

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

ELVERSON SOARES DE MELO

ANÁLISE DA VARIABILIDADE IMUNOLÓGICA E DA EXPRESSÃO DOS GENES
FREPs ENTRE AS ESPÉCIES *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* COM
DIFERENTES PERFIS DE SUSCETIBILIDADE AO PARASITO *Schistosoma mansoni*

Recife

2015

ELVERSON SOARES DE MELO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE IMUNOLÓGICA E DA EXPRESSÃO DOS GENES
FREPs ENTRE AS ESPÉCIES *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* COM
DIFERENTES PERFIS DE SUSCETIBILIDADE AO PARASITO *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Luiz Carlos Alves

Co-orientador: Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Recife

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- M528a Melo, Elverson Soares de.
Análise da variabilidade imunológica e da expressão dos genes FREPs entre as espécies *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea* com diferentes perfis de suscetibilidade, frente à infecção por *Schistosoma mansoni* / Elverson Soares de Melo. - Recife: [s.n.], 2015.
75 p. : ilus., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2015.
Orientador: Luiz Carlos Alves.
Co-orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
1. Epitopos - imunologia. 2. *Biomphalaria* - genética. 3. *Biomphalaria* - imunologia. 4. *Schistosoma mansoni* - imunologia. 5. Interações Hospedeiro-Parasita. 6. Hemócitos. I. Alves, Luiz Carlos. 2. Santos, Fábio André Brayner dos. III. Título.

CDU 616.995.112

ELVERSON SOARES DE MELO

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE IMUNOLÓGICA E DA EXPRESSÃO DOS GENES
FREPs ENTRE AS ESPÉCIES *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* COM
DIFERENTES PERFIS DE SUSCETIBILIDADE AO PARASITO *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovado em: 26/06/2015

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luiz Carlos Alves
CPqAM - FIOCRUZ

Dr. Roberto Afonso da Silva
LIKA - UFPE

Dra. Cláudia Maria Fontes de Oliveira
CPqAM - FIOCRUZ

Dedico esta dissertação a minha família e amigos, pelo apoio nos momentos bons e ruins da construção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio André Brayner dos Santos pela amizade, pelas discussões científicas e pela oportunidade de participar do Grupo LBCM.

Aos meus pais Samuel e Lucicleide, pelo esforço que fizeram para me educar e pelo estímulo na carreira acadêmica, pelo apoio nos momentos em que me senti perdido em meio aos problemas decorrentes dessa carreira.

À minha namorada Sophia, pelo carinho e apoio dados e pela compreensão nas horas em que muitas vezes não pude estar com ela, pois estava trabalhando no projeto de mestrado, inclusive aos domingos.

À Fiocruz Pernambuco por ter me dado à oportunidade de estudar em uma instituição de qualidade.

Aos meus colegas do LBCM pelos momentos de companheirismo, de discussões filosóficas, pelo auxílio nos difíceis experimentos, que se multiplicavam, e por conseguir conviver com comigo.

À FACEPE pelo incentivo financeiro durante todo o período de mestrado, sem o qual seria mais complicado comprar alguns reagentes necessários a minha pesquisa.

À banca examinadora, por ter aceitado o convite e pela contribuição oferecida a este trabalho.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami/LIKA-UFPE pela colaboração neste trabalho, principalmente à Olavio que me ajudou a varrer várias lâminas em busca dos hemócitos marcados.

Ao Dr. Franklin Magliano da Cunha pelo auxílio com as análises estatísticas.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva, e a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram com a elaboração deste trabalho.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”

(Sócrates)

MELO, Elverson Soares de. Análise da variabilidade imunológica e da expressão dos genes FREPs entre as espécies *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea* com diferentes perfis de suscetibilidade, frente à infecção por *Schistosoma mansoni*. 2015. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

Algumas espécies do gênero *Biomphalaria* se apresentam como potenciais hospedeiras ao parasito *Schistosoma mansoni*, estando a suscetibilidade a este parasito, neste gênero, ligada ao sistema interno de defesa de cada espécie de *Biomphalaria*. Um dos componentes importantes no sistema imune de invertebrados é a enzima fenoloxidase, que ainda apresenta muitos aspectos desconhecidos no sistema de defesa do gênero *Biomphalaria*. Foi relatado também que os genes de proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs) possuem importância na resposta imune de *Biomphalaria glabrata*, entre esses, as subfamílias dos FREPs 3 e 4 são diferencialmente expressas em linhagens susceptíveis e resistentes frente a infecção com trematódeos. No entanto os trabalhos existentes em sua maioria estudam a espécie *Biomphalaria glabrata*, excluindo a espécie *Biomphalaria straminea*, amplamente distribuída no Brasil e principal responsável pela disseminação da esquistossomose. Tendo em vista a falta de conhecimento sobre a resposta imune destes moluscos hospedeiros, principalmente em relação à expressão de genes imune relevantes e ao tipo de resposta, o presente trabalho se propôs a estudar a variação do número de hemócitos, da produção de fenoloxidase e da expressão dos genes dos FREP 3 e FREP 4 envolvidos com a ligação a antígenos de trematódeos, nas espécies *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* pós-infecção com *S. mansoni*, bem como em caramujos pré-expostos a antígenos de *S. mansoni*. Para isso, os caramujos de cada espécie foram divididos em 2 grupos: pré-expostos e não expostos a antígenos de *S. mansoni*. Esses grupos foram divididos em sadios e infectados com a cepa LE de *S. mansoni*. Em *B. glabrata* não houve alteração no número de hemócitos, porém *B. straminea* mostrou uma queda após duas horas de infecção. A atividade da fenoloxidase variou após a sensibilização na espécie menos susceptível (*B. straminea*) e não variou em *B. glabrata*, também foi identificado que os hemócitos produtores da fenoloxidase são os granulócitos e hialinócitos. Quanto à expressão dos genes, o FREP 3 e 4 apresentaram níveis basais de expressão aumentados após a sensibilização, com perfil de expressão diferente entre as espécies estudadas. Esses resultados confirmam que a resposta imune varia em diversos aspectos entre as espécies do gênero *Biomphalaria*, e que nas espécies estudadas a enzima fenoloxidase não parece ter o mesmo papel que no sistema de defesa de insetos, diferindo apenas após a sensibilização, que tem influência na expressão dos genes imuno relevantes do FREPs.

Palavras Chave: *Biomphalaria*, Interações Hospedeiro-Parasita, Hemócitos, Fenoloxidase, FREP.

MELO, Elverson Soares de. Analysis of immune variability and expression of FREPS genes between the species *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* with different susceptibility profiles to infection to by *Schistosoma mansoni*. Dissertation (Master Degree in Bioscience and Biotechnology for Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

Some species of the genus *Biomphalaria* present themselves as potential host to the parasite *Schistosoma mansoni*, being the susceptibility to this parasite, in this genus, related to the internal defense system of each species of *Biomphalaria*. An important component in the immune system of invertebrates is the phenoloxidase enzyme, which still has many unknown aspects in the defense system of *Biomphalaria* genus. It was also reported that genes which encode fibrinogen related proteins (FREPS) have importance in the immune response of *Biomphalaria glabrata*, among these, the subfamilies of FREPs 3 and 4 are differentially expressed in susceptible and resistant strains against infection with trematodes. However existing works generally study *Biomphalaria glabrata* species, excluding *Biomphalaria straminea* species, widely distributed in Brazil and mainly responsible for the spread of schistosomiasis. Given the lack of knowledge about the immune response of these host molluscs, especially in relation to the expression of immune relevant genes and to the type of response, this study proposed to analyze the variation in the number of hemocytes, the phenoloxidase production and the expression of genes FREP 3 and FREP 4 involved with binding to trematode antigens, in species *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* post-infection with *S. mansoni* as well as snails pre-exposed to *S. mansoni* antigens. For this, the snails of each species were divided into two groups: pre-exposed and non-exposed to *S. mansoni* antigens. These groups were divided into healthy and infected with the LE strain of *S. mansoni*. In *B. glabrata* there wasn't change in the number of hemocytes, but *B. straminea* showed a reduction in this number after two hours of infection. The activity of phenoloxidase varied after sensitization at less susceptible species (*B. straminea*) and did not change in *B. glabrata*. Moreover, it was also identified that the hemocytes which produce phenoloxidase are granulocytes and hyalinocytes. Regarding expression of genes, FREP 3 and 4 showed basal levels of expression increased after sensitization with different expression profile between the species studied. These results confirm that the immune response varies in different aspects between species of the genus *Biomphalaria*, and in the species studied the phenoloxidase enzyme does not seem to have the same role in insect defense system, differing only after sensitization, that also influences the expression of immune relevant genes FREPs.

Key words: *Biomphalaria*, Hemocytes, Host-Parasite Interactions, Phenoloxidase, FREP.

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Gráfico 1 | – Análise da atividade dos hemócitos de <i>B. glabrata</i> após 2 horas de infecção..... | 41 |
| Gráfico 2 | – Análise da atividade dos hemócitos de <i>B. straminea</i> após 2 horas de infecção..... | 42 |
| Gráfico 3 | – Dosagem de fenoloxidase em <i>B. glabrata</i> não sensibilizado..... | 44 |
| Gráfico 4 | – Dosagem de fenoloxidase em <i>B. glabrata</i> sensibilizado..... | 45 |
| Gráfico 5 | – Dosagem de fenoloxidase em <i>B. straminea</i> não-sensibilizado | 46 |
| Gráfico 6 | – Dosagem de fenoloxidase em <i>B. straminea</i> sensibilizado..... | 46 |
| Gráfico 7 | – Variação da expressão do FREP 3 em <i>B. glabrata</i> não sensibilizados..... | 51 |
| Gráfico 8 | – Variação da expressão do FREP 3 em <i>B. glabrata</i> sensibilizados..... | 52 |
| Gráfico 9 | – Variação da expressão do FREP 3 em <i>B. glabrata</i> infectado sensibilizado e não sensibilizado..... | 52 |
| Gráfico 10 | – Variação da expressão do FREP 3 em <i>B. straminea</i> não sensibilizado ... | 53 |
| Gráfico 11 | – Variação da expressão do FREP 3 em <i>B. straminea</i> sensibilizado..... | 54 |
| Gráfico 12 | – Efeito da sensibilização ao <i>S. mansoni</i> na expressão do FREP 3 em <i>B. straminea</i> sadio..... | 54 |
| Gráfico 13 | – Variação da expressão do FREP 3 em <i>B. straminea</i> infectado sensibilizado e não sensibilizado..... | 55 |
| Gráfico 14 | – Variação da expressão do FREP 4 em <i>B. glabrata</i> não sensibilizados... | 57 |
| Gráfico 15 | – Variação da expressão do FREP 3 em <i>B. glabrata</i> sensibilizados..... | 57 |
| Gráfico 16 | – Efeito da sensibilização ao <i>S. mansoni</i> na expressão do FREP 3 em <i>B. glabrata</i> sadios.... | 58 |
| Gráfico 17 | – Variação da expressão do FREP 4 em <i>B. glabrata</i> infectado sensibilizado e não sensibilizado..... | 58 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Espécies e subespécie do gênero <i>Biomphalaria</i> que ocorrem no Brasil | 17 |
| Figura 1 – Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria glabrata</i> no Brasil..... | 18 |
| Figura 2 – Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria straminea</i> no Brasil. | 19 |
| Figura 3 – Desenho esquemático do ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> | 21 |
| Figura 4 – Estrutura do FREP 3 | 28 |
| Figura 5 – Estrutura do FREP 4 | 28 |
| Figura 6 – Disposição da lamínula na placa para o experimento de marcação dos hemócitos produtores de fenoloxidase..... | 36 |
| Figura 7 – Hemócitos marcados com fenoloxidase..... | 49 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|--------------------------------|---|---|
| FREP | – | <i>Fibrinogen Related Protein</i> – Proteínas Relacionadas ao Fibrinogênio |
| OMS | – | Organização Mundial da Saúde |
| PCE | – | Programa de controle da esquistossomose |
| SmPoMucs | – | Mucinas Polimórficas de <i>Schistosoma mansoni</i> |
| PRRs | – | <i>Pattern Recognition Receptors</i> – Receptores de Reconhecimento Padrão |
| PGRPs | – | Proteínas de reconhecimento de peptidoglicano |
| TNF-α | – | Fator de necrose Tumoral Alfa |
| IL-1 | – | Interleucina 1 |
| IgSF | – | <i>Immunoglobulin superfamily</i> – Superfamília da Imunoglobulinas |
| PAS | – | Potencial de ampliação do sistema |
| EDTA | – | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> – Ácido etilendiamino tetra-acético |
| L-DOPA | – | <i>L-3,4-dihydroxyphenylalanine</i> |
| NPT | – | Núcleo de Plataformas Tecnológicas |
| DEPC | – | <i>Diethylpyrocarbonate</i> – Dietilpirocarbonato |
| BLAST | – | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> – Ferramenta de Busca Básica de Alinhamento Local |
| qPCR | – | PCR quantitativa |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 | Hipótese | 15 |
| 2 | MARCO TEÓRICO CONCEITUAL | 16 |
| 2.1 | O gênero <i>Biomphalaria</i> | 16 |
| 2.2 | A esquistossomose e o parasito <i>Schistosoma mansoni</i> | 19 |
| 2.3 | A relação parasita/hospedeiro | 22 |
| 2.4 | O sistema imune de <i>Biomphalaria</i> spp. | 23 |
| 2.5 | O envolvimento de alguns genes e suas proteínas na susceptibilidade do hospedeiro ao parasito | 26 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 30 |
| 4 | OBJETIVOS | 31 |
| 4.1 | Objetivo Geral | 31 |
| 4.2 | Objetivos Específicos | 31 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 5.1 | Obtenção dos moluscos | 32 |
| 5.2 | Delimitação dos grupos para análise | 32 |
| 5.3 | Infecção dos camundongos com <i>Schistosoma mansoni</i> | 32 |
| 5.4 | Obtenção dos miracídios | 33 |
| 5.5 | Infecção dos moluscos | 33 |
| 5.6 | Contagem dos hemócitos | 33 |
| 5.7 | Recuperação dos hemócitos para ensaio da fenoloxidase e expressão gênica | 34 |
| 5.8 | Avaliação da atividade da fenoloxidase | 35 |
| 5.9 | Marcação dos hemócitos produtores de Fenoloxidase | 35 |
| 5.10 | Extração do RNA | 36 |
| 5.11 | Tratamento do RNA com DNase | 37 |
| 5.12 | Eletroforese de RNA | 37 |

