculo preto);

Figura 2: Presença de hialinócitos tipo I (círculo preto);

Figura 3: Hialinócito tipo II (círculo preto).

PRANCHA 6



Prancha 6 - Figuras 1 à 4: Microscopia de campo claro de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* aos 30 dias de exposição corados com Giemsa 20%.

Figura 1: Células blásticas encontradas isoladas (círculos);

Figura 2: Células blásticas encontradas em grupos (círculos);

Figura 3: Hialinócito tipo II;

Figura 4: Células blásticas.

4.4. Resultados dos aspectos imunocitológicos da exposição em massa de *B. glabrata* e *B. straminea* por *S. mansoni*.

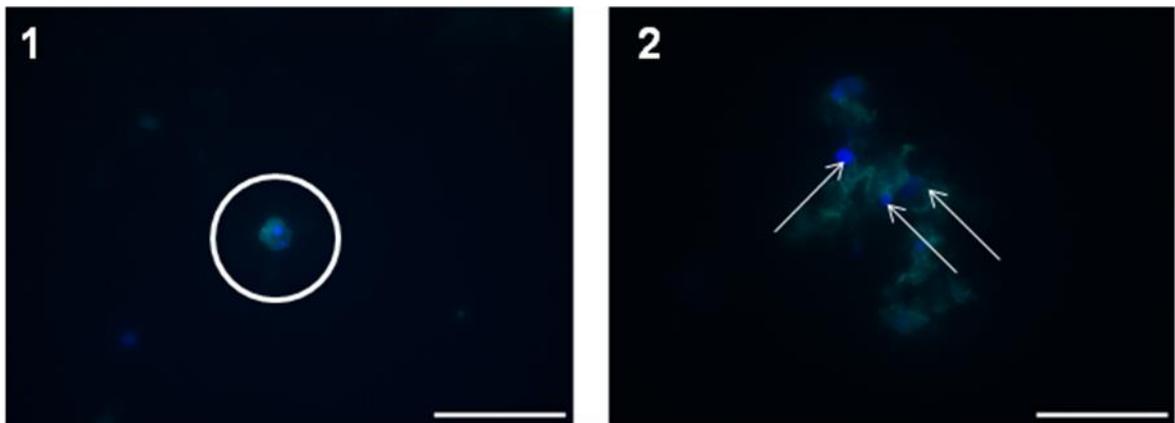
4.4.1. *Lens culinaris*

4.4.1.1. Animais não expostos (Controle)

B. straminea: Houveram células blásticas positivas bem marcadas para esta lectina, exibindo esta marcação em sua superfície (círculo) (Prancha 7 - Figura 1). Algumas células negativas estavam envoltas por um grumo positivo à lectina (setas) (Prancha 7 - Figura 2).

B. glabrata: Havia muitas células em toda a lâmina, em sua maioria células blásticas que se encontravam positivas para *L. culinaris* assim como hialinócitos tipo I. A marcação apresentou-se mais intensa na superfície das células blásticas e nos filópodes dos hialinócitos (círculos) (Prancha 8 - Figuras 1, 2 e 4). Também havia algumas células negativas (setas) (Prancha 8 - Figuras 1, 2 e 3).

PRANCHA 7

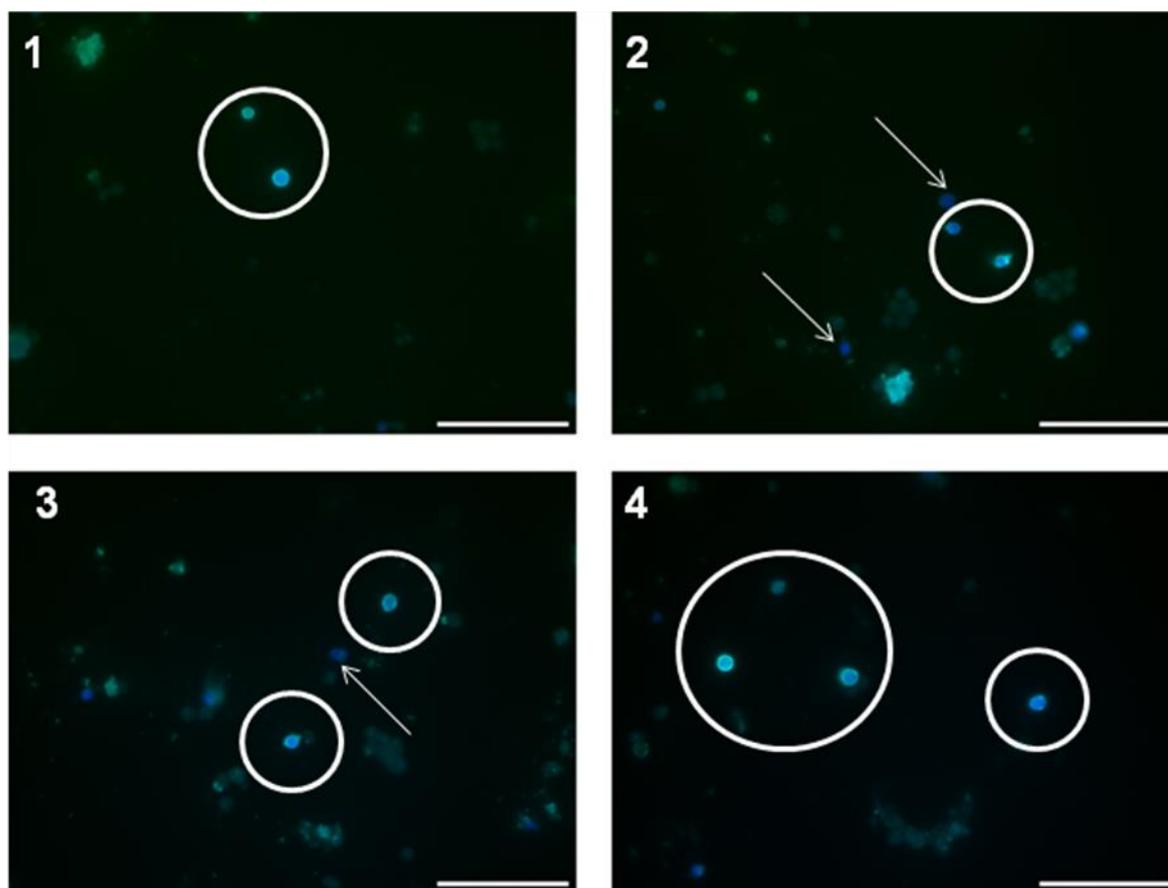


Prancha 7 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea*, animal controle, marcados pela lectina de *Lens culinaris* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figura 1: Células blásticas positivas, apresentando moderada marcação na superfície da célula (círculo);

Figura 2: Hemócitos negativos (setas) em grumos.

PRANCHA 8



Prancha 8 - Figuras 1, 2, 3 e 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata*, animal controle, marcados pela lectina de *Lens culinaris* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figura 1: Os hemócitos estavam positivos para *Lens culinaris*, apresentando a marcação na membrana da célula;

Figura 2: Hemócitos positivos (círculo) e negativos (seta) no mesmo campo;

Figura 3: Hemócitos positivos (círculo) e negativos (seta) no mesmo campo;

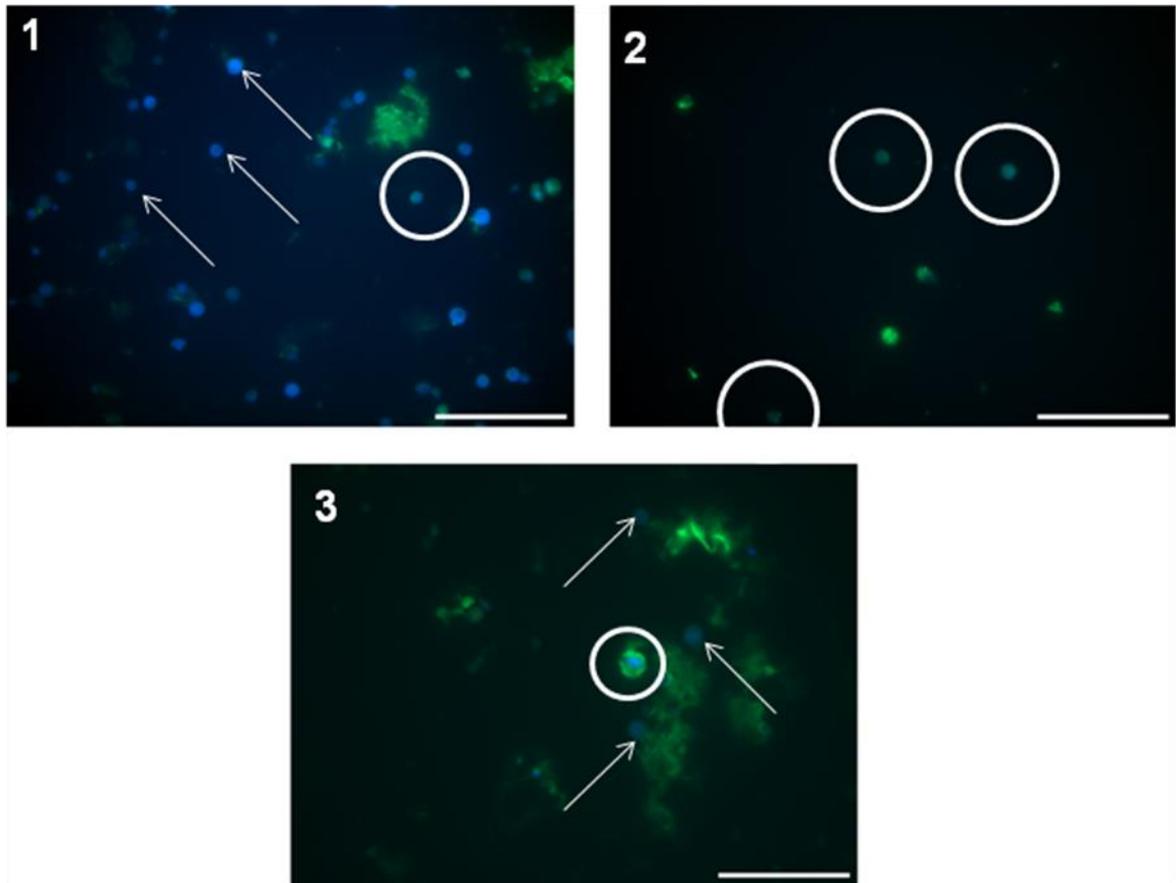
Figura 4: Hemócitos exibindo marcação para *Lens culinaris* (círculo).

4.4.1.2. 24 horas após a exposição

B. straminea: A maioria das células blásticas estava negativa para *L. culinaris* (setas) (Prancha 9 - Figuras 1 e 3). As poucas células positivas para a lectina apresentaram menor intensidade de marcação do que os hemócitos de *B. glabrata* (círculos) (Prancha 9 - Figura 2).

B. glabrata: A maioria das células encontradas eram células blásticas, assim como nos tempos anteriores, e estas encontravam-se isoladas ou em grumos, porém negativas para *L. culinaris* (setas) (círculos vermelhos) (Prancha 10 - Figuras 1, 2, 3 e 4). Os hemócitos que estavam positivos, hialinócitos tipo I, apresentaram marcação mais intensa em sua superfície e nos prolongamentos celulares (círculos) (Prancha 10 - Figuras 1 e 2).

PRANCHA 9



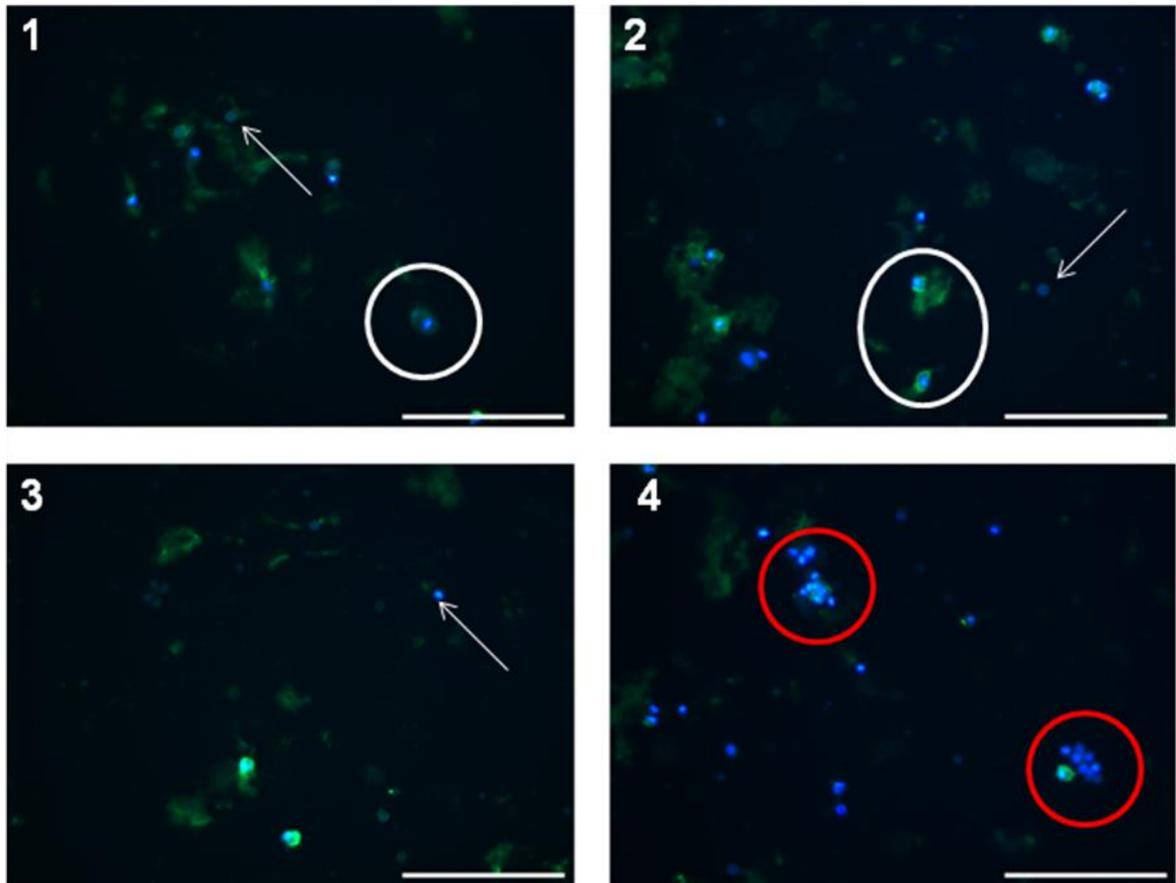
Prancha 9 - Figuras 1, 2 e 3: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* após 24 horas de exposição maciça marcados pela lectina de *Lens culinaris* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figura 1: A maioria dos hemócitos estava negativo para *Lens culinaris* mostrando apenas a marcação do DAPI (seta);

Figura 2: Células blásticas positivas (círculo) e negativas (seta) no mesmo campo;

Figura 3: Hemócito exibindo marcação para *Lens culinaris* (círculo) e DAPI (seta).