| | | |
|-------------|--|----|
| 5.13 | Produção do cDNA | 37 |
| 5.14 | Análise da expressão gênica | 38 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 40 |
| 7 | RESULTADOS | 41 |
| 7.1 | Variação da dinâmica hemocitária | 41 |
| 7.2 | Análise da atividade da fenoloxidase nos hemócitos de <i>Biomphalaria</i> | 43 |
| 7.2.1 | Atividade da fenoloxidase em <i>Biomphalaria glabrata</i> não sensibilizados | 44 |
| 7.2.2 | Atividade da fenoloxidase em <i>Biomphalaria glabrata</i> sensibilizados | 45 |
| 7.2.3 | Atividade da fenoloxidase em <i>Biomphalaria straminea</i> não sensibilizados | 45 |
| 7.2.4 | Atividade da fenoloxidase em <i>Biomphalaria straminea</i> sensibilizados | 46 |
| 7.3 | Marcação dos hemócitos produtores de fenoloxidase | 48 |
| 7.4 | Padronização dos genes da qPCR | 50 |
| 7.5 | Análise da expressão do FREP 3 | 50 |
| 7.5.1 | Expressão do FREP 3 em <i>Biomphalaria glabrata</i> . | 51 |
| 7.5.2 | Expressão do FREP 3 em <i>B. straminea</i> . | 53 |
| 7.6 | Análise da expressão do FREP 4 | 56 |
| 7.6.1 | Expressão do FREP 4 em <i>Biomphalaria glabrata</i> | 56 |
| 8. | DISCUSSÃO | 60 |
| 9. | CONCLUSÃO | 67 |
| | REFERÊNCIAS | 68 |
| | ANEXO A - PARECER DO CEUA | 75 |

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o gênero *Biomphalaria* é representado por dez espécies e uma subespécie, das quais três espécies são hospedeiras intermediárias naturais para o *Schistosoma mansoni*, trematódeo causador da esquistossomose: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea*. Entretanto estas espécies possuem um perfil de susceptibilidade totalmente diferente, sendo a espécie *B. straminea* a menos susceptível a infecção pelo *S. mansoni*, sendo assim mais resistente que aquelas outras duas, porém a mais dispersa no Brasil e mais encontrada em áreas endêmicas (BRASIL, 2007).

Um dos grandes problemas no controle da esquistossomose é a ampla difusão dos hospedeiros intermediários, o que leva a necessidade de estudá-los. A relação parasita-hospedeiro depende, entre outros fatores, do sistema intrínseco de defesa dos hospedeiros (MACHADO *et al.*, 1988). Em seu sistema de defesa os moluscos possuem uma resposta inata bastante desenvolvida, subdividida em defesa humoral e defesa celular mediada por hemócitos (CAVALCANTI *et al.*, 2012; VARGAS-ALBORES *et al.*, 2001). Além de fagocitar partículas estranhas, os hemócitos podem fazer a nodulação e no caso de invasores maiores, pode ainda fazer a encapsulação (LAVINE; STRAND, 2008; WOOD; JACINTO, 2007). Os hemócitos produzem também moléculas efetoras como: a fenoloxidase, enzima que desencadeia processos de defesa contra patógenos como melanização e ativação da via do óxido nítrico (GONZALEZ-SANTOYO; CÓRDOBA-AGUILAR, 2011).

Embora um conhecimento básico tenha sido adquirido, ainda existe muita discordância sobre como se dão os mecanismos de resposta à infecção nestes moluscos. Hanington *et al.* (2010) sugeriram a existência de uma resposta secundária nos invertebrados, uma vez que a resposta imune destes caramujos não está só relacionada a componentes pré-formados, uma vez que ao infectar os caramujos, os microrganismos geram uma variedade de repostas que são moduladas de acordo com o patógeno (HANELT *et al.*, 2008).

A partir do final da década de 1990, foram intensificados estudos moleculares sobre os caramujos do gênero *Biomphalaria*, particularmente sobre a espécie *B. glabrata*. Estudos em hemócitos mostraram que a expressão de alguns genes era alterada em linhagens susceptíveis e resistentes de *B. glabrata* infectado com *S. mansoni* (MILLER *et al.*, 2001). Mitta *et al.* (2005) dividiram os transcritos diferencialmente expressos de genes imune relevantes em seis grupos funcionais: efetores de defesa celular, proteases, inibidores de protease, genes de adesão celular, receptores de reconhecimento padrão e genes reguladores imunes. Os

receptores de reconhecimento padrão mais estudados são os FREPs. Hertel *et al.* (2005) mostraram que os FREPs 2 e 4 são diferencialmente expressos em *B. glabrata* resistentes e susceptíveis pós-infecção com *S. mansoni*. Hanington *et al.* (2010) mostraram que o FREP 3 é diferencialmente expresso em *B. glabrata* resistentes e susceptíveis pós-infecção com *S. mansoni* e pós infecção com *Echinostoma caproni*.

No entanto os trabalhos existentes quase que em sua totalidade estudam a espécie *B. glabrata*, excluindo a espécie *B. straminea* que apresenta ampla distribuição no Brasil e um perfil diferenciado de suscetibilidade em relação a *B. glabrata*, não permitindo saber se existe variação no comportamento dos hemócitos e na produção de componentes relacionados ao sistema de defesa (fenoloxidase, FREPs 3 e 4) entre as espécies (*B. glabrata* e *B. straminea*) com diferentes perfis de susceptibilidade frente à infecção pelo *S. mansoni*.

1.1 Hipótese

A produção de componentes relacionados ao sistema de defesa (fenoloxidase, FREPs 3 e 4) e de hemócitos é maior em espécies que possuem menor susceptibilidade ao *S. mansoni* (*B. straminea*) do que em espécies mais susceptíveis (*B. glabrata*) frente à infecção por *S. mansoni*.

2 MARCO TEÓRICO CONCEITUAL

2.1 O gênero *Biomphalaria*

O gênero *Biomphalaria* pertence à Família Planorbidae, que compõe os moluscos pulmonados que possuem concha geralmente planispiral, fazendo parte da classe Gastropoda, que constitui cerca de 75% do total das espécies do filo Mollusca. Este gênero é considerado de grande importância médica já que algumas de suas espécies de caramujos são hospedeiras intermediárias para o verme causador da esquistossomose, o trematódeo *Schistosoma mansoni* (BRASIL, 2007).

Os caramujos *Biomphalaria* são moluscos de água doce, habitando rios, lagos, córregos, canais, geralmente em locais de águas rasas. Esses moluscos ocorrem principalmente em áreas tropicais, nos continentes da África, América do Sul e América Central, além da Arábia (TOLEDO; FRIED, 2007), não se podendo atribuir totalmente a fatores como variação de climas, topografia e vegetação a ocorrência ou não de moluscos do gênero *Biomphalaria* (PIERI, 1995). No entanto, os focos de transmissão de esquistossomose geralmente têm características ecológicas em comum, localizados no peridomicílio de comunidades urbanas ou rurais que não possuem saneamento básico (BRASIL, 2007).

A ocorrência de caramujos do gênero *Biomphalaria* está relacionada a fatores como a temperatura da água, já que temperaturas fora da faixa ideal interferem na reprodução destes caramujos (SOUZA *et al.*, 1990). Outro fator que influencia na ocorrência de *Biomphalaria* é o pH da água, o intervalo ideal é de 6 a 8, fora dessa faixa o pH desfavorece a sobrevivência destes moluscos (BRASIL, 2007). Quanto a salinidade da água, mesmo vivendo em ambientes dulcícolas cuja salinidade é de 0,5%, já foi relatado em Pernambuco a ocorrência de caramujos que suportam índices de salinidade 15 vezes maior (SILVA *et al.*, 2006). Outros fatores como condutividade e quantidade de matéria orgânica dissolvida na água, assim como iluminação do local também afetam a ocorrência de *Biomphalaria* (TOLEDO; FRIED, 2007).

A maior parte das espécies de *Biomphalaria* foi descoberta no século XIX, sendo as espécies classificadas, na época, a partir da anatomia da sua concha, hoje as espécies deste gênero também são diferenciadas a partir de estudos genéticos e moleculares. São encontradas 12 espécies do gênero *Biomphalaria* na África e 11 na América do Sul (TOLEDO; FRIED, 2007). No Brasil são encontradas 10 espécies e uma subespécie, sendo divididas em três

grupos: hospedeiras intermediárias naturais, aquelas que se infectam por *S. mansoni* em condições naturais, hospedeiras intermediárias potenciais, aquelas que se infectam por *S. mansoni* apenas em condições laboratoriais, e não hospedeiras, aquelas que são totalmente refratárias à infecção por *S. mansoni* (Quadro 1).

O hospedeiro intermediário é vital no ciclo do parasito, desenvolvendo uma ou todas suas formas larvais. As espécies que funcionam como hospedeiras intermediárias naturais para o *S. mansoni* são: *Biomphalaria straminea*, *Biomphalaria tenagophila*, e *Biomphalaria glabrata*. Apenas em 2 estados brasileiros não foi constatada a presença de hospedeiros intermediários para o *S. mansoni* são os estados do Amapá e Rondônia (BRASIL, 2007).

Quadro 1 – Espécies e subespécie de *Biomphalaria* que ocorrem no Brasil

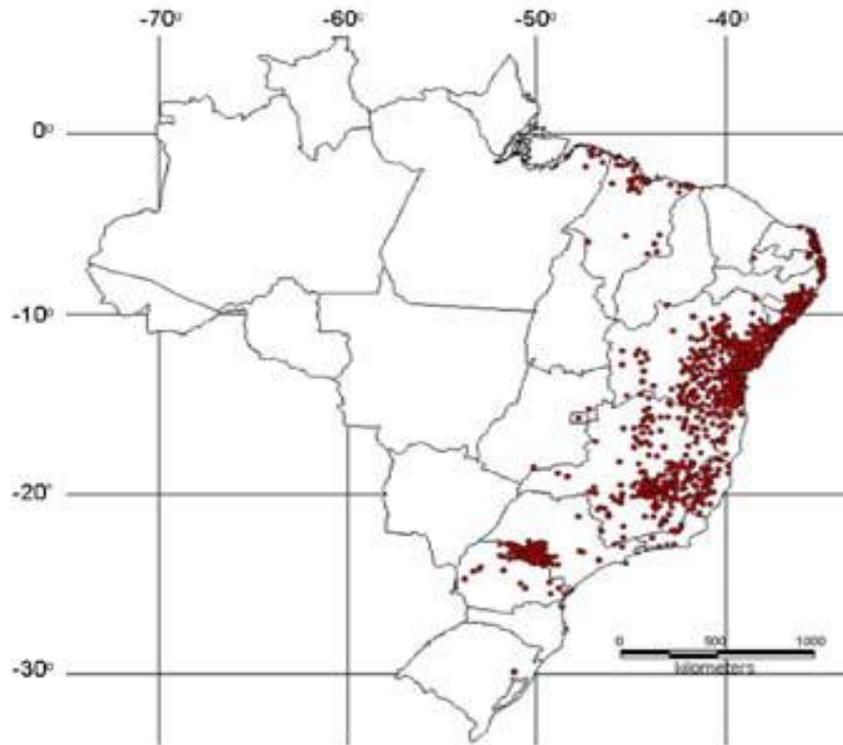
| Tipo de hospedeiros | Espécies |
|----------------------------|---|
| Hospedeiras naturais | <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) |
| | <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Orbigny, 1835) |
| | <i>Biomphalaria straminea</i> (Dunker, 1848) |
| Hospedeiras potenciais | <i>Biomphalaria amazonica</i> Paraense, 1966 |
| | <i>Biomphalaria peregrina</i> (Orbigny, 1835) |
| Não hospedeiras | <i>Biomphalaria intermedia</i> (Paraense & Deslandes, 1962) |
| | <i>Biomphalaria kuhniana</i> (Clessin, 1883) |
| | <i>Biomphalaria schrammi</i> (Crosse, 1864) |
| | <i>Biomphalaria oligoza</i> Paraense, 1975 |
| | <i>Biomphalaria occidentalis</i> Paraense, 1981 |
| | <i>Biomphalaria tenagophila guaiensis</i> Paraense, 1984 |

Fonte: Brasil (2007)

A espécie com o maior potencial de infecção por *S. mansoni* e a que mais vem sendo foco de estudos entre aquelas do gênero *Biomphalaria* é a espécie *B. glabrata*. Um dos fatores que contribuem para isso é a sua facilidade de criação e sua maior massa corpórea, tendo em vista que um caramujo de maior massa, quando infectado, é capaz de eliminar um maior número de cercárias (EVELAND; RITCHIE, 1972). Esta é utilizada como modelo e é testada frente às infecções de diferentes microrganismos como bactérias e *Echinostoma paraensei* (ADEMA *et al.*, 2010), *E. caproni* (MITTA *et al.*, 2005), *S. mansoni* (BAYNE, 2009) e tinta nanquin (SETA *et al.*, 1996), no Brasil ela está distribuída em 16 estados (Figura 1) sendo a

maior parte deles das Regiões Nordeste e Sudeste, estando a distribuição desta espécie, quase sempre associada à distribuição da esquistossomose (BRASIL, 2007).

Figura 1 - Distribuição geográfica de *Biomphalaria glabrata* no Brasil.



Fonte: Brasil (2007)

A espécie *B. straminea* é descrita por muitos autores como uma espécie de baixa suscetibilidade, apresentando uma taxa de infecção bem menor (SOUZA *et al.*, 1987) em comparação com *B. glabrata*. Dias *et al.* (1987) mostraram que caramujos *B. straminea* do estado de São Paulo apresentaram reduzida taxa de eliminação de cercárias quando infectados com uma cepa simpátrica de *S. mansoni*, mas não liberavam cercárias quando infectados com uma cepa de Minas Gerais. Fernandez e Thiengo (2010) mostraram em seu estudo com *B. straminea*, provenientes do estado de Tocantins, que apenas 0,6 % destes moluscos se infectaram com a cepa BH de *S. mansoni*, enquanto essa taxa foi de 80% quando os caramujos estudados foram da espécie *B. glabrata*. Com cepas de *S. mansoni* de Pernambuco e do Ceará, a taxa de infecção de *B. straminea* foi de 0%.

B. straminea é a espécie de mais ampla distribuição no país ocorrendo em 24 estados e no Distrito Federal (Figura 2) (BRASIL, 2007). Um estudo da década de 1970 mostrou que esta espécie poderia estar sendo introduzida em áreas onde sua ocorrência nunca fora descrita, a partir do transporte de peixes oriundos de locais com ocorrência comprovada de *B. straminea*, caracterizando-se assim um fenômeno de dispersão passiva, que poderia estar aumentando a distribuição geográfica deste molusco (CORRÊA *et al.*, 1970).

Figura 2 - Distribuição geográfica de *Biomphalaria straminea* no Brasil.



Fonte: Brasil (2007)

2.2 A esquistossomose e o parasito *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose é uma das maiores parasitoses do mundo, constituindo um grave problema de saúde pública em vários países. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2012), estima-se que mais de 200 milhões de pessoas estejam infectadas e outros 700 milhões estejam em situação de risco em 77 países que são considerados áreas endêmicas. Destes, 51 países apresentam populações que necessitam de tratamento preventivo.

A esquistossomose tem como agentes etiológicos os trematódeos do gênero *Schistosoma* que pertence à subclasse Digenea, sendo encontradas cinco espécies capazes de infectar o homem:

- a) *S. mansoni* Sambon 1907, que ocorre na América do Sul, na África, em algumas ilhas do Caribe, e em alguns locais da península arábica;
- b) *S. haematobium* Bilharz 1852, que ocorre em partes do Oriente médio e principalmente nos países da África;
- c) *S. japonicum* Katsurada 1904, que é encontrado na China, Indonésia e Filipinas, o *S. intercalatum* Fisher 1934, descrito em dez países da África;
- d) *S. mekongi* Voge, Bruckner e Bruce 1978, encontrado no Camboja e no Laos;
- e) *S. intercalatum* Fisher, 1934, que é encontrado em duas áreas endêmicas na África.

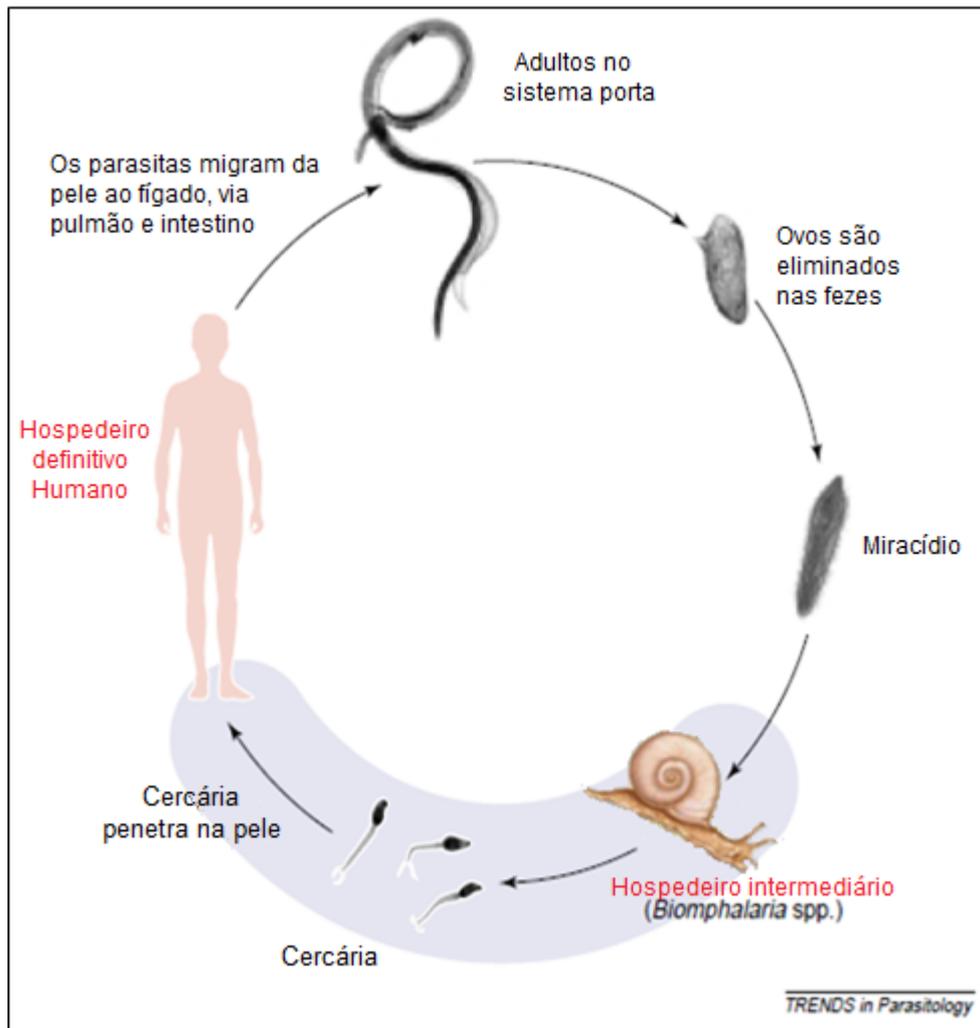
Além dessas espécies, outras podem eventualmente infectar o homem como o *S. bovis* Sonsino 1876 e *S. mattheei* Veglia e Le Roux 1929, assim como algumas espécies de *Schistosoma* que parasitam aves (GOLDMAN; AUSIELLO, 2005).

No Brasil e em outros países com regiões endêmicas, a esquistossomose causada pelo *S. mansoni*, é uma doença associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico. O péssimo saneamento básico nestas áreas possibilita o surgimento de ótimos criadouros agravados pela atividade humana a partir da necessidade de utilização de água por parte da população. Dados do último inquérito nacional mostraram que a prevalência da doença no Brasil era de 3,75% em 333.427 amostras analisadas entre os anos de 1977 e 1981, provenientes de crianças e jovens adolescentes (KATZ; PEIXOTO, 2000). Estimativas do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) mostram que na década de 1990 o percentual de pessoas infectadas ficou entre 7% e 11% em meio a população analisada, sendo reduzida com a entrada do novo milênio (COURA; AMARAL, 2004). No entanto esses dados não contemplam uma avaliação detalhada da doença no país e podem estar mascarando uma prevalência real da esquistossomose (KATZ; PEIXOTO, 2000). Para solucionar a falta de informações de cerca de 30 anos desde o inquérito de 1977 a 1981, está sendo realizado um novo Inquérito Nacional de Prevalência iniciado em outubro de 2010, ainda não finalizado.

No seu ciclo de vida o parasito *S. mansoni* passa por diversas fases: ovo, miracídio, esporocisto primário e secundário, cercária, esquistossômulo e verme adulto, tendo reprodução assexuada no hospedeiro intermediário e sexuada no hospedeiro definitivo (NEVES *et al.*, 2005). (Figura 3). Os ovos postos pelos vermes adultos atravessam a mucosa intestinal e são eliminados nas fezes da pessoa infectada, se essas fezes entrarem em contato com a água doce de coleções hídricas na presença de luz e calor, os ovos se rompem, e os miracídios eclodem, estes são larvas livres nadantes com tamanho de 160 µm por 60 µm e que apresenta fototropismo, ela nada ativamente durante um período de duas a três horas

reduzindo sua atividade nas horas seguintes. Enquanto está nadando o miracídio pode encontrar seus hospedeiros intermediários do gênero *Biomphalaria*, aderindo ao seu tegumento o miracídio ejeta seu conteúdo interno dentro dos tecidos do caramujo, transformando-se em esporocisto primário cerca de oito dias pós-infecção (REY, 2011).

Figura 3 - Desenho esquemático do ciclo de vida do *S. mansoni*.