PRANCHA 10



Prancha 10 - Figuras 1 à 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após 24 horas de exposição maciça marcados pela lectina de *Lens culinaris* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

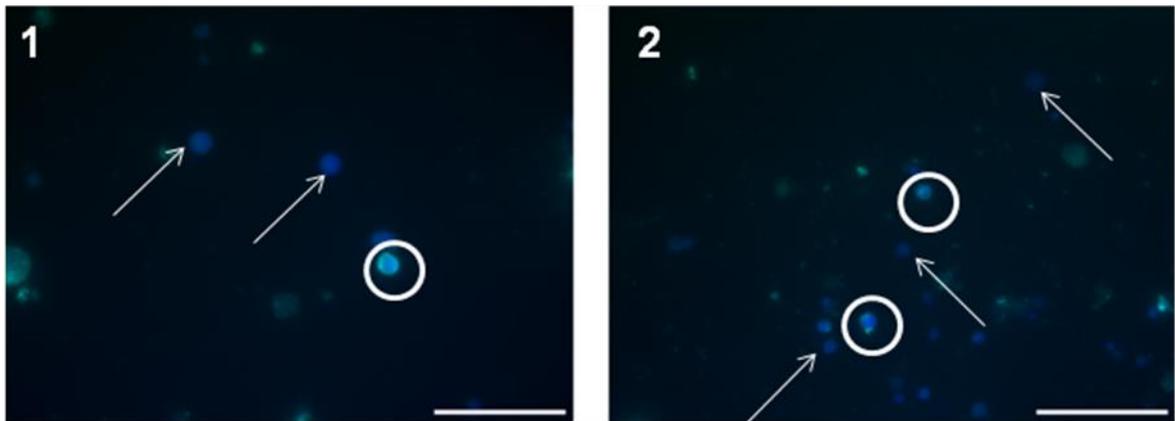
Figuras 1 à 4: Células blásticas positivas (círculos) e negativas (setas) à lectina. Na figura 4 foram observados grumos formados por algumas células negativas (círculos vermelhos).

4.4.1.3. 48 horas após a exposição

B. straminea: Assim como nos tempos anteriores, a maior parte das células encontradas, tanto positivas quanto negativas, consistiam em células blásticas. Havia hemócitos positivos (círculo) (Prancha 11 - Figuras 1 e 2), dos quais alguns exibiram marcações mais intensas do que outros (círculo) (Prancha 11 - Figura 1), entretanto a maioria estava negativa à lectina (setas) (Prancha 11 - Figuras 2).

B. glabrata: As células blásticas encontradas neste tempo de exposição tiveram suas superfícies intensamente marcadas para a lectina de *Lens culinaris*, entretanto não houve diferença na quantidade de células positivas quando comparado com 24 horas (círculos) (Prancha 12 - Figuras 1 e 2). Neste tempo, assim como os anteriores, houveram células negativas (seta) (Prancha 12 - Figura 2).

PRANCHA 11

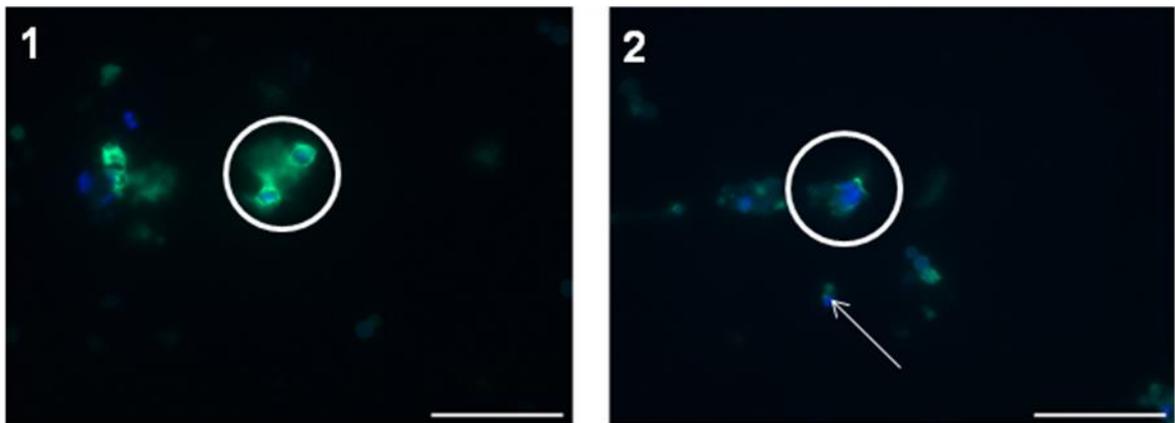


Prancha 11 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* após 48 horas de exposição maciça marcados pela lectina de *Lens culinaris* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figura 1: Célula blástica positiva (círculos) e negativas (setas);

Figura 2: Células blásticas positivas (círculos) e negativas (setas);

PRANCHA 12



Prancha 12 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após 48 horas de exposição maciça marcados pela lectina de *Lens culinaris* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 50 μ m.

Figura 1: Hialinócitos tipo I e seus filopódios intensamente positivos (círculos);

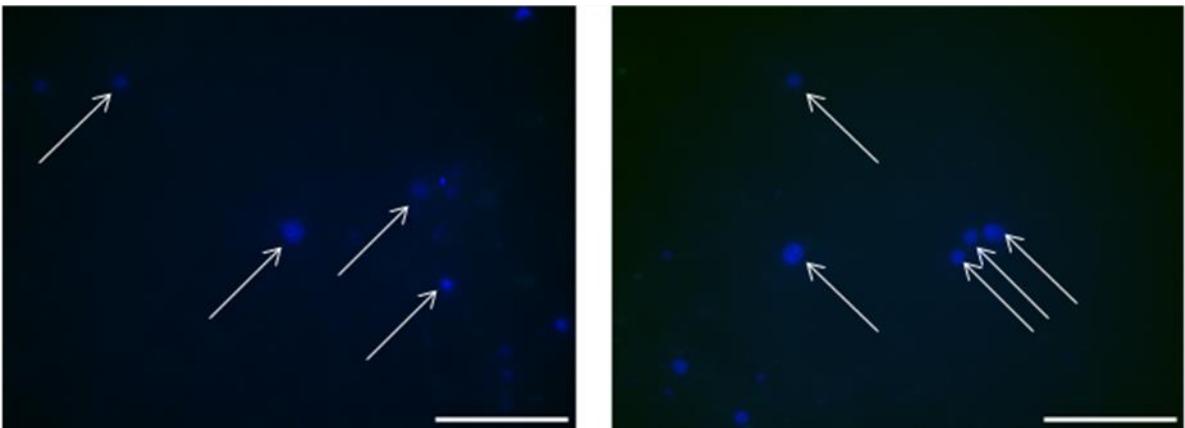
Figura 2: Célula blástica negativa (seta) à lectina.

4.4.1.4. 72 horas após a exposição

B. straminea: Havia somente células blásticas negativas em toda lâmina, sem exibir a marcação pela lectina (setas) (Prancha 13 - Figuras 1 e 2). A quantidade de células existente na lâmina foi a mesma dos tempos anteriores.

B. glabrata: Foram encontrados hialinócitos tipo I com suas superfícies e seus filopódios bem marcados para a lectina de *Lens culinaris* (círculos) (Prancha 14 - Figuras 1 e 2) e poucas células negativas (seta) (Prancha 14 - Figura 1). Não houve diferença na quantidade de células positivas quando comparado com os tempos anteriores.

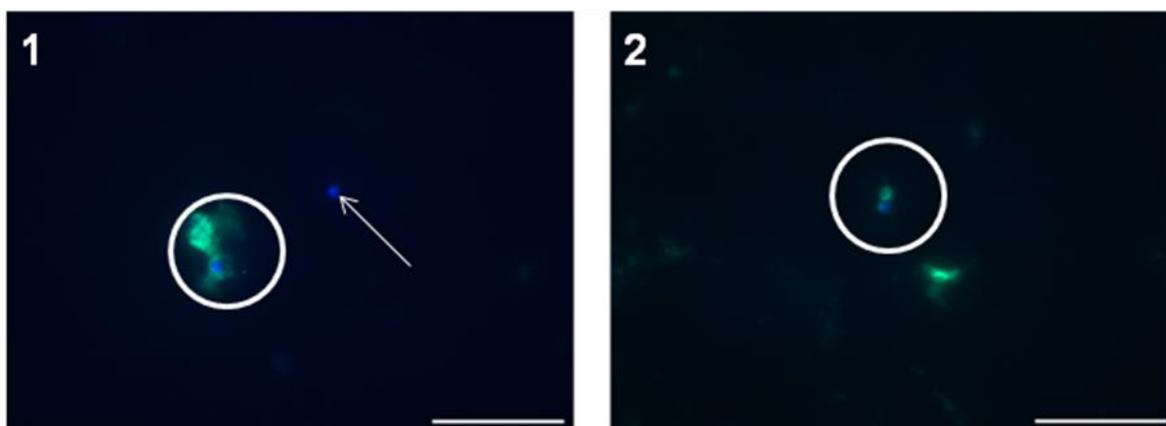
PRANCHA 13



Prancha 13 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* após 72 horas de exposição maciça marcados pela lectina de *Lens culinaris* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figuras 1 e 2: Hemócitos negativos (setas) à lectina;

PRANCHA 14



Prancha 14 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após 72 horas de exposição maciça marcados pela lectina de *Lens culinaris* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 50µm.

Figura 1: Hialinócitos tipo I e seus filopódios positivos à lectina (círculos);

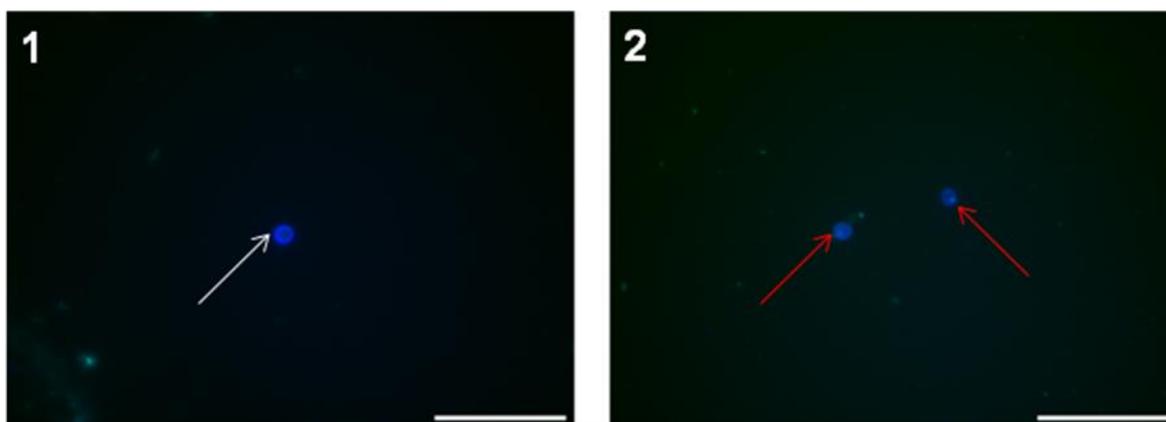
Figura 2: Células blásticas negativas à lectina (seta).

4.4.1.5. 30 dias após a exposição

B. straminea: Houveram células blásticas negativas (seta) (Prancha 15 - Figura 1) enquanto outros exibiam a marcação da lectina no seu interior (setas vermelhas) (Prancha 15 - Figura 2).

B. glabrata: Haviam várias células blásticas com suas superfícies bem marcadas para a lectina de *Lens culinaris* (círculo) assim como várias outras encontraram-se negativas (setas) (Prancha 16 - Figuras 1 e 2).

PRANCHA 15

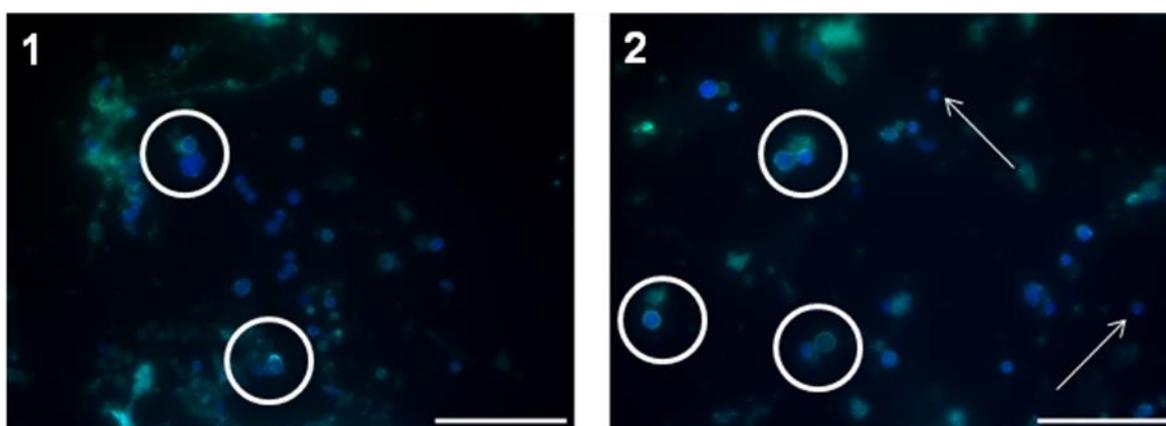


Prancha 15 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* após 30 dias de exposição maciça marcados pela lectina de *Lens culinaris*. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figura 1: Célula blástica negativa à lectina (seta).

Figura 2: Células blásticas com o interior marcado pela lectina (setas vermelhas).

PRANCHA 16



Prancha 16 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após 30 dias de exposição maciça marcados pela lectina de *Lens culinaris*. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figuras 1 e 2: Células blásticas positivas (círculo) e negativas (setas) à lectina.

4.5. Resultados dos aspectos imunocitológicos da exposição individual à *S. mansoni* em *B. glabrata* e *B. straminea*.

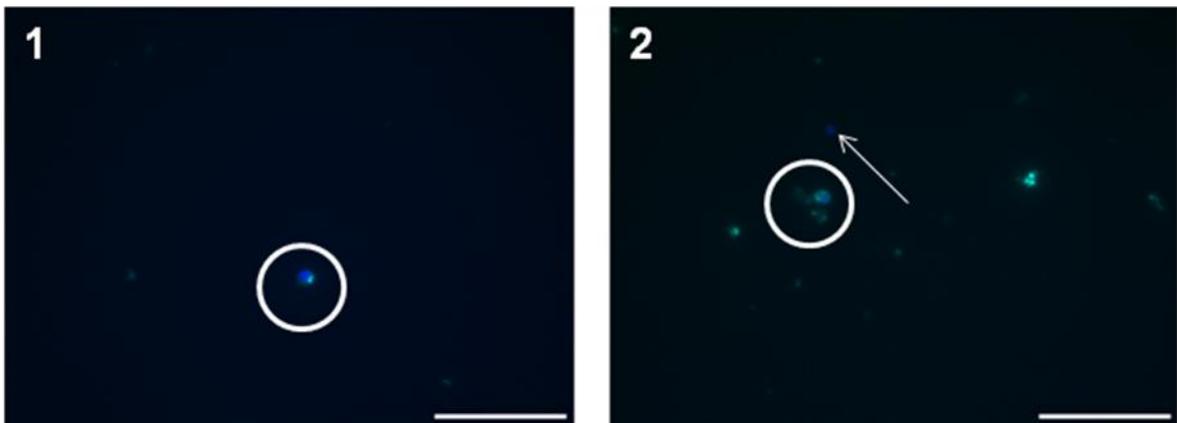
4.5.1. *Lens culinaris*

4.5.1.1. 0 minutos após a exposição

B. straminea: As células blásticas deste tempo de exposição exibiram moderada marcação à lectina (círculos) (Prancha 17 - Figuras 1 e 2) assim como houve a presença de algumas células negativa (seta) (Prancha 17 - Figura 2).