Fonte: Adaptado de Mckerrow e Salter (2002, tradução nossa)

O esporocisto primário é uma estrutura sacular repleta de células germinativas formadas por poliembrionia que dão origem aos esporocistos secundários, onde cerca de quatro semanas pós-infecção originam as cercárias, a forma infectante do parasito *S. mansoni* para o homem. As cercárias se locomovem pelos tecidos do hospedeiro intermediário, onde provocam a formação de vesículas e saem do corpo do caramujo para o meio exterior. O corpo da cercária é alongado e achatado dorso-ventralmente, formado de corpo e cauda, o corpo possui cerca de 200 μm e a cauda 300 μm . A cauda permite a locomoção da cercária na

água, locomovendo-se quase sempre em direção à superfície, o contato do homem com a água contaminada com cercárias, faz com que essas penetrem ativamente pela pele do hospedeiro, perdendo a cauda e transformando-se em esquistossômulo. Os esquistossômulos entram na circulação sanguínea, passam pelo coração e pelos pulmões e em seguida pelo fígado chegando ao sistema porta intra-hepático, onde completam seu desenvolvimento transformando-se em vermes adultos, estes apresentam dimorfismo sexual, o macho é menor com cerca de 1 cm de comprimento apresentando uma reentrância longitudinal, o canal ginecóforo, já a fêmea possui comprimento entre 1,2 cm e 1,6 cm com corpo cilíndrico, vivendo dentro do canal ginecóforo do macho. Após o acasalamento, os vermes migram para vênulas do intestino onde põem os ovos que atravessam a parede intestinal e são eliminados pelas fezes (REY, 2011).

2.3 A relação parasita/hospedeiro

Grande parte das espécies da subclasse Digenea, da qual *S. mansoni* faz parte, depende de moluscos para completar seu desenvolvimento, isso está relacionado a um alto grau de especificidade entre o parasito e seu hospedeiro intermediário (CRIBB *et al.*, 2003). Neste ocorre a multiplicação do parasito, como resultado, além da influência de fatores ambientais, de suas características genéticas que possibilitam o ajustamento fisiológico entre a larva infectante e o molusco, como também dos mecanismos intrínsecos de defesa dos moluscos (MACHADO *et al.*, 1988). Acredita-se que a especificidade ocorra principalmente nos primeiros estágios da infecção (ADEMA *et al.*, 2010).

Os primeiros estudos relatando a relação parasita/hospedeiro entre caramujos *Biomphalaria* e *S. mansoni* com relação a susceptibilidade dos caramujos, foram publicados na década 50, já são mais de 60 anos investigando como se dá essa interação em diversas espécies de *Biomphalaria* frente à infecção por *S. mansoni* (TOLEDO; FRIED, 2007).

O sistema imune de *B. glabrata* tem extrema importância na capacidade de infecção por diferentes parasitos, em um estudo feito por Adema *et al.* (1997), foram descobertas proteínas que tinham sua tradução aumentada para uma linhagem resistente em comparação a uma linhagem susceptível de *B. glabrata* em relação à infecção pelo Digenea *Echinostoma paraensei*, essas proteínas foram chamadas de FREPs (Fibrinogen related proteins), e tinham a capacidade de precipitar proteínas derivadas de parasitos. O sistema imune parece também variar com a idade e o tamanho dos caramujos, em *B. glabrata* caramujos jovens podem

apresentar taxas de infectividade maiores que caramujos adultos (RICHARDS *et al.*, 1992; LARSON *et al.*, 2014).

Uma das visões recentes da relação parasita/hospedeiro envolvendo *S. mansoni* e seus hospedeiros do gênero *Biomphalaria* baseia-se no chamado polimorfismo de compatibilidade, que é o fenômeno onde a virulência do parasito e a defesa do hospedeiro entram em equilíbrio (MITTA *et al.*, 2012). Esse polimorfismo de compatibilidade depende da variabilidade de antígenos dos miracídios e da variedade de moléculas efetoras do sistema imune de *Biomphalaria* spp. Uma dessas classes de antígenos, que possui grande função na compatibilidade parasita/hospedeiro, são as Mucinas Polimórficas de *S. mansoni* (SmPoMucs). Essas moléculas são produzidas por cerca de 10 genes, e são altamente polimórficas, produzidas por diversos tipos de *splicing* e sofrendo diferentes tipos de glicosilações, onde cada indivíduo poderia produzir um padrão específico (MITTA *et al.*, 2012).

Essa compatibilidade pode variar entre linhagens mantidas em laboratórios e linhagens selvagens, com caramujos *B. glabrata* e miracídios de mesmo local de origem, onde uma dose de 10 a 20 miracídios por caramujo pode causar 100% de infecção. A compatibilidade pode cair para 50% depois de uma geração de laboratório (F1) de ambas as linhagens de parasito e hospedeiro, proporção essa que se mantém nas gerações seguintes (BECH *et al.*, 2010).

2.4 O sistema imune de *Biomphalaria* spp.

Em seu sistema de defesa os moluscos possuem uma resposta inata bastante desenvolvida, subdividida em defesa humoral, representada principalmente por proteínas plasmáticas presentes na hemolinfa, e defesa celular, mediada por hemócitos (VARGAS-ALBORES *et al.*, 2001).

Um estudo *in vitro* realizado por Santos e Rodrigues (2006) mostrou que a exposição de miracídios à fase solúvel da hemolinfa resultou na morte de 100% dos miracídios, indicando assim que a hemolinfa possui compostos capazes de reagir contra patógenos. Esses compostos são formados, entre outros por PRRs (receptores de reconhecimento padrão) não associados a membranas, que são compostos principalmente por PGRPs (Proteínas de reconhecimento de peptidoglicano) (TOLEDO; FRIED, 2007) e pela grande e diversificada família de FREPs (ADEMA *et al.*, 1997). Além destes PRRs a fração solúvel da hemolinfa também contém

outras enzimas com participação na resposta imune como fosfatases e proteinases (BOUCHUT *et al.*, 2007).

Na resposta celular o primeiro passo para sua ativação é o reconhecimento dos parasitos pelos hemócitos (NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2012). Nos caramujos mais suscetíveis à infecção, os esporocistos podem se desenvolver quase sem reação tecidual, contudo em caramujos mais resistentes, a destruição dos parasitos está frequentemente associada a reações de adesão e de encapsulamento dos esporocistos por hemócitos, reações que ocorrem no espaço de poucas horas (GUARALDO *et al.*, 1981; NEGRÃO-CORRÊA *et al.*, 2012), havendo também um segundo mecanismo de resposta hemocitária ocorrendo geralmente em caramujos bastante susceptíveis como *B. glabrata*, onde há uma resposta imunológica tardia havendo formação de granulomas quando os miracídios já estão disseminados pelo indivíduo (SOUZA *et al.*, 1997). Quando comparadas uma linhagem susceptível e resistente de *B. tenagophila*, se percebe que na linhagem resistente a camada de hemócitos é muito mais espessa, apresentando muito mais hemócitos que a linhagem susceptível (NACIF-PIMENTA *et al.*, 2012). A capacidade de adesão dos hemócitos também influencia muito na susceptibilidade, linhagens mais resistentes possuem um maior número de hemócitos “spread” que linhagens mais susceptíveis (LARSON *et al.*, 2014).

Além de promover o encapsulamento, os hemócitos também são responsáveis pela realização de fagocitose e pela liberação de substâncias citotóxicas, sendo essenciais na eliminação do parasito. Dessa forma, os hemócitos representam a principal linha de defesa de moluscos contra a invasão de parasitos. A ação dos hemócitos é auxiliada por uma classe de proteínas conhecida como lectinas, estas podem ter uma importância na interação inicial entre os hemócitos e os parasitos, além disso, elas atuam como opsoninas facilitando a fagocitose de microrganismos (VARGAS-ALBORES *et al.*, 2001).

Os estudos sobre o sistema interno de defesa de diversos invertebrados revelam que os mecanismos de defesa envolvidos no reconhecimento e eliminação do parasito se mostram bastante diversos, assim como a fagocitose, existe também produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, de peptídeos antimicrobianos, de matriz extracelular, e também ocorrência de melanização (GONZALEZ-SANTOYO; CÓRDOBA-AGUILAR, 2011).

A melanização é um mecanismo de defesa amplamente conhecido em insetos e também estudado em outros invertebrados, e tem como um dos principais ativadores a enzima fenoloxidase, que é um ponto chave neste processo (LING; YU, 2005). A ativação do processo de melanização é um processo mediado por células, ocorrendo unicamente no sítio

onde está localizado o parasito. Em insetos a melanina é produzida logo na região de penetração do parasito e também nos tecidos ao redor deste (NAPPI; CHRISTENSEN, 2005).

Em invertebrados a fenoloxidase é sintetizada de forma inativada sendo denominada profenoloxidase, a qual vem a ser ativada através de uma cascata mediada por uma serino-protease gerando a fenoloxidase ativada, que em insetos parece ser liberada após a lise celular dos hemócitos (NAPPI; CHRISTENSEN, 2005). A fenoloxidase da continuidade a uma cascata que utiliza monofenóis e catecóis e resulta na formação da melanina, como também, de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que também participam na defesa contra parasitos (GONZALEZ-SANTOYO; CÓRDOBA-AGUILAR, 2011).

Um trabalho realizado com a larva *Manduca sexta* mostrou que havia uma maior ativação da profenoloxidase quando as larvas sofriam danos no tegumento, ou eram desafiadas com injeção de microesferas (LING e YU, 2005). Ao analisar a libélula *Hetaerina americana* Contreras-Garduño *et al.* (2007) observaram que a inoculação da bactéria *Serratia marcescens* estimulou o aumento da produção da fenoloxidase em machos mais territoriais. Entretanto em outros casos a enzima fenoloxidase parece não estar fortemente envolvida com a defesa contra patógenos em invertebrados. Mucklow *et al.* (2004) mostrou que a atividade da fenoloxidase não é útil para medir a imunocompetência e a resistência do crustáceo *Daphnia magna* a parasitos.

A fenoloxidase em *Biomphalaria glabrata* foi primeiramente estudada por Bai *et al.* (1996) no sistema reprodutivo dessa espécie, sem ter foco voltado a sua imunidade. Bahgat *et al.* (2002) mostraram que os níveis da fenoloxidase não variavam entre uma linhagem resistente e susceptível de *B. glabrata* sadios quando um *pool* de hemolinfa foi analisado, entretanto revelaram também que a produção da fenoloxidase varia bastante entre os espécimes estudados. Além disso foi relatado neste trabalho que a variação das serino-proteases não acompanha a variação da fenoloxidase.

Além de variar entre linhagens susceptíveis e resistentes da mesma espécie, a resposta imune desses moluscos pode variar consideravelmente entre espécies diferentes. Estudos mostraram que há diferença entre a resposta em *B. glabrata* e *B. straminea* quanto à quantidade de hemócitos. A espécie *B. straminea* tem um declínio do número de hemócitos mais lento que a espécie *B. glabrata* (SANTOS; RODRIGUES, 2003).

O sistema imune desses moluscos também é capaz de responder a vários outros estímulos. Em estudo realizado por Seta *et al.* (1996), foi demonstrado que a resposta imune

contra *S. mansoni* varia entre as espécies. Respondendo também a diferentes estímulos como injeção de tinta nanquim e injeção simulada. Esses autores também demonstraram que o pico hemocitário após a infecção com *S. mansoni* em *B. glabrata* ocorre duas horas após a infecção e que o número de hemócitos cai gradativamente após esse período.

Mesmo com uma resposta inata bastante desenvolvida, a resposta imune destes caramujos não está só relacionada a componentes pré-formados existentes, ao infectar os caramujos, os microrganismos geram uma variedade de repostas que são moduladas de acordo com o patógeno (HANELT *et al.*, 2008). Alguns autores também relatam dúvidas sobre a presença única de uma resposta inata, há suposições de que existem dois tipos de resposta secundária, a primeira seria quando o invertebrado é pré-exposto a um patógeno tendo a atividade imune aumentada por algum tempo e não se infectaria em uma nova exposição, a segunda é que o invertebrado desenvolveria uma resposta específica (HANINGTON; FORYS; *et al.*, 2010). Vários estudos tentam compreender como se dão as vias destas respostas e elucidar o porquê de algumas linhagens do gênero *Biomphalaria* serem resistentes à infecção pelo *S. mansoni*.

2.5 O envolvimento de alguns genes e suas proteínas na susceptibilidade do hospedeiro ao parasito

Dada a complexidade de se estudar essa relação de parasitismo, diversos estudos utilizando-se das mais variadas técnicas são realizados focando nos antígenos dos miracídios e no sistema imune dos caramujos.

Uma abordagem que vem se tornando comum é o estudo do transcriptoma e do proteoma destes moluscos hospedeiros. Boyer (1994) encontrou uma proteína semelhante ao Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) na hemolinfa de *B. glabrata* estando seu nível diminuído durante a infecção por *S. mansoni*. Outra proteína encontrada na hemolinfa de *B. glabrata* apresenta características semelhantes à interleucina 1 (IL-1), estando associada à ativação e proliferação celular (HUGHES *et al.*, 1991; RAFTOS *et al.*, 1991, 1992), ao aumento da fagocitose (BECK, 1993; BURKE; WATKINS, 1992) e com a produção de superóxidos (GRANATH *et al.*, 1994). Caramujos de linhagens resistentes de *B. glabrata*, apresentam níveis maiores de proteínas semelhantes a IL-1 em comparação com as linhagens suscetíveis, eles também mantêm quantidades significativamente altas durante a exposição pelo *S. mansoni* em relação a essas últimas linhagens (GRANATH *et al.*, 1994), recentemente

foi encontrada uma proteína citolítica denominada de Biomphalysin capaz de se ligar nas membranas dos parasitas e se polimerizar promovendo a formação de poros (GALINIER *et al.*, 2013).

Em um estudo feito por Adema *et al.* (1997) foram descobertas proteínas que tinham sua tradução aumentada para uma linhagem resistente em comparação a uma linhagem susceptível de *B. glabrata*, essas proteínas, os FREPs, tinham a capacidade de precipitar proteínas derivadas de parasitas. A partir deste estudo e graças ao desenvolvimento e facilidade de acesso a novas técnicas de biologia molecular, várias outras pesquisas foram e vêm sendo realizadas com enfoque na diferença de expressão de genes e proteínas de *B. glabrata* susceptíveis e resistentes a *S. mansoni*, e a outros modelos de parasito como o *E. caproni*.

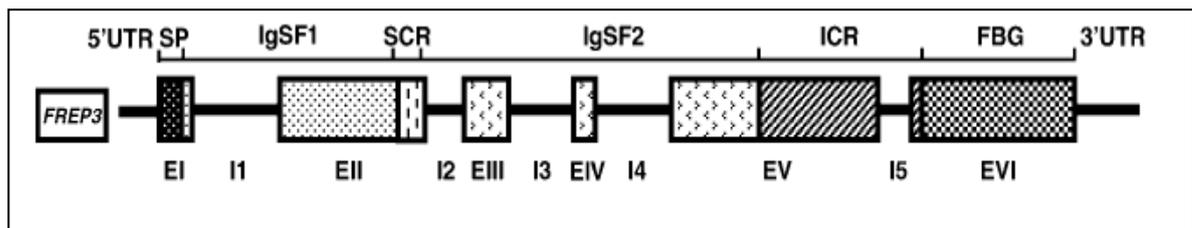
Miller *et al.* (2001) mostraram a partir de um estudo em hemócitos que a expressão de alguns genes era alterada em linhagens susceptíveis e resistentes de *B. glabrata* quando este era infectado com *S. mansoni*. A expressão de genes relacionados à imunidade também pode ser aumentada ou diminuída quando o *B. glabrata* é infectado com *E. caproni* (GUILLOU *et al.*, 2007). O aumento e a diminuição na expressão de alguns genes imuno relevantes de *B. glabrata* também foram mostrados por Adema *et al.* (2010), que relataram diferenças na expressão de genes relacionados à lectinas, adesão celular, peptídeos antimicrobianos e resposta imune de *B. glabrata* frente à infecção com diferentes microrganismos. Mitta *et al.* (2005) ao estudarem *B. glabrata* susceptíveis e resistentes a *E. caproni* pós-infecção dividiram os transcritos diferencialmente expressos de genes imuno relevantes em seis grupos funcionais: efetores de defesa celular, proteases, inibidores de protease, genes de adesão celular, receptores de reconhecimento padrão e genes reguladores imunes.

Entre os principais receptores de reconhecimento padrão estão os FREPs, essas são moléculas altamente diversificadas, existem pelo menos 14 genes codificando os FREPs (MITTA *et al.*, 2012), há evidências que mostram que esses FREPs sofrem processo de splicing alternativo, aumentando ainda mais sua variabilidade (ZHANG; LOKER, 2003).

Os FREPs são lectinas que apresentam dois domínios principais distintos, um desses é o domínio N-terminal Ig, semelhante a superfamília das imunoglobulinas, que são regiões com a estrutura dobrada, composta de duas fitas β antiparalelas unidas por pontes dissulfeto. O outro domínio é o C-terminal FBG, este é um domínio que codifica fibrinogênio β/γ , ele apresenta-se semelhante as ficolinas. Em sua estrutura básica ele apresenta um peptídeo sinal, seguido de um domínio Ig, uma região ICR (região intercedente) e um domínio de

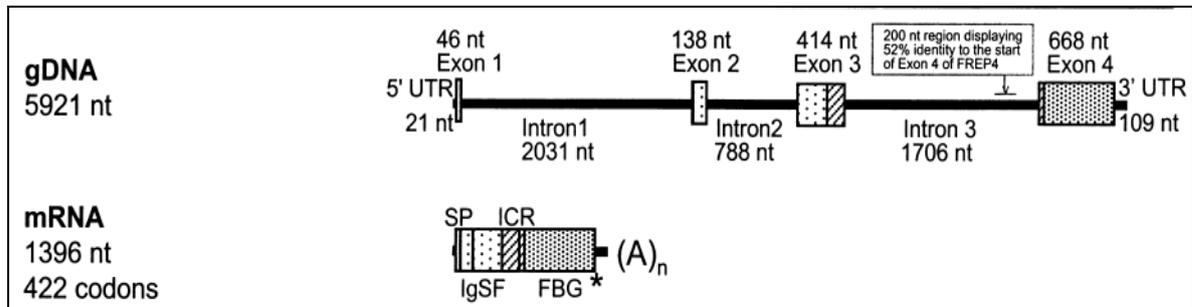
fibrinogênio C-terminal. A região ICR é bastante variável entre os tipos de FREPs, variando em tamanho e sequências de bases, já o domínio FBG se apresenta mais conservado (LÉONARD *et al.*, 2001). Com relação ao domínio IgSF este pode apresentar-se com um domínio que ocorre apenas uma vez ou em duas ou mais em tandem (ZHANG; LOKER, 2003). As figuras 4 e 5 mostram a estrutura de dois tipos de FREPs, o FREP 3 que possui dois domínios IgSF e o FREP 4 que apresenta apenas um domínio deste tipo.

Figura 4 – Estrutura do FREP 3



Fonte : Zhang *et al.* (2001)

Figura 5 – Estrutura do FREP 4



Fonte : Léonard *et al.* (2001)

Uma das moléculas que se ligam aos FREPs são as BgTEPs, essas moléculas com características de tioéster, funcionam como supostas opsoninas que se associam aos FREPs quando estes estão ligados aos parasitos. Antes de se ligar ao complexo FREP/parasito essa proteína é clivada e ativada, recrutando os hemócitos. Dessa forma essa molécula pode ter um papel crucial na resposta à infecção pelo *S. mansoni* (MONÉ *et al.*, 2010)

Os FREPs são identificados por suas subfamílias, sendo nomeados assim FREPs 1, 2, 3, 4 ..., cada uma dessas subfamílias de FREPs apresenta características próprias. Contudo dentro de cada uma dessas subfamílias há diferentes variantes sendo nomeados por exemplo FREPs 2.1, 2.2, 2.3 ... (ZHANG; LOKER, 2003).

Os genes dos FREPs 2 e 4 foram descritos como super expressos quando uma linhagem resistente de *B. glabrata* é infectada com *S. mansoni* em comparação com uma linhagem

suscetível de *B. glabrata* (HERTEL *et al.*, 2005). O FREP 3 foi descrito como super expresso em uma linhagem de resistente de *B. glabrata* quando está infectada com *Echinostoma caproni*. O papel do FREP 3 na defesa contra trematódeos é evidenciado quando sua expressão foi reduzida através do uso de RNA de interferência, fazendo com que 30% dos caramujos resistentes se tornassem susceptíveis frente a infecção com *E. caproni* (HANINGTON *et al.*, 2010). Sendo também, capaz de se ligar a domínios de bactérias Gram positivas e Gram negativas (ZHANG *et al.*, 2008).

No entanto os trabalhos existentes, quase que em sua totalidade, estudam a espécie *B. glabrata*, excluindo a espécie *B. straminea* que apresenta ampla distribuição no Brasil e um perfil diferenciado de suscetibilidade em relação a *B. glabrata*.

3 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que o controle da esquistossomose é considerada como uma das uma das tarefas difíceis dos serviços de saúde pública, e que uma das fortes razões para isso é a ampla difusão dos hospedeiros intermediários, se faz necessário intensificar o estudo sobre estes moluscos hospedeiros.

Devido a lacunas existentes no conhecimento sobre a expressão gênica como descrito anteriormente, e a dúvidas existentes sobre a ocorrência única de uma resposta inata nestes moluscos hospedeiros, o presente trabalho se propôs a estudar variações no número de hemócitos bem como variação na produção de efetores da defesa como a fenoloxidase e os FREPs 3 e 4 em *B. glabrata* e *B. straminea* que se mostram susceptível e menos susceptível a infecção pelo *S. mansoni*, bem como em caramujos pré-expostos a antígenos de *S. mansoni*, com o intuito de verificar a capacidade adaptativa nas infecções subsequentes à uma primeira exposição a antígenos de *S. mansoni*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar o comportamento dos hemócitos e a produção e expressão de compostos relacionados ao sistema de defesa do gênero *Biomphalaria* em espécies de diferentes perfis de suscetibilidade a *S. mansoni*, sadios e infectados por este parasito, em caramujos previamente expostos e não expostos a antígenos de *S. mansoni*.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar a dinâmica hemocitária em caramujos sadios, infectados e infectados expostos a partículas de *S. mansoni*, em linhagens *B. glabrata* e *B. straminea*;
- b) Analisar a atividade de fenoloxidase em caramujos sadios, infectados e infectados expostos a partículas de *S. mansoni*, em linhagens *B. glabrata* e *B. straminea*;
- c) Identificar quais os tipos de hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* são responsáveis pela produção de fenoloxidase;
- d) Analisar os níveis de expressão dos genes de FREP 3 e FREP 4 em *B. glabrata* e *B. straminea* sadios, infectados com *S. mansoni*;
- g) Analisar os níveis de expressão gênica dos FREP 3 e FREP 4 em *B. glabrata* e *B. straminea* sadios, infectados com *S. mansoni*, estando previamente expostos a partículas de *S. mansoni*;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos moluscos

Os moluscos utilizados foram todos provenientes de linhagens de laboratório mantidas no Serviço de Referência de esquistossomose do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Para o estudo foram utilizadas as espécies *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea* (linhagens provenientes do município de São Lourenço da Mata/Pernambuco).

5.2 Delimitação dos grupos para análise

Para os experimentos, os caramujos de cada espécie foram divididos em quatro grupos:

- a) **Grupo 1:** 10 caramujos (sadios para *Schistosoma mansoni*), caracterizando-se como grupo controle.
- b) **Grupo 2:** 10 caramujos submetidos à infecção por miracídios de *S. mansoni*.
- c) **Grupo 3:** 10 caramujos pré expostos a antígenos de *S. mansoni* e não infectados.
- d) **Grupo 4:** 10 caramujos pré expostos a antígenos de *S. mansoni*, submetidos após 4 dias à infecção por miracídios de *S. mansoni*.

5.3 Infecção dos camundongos com *Schistosoma mansoni*

Os camundongos foram colocados em um recipiente contendo uma quantidade mínima de água morna para que os animais eliminassem fezes e urina. O inóculo contendo cerca de 120 cercárias por camundongo foi colocado em frascos de vidro individuais de boca larga, com tampas aeradas (furadas), onde, em seguida foram colocados os animais de modo que a água contendo o inóculo de cercárias cobrisse as patas e a cauda do camundongo, ficando os animais em contato com o inóculo em torno de uma hora, sob fonte de luz direta (que funciona como um ativador), facilitando a penetração do patógeno¹.