B. glabrata: Foram encontradas células blásticas positivas à lectina, exibindo intensa marcação em sua superfície (Prancha 18 - Figuras 1 e 2). Foram encontradas poucas células negativas para este tempo.

PRANCHA 17

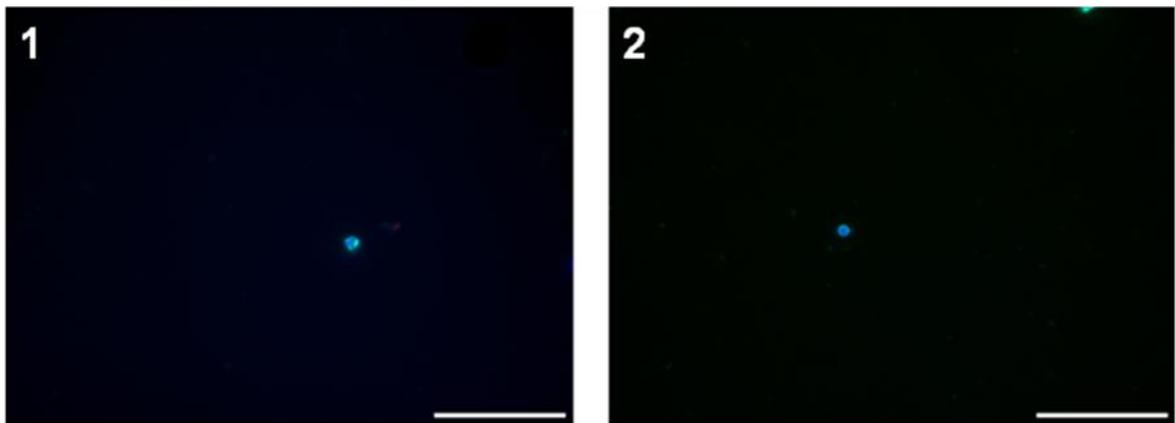


Prancha 17 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* após 0 minutos de exposição à 5 miracídeos (penetração inicial do miracídio) marcados pela lectina de *Lens culinaris*. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figura 1: Célula blástica positiva à lectina;

Figura 2: Células blásticas positiva (círculo) e negativa à lectina.

PRANCHA 18



Prancha 18 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após 0 minutos de exposição à 5 miracídios (penetração inicial do miracídio) marcados pela lectina de *Lens culinaris*. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

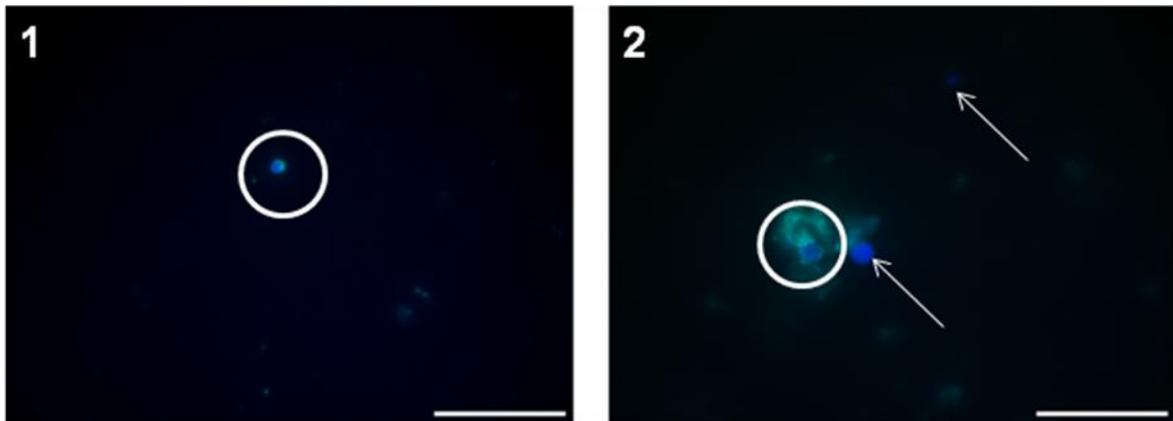
Figuras 1 e 2: Células blásticas positivas à lectina.

4.5.1.2. 15 minutos após a exposição

B. straminea: Foram encontradas células blásticas e hialinócitos tipo I positivos à lectina (círculos) (Prancha 19 - Figuras 1 e 2), com um deles exibindo seus filopódios intensamente marcados (círculos) (Prancha 17 - Figura 2). Também houveram hemócitos negativos na lâmina (seta) (Prancha 19 - Figura 2).

B. glabrata: A maioria dos hemócitos, as células blásticas, estava positiva à lectina com variações na intensidade da mesma (círculos) (Prancha 20 - Figuras 1 à 4). Alguns deles eram maiores do que a maioria das células encontradas na lâmina, sendo hialinócitos tipo III (Prancha 20 - Figuras 3 e 4).

PRANCHA 19

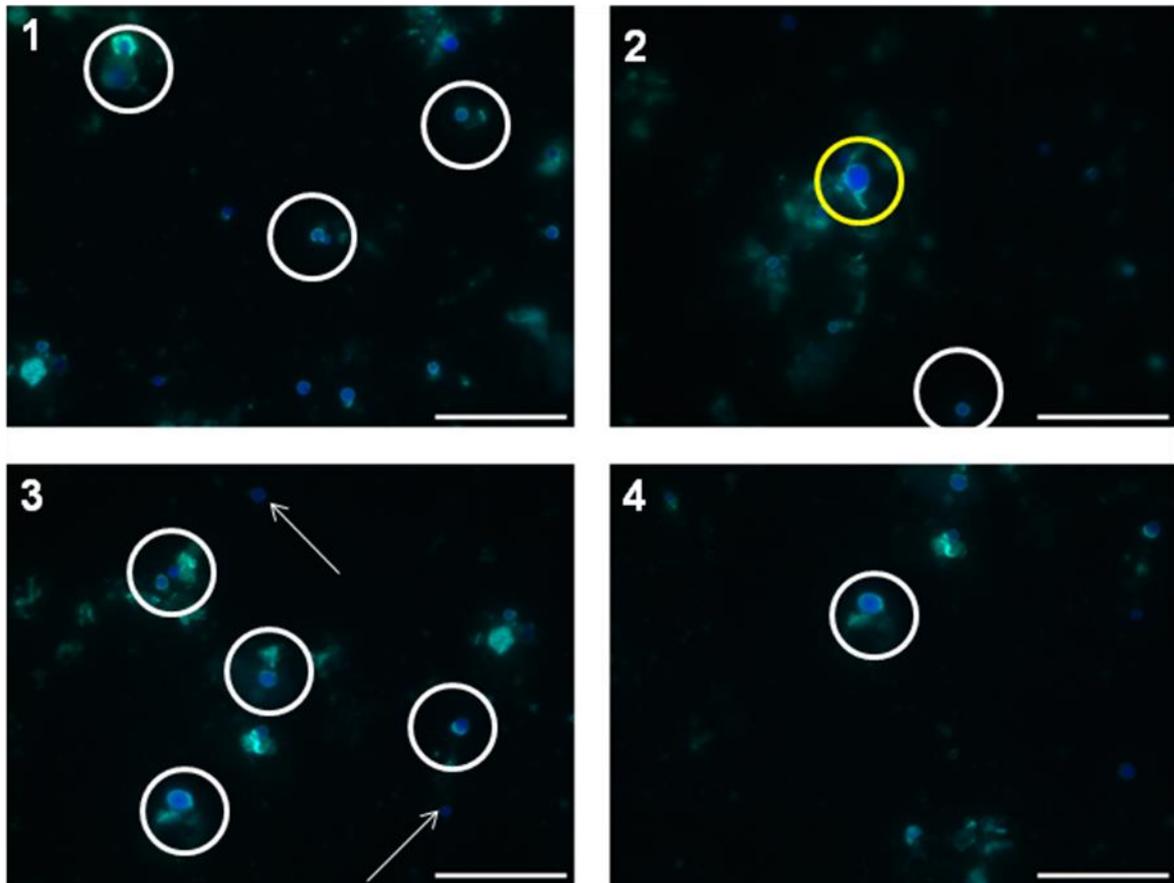


Prancha 19 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* após 15 minutos de exposição à 5 miracídeos marcados pela lectina de *Lens culinaris*. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figura 1: Célula blástica apresentando intensa marcação pela lectina (círculo);

Figura 2: Hialinócito tipo III e seus filopódios mostrando intensa marcação pela lectina (círculo) e células blásticas negativas (setas).

PRANCHA 20



Prancha 20 - Figuras 1, 2, 3, e 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após 15 minutos de exposição à 5 miracídios marcados pela lectina de *Lens culinaris*. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figura 1: Os hemócitos estavam positivos (círculos) para *Lens culinaris*, apresentando um halo verde na membrana da célula.

Figura 2: Hemócito grande e seus prolongamentos (círculo), assim como outro hemócitos menor, positivo à lectina.

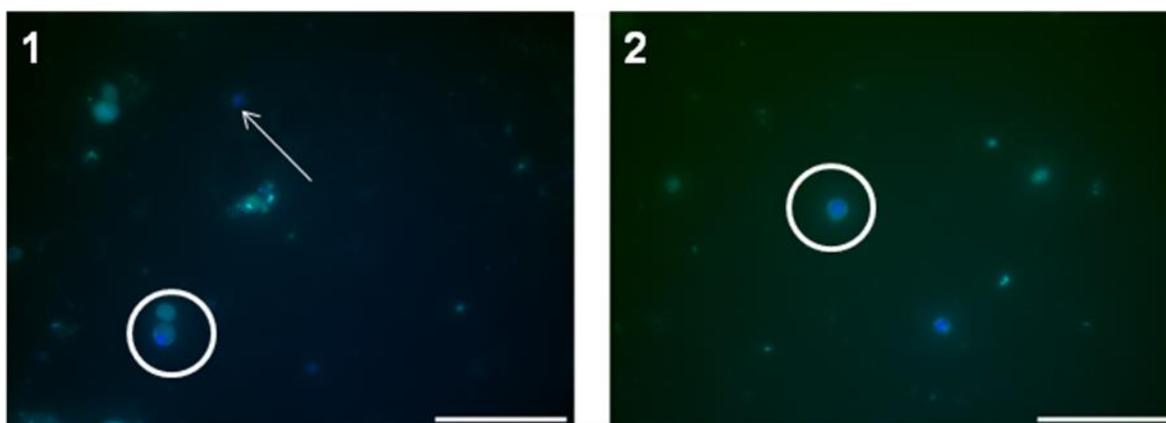
Figura 3: Hemócitos positivos (círculos) e negativos (setas) no mesmo campo. Um granulócito (círculo amarelo);

Figura 4: Detalhe do hemócito na figura 22 (círculo).

4.5.1.3. 30 minutos após a exposição

B. straminea: As células blásticas encontradas estavam positivas à lectina exibindo uma tênue marcação em suas superfícies (círculos) (Prancha 21 - Figuras 1 e 2). Também foram encontrados granulócitos com grânulos positivos em seu interior e algumas células negativas (seta) (Prancha 21 - Figura 2).

PRANCHA 21



Prancha 21 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* após 30 minutos de exposição à 5 miracídeos marcados pela lectina de *Lens culinaris*. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figura 1: Células blásticas positivas à lectina (círculo) e outra negativa (seta);

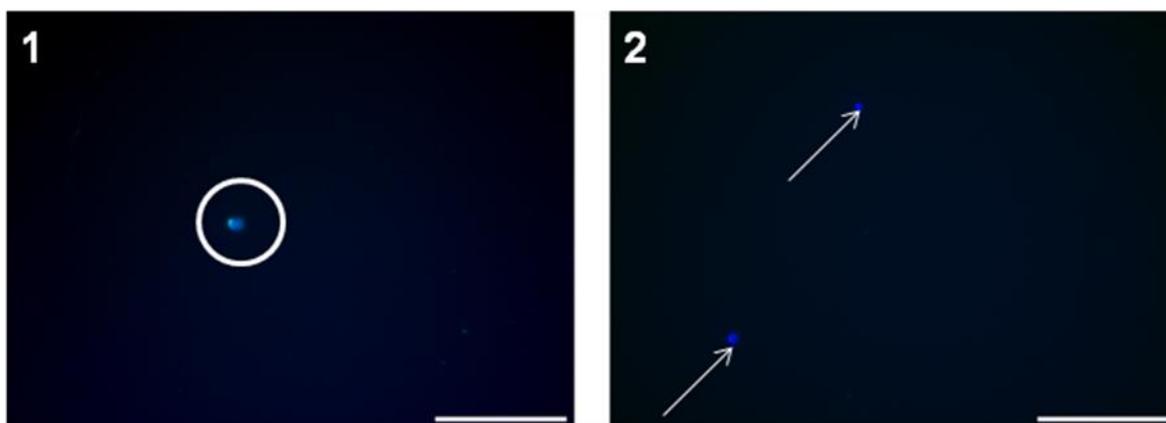
Figura 2: Presença de granulócito positivo (círculo).

4.5.1.4. 45 minutos após a exposição

B. straminea: As células blásticas encontradas estavam positivas mostrando a marcação pela lectina em suas superfícies (círculo) assim como foram encontradas células negativas (setas) (Prancha 22 - Figuras 1 e 2).

B. glabrata: Havia hemócitos, células blásticas, que estavam positivos à lectina com a marcação da lectina em suas superfícies (círculo) (Prancha 23 - Figura 1) e hemócitos negativos (setas) (Prancha 23 - Figura 2).

PRANCHA 22

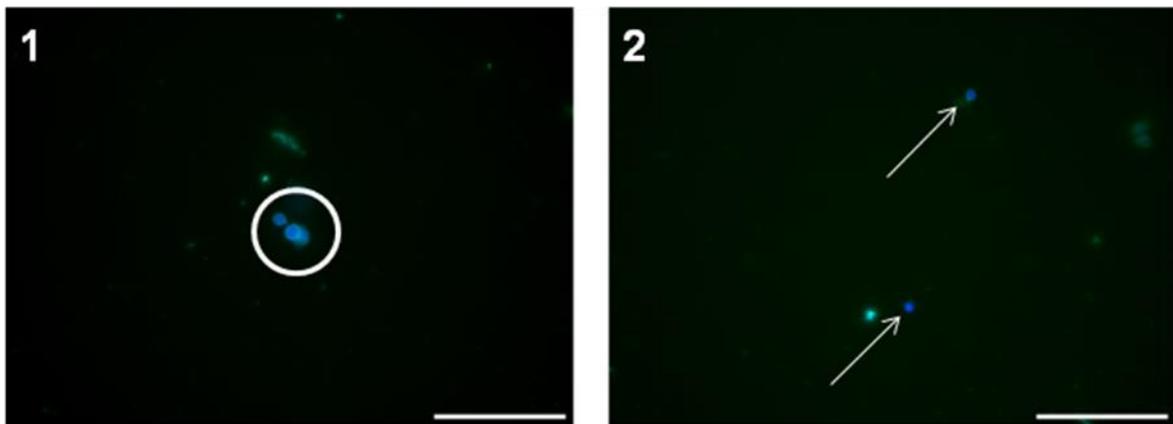


Prancha 22 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* após 45 minutos de exposição à 5 miracídeos marcados pela lectina de *Lens culinaris*. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figura 1: Célula blástica exibindo a marcação em sua superfície (círculo);

Figura 2: Células blásticas negativas à lectina (setas).