¹ Adaptado de CEUA FIOCRUZ/PE, Protocolo de Procedimento 006/ 2010

5.4 Obtenção dos miracídios

Os miracídios destinados a infecção dos moluscos foram obtidos a partir da técnica de sedimentação espontânea das fezes de camundongos infectados com a cepa LE de *S. mansoni*. As fezes foram maceradas, diluídas em água destilada e filtradas em gaze para um cálice de sedimentação e colocadas em repouso por 24 horas, a temperatura de 8 °C, na ausência de luz. Posteriormente os ovos foram expostos à luz artificial pelo período de uma hora para a eclosão dos miracídios.

Para preparação da solução do parasita particulado, os miracídios obtidos foram acondicionados em microtubos e levados a baixa temperatura por 10 minutos para diminuir sua motilidade, em seguida foi realizada centrifugação a 800xg para que os miracídios permanecessem no fundo do microtubo, sendo realizadas três lavagens com água milli Q estéril, a fim de reduzir a quantidade de contaminantes da solução. A solução com os miracídios foi em seguida levada ao sonicador, onde foi aplicada uma potência de 100 W por 20 segundos uma única vez, responsável por gerar a solução com os parasitas particulados, essa solução foi armazenada a -80° C até a data de utilização.

5.5 Infecção dos moluscos

Os caramujos do grupo 2 e do grupo 4 foram colocados individualmente na presença de 10 miracídios e deixados expostos à luz artificial por um período de aproximadamente duas horas. Os caramujos dos grupos 1 e 3 sofreram o mesmo estresse de exposição à luz e ao calor, que os grupos 2 e 4 durante a infecção com *S. mansoni*.

Os caramujos dos grupos 3 e 4 foram sensibilizados 4 dias antes da infecção com as partículas de *S. mansoni*. Essa solução foi injetada em caramujos nos previamente anestesiados com pentobarbital sódico.

5.6 Contagem dos hemócitos

Para contagem de hemócitos foram utilizados caramujos dos quatro grupos.

Após duas e vinte e quatro horas de infecção 5 µl de hemolinfa foi coletada por punção cefalopodal com auxílio de um capilar de vidro e de uma pipeta siliconizada. A hemolinfa

retirada foi colocada em um microtubo siliconizado para evitar a aderência dos hemócitos. O *pool* de 25 µl com a hemolinfa de 5 caramujos de cada grupo foi diluído de 1:1 com anticogulante, totalizando 50 µl de hemolinfa por microtubo.

A contagem de hemócitos foi realizada utilizando-se o iNCYTO C-Chip (DHC-N01) Neubauer Improved, para isso 10 µl do *pool* de hemolinfa de cada um dos grupos foi colocado na câmara de Neubauer em triplicata técnica. A visualização dos hemócitos foi feita sob microscópio óptico a um aumento de 400X. O número de células em quatro quadrados foi contado, de acordo com as instruções do fabricante, e o número total de hemócitos por microlitro de hemolinfa foi determinado a partir da equação:

$$\text{Células por } \mu\text{l} = \text{média da contagem por quadrante} \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times 10$$

Para a análise estatística da contagem total de hemócitos foi utilizado o software estatístico GraphPad Prism® 6.0, onde foi aplicado a análise de variância (ANOVA) seguida dos pós teste Tukey com nível de significância de 5%.

5.7 Recuperação dos hemócitos para ensaio da fenoloxidase e expressão gênica

A hemolinfa dos caramujos de cada grupo foi extraída através de punção cefalopodal com o auxílio de capilares de vidro no período de 2h e 24h pós-infecção no caso dos grupos 2 e 4 e no mesmo período para o grupo 1 e 3 pós-estresse. Para a extração da hemolinfa foi utilizado o anticoagulante contendo Solução Salina Balanceada de Hanks, 10 mM de EDTA, 25 mM de sacarose e 50 mM de citrato de sódio. 10 µl da hemolinfa obtida foram reservados para a dosagem de fenoloxidase e o restante posteriormente foi submetido à centrifugação em rotação 2000 X g por 20 minutos a uma temperatura de 4° C como descrito por Mitta *et al.* (2005). O sobrenadante foi descartado, ao pellet restante, contendo os hemócitos, foi adicionado 100 µl de tiocianato de guanidina e então armazenados a -80° C até a extração do RNA.

5.8 Avaliação da atividade da fenoloxidase

Os experimentos de dosagem de fenoloxidase visaram estabelecer o comportamento da atividade enzimática nas espécies estudadas e determinar seu envolvimento na imunidade do caramujo frente a infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

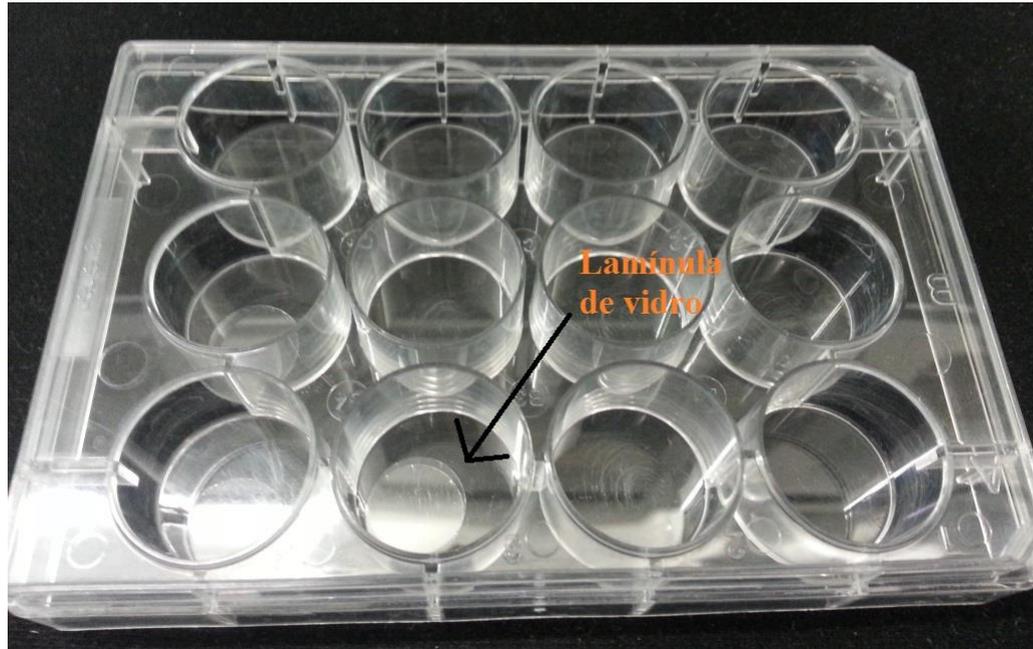
Uma quantia de 10 µl hemolinfa obtida no item 5.7 foi diluída de 1:10 com tampão PBS. Foi utilizada uma placa de 96 poços para realizar a leitura da fenoloxidase. Para cada reação (correspondente a um poço) foi adicionado 30 µl de hemolinfa mais 35 µl de tampão PBS e 35 µl do substrato L-DOPA (4 mg/ml). Os experimentos foram realizados em triplicata técnica e as leituras de absorbância foram realizadas em leitor de ELISA com comprimento de onda de 490 nm a cada dois minutos até o período de três horas e meia após a adição da L-DOPA. A análise estatística foi realizada empregando o Proc GLM para medidas repetidas no tempo (avaliações) através do programa estatístico SAS Institute 2002.

5.9 Marcação dos hemócitos produtores de Fenoloxidase

A fim de estabelecer quais os tipos de hemócitos são responsáveis por produzir a enzima fenoloxidase nestas espécies de caramujos, foi realizado um experimento para marcação da atividade desta enzima onde os hemócitos produtores de fenoloxidase irão produzir uma coloração marrom quando fixados numa lâmina e expostos a L-DOPA.

Para isso foi retirada a hemolinfa dos caramujos sadios e após 24 horas de infecção com *Schistosoma mansoni*, a hemolinfa foi inicialmente diluída com anticoagulante na proporção de 1:5 em um microtudo siliconizado para impedir a adesão dos hemócitos. Em seguida lamínulas redondas com 13 mm de diâmetro foram colocadas dentro de placas de cultura de 12 poços conforme ilustrado na Figura 6.

Figura 6 – Disposição da lamínula na placa para o experimento de marcação dos hemócitos produtores de fenoloxidase.



Fonte: elaborado pelo autor

À essas lamínulas foi adicionado 60 μ l da hemolinfa e deixado durante trinta minutos em câmara húmida para permitir a adesão dos hemócitos nas lamínulas. Após esse tempo foram realizadas três lavagens com PBS para retirar restos da hemolinfa, permitindo apenas a presença dos hemócitos aderidos na lamínula. Em seguida foi adicionado L-DOPA numa concentração de 1mg/ml diluído em etanol a 35%, os hemócitos aderidos ficaram expostos a essa solução por uma hora, ao mesmo tempo foi realizado um controle da reação onde os hemócitos aderidos a lamínula foram expostos somente a etanol a 35%. Após esse período foram realizadas três lavagens com PBS a fim de eliminar qualquer resquício de L-DOPA. As lâminas foram colocadas para secar e em seguidas foram analisadas no microscópio de luz.

5.10 Extração do RNA

Para obtenção de RNA, os hemócitos obtidos no item 5.7, já imersos no tiocianato de guanidina, foram homogeneizados em vórtex por um minuto, logo após foi adicionado 100 μ l de fenol ácido (pH 5,0), 50 μ l clorofórmio, 25 μ l de acetato de sódio, esse material foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C, após isso a porção superior do sobrenadante (contendo o RNA) foi recuperada e adicionada a igual volume de isopropanol, a mistura foi deixada por 12 horas a -20°C pra precipitação do RNA. Em seguida centrifugou-se esse RNA,

o sobrenadante foi então descartado. O RNA, após secar, foi ressuspenso em 20 µl de água Ultrapura (Sigma).

A quantificação do RNA obtido foi realizada no *NanoDrop* (Thermo Scientific) utilizando Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM\FIOCRUZ.

5.11 Tratamento do RNA com DNase

As amostras brutas de RNA obtidas no item acima, foram tratadas com a enzima DNase, para a degradação do DNA genômico, que ocasionalmente é recuperado durante o processo de extração, e que em grande quantidade impossibilita a análise correta da expressão gênica durante a PCR em tempo real.

Para isso foi utilizado o kit DNase Amplification Grade (Sigma) em 8 µl das amostras de RNA recuperadas. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

5.12 Eletroforese de RNA

A fim de identificar quais amostras de RNA, obtidas após o tratamento com a enzima DNase, permaneçam ou não contaminadas com DNA genômico foi realizada uma eletroforese de RNA. Para realização da eletroforese, todo material envolvido no processo foi previamente lavado com água DEPC, que possui a capacidade de desnaturar as RNases.

Foi utilizado 1 µl da amostra de RNA tratado diluído em 5 µl de água DEPC e mais 1 µl do corante Blue Green Loading Dye. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% e tampão TBE 0,5x preparados com água DEPC.

A visualização foi realizada com o auxílio de um transluminador.

5.13 Produção do cDNA

Para produção do cDNA, uma amostra com 1 mg de RNA tratado com DNase foi adicionado a 1 µl de oligo dT (500ng/µl), e o suficiente de água ultrapura para completar 5 µl, essa mistura foi levada ao termociclador por 5 minutos a 70°C, para ligação do oligo dT a

cauda poli A do RNA mensageiro. A amostra em seguida foi posta no gelo por 5 minutos. Após esse tempo foi adicionado a cada amostra um mix contendo: 5 µl de tampão 5x, 5 µl de um mix de dNTPs, 1 µl da enzima de transcriptase reversa M-MLV RT, 0,6 µl de RNasin, um inibidor de Ribonucleases, e água ultrapura para completar um volume de 20 µl. Essa reação foi levada ao termociclador por 60 minutos a 42°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

5.14 Análise da expressão gênica

Para a análise da expressão gênica foi utilizado o cDNA extraído dos caramujos dos grupos 1 a 4. O cDNA de cada grupo foi submetido a PCR quantitativa em tempo real, utilizando o conjunto de iniciadores descritos por Hertel *et al.* (2005); Lockyer, (2008); Galinier (2013) Esse conjunto de primers foi levado ao BLAST do NCBI onde foi realizado um alinhamento com todas as sequencias de RNA e DNA conhecidas, a fim de garantir que os *primers* apenas alinhem com seus respectivos genes alvo.