PRANCHA 23



Prancha 23 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* após 45 minutos de exposição à 5 miracídeos marcados pela lectina de *Lens culinaris*. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figura 1: Células blásticas positivas à lectina, mostrando a superfície marcada (círculos);

Figura 2: Células blásticas negativas à lectina (setas).

4.6. Aspectos imunocitológicos da exposição em massa de *B. glabrata* e *B. straminea* à miracídios de *S. mansoni*.

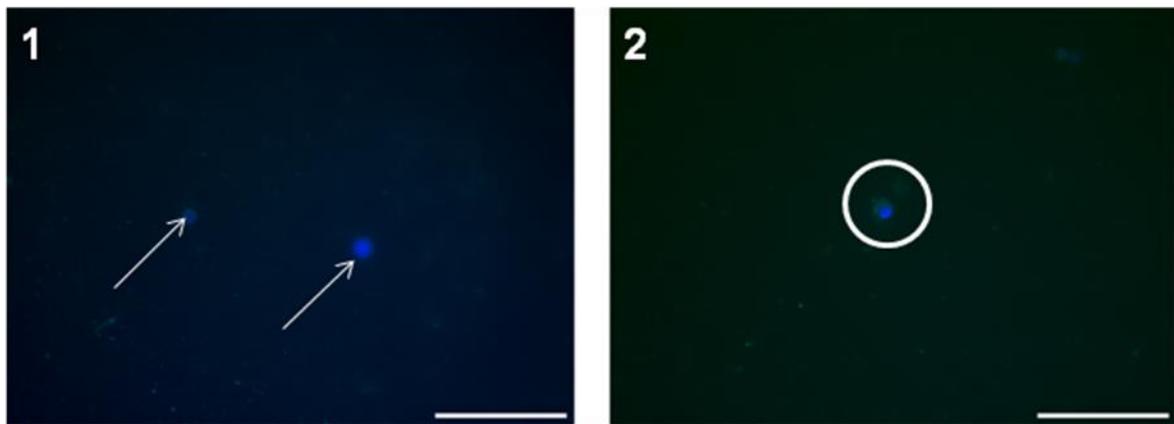
4.6.1. *Griffonia simplicifolia*

4.6.1.1. 0 minutos após a exposição

B. straminea: As células blásticas encontravam-se, em sua maioria, negativas à lectina (setas) (Prancha 24 - Figura 1), porém haviam algumas positivas mostrando a marcação em sua superfície (círculo) (Prancha 24 - Figura 2).

B. glabrata: Houveram diversos hemócitos positivos e bem marcados (círculos) e negativos (setas) à lectina (Prancha 25 - Figuras 1 e 2), todos sendo células blásticas.

PRANCHA 24

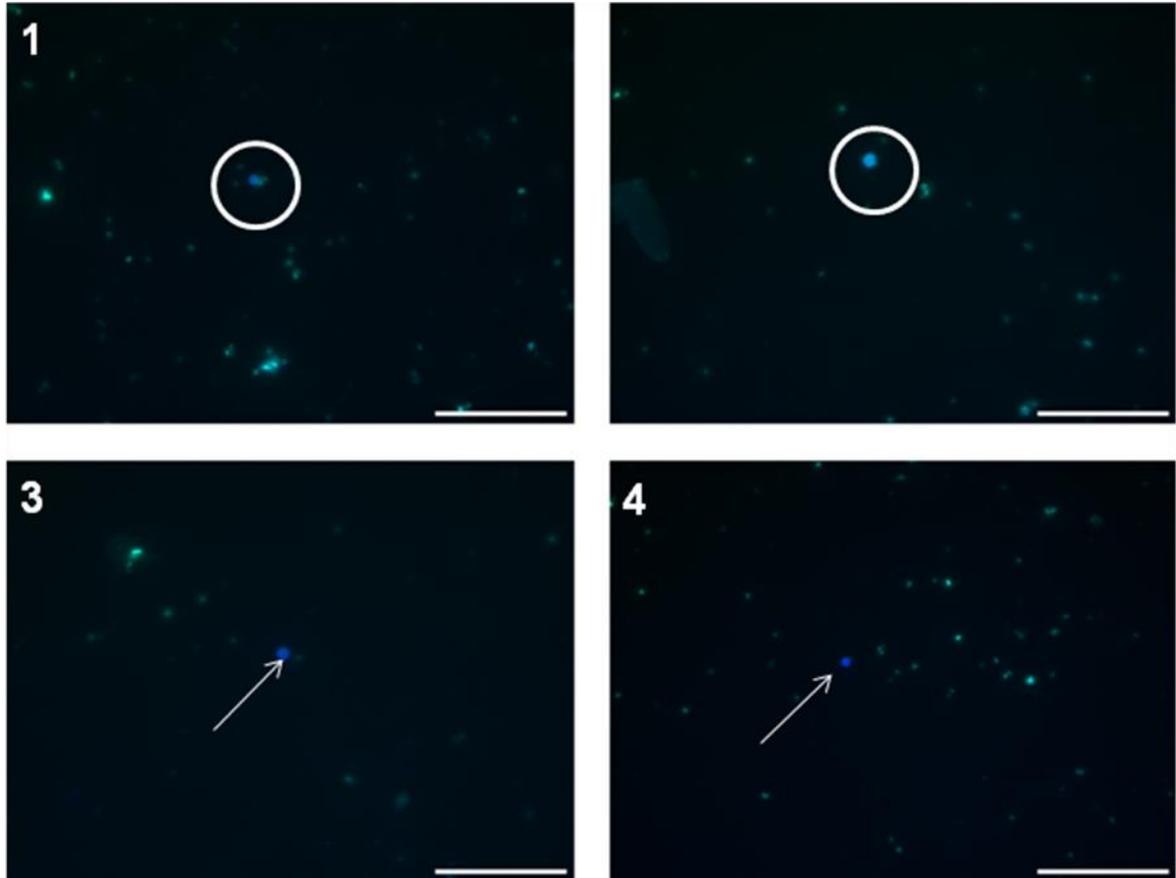


Prancha 24 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* aos 0 minutos (penetração inicial dos miracídeos) após exposição marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figura 1: Células blásticas negativas à lectina;

Figura 2: Célula blástica apresentando marcação desidiosa à lectina.

PRANCHA 25



Prancha 25 - Figuras 1, 2, 3 e 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* aos 0 minutos (penetração inicial do miracídio) após exposição marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

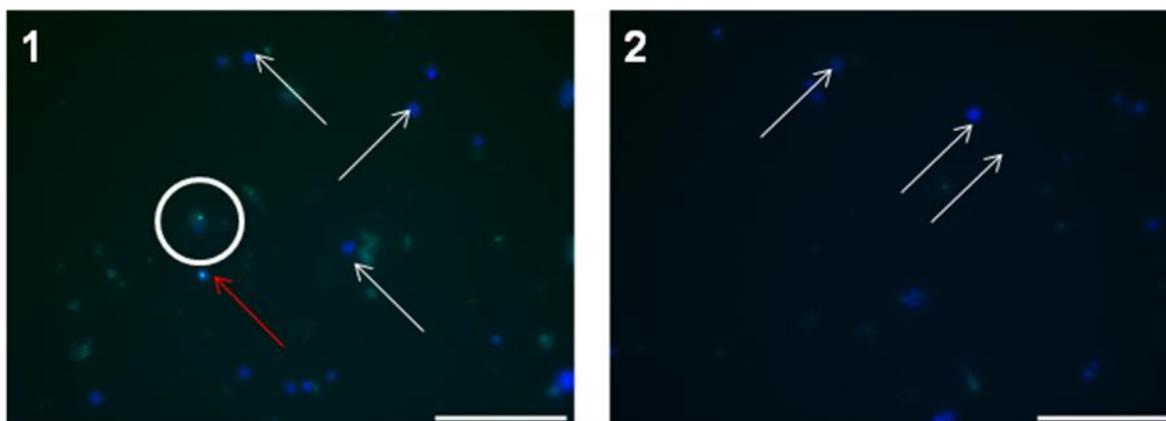
Figuras 1 e 2: As células blásticas estavam positivas para lectina, exibindo a marcação sobre a superfície da célula (círculos).

Figuras 3 e 4: Células blásticas negativas à lectina (setas).

4.6.1.2. 24 horas após exposição

B. straminea: Houveram células blásticas cuja marcação encontrava-se no interior ao invés da superfície celular (setas vermelhas) (Prancha 26 - Figura 1). Outras células estavam positivas exibindo a superfície marcada (círculo) e várias negativas (setas) (Prancha 26 - Figuras 1 e 2).

PRANCHA 26



Prancha 26 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biophalaria straminea* 24 horas após exposição marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

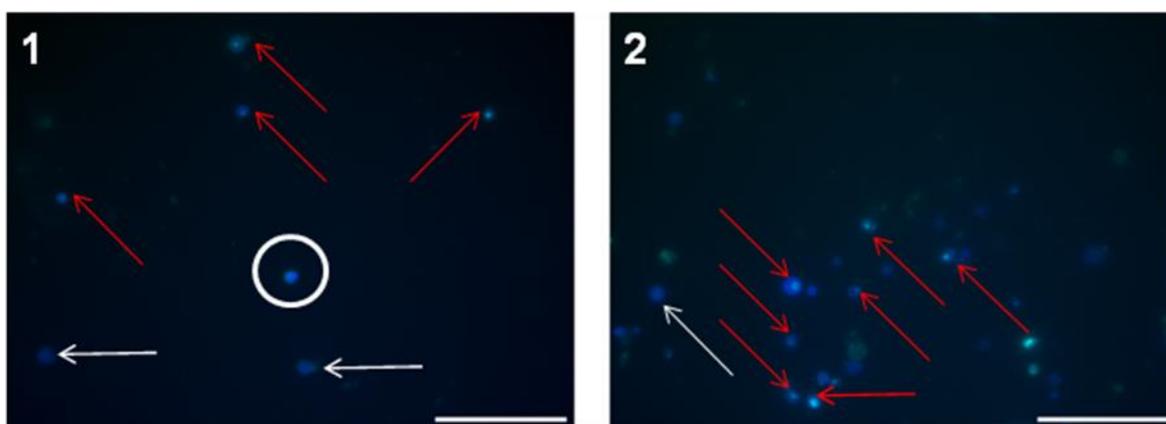
Figura 1: Célula blástica positiva (círculo) para a lectina, exibindo a marcação na superfície da célula e outra apresentando a marcação em seu interior (seta vermelha), assim como a presença de células negativas (setas) ocorrendo no mesmo campo;

Figura 2: Presença de células blásticas negativas (setas) à lectina.

4.6.1.3. 48 horas após exposição

B. straminea: As células blásticas encontradas tinham seu interior marcado pela lectina assim como no tempo anterior, porém estas ocorreram em maior quantidade (setas vermelhas) (Prancha 27 - Figuras 1 e 2). Também houveram várias células negativas (setas) e algumas positivas (círculo) (Prancha 27 - Figura 1).

PRANCHA 27



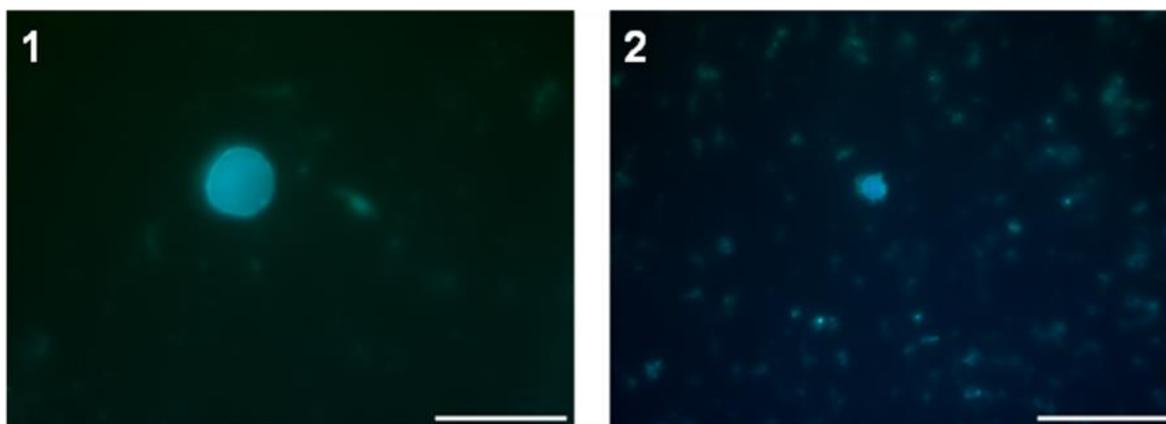
Prancha 27 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* 48 horas após exposição marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figuras 1 e 2: Célula blástica positiva para a lectina (círculo), exibindo a marcação sobre a superfície da célula e outras apresentando a marcação em seu interior (setas vermelhas), assim como células negativas (setas) ocorrendo no mesmo campo;

4.6.1.4. 72 horas após exposição

B. straminea: Foi encontrado uma hialinócito tipo III, o único em toda lâmina, completamente marcado pela lectina em sua superfície (Prancha 28 - Figura 1) e granulócitos exibindo os grânulos verdes em seu citoplasma e sua superfície completamente marcados pela lectina (Prancha 28 - Figura 2).

PRANCHA 28



Prancha 28 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* 72 horas após exposição marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figura 1: Hialinócito tipo III positivo para a lectina;

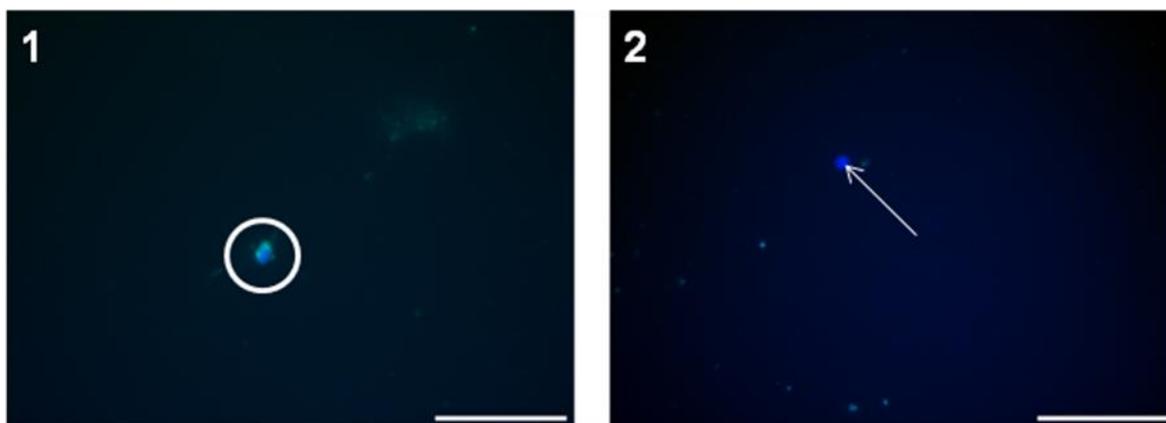
Figura 2: Granulócito positivo exibindo a marcação sobre sua superfície;

4.6.1.5. 30 dias após a exposição

B. straminea: Haviam células blásticas moderadamente positivas à lectina (círculo) (Prancha 29 - Figura 1) e outras negativas (seta) (Prancha 27 - Figura 2).

B. glabrata: Células blásticas com marcações moderadas para a lectina (círculo) (Prancha 30 - Figuras 1 e 2) assim como células negativas ocorrendo no mesmo campo (setas) (Prancha 30 - Figuras 3 e 4).

PRANCHA 29

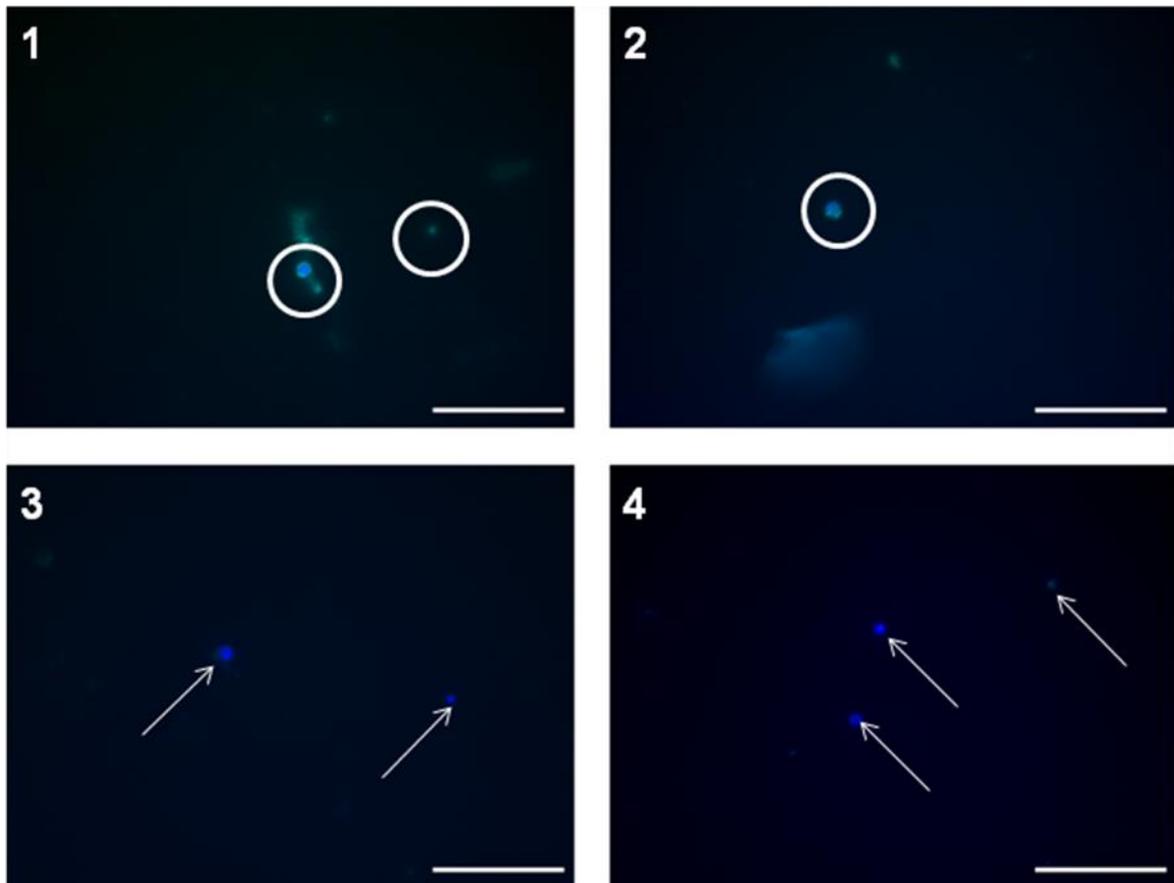


Prancha 29 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* 30 dias após exposição marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figura 1: Célula blástica positiva para a lectina exibindo a marcação verde sobre sua superfície célula (círculo);

Figura 2: Célula blástica negativa para a lectina (seta);

PRANCHA 30



Prancha 30 - Figuras 1 à 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* 30 dias após exposição marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figuras 1 e 2: Células blásticas positivas para a lectina, exibindo a marcação sobre a superfície celular;

Figuras 3 e 4: Células blásticas negativas (setas).

4.7. Aspectos Imunocitológicos da exposição individual à *S. mansoni* em *B. glabrata* e *B. straminea*.

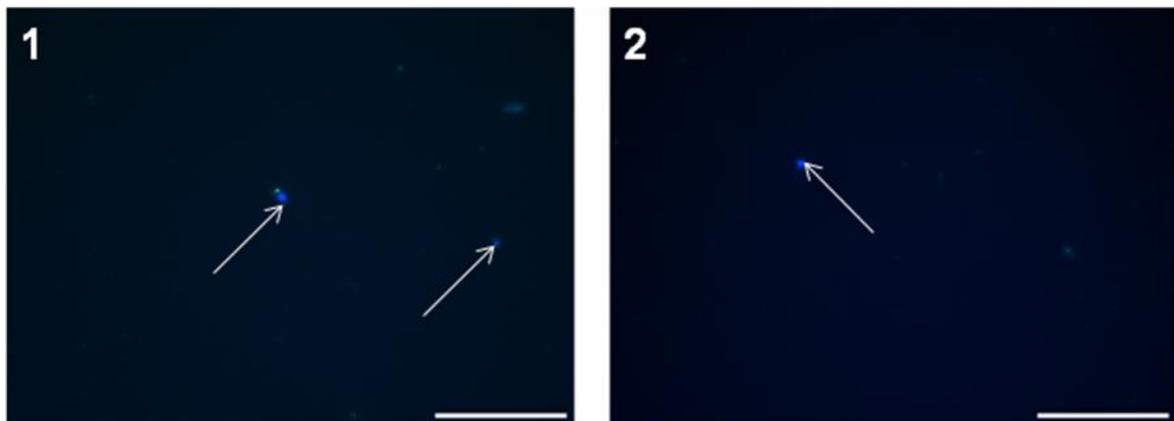
4.7.1. *Griffonia simplicifolia*

4.7.1.1. 0 minutos após a exposição

B. straminea: Foram encontradas células blásticas negativas à lectina sem exibir a marcação em sua superfície (setas) (Prancha 31 - Figuras 1 e 2).

B. glabrata: Houve a presença de células blásticas com marcações desidiosas (círculo) (Prancha 32 - Figuras 1) e intensas para a lectina (círculo) (Prancha 32 - Figuras 2). Também houveram células negativas (setas) (Prancha 32 - Figuras 3 e 4).

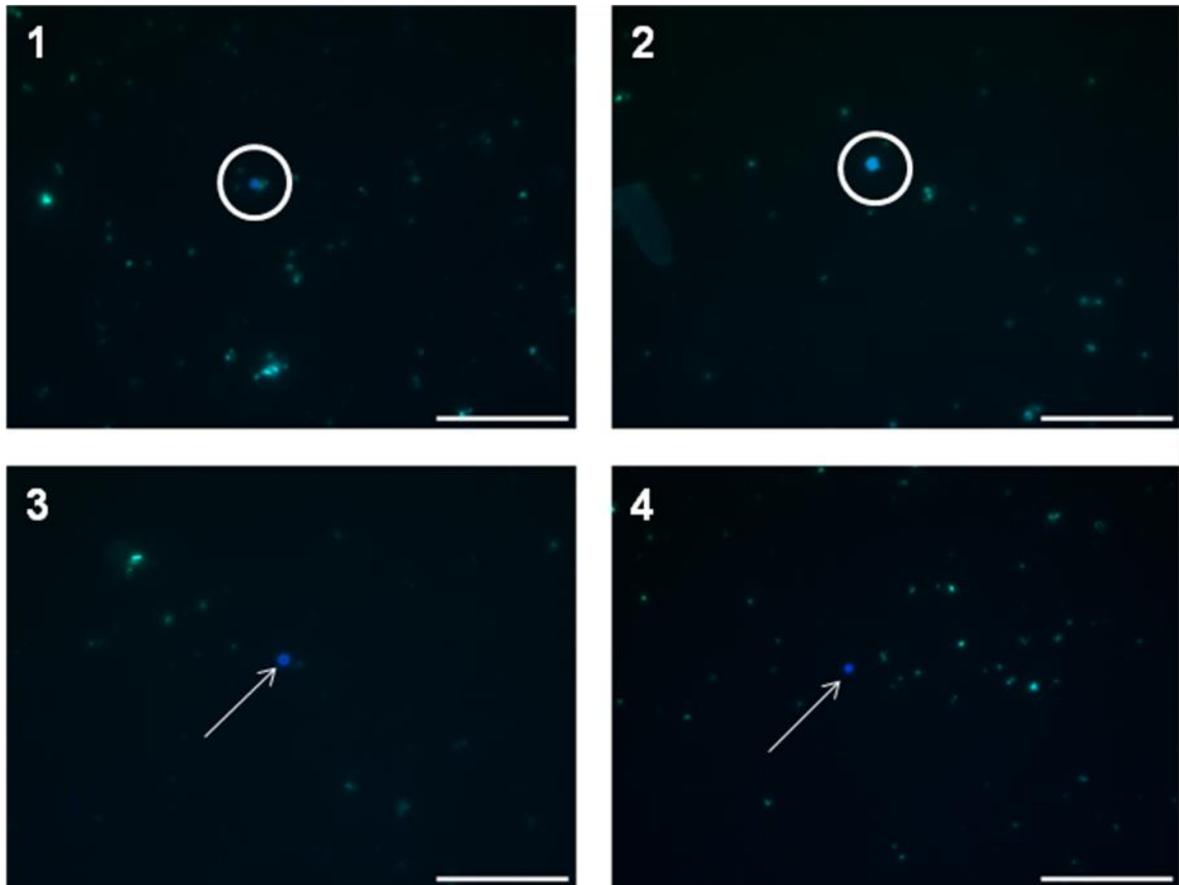
PRANCHA 31



Prancha 31 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* 0 minutos após exposição à cinco miracídeos marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

Figuras 1 e 2: Células blásticas negativas para a lectina.

PRANCHA 32



Prancha 32 - Figuras 1, 2, 3 e 4: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* 0 minutos após exposição à cinco miracídeos marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

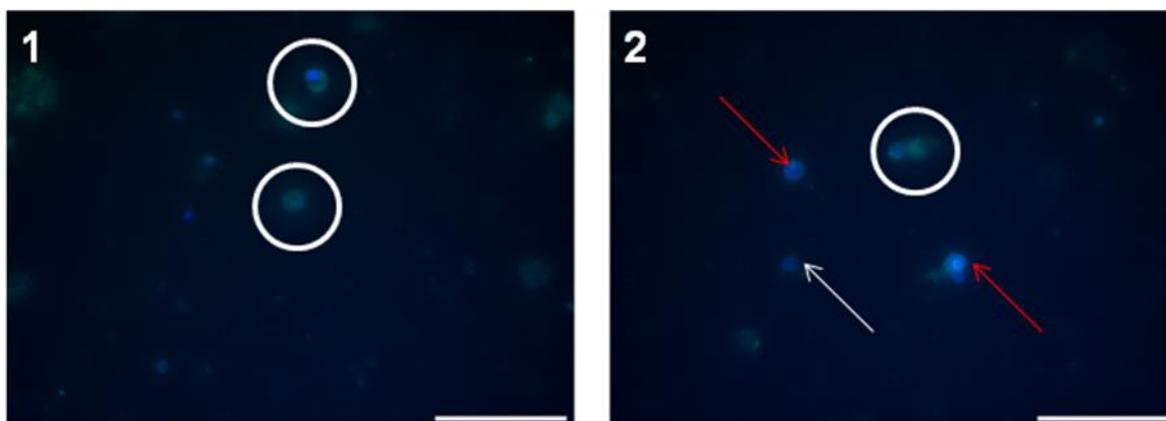
Figuras 1 e 2: Células blásticas positivas para a lectina (círculos);

Figuras 3 e 4: Células blásticas negativas para a lectina (setas).

4.7.1.2. 15 minutos após a exposição

B. straminea: Houveram células blásticas positivas desidiosas (círculos) e negativas (setas) à lectina (Prancha 33 - Figuras 1 e 2) assim como outros hemócitos, também células blásticas, exibindo a marcação em seu interior (setas vermelhas) (Prancha 33 - Figura 2).

PRANCHA 33



Prancha 33 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* 15 minutos após exposição à cinco miracídios marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

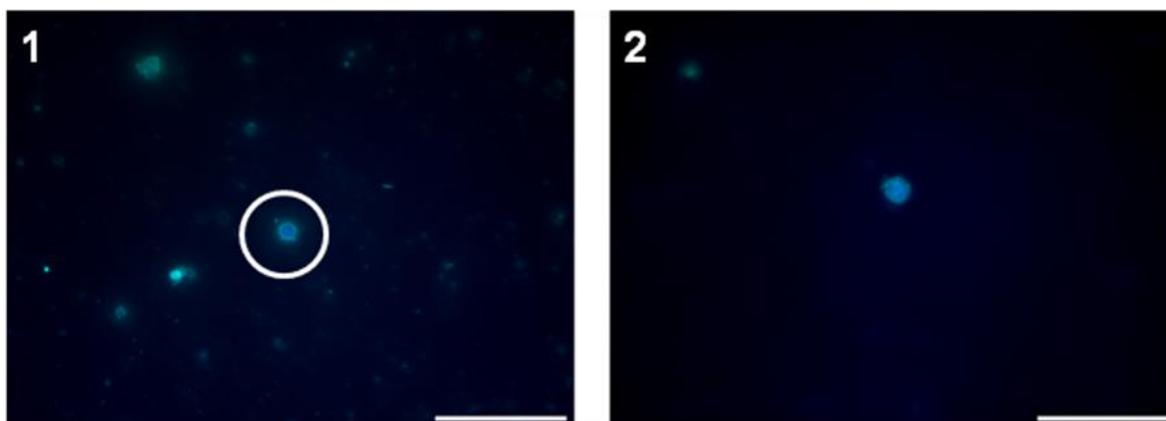
Figura 1: Células blásticas positivas para a lectina (círculos);

Figura 2: Células blásticas exibindo a marcação da lectina em seu interior (setas vermelhas), célula blástica positiva (círculo) e outra negativa (seta).

4.7.1.3. 30 minutos após a exposição

B. straminea: Células blásticas positivas foram observadas (círculo) (Prancha 34 - Figura 1), assim como granulócitos exibindo grânulos positivos em seu citoplasma (Prancha 34 - Figuras 2).

PRANCHA 34



Prancha 34 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* 30 minutos após exposição à cinco miracídios marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100µm.

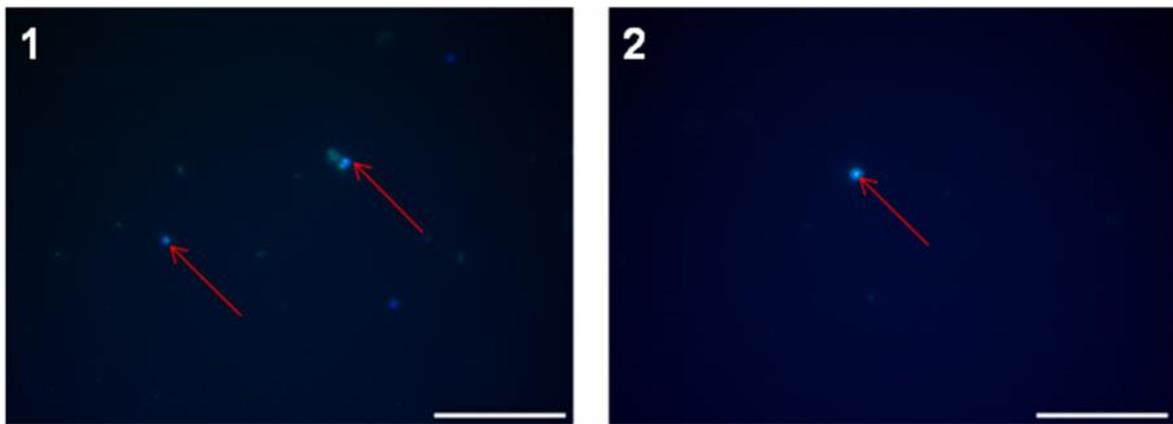
Figura 1: Célula blástica com a superfície bem marcada para a lectina (círculo);

Figura 2: Granulócito positivo para a lectina.