Para padronização do experimento foram testados três genes endógenos, o gene da proteína ribossomal 19S (CK988928) (BARON *et al.*, 2013; BOUCHUT, 2006; GALINIER, 2013) utilizando o conjunto de iniciadores descrito por Galinier (2013) forward: 5'-TTCTGTTGCTCGCCAC-3' e reverse: 5'-CCTGTATTTGCATCCTGTT-3', o gene endógeno da actina com um conjunto de iniciadores forward: 5'-TATGTGCAAGGCAGGTTTCG-3' e reverse: 5'-AGCTGTCCTTCTGACCCATACC-3' (LOCKYER, 2008) e o gene endógeno da proteína ribossomal 18S com um conjunto de iniciadores forward: 5'-CGCCCGTCGCTACTATCG-3' e reverse 5'-ACGCCAGACCGAGACCAA -3' (HERTEL *et al.* 2005).

Todos os genes alvos assim como todos os genes endógenos foram testados por PCR convencional. Foi realizada graduação de temperatura de anelamento para todo par de primer utilizado a fim de determinar a temperatura ideal de uso.

Após a determinação da temperatura ideal de uso, foram realizadas PCRs em tempo real utilizando o cDNA produzido. Para os genes alvo e para os genes endógenos foram construídas curvas padrão a partir de diluições seriadas do cDNA de 1:10, sendo utilizado o SYBR green PCR Master Mix, esse procedimento assim como os experimentos posteriores de qPCR foram realizados no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Para os genes endógenos também foi realizado outro experimento de padronização. Foi verificado o Ct para cada gene endógeno em caramujos em todas as condições estudadas. Esse

experimento é necessário para assegurar que o gene endógeno não varie em sua expressão nos diferentes tratamentos. Foram admitidos como genes de expressão invariável aqueles em que o Ct de um tratamento variava menos de 5 % em relação a outro tratamento.

Após a etapa de padronização de todos os genes, foram realizadas qPCRs a partir do cDNA obtido utilizando-se o kit SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied biosystems). O procedimento foi realizado em duplicata biológica e triplicata experimental.

A análise da expressão gênica foi realizada através de quantificação relativa por meio do método C_T Comparativo ($2^{\Delta\Delta CT}$), comparando a amplificação das sequências alvo dos grupos controle e infectado, de 2 modos distintos: entre diferentes tratamentos dentro da mesma espécie e entre caramujos pré-expostos e não pré-expostos a antígenos de *S. mansoni*.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

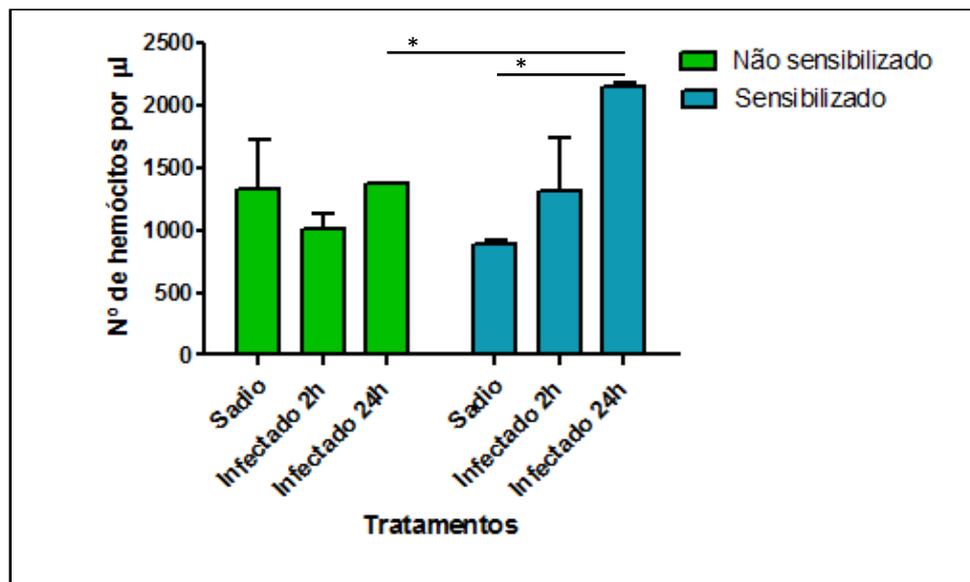
Devido a necessidade do uso de animais (camundongos Swiss Webster) no segundo semestre do ano de 2014, o presente Projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz com o N° 58/2014, o certificado de aprovação se encontra no Anexo A.

7 RESULTADOS

7.1 Variação da dinâmica hemocitária

A contagem das células dos caramujos controle, infectados 2h e infectados 24h, das duas espécies foi realizada na câmara de Neubauer, a média das contagens estão descritas nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 – Análise da variabilidade dos hemócitos de *B. glabrata* nos grupos sensibilizados e não sensibilizados



Fonte: Elaborado pelo autor

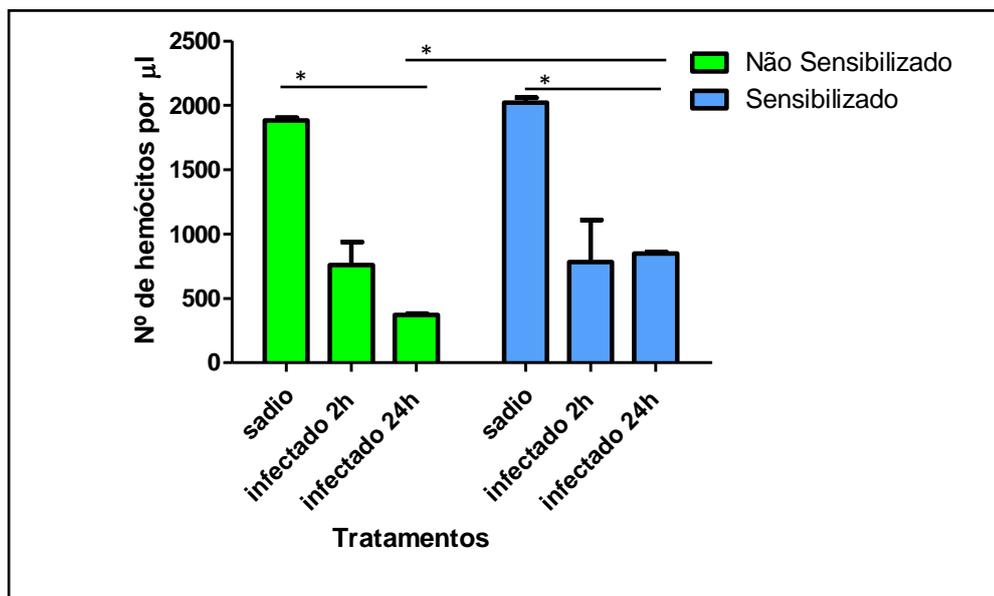
Quando analisados individualmente os grupos não sensibilizados e sensibilizados da espécie *B. glabrata*, percebe-se que não há variação no número de hemócitos quando comparados sadios e infectados do grupo não sensibilizado, o que concorda com o fato dessa espécie falhar no reconhecimento e destruição do parasito *S. mansoni*. No grupo sensibilizado não há variação do número de hemócitos no grupo infectado 2h em relação ao sadio, contudo ocorre um aumento significativo de número de hemócitos após 24h de infecção, indicando que o segundo contato com o patógeno, nesta espécie, provoca um aumento no número de células produzidas em resposta a esse mesmo patógeno, isso reflete um aumento na capacidade de produção de hemócitos nesta espécie, uma vez que o número de hemócitos no grupo sadio sensibilizado não varia em relação ao sadio que nunca teve contato com o antígeno do miracídio.

Os grupos de caramujos *B. glabrata* apresentaram um perfil semelhante do número de hemócitos nos grupos sensibilizados e não sensibilizados, quando comparados em relação a dinâmica hemocitária entre os dois grupos.

Nota-se que não há variação entre os dois subgrupos sadios quanto ao número de hemócitos circulantes, isso indica que a sensibilização não altera os níveis basais dos hemócitos. Também não é possível observar variação entre os dois subgrupos infectados 2h, indicando que a sensibilização não possui efeito neste período, entretanto como visto anteriormente este período não parece possuir por si mesmo uma variação no número dessas células, uma vez que o infectado 2h não varia em relação ao sadio, nem em caramujos sensibilizados nem em caramujos não sensibilizados. Quando analisamos o subgrupo infectado sensibilizado com 24h se percebe um grande aumento no número de hemócitos quando comparado ao subgrupo não-sensibilizado infectado 24h, tornando claro que após a sensibilização a resposta após 24 horas de infecção se dá com mais intensidade.

Quando estudamos o caramujos *B. straminea*, que apresenta um perfil de susceptibilidade diferenciado em relação ao caramujos *B. glabrata*, observamos que a uma diferença na dinâmica hemocitária (Gráfico 2).

Gráfico 2 –Análise da variabilidade dos hemócitos de *B. straminea* nos grupos sensibilizados e não sensibilizados



Fonte: Elaborado pelo autor

Analisando individualmente, o grupo Não Sensibilizado mostrou uma variação significativa no número de hemócitos entre os subgrupos infectados e sadio. Nos subgrupos infectados há uma redução de aproximadamente 50% no número de hemócitos em relação ao sadio no período de 2h pós infecção, redução que se tornou ainda maior após 24h de infecção. Em caramujos sensibilizados, o número de hemócitos do subgrupo infectado 2h cai cerca de 50% em relação ao subgrupo sadio, mantendo-se com a mesma quantidade de células até o período de 24 horas pós infecção com *S. mansoni*. Essa diminuição dos hemócitos circulantes após a infecção em ambos os grupos sensibilizados e não sensibilizados é decorrente da maior ativação dos hemócitos nesta espécie, o que causa um aumento da migração dos hemócitos para o sítio de penetração do parasito.

Os caramujos *B. straminea* apresentaram um perfil semelhante nos grupos sensibilizados e não sensibilizados não havendo variação significativa no número de hemócitos circulantes dos subgrupos sadios e infectados 2h entre caramujos sensibilizados e não sensibilizados. Uma diferença é encontrada quando comparamos os caramujos infectados 24h desses dois grupos, neste ponto vemos uma relação semelhante ao que aconteceu com *B. glabrata*, o número de hemócitos é maior no subgrupo infectado 24h do grupo sensibilizado em relação ao não sensibilizado, indicando assim que a velocidade de produção de hemócitos que ocorre após a infecção, entre o período imediato de 2h e o período 24h é maior em caramujos cujos hemócitos já entraram em contato com partículas do parasita.

Se compararmos o comportamento dos hemócitos entre as espécies, vemos que numa espécie susceptível como em *B. glabrata* o número de hemócitos praticamente não varia pós infecção, já em uma espécie mais resistente como *B. straminea* a quantidade de hemócitos circulantes cai bastante logo nos primeiros momentos após contato com parasitas, o que indica que em espécies menos susceptíveis os hemócitos são bem mais ativos e migram mais rápido para o local da infecção.

7.2 Análise da atividade da fenoloxidase nos hemócitos de *Biomphalaria*

Os hemócitos foram obtidos através da punção cefalopodal da hemolinfa de caramujos sadios e infectados das 2 espécies, eles foram então diluídos em PBS e armazenados a -80°C. A dosagem de fenoloxidase foi realizada num leitor de ELISA sob o comprimento de onda de 495nm. Foi traçado o comportamento da enzima através do tempo, a variação da atividade enzimática entre os grupos foi analisada através do Proc GLM para medidas repetidas no

tempo (avaliações). A variação da atividade da fenoloxidase em *B. glabrata* está mostrada na tabela 1.