4.7.1.4. 45 minutos após a exposição

B. straminea: As células blásticas deste tempo exibiram a marcação pela lectina em seu interior (setas vermelhas) (Prancha 35 - Figuras 1 e 2).

PRANCHA 35



Prancha 35 - Figuras 1 e 2: Imunofluorescência de citocentrifugados de hemócitos de *Biomphalaria straminea* 45 minutos após exposição à cinco mirácidos marcados pela lectina de *Griffonia simplicifolia* conjugada à FITC. Os núcleos celulares estão marcados em DAPI. Escalas em 100 μ m.

Figuras 1 e 2: Células blásticas exibindo marcação positiva em seu interior (setas vermelhas).

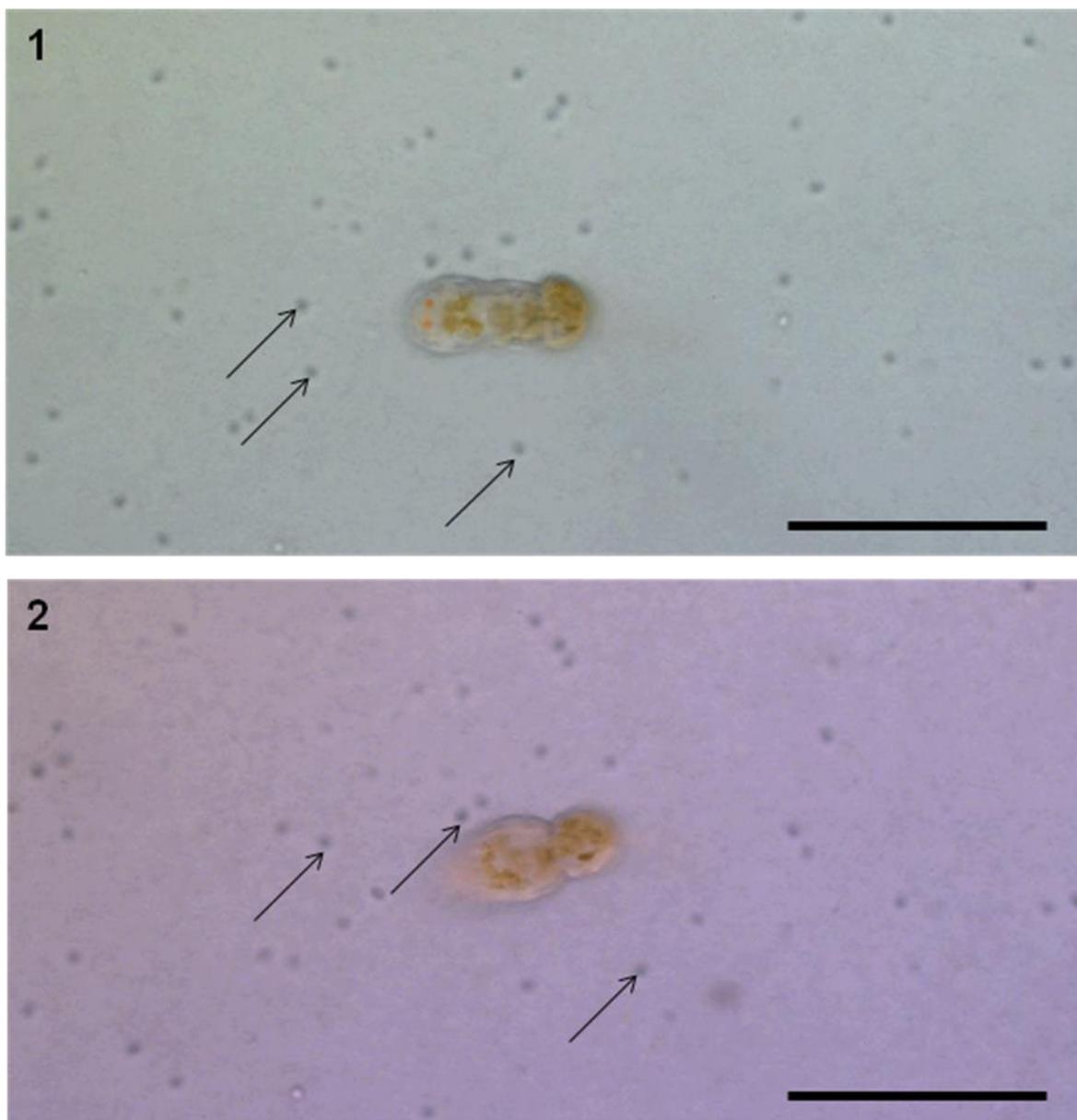
4.8. Aspectos da interação parasito-hospedeiro entre os hemócitos de *B. straminea* e *B. glabrata* à esporocistos primários de *S. mansoni*.

4.8.1. Animais não expostos (Controle)

B. straminea: Não houve células suficiente, impossibilitando a filmagem.

B. glabrata: Os hemócitos não aderiram ao parasito (pontas das setas), permanecendo ao lado e entorno do mesmo durante todo o tempo de observação do vídeo de 14 segundos (Prancha 36 - Figuras 1 e 2). Fotos tiradas aos 2 e 10 segundos de vídeo respectivamente.

PRANCHA 36



Prancha 36 - Figuras 1 e 2: Relação parasito-hospedeiro entre hemócitos de *Biomphalaria glabrata* animal controle e esporocistos primários de *Schistosoma mansoni*. Escalas em 20 μ m.

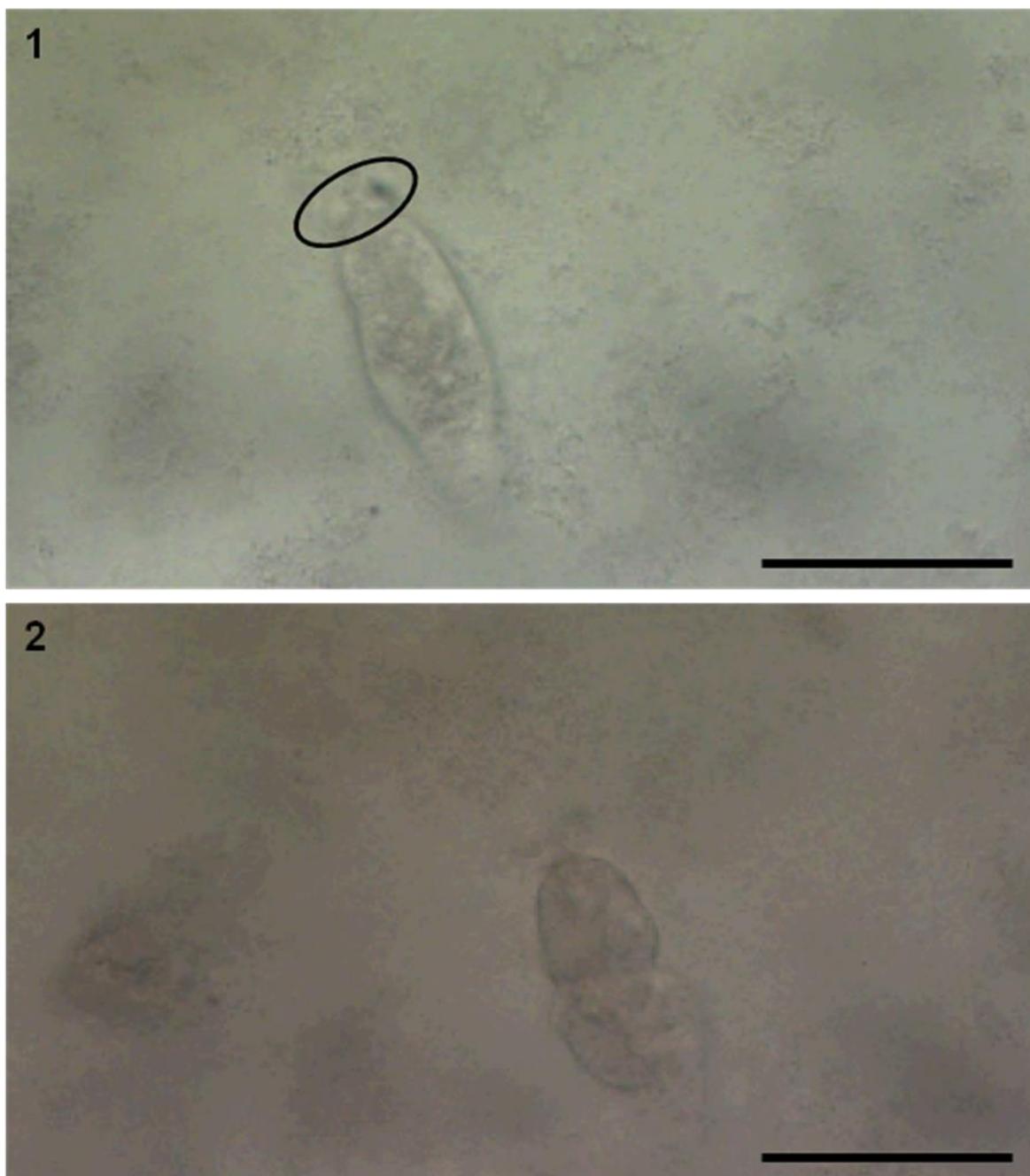
Figuras 1 e 2: Hemócitos entorno do parasito sem aderir à ele (ponta das setas).

4.8.2. 30 dias após exposição maciça

B. straminea: Houveram três hemócitos de *B. straminea* aderidos à extremidade anterior do esporocisto primário (círculo), entretanto estes não estavam mais aderidos ao parasito nos momentos finais do vídeo de 14 segundos (Prancha 37 - Figuras 1 e 2). Fotos tiradas aos 2 e 12 segundos de vídeo respectivamente.

B. glabrata: As células do molusco permaneceram aderidas à superfície do parasito durante todo o tempo de observação (círculo) (Prancha 38 - Figura 1), do vídeo de 24 segundos. Foto tirada aos 5 segundos.

PRANCHA 37

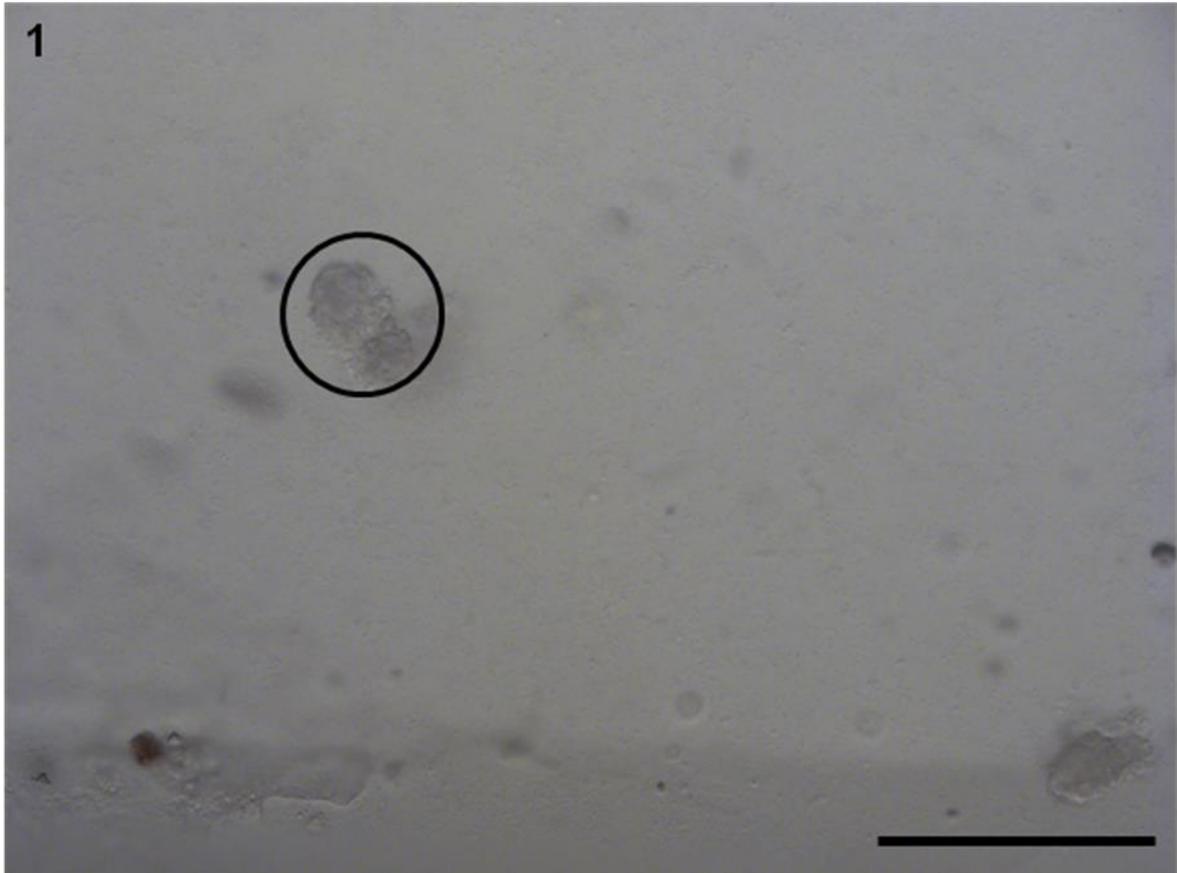


Prancha 35 - Figuras 1 e 2: Relação parasito-hospedeiro entre hemócitos de *Biomphalaria straminea* aos 30 dias após exposição e esporocistos primários de *Schistosoma mansoni*. Escalas em 20 μ m.

Figura 1: Hemócitos aderidos à extremidade do parasito (círculo preto);

Figura 2: Ausência dos hemócitos que aderiram ao parasito.

PRANCHA 38



Prancha 38 - Figura 1: Relação parasito-hospedeiro entre hemócitos de *Biomphalaria glabrata* aos 30 dias de exposição e esporocistos primários de *Schistosoma mansoni*. Escalas em 20 μ m.

Figura 1: Hemócitos completamente aderidos ao parasito (círculo preto).

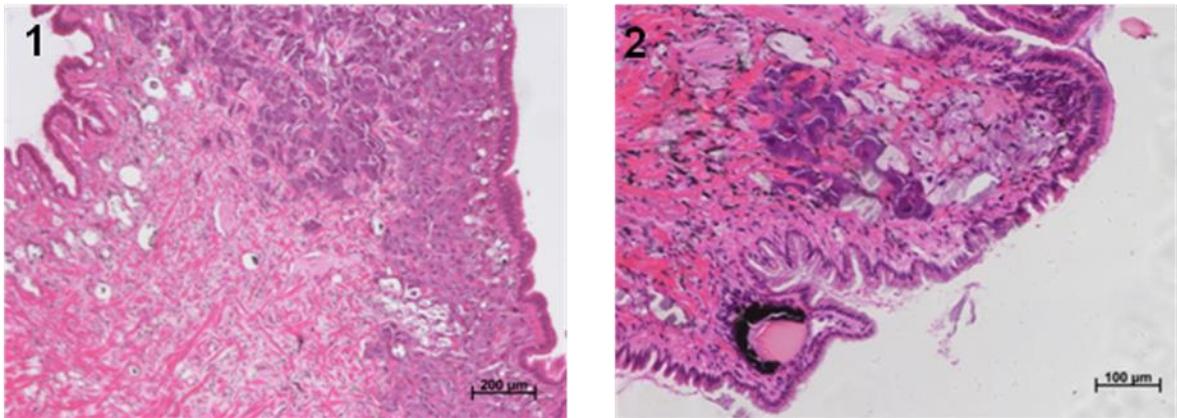
4.9. Aspectos histológicos da exposição em massa por *S. mansoni* em *B. glabrata* e *B. straminea*

4.9.1. 24 horas e 30 dias após a exposição

B. straminea: Não foram observadas lesões teciduais decorrentes da exposição nos tecidos do molusco em nenhum dos tempos estudados (Prancha 39 - Figuras 1 e 2).

B. glabrata: Não foram observadas lesões teciduais decorrentes da exposição nos tecidos do molusco nos durante as 24 horas após a exposição (Prancha 40 - Figura 1). Porém, aos 30 dias foram observados esporocistos secundários na região da massa cefalopédiosa (setas) (Prancha 40 - Figura 2).

PRANCHA 39

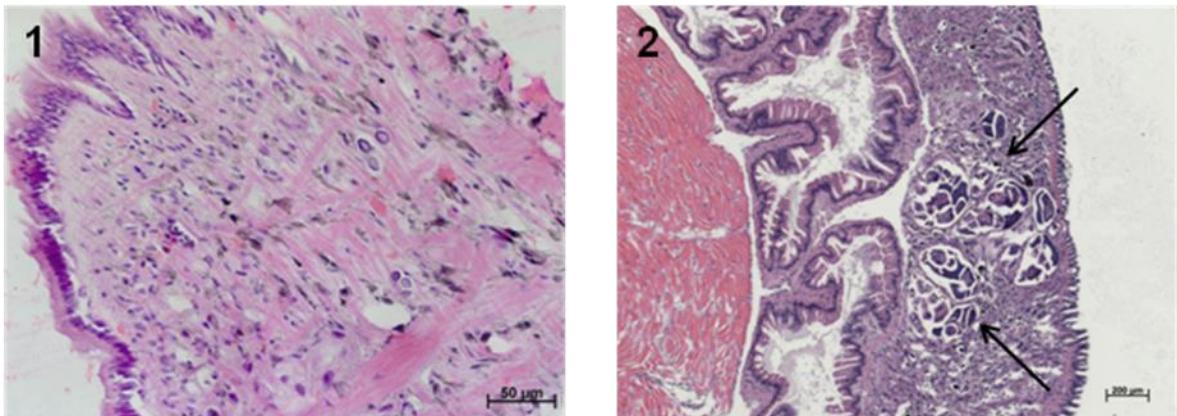


Prancha 39 - Figuras 1 e 2: Histologia de *Biomphalaria straminea* após 24 horas e 30 dias de exposição à *S. mansoni*.

Figura 1: Corte histológico da massa cefalopediosa após 24 horas de exposição sem a presença de parasitos;

Figura 2: Ausência de parasitos na massa cefalopediosa após 30 dias de exposição.

PRANCHA 40



Prancha 40 - Figuras 1 e 2: Histologia de *Biomphalaria glabrata* após 24 horas e 30 dias de exposição à *S. mansoni*.

Figura 1: Corte histológico da massa cefalopediosa após 24 horas de exposição sem a presença de parasitos;

Figura 2: Esporocistos secundários em região da massa cefalopediosa após 30 dias de exposição (setas).

V. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram utilizadas diferentes metodologias para caracterizar a resposta imune de *Biomphalaria straminea* frente a exposição por *Schistosoma mansoni*, utilizando *Biomphalaria glabrata* como controle positivo. Há poucos trabalhos na literatura descrevendo características dos hemócitos de *B. straminea*. Isto se deve aos aspectos biológicos deste hospedeiro em relação ao parasito (Cavalcanti, 2011). Em contrapartida, vários autores já descreveram os tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de *B. glabrata* (Matricon-Gondrant & Letocart, 1999) e *B. tenagophila* (Barraco et al, 1993; Oliveira et al, 2010).

Geralmente a literatura apresenta dois tipos de hemócitos: os hialinócitos e os granulócitos (Pereira et al, 2008; Martins-Souza et al, 2009; Sousa et al, 2012). No presente trabalho, cinco tipos de hemócitos foram encontrados na hemolinfa de *B. straminea* e *B. glabrata*, tal qual foi descrito por Cavalcanti et al (2011): células blásticas, granulócitos, hialinócitos tipo I, hialinócitos tipo II e hialinócitos tipo III. Estes autores também relataram alterações celulares por parte dos hemócitos de *B. straminea* e *B. glabrata* expostos ao *S. mansoni* como: maior produção de glicogênio, aumento de projeções citoplasmáticas e maior adesão celular. Neste trabalho também foi mensurado o tamanho dos hemócitos, estando de acordo com Cavalcanti et al (2011), onde observamos que as células de *B. straminea* eram menores em comparação à *B. glabrata* e os hialinócitos tipo III foram os maiores tipos celulares observados nos dois hospedeiros. Apesar de presentes em ambos os hospedeiros, somente os hialinócitos tipo I de *B. glabrata* (molusco controle) apresentaram filopódios, o que confirma os achados de Cavalcanti et al (2011) e Souza et al (2012), entretanto estes autores encontraram estes tipos celulares alterados pela exposição ao *S. mansoni*. Em nossos estudos, os hialinócitos tipo I também foram observados nos moluscos expostos, porém sem exibir os filopódios.

Foi observado um comportamento diferente entre as duas espécies hospedeiras de *S. mansoni* abordadas neste estudo. Enquanto que em *B. glabrata* a entrada do parasito nos tecidos dos moluscos estimula um

recrutamento de hemócitos da hemolinfa em direção aos tecidos, no período pré-patente, na cepa de *B. straminea* estudada a presença do parasito parece atuar sobre as regiões APO (*Amebocyte Producing Organ*) estimulando o aumento de hemócitos na hemolinfa. Pereira et al (2008) também observaram aspecto semelhante em *B. tenagophila* (cepa Cabo Frio) inoculadas com hemolinfa acelular da cepa resistente de Taim, as quais apresentaram um aumento de hemócitos na hemolinfa após 24 horas de exposição ao *S. mansoni*. Interessante, que após 30 dias, o número de hemócitos de *B. straminea* continuou elevado, quando comparado ao controle não exposto, mesmo após a eliminação do parasito observado através do exame histológico e exposição à luz.

Em nosso estudo, as células blásticas foram as mais abundantes em ambos os hospedeiros estudados, tanto nos controles quanto nos expostos, o que coloca nossos achados em desacordo com os de Cavalcanti (2011) que encontrou mais hialinócitos tipo I na hemolinfa de *B. straminea* e *B. glabrata*. Entretanto, a diferença entre este trabalho e o de Cavalcanti (2011) é que os tempos de infecção analisados não foram os mesmos com exceção à 30 dias dpi. No hospedeiro *B. tenagophila* (cepa Cabo Frio) Pereira et al (2008) observaram maior abundância de granulócitos na hemolinfa.

No trabalho de Mattos et al (2011) os hemócitos de todos os moluscos estudados, *B. glabrata* e *B. tenagophila* (cepas Taim e Cabo Frio), foram capazes de aderir à superfície do esporocisto primário, entretanto em nosso estudo esta aderência só foi observada aos 30 dias após a exposição em ambos os hospedeiros utilizados. Durante esta etapa dos experimentos, não foi possível identificar os tipos celulares presentes nas filmagens, pois esta foi realizada em placa de 24 poços acoplada ao microscópio, utilizando objetiva de 20x, enquanto as lâminas foram observadas em objetiva de 63x, o que deixava os hemócitos menos nítidos para observação.

A interação lectina/carboidrato tem sido associada ao reconhecimento da larva de trematódeos e consequente aumento da atividade fagocitária dos hemócitos, que também é influenciada pela presença de cálcio e fatores plasmáticos (Zelck, 1992; Martins-Souza et al, 2006). Ambas as lectinas utilizadas neste trabalho foram expressas, em sua maioria, na superfície das

células (células blásticas, granulócitos e hialinócitos) dos dois modelos experimentais, entretanto em *B. straminea* foram observadas células exibindo marcação para ambas as lectinas também no interior dos hemócitos, o que pode indicar uma ativação celular maior neste hospedeiro (com produção, expressão e secreção da lectina) do que em *B. glabrata*. Cavalcanti et al (2011) também observaram aumento na intensidade de marcação dessas lectinas em *B. straminea* expostas quando comparados com moluscos controles e com *B. glabrata* expostas.

A presença de *Griffonia simplicifolia* em hemócitos de *B. straminea* em tempos precoces (início da infecção) pode indicar a importância da participação desta lectina no reconhecimento do parasito e conseqüentemente sua eliminação. Já o achado do aumento da expressão de *Lens culinaris* somente no 30º dia após a exposição sugere a possibilidade de modulação do tipo de lectina expressa nos hemócitos no transcurso da infecção, o que provavelmente possa ocorrer em virtude do estágio do parasito. Acreditamos que a modulação das lectinas sejam semelhantes à modulação das imunoglobulinas dos vertebrados, onde a maior expressão destes carboidratos na superfície do hemócito pode induzir a eliminação parasitária. Segundo Oliveira et al (2010) os hemócitos de moluscos resistentes e suscetíveis exibem comportamentos diferentes. Cavalcanti et al (2011) destacaram em seus estudos o fato do número de granulócitos de *B. straminea* aumentarem aos 30 dias após a exposição em relação ao controle. O contrário foi visto por estes autores em *B. glabrata*, onde os granulócitos diminuíram com o tempo. Supomos que a diferença observada na expressão de lectinas entre os dois hospedeiros pode estar associada à diferença no comportamento celular como consequência do processo adaptativo do hospedeiro ao parasitismo por *S. mansoni*.

Foram observadas células negativas às lectinas, as quais também apresentavam morfologia condizente com células blásticas. Acreditamos que estas possam estar em estágio muito imaturo (células precursoras) a ponto de não responderem ao estímulo parasitário, ou simplesmente não apresentarem os carboidratos específicos em sua superfície. A caracterização fenotípica das fases de diferenciação das células blásticas pode auxiliar na identificação das

mesmas, assim como poderia ajudar na compreensão do processo de maturação dos hemócitos na fisiologia e fisiopatologia de planorbídeos hospedeiros de *S. mansoni*.

Nas análises histológicas não foram observadas lesões em ambos os hospedeiros. Na cepa de *B. straminea* estudada, deduz-se que a rápida resposta do molusco à exposição aos miracídios impossibilitou a visualização das formas larvais. Em cepas mais suscetíveis de *B. glabrata* ocorre o desenvolvimento de um grande número de parasitos, sem indução de resposta celular (Godoy et al, 1997). Segundo Pan (1963), uma pequena porcentagem dos miracídios que penetra no molusco transforma-se em esporocistos primários que usualmente ficam localizados no pé. Souza (1995) não detectou a presença de parasitos em animais com 72 horas de infecção. Em nosso trabalho, não detectamos esporocistos primários nos tecidos durante os tempos iniciais do estudo.

Ao observar as reações teciduais de *B. alexandrina*, Abou-El-Naga (2012) sugeriu que a resposta imune desses moluscos se deu por dois mecanismos diferentes. No primeiro mecanismo de defesa, o miracídio é eliminado logo após a penetração. Este tipo foi observado em caramujos resistentes e nesses moluscos, um intenso infiltrado hemocitário e nódulos ricos em hemócitos estavam presentes no sítio de penetração do miracídio. Essas reações podem levar a eliminação dos parasitos, logo após a penetração. Em *B. tenegophila* (cepa Taim), foram observados infiltrados hemocitários difusos e focais no tecido da região cefalopédica e estes foram associados à rápida destruição do parasito logo após a penetração (Negrão-Corrêa et al, 2007).

O outro mecanismo de defesa observado por Abou-El-Naga (2012) mostrou que o infiltrado celular difuso, os nódulos ricos em hemócitos e o espessamento focal do estroma estavam presentes nos tecidos mais profundos do molusco. Os autores Godoy et al (1997) e Borges et al (1998) consideraram que estas reações consistiam em um desenvolvimento tardio da resistência, que ocorreu após a disseminação dos esporocistos nos tecidos do molusco. Este tipo de reação tardia também foi observada por Barros da Silva (2014) utilizando *B. glabrata* como modelo, onde as reações hemocitárias só foram encontradas a partir do 42º dia de infecção e onde foi observada a incidência

de esporocistos e cercárias. Estes autores consideram que este tipo de resistência desenvolvida tardiamente representa uma alternativa no mecanismo de defesa do hospedeiro contra os miracídios de *S. mansoni*, apesar de evidências sugerirem que esporocistos mais velhos possam, ocasionalmente, interferir no sistema de defesa interno do molusco (Lie et al, 1980).

Trabalhos que investigam os mecanismos moleculares da memória imune inata dos invertebrados sugerem que a resposta imune celular e/ou fagocitose hemocitária é/são aprimoradas após um encontro posterior com o mesmo patógeno (Rowley e Powell, 2007; Neeta et al, 2011; Wang et al, 2013). Segundo Pinaud et al (2016), os parasitos da segunda exposição falharam ao se desenvolver em esporocistos no interior de moluscos expostos uma primeira vez, e foram mortos pelo hospedeiro, sem que nenhuma resposta imune celular/reação hemocitária fosse observada. De acordo com estes autores, após uma primeira exposição, cada encontro sucessivo entre o molusco e o parasito inicia uma resposta de defesa imune humoral exclusiva para *B. glabrata*. No gênero *Biomphalaria*, experimentos de transferência de plasma demonstraram que fatores humorais solúveis são liberados na hemolinfa de moluscos expostos pela primeira vez e, a transferência de tais fatores ativa/regula a resposta imune humoral no hospedeiro e confere maior imunidade antischistosômica contra encontros subsequentes com o patógeno (Pinaud et al, 2016).

Foi observado que *B. tenagophila* e *B. straminea* expostas à *S. mansoni* utilizaram o primeiro mecanismo de resistência descrito acima. Isto ocorreu por causa de sua intensa resistência e da eficiência de seus sistemas de defesa interno em conseguir destruir os miracídios logo após a penetração, a partir da maior rapidez e do recrutamento de um maior número de hemócitos do que os moluscos suscetíveis (Souza et al, 1997; Grassi et al, 2001; Negrão-Corrêa et al, 2007). Por outro lado *B. glabrata*, que é mais suscetível, fez uso do segundo mecanismo de defesa (Souza et al, 1997).

Estudar o hospedeiro intermediário *Biomphalaria straminea* pode contribuir para a elucidação de meios para o combate e/ou eliminação da esquistossomose no Brasil. Estudos futuros para identificação e quantificação de lectinas e seus ligantes presentes na hemolinfa de *B. straminea* poderiam

auxiliar na caracterização de diferentes perfis proteicos e glicoproteicos associando-os a diferentes padrões de resposta imune dos moluscos infectados, assim como outros marcadores e enzimas celulares como TLR, Lisozima e Fosfatase Ácida. Dessa forma, a comparação entre perfis genéticos merece ser investigada com mais detalhamento visando obter dados sobre o processo evolutivo/adaptativo que permitiu a resistência ou o sucesso do parasitismo por *S. mansoni*. Estas, portanto, são as próximas etapas a serem pesquisadas.

VI. CONCLUSÃO

7.1. É possível demonstrar que há um perfil fenotípico da resposta celular de *B. straminea* frente ao *S. mansoni*, que difere de um molusco suscetível, como *B. glabrata*.

7.2. Os hemócitos mais abundantes na hemolinfa de *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata* são as células blásticas, o que sugere que há potencial para diferenciar em diferentes tipos de hemócitos, ou seja, células precursoras;

7.3. A expressão de lectinas por hemócitos de *B. straminea* (cepa Sousa-PB), parece ser influenciada pelo tempo de infecção à *S. mansoni*;

7.4. *B. straminea* (cepa Souza) foi eficiente na eliminação do parasito apesar de não haver diferença estatisticamente significativa no número de hemócitos nos tempos estudados;

7.5. Hemócitos de *B. straminea* são capazes de interagir/reconhecer o parasito durante os períodos pré e patente da infecção, diferentemente de *B. glabrata*, cujos hemócitos só interagem/reconhecem os parasitos a partir do período patente independentemente da fase do mesmo.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-El-Naga IF, Radwan EH. Defense response of susceptible and resistant *Biomphalaria alexandrina* snails against *Schistosoma mansoni* infection. Rev Biol Trop 60 (3): 1195-1204, 2012.

Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite – derived molecules is produced by invertebrate after infection. PNAS (USA) 94: 8691-8696, 1997.

Andrade AN. Neuroesquistossomose. Arq Neuropsiquiatria 44: 275-279, 1986.

Azevedo CM, Borges CC, Andrade ZA. Changes induced in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) following trials for artificial stimulation of its internal defense system. Mem Inst Oswaldo Cruz 1: 199–203, 2006.

Barbosa L, Caldeira RL, Carvalho OS, Vidigal THDA, Jannotti-Passos LK, Coelho PMZ. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. Parasite Immunology 28: 209 –212, 2006.

Barondes SH. Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. Trends Biochem Sci. 13: 480-482, 1988.

Barracco MA, Steil AA, Gargioni R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. Mem Ins Oswaldo Cruz 88: 73-83, 1993.

Barros da Silva, TC. Expressão de lectinas nos tecidos do hospedeiro intermediário *Biomphalaria glabrata*, (Say 1818) (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae) durante os períodos pré patente e patente da infecção por *Schistosoma mansoni*, Sambon 1907 (Trematoda: Schistosomatidae) [Monografia de Especialização]. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro; 2014.

Bayne CJ, Buckley PM, DeWan PC. *Schistosoma mansoni*: cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. *Exp Parasitol* 50: 409–16, 1980.

Bayne CJ. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. *Mol Biochem Parasitol* 165: 8-18, 2009.

Bender RC, Broderick EJ, Goodall CP, Bayne CJ. Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* haemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H₂O₂ than susceptible snails. *J Parasitol* 91: 275-279, 2005.

Borges CM, Souza CP, Andrade ZA. Histopathologic features associated with susceptibility and resistance of *Biomphalaria* snails to infection with *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 117-121, 1998.

Boswell CA, Bayne CJ. Lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity in an invertebrate model: Con A does not act as a bridge. *Immunology* 57: 261–64, 1986.

Cavalcanti MGS, Filho FC, Mendonça AMB, Duarte GR, Barbosa CCGS, De Castro CMMB, Alves LC, Brayner FA. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. *Micron* 43: 285-291, 2011.

Cavalcanti MGS. Caracterização dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* sadios e infectados por *Schistosoma mansoni* [tese]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2011.

Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am-J. of Clin. Pathol.* 59: 365-373, 1973.

Carvalho OS, Amaral SR, Scholte RGC, Guerra MAM. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma versão multidisciplinar. 1ed (português). Editora: Editora Fiocruz; 2008. p, 395-418.

Chermin E. Observations on hearts explanted *in vitro* from the snail *Australorbis glabratus*. J. Parasitol. 49: 353-364, 1963.

de Jong-Brink M, Bergamin-Sassen M, Solis Soto M. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate host. Parasitology 123: 129-141, 2001.

Faro MJ, Perazzini M, Corrêa LR, Mello-Silva CC, Pinheiro J, Mota ES, Souza SS, Andrade Z, Maldonado A. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. Experimental Parasitology 134 (2): 228-234, 2013.

Fernandez MA, Pieri OS. Infection by *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 in the first four months of life of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 96 (Suppl.): 185-192, 2001.

Fernandez MA, Thiengo SC. Susceptibility of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) from Serra da Mesa Dam, Goiás, Brazil to Infection with Three Strains of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97 (Suppl. 1): 59-60, 2002.

Florence MR, Godard ALB, Azevedo V, Zech Coelho PM. *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.

Galinier R, Portela J, Moné Y, Allienne JF, Henri H, Delbecq S, Mitta G, Gourbal B, Duval D. Bipmphalisin a new β pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. Plos Pathogens 9: 1-16, 2013.

Godoy A, Souza CP, Guimarães CT, Andrade ZA. Unusual histological findings in *Biomphalaria glabrata* with high degree of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. Mem Inst Oswaldo Cruz 92: 121-122, 1997.

Grassi L, Jordá MT, Andrade ZA, González--Cappa SM. Short report: *Schistosoma mansoni* miracidia are killed by the defense system of an Argentine strain of *Biomphalaria straminea*. Am J Trop Med Hyg 65: 290-292, 2001.

Guaraldo AMA, Magalhães LA, Rangel HA, Pareja G. The evolution of sporocysts of *Sehistosoma mansoni*, Sambon, 1907, in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and in *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). Rev. Saúde Pública 15 (4): 436-448, 1981.

Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. Production of reactive oxygen species by haemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydratespecific stimulation. Dev Comp Immunol 24: 531-541, 2000.

Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by haemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 87: 778-785, 2001.

Hanington PC, Cheng-Man L, Adema CM, Loker ES. Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. Int J Parasitol 40: 819-831, 2010a.

Hanington PC, Forsys MA, Dragoo JW, Zhang SM, Adema CM, Loker ES. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. *Proc Natl Acad Sci USA* Dec 7107: 21087-21092, 2010b.

Horák P, Van Der Knaap WPW. Lectins in snail-trematode immune interactions: a review. *Folia Parasitologica*. 44: 161-172, 1997.

Johnston LA, Yoshino TP. Analysis of lectin and snail plasma binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 112: 469-479, 1996.

Johnston LA, Yoshino TP. Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to haemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. *J Parasitol* 87: 786-793, 2001.

Joky A, Matricón-Gondran M, Benex J. Fine structural differences in the amoebocytes of *Biomphalaria glabrata*. *Dev Comp Immunol* 7: 669–72, 1983.

Jurberg AD, Oliveira AA, Lenzi HL, Coelho PM. A new miracidia hatching device for diagnosing schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103 (1): 112-114, 2008.

Lavine MD, Strand MR. Insect haemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1295-1309, 2002.

Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D. Tissue reaction induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78: 157-166, 1980.

Lutz A. O *Schistosoma mansoni* e a Schistomatose, segundo as observações feitas no Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11(1): 121-155, 1919.

Malagueño E, Albuquerque C, Castro CMMB, Gadelha M, Irmão JI, Santana JV. Effect of *Biomphalaria straminea* plasma in the phagocytosis of *Biomphalaria glabrata* hemolymph cells. Mem Inst Oswaldo Cruz 93 (Supl. 1): 301-302, 1998.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Martins Filho OA, Coelho PMZ, Corrêa Jr A, et al. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 101(Supl. 1): 185–192, 2006.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Coelho PMZ, Martins Filho OA, Negrão-Corrêa, D. Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. Cambridge University Press 136 (1): 76-76, 2009.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Rodrigues L, Araújo ES, Coelho PMZ, et al. Participation of N-acetyl-D-glucosamine carbohydrate moieties in the recognition of *Schistosoma mansoni* sporocysts by haemocytes of *Biomphalaria tenagophila*. Mem Inst Oswaldo Cruz 106: 884–91, 2011.

Massara CL, Carvalho OS, Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Schall VT. First Report on the Presence of *Biomphalaria straminea* in the Municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97 (Supl.1): 27-29, 2002.

Mattos ACA, Martins-Souza RL, Kusel JR, Coelho PMZ. Interaction between primary and secondary sporocysts of *Schistosoma mansoni* and the internal defense system of *Biomphalaria* resistant and susceptible to the parasite. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 106: 424-432, 2011.

Matricon-Gondrant M, Letocart M. Internal Defenses of the Snail *Biomphalaria glabrata*: I. Characterization of Hemocytes and Fixed Phagocytes. Journal of Invertebrate Pathology 74 (3): 224-234, 1999.

Mello-Silva CC, Gault CE, Costa VA, Barbosa FS. Possible hybridization of brazilian planorbic snails and its importance in population dynamics. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93, suppl. 1: 227-232, 1998.

Mello-Silva CC, Vasconcellos MC, Bezerra JCB, Rodrigues MLA, Pinheiro J. The influence of exposure to *Euphorbia splendens* var. *hislopii* latex on the concentrations of total proteins and nitrogen products in *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. Acta Tropica 117: 101-104, 2011.

Meuleman EA, Bayne ME, Van der Knaap, WPW. Developmental and Comparative Immunology (Cooper, E. L. Langlet, C. and Bierene, J., eds), 116–127, Alan Liss, 1987.

Ministério da Saúde. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica Diretrizes Técnicas: Programa e Vigilância do Controle da Esquistossomose (PCE). 2.ed. (português). Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2007.

Ministério da Saúde. Vigilância da Esquistossomose Mansoni Diretrizes Técnicas. 4.ed. (português). Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2014.

Moné Y, Gourbal B, Duval D, Du Pasquier L, Kieffer-Jaquinod S. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. PLoS Negl Trop Dis 4: e813, 2010.

Mullainadhan P, Renwanz L. Comparative analysis of agglutinins from hemolymph and albumen gland of *Helix pomatia*. J. Invert. Physiol. 159: 443-452, 1989.

Neeta MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. Cell Host Microbe 9: 355-361, 2011.

Negrão-Corrêa D, Pereira CAJ, Rosa FM, Martins-Souza RL, Andrade ZA, Coelho PMZ. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. J Invert Survival 4: 101-111, 2007.

Neves DP. Parasitologia Humana. 12.ed. (português). Rio de Janeiro: Editora Atheneu; 2011.

Noya O, Katz N, Pointier JP, Theron A, Noya BA. Schistosomiasis in America. In: Franco-Paredes C, Santos-Preciado JI. Neglected Tropical Diseases - Latin America and the Caribbean. 1ed (inglês). Editora: Springer-Verlag Wien; 2015. p, 11-43.

Oliveira AL, Levada PM, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Ribeiro-Paes JT. Differences in the number of haemocytes in the snail host *Biomphalaria tenagophila*, resistant and susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. Genet Mol Rev 9: 2436-2445, 2010.

Ottaviani E. Molluscan Immunorecognition. ISJ. 6: 49-58, 2006.

Pan CT. Generalized and focal tissue responses in the snail, *Australorbis glabratus*, infected with *Schistosoma mansoni*. An NY Acad Sci. 113: 475-485, 1963.

Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. Arquivo do Museu Nacional do Rio de Janeiro 55:105-128, 1975.

Patz J, Graczyk T, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. Int J Parasitol 48: 121–24, 2000.

Pereira CA, Martins-Souza RL, Corrêa A Jr, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa D. Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the

defense mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Parasite Immunol.* 30 (11-12): 610-619, 2008.

Pinaud S, Portela J, Duval D, Nowacki FC, Olive MA, Allienne JF, Galinier R, Dheilly NM, Kieffer-Jaquinod S, Mitta G, Theron A, Gourbal B. A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. *Plos Pathogens* 12 (1): e1005361, 2016.

Rey L. Bases da Parasitologia Médica. 3.ed. (português). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2011.

Richards CS, Renwranz LR. Two lectins on surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca²⁺-dependent, GalNac-specific lectin and a Ca²⁺-independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognizes activated homologous opsonins. *J. Comp. Physiol.* 161: 43-54, 1991.

Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP. Katayama syndrome. *Lancet Infect Dis* 7: 218–24, 2007.

Rowley AF, Powell A. Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?. *J Immunol* 179: 7209-7214, 2007.

Sokolova IM. Apoptosis in molluscan immune defense. *ISJ* 6: 49-58, 2009.

Souza CP, Cunha RCP, Andrade ZA. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Inst Med Trop São Paulo* 37: 201-206, 1995.

Souza CP, Borges CC, Santana AG, Andrade ZA. Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92 (4): 517-522, 1997.

Souza SS, Andrade ZA. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101 (Suppl. 1): 213-218, 2006.

Souza SS, Andrade ZA. The significance of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. Mem Ins Oswaldo Cruz 107 (5): 598-603, 2012.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect Dis 6: 411–25, 2006.

Sturrock RF. Schistosomiasis Epidemiology and Control: How Did We Get Here and Where Should We Go? Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96 Suppl.: 17-27, 2001.

Thiengo SC, Fernandez MA, Mattos AC. Malacologia. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Vol.5 1.ed. (português). Editora: EPSJV, IOC; 2012 p, 413-475. 476p.

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Neto AGF. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. (português) Rio de Janeiro. Editora Manole; 2003.

Uchikawa R, Locker ES. Lectin-binding properties of the surfaces of *in vitro*-transformed *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* sporocysts. J Parasitol 77: 742-748, 1991.

Van Der Knaap WPW, Loker ES. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitol Today 6: 175-182, 1990.

Wang J, Wang L, Yang C, Jiang Q, Zhang H, et al. The response of mRNA expression upon secondary challenge with *Vibrio anguillarum* suggests the involvement of C-lectins in the immune priming of scallop *Chlamys farreri*. Dev Comp Immunol 40: 142-147, 2013.

World Bank, [2016]. Disponível em: <http://data.worldbank.org>. Acesso em 05/06/2016.

World Health Organization, [2016]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>. Acesso em: 05/06/2016.

Yoshino TP. The ultrastructure of circulating haemolymph cells of marine snail *Cerithidea californica* (Gastropoda: Prosobranchiata). J. Morphol 150: 148, 1977.

Zhang SM, Nian H, Zeng Y, Dejong RJ. Fibrinogen-bearing protein genes in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of two novel genes and expression studies during ontogenesis and trematode infection. Dev Comp Immunol 32: 1119-1130, 2008.

Zanker KS. Immunology of invertebrates: Humoral. 1ed (inglês). Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester; 2010.

Zelck U, Becker W. *Biomphalaria glabrata*: Influence of calcium, lectins, and plasma factors on *in vitro* phagocytic behavior of hemocytes of non infected or *Schistosoma mansoni*-infected snails. Experimental Parasitology. 75: 126-136, 1992.

VIII. ANEXO

Tabela 2 - Lectinas usadas neste trabalho

Lectina	Carboidrato
<i>Arachis hypogaea</i>	β -galactosamina; N-acetil-galactosamina
ConcanavalinaA	α -glicosamina; α -manose
<i>Glycyne max</i>	N-acetil-galactosamina
<i>Griffonia simplicifolia</i> *	α -galactosamina
<i>Lens culinaris</i> *	α -manose
<i>Triticum vulgare</i>	N-acetil-glicosamina