Tabela 1 – Dados da atividade da fenoloxidase em *B. glabrata* gerados pelo programa SAS

| Tratamento | Tempo (min) | | | | | | | | | |
|----------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 10 | 30 | 50 | 70 | 90 | 110 | 130 | 150 | 170 | 190 |
| Sadio | 0,760a* | 0,759a | 0,760a | 0,762a | 0,763a | 0,763a | 0,764a | 0,764a | 0,764a | 0,764a |
| Sadio sense.** | 0,753a | 0,755a | 0,756a | 0,758a | 0,759a | 0,760a | 0,760a | 0,761a | 0,762a | 0,763a |
| Infectado 2h | 0,759a | 0,761a | 0,763a | 0,765a | 0,766a | 0,767a | 0,767a | 0,767a | 0,767a | 0,768a |
| Infectado sense. 2h | 0,759a | 0,762a | 0,764a | 0,765a | 0,767a | 0,767a | 0,768a | 0,768a | 0,768a | 0,769a |
| Infectado 24h | 0,755a | 0,758a | 0,759a | 0,761a | 0,762a | 0,762a | 0,763a | 0,764a | 0,764a | 0,764a |
| Infectado sense. 24h | 0,753a | 0,759a | 0,762a | 0,763a | 0,765a | 0,766a | 0,766a | 0,767a | 0,767a | 0,767a |

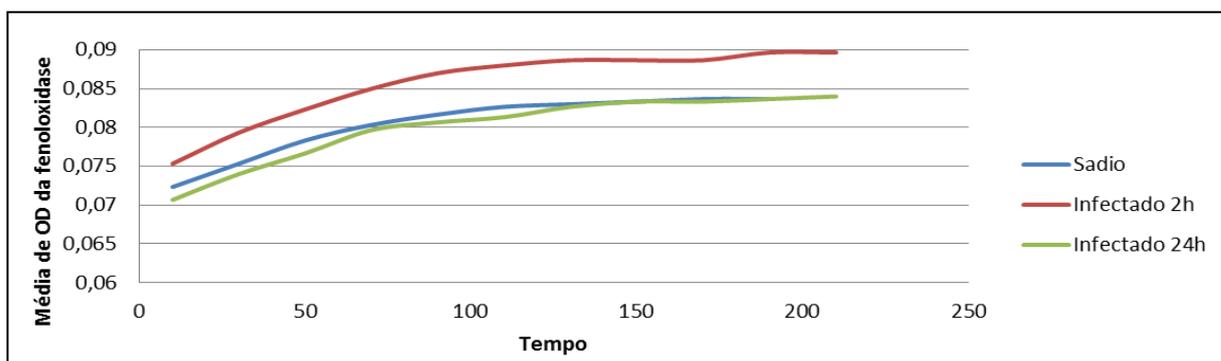
Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: *Média seguidas pela mesma letra não diferem entre si na coluna pelo teste de Tukey (HSD) a 5% de probabilidade. ** Abreviação de sensibilizados

7.2.1 Atividade da fenoloxidase em *Biomphalaria glabrata* não sensibilizados

O perfil enzimático da fenoloxidase nos caramujos *B. glabrata* não sensibilizados está mostrado no gráfico 3.

Gráfico 3 – Dosagem de fenoloxidase em *Biomphalaria glabrata* não sensibilizado



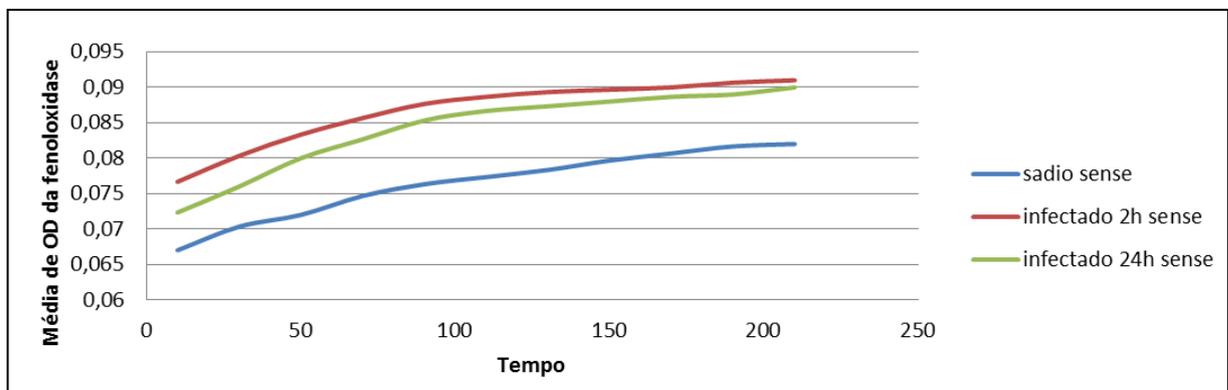
Fonte: Elaborado pelo autor

Percebe-se que todos os três subgrupos: sadio, infectado 2h e infectado 24h apresentam o mesmo padrão de crescimento de atividade. A análise estatística realizada mostrou que não houve variação significativa da atividade enzimática da fenoloxidase nestes grupos.

7.2.2 Atividade da fenoloxidase em *Biomphalaria glabrata* sensibilizados

O perfil enzimático da fenoloxidase nos caramujos *B. glabrata* sensibilizados (gráfico 4) apresenta um perfil quadrático de crescimento semelhante. Nota-se que em todos os tempos de medição o grupo sadio sensibilizado apresenta um menor valor de absorbância, entretanto estatisticamente esse valor não se reflete em nenhuma alteração na atividade enzimática da fenoloxidase neste grupo. Não há também diferenças na atividade desta enzima nos outros grupos.

Gráfico 4 – Dosagem de fenoloxidase em *Biomphalaria glabrata* sensibilizado.

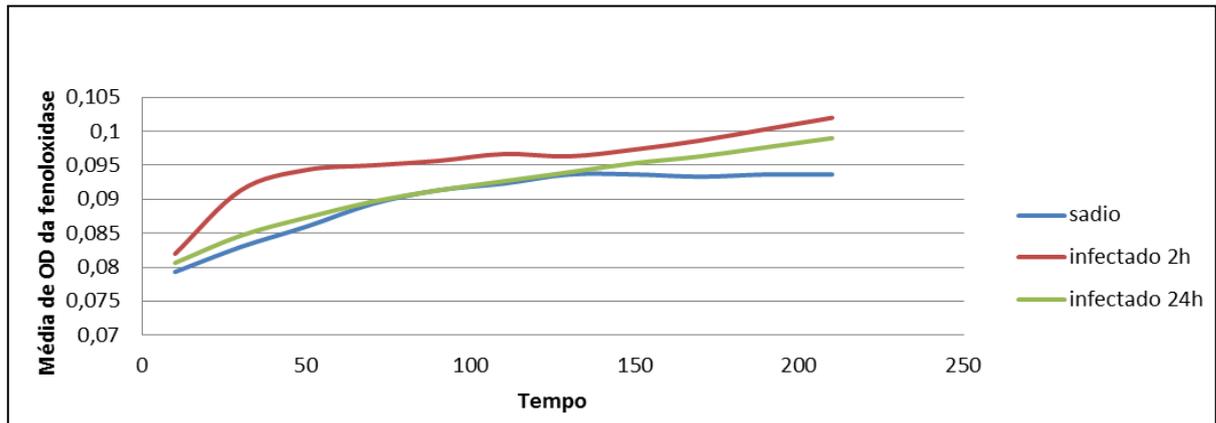


Fonte: Elaborado pelo autor

7.2.3 Atividade da fenoloxidase em *Biomphalaria straminea* não sensibilizados

O perfil enzimático da fenoloxidase nos caramujos *B. straminea* não sensibilizado (gráfico 5) possui pequenas variações no seu padrão de crescimento, que não causam uma total diferença na atividade da enzima fenoloxidase se considerados todos os tempos. Porém, o grupo infectado 2h apresenta uma pequena variação da atividade enzimática no período entre 30 minutos a 130 minutos após a adição do substrato L-DOPA. Ao término do período de exposição a L-DOPA os três tratamentos: sadio, infectado 2h e infectado 24h não mostram variação quanto a atividade daquela enzima.

Gráfico 5 – Dosagem de fenoloxidase em *Biomphalaria straminea* não-sensibilizado.

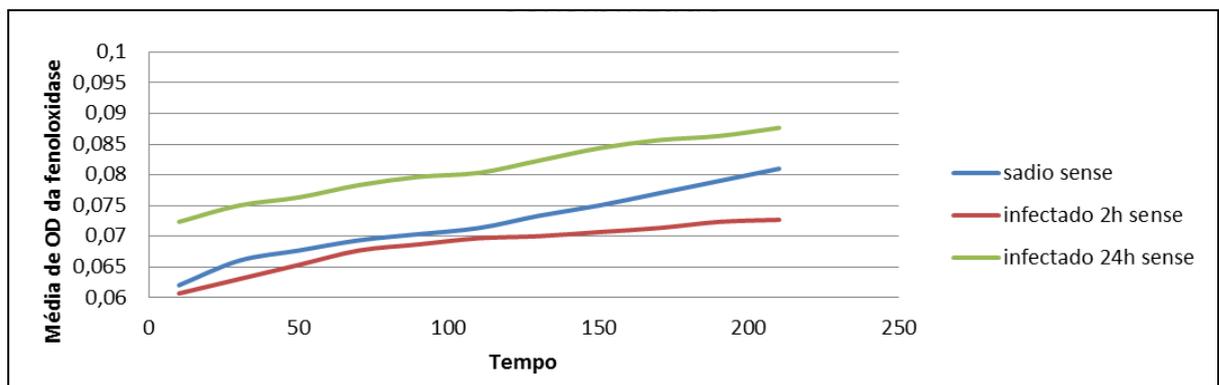


Fonte: Elaborado pelo autor

7.2.4 Atividade da fenoloxidase em *Biomphalaria straminea* sensibilizados

O perfil enzimático da fenoloxidase nos caramujos *B. straminea* sensibilizados, mostrado no gráfico 6, segue um perfil de crescimento linear, diferentemente do observado em *B. glabrata*.

Gráfico 6 – Dosagem de fenoloxidase em *Biomphalaria. straminea* sensibilizado.



Fonte: Elaborado pelo autor

Foi observado que a atividade enzimática da fenoloxidase não varia entre os grupos sensibilizados sadio e infectados 2h. Com 24 horas pós infecção entretanto há uma pequena diferença na atividade desta enzima durante as duas primeiras horas de exposição a L-DOPA, quando ela está um pouco mais ativa se comparada aos dois outros grupos. Essa diferença se acentua entre as duas horas e meia e as três horas de exposição a L-DOPA em relação ao grupo sadio sensibilizado, quando a enzima começa a entrar em fase estacionária neste grupo, enquanto continua aumentando sua atividade no grupo sensibilizados infectados 24 horas.

Ao analisar o comportamento da enzima no substrato no decorrer do tempo vemos que existe diferença na atividade da fenoloxidase do grupo sensibilizado em relação ao grupo não sensibilizado, estando este último com uma maior atividade desta enzima (tabela 2).

Tabela 2 – Dados da atividade da fenoloxidase em *B. straminea* gerados pelo programa SAS

| Tratamento | Tempo (min) | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------|---------|---------|---------------------|---------|---------------------|---------|---------|---------|---------|
| | 10 | 30 | 50 | 70 | 90 | 110 | 130 | 150 | 170 | 190 |
| Sadio | 0,761a* | 0,764ab | 0,766ab | 0,768ab | 0,769ab | 0,77ab ¹ | 0,77ab | 0,77a | 0,77a | 0,77a |
| Sadio sense.** | 0,75b* | 0,752c* | 0,753c | 0,755c | 0,755c | 0,756c | 0,757c | 0,758bc | 0,760bc | 0,761b |
| Infectado 2h | 0,763a | 0,769a | 0,771a | 0,771a | 0,772a | 0,772a | 0,772a | 0,773a | 0,774a | 0,775a |
| Infectado sense. 2h | 0,749b | 0,750c | 0,752c | 0,753c | 0,754c | 0,755c | 0,755c | 0,755c | 0,756c | 0,757b |
| Infectado 24h | 0,762a | 0,765ab | 0,766ab | 0,768ab | 0,769ab | 0,770ab | 0,771ab | 0,772a | 0,772a | 0,773a |
| Infectado sense. 24h | 0,757ab | 0,758bc | 0,759bc | 0,76bc ² | 0,761bc | 0,762bc | 0,763bc | 0,764ab | 0,765ab | 0,766ab |

Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: *Média seguidas pela mesma letra dentro de um mesmo tempo não diferem entre si na coluna pelo teste de Tukey (HSD) a 5% de probabilidade, letras diferentes indicam médias diferentemente significativas. ¹ ab indica que a média não varia em relação a a ou b, mas varia em relação a c. ² bc indica que a média não varia em relação a b ou c, mas varia em relação a a. ** Abreviação de sensibilizados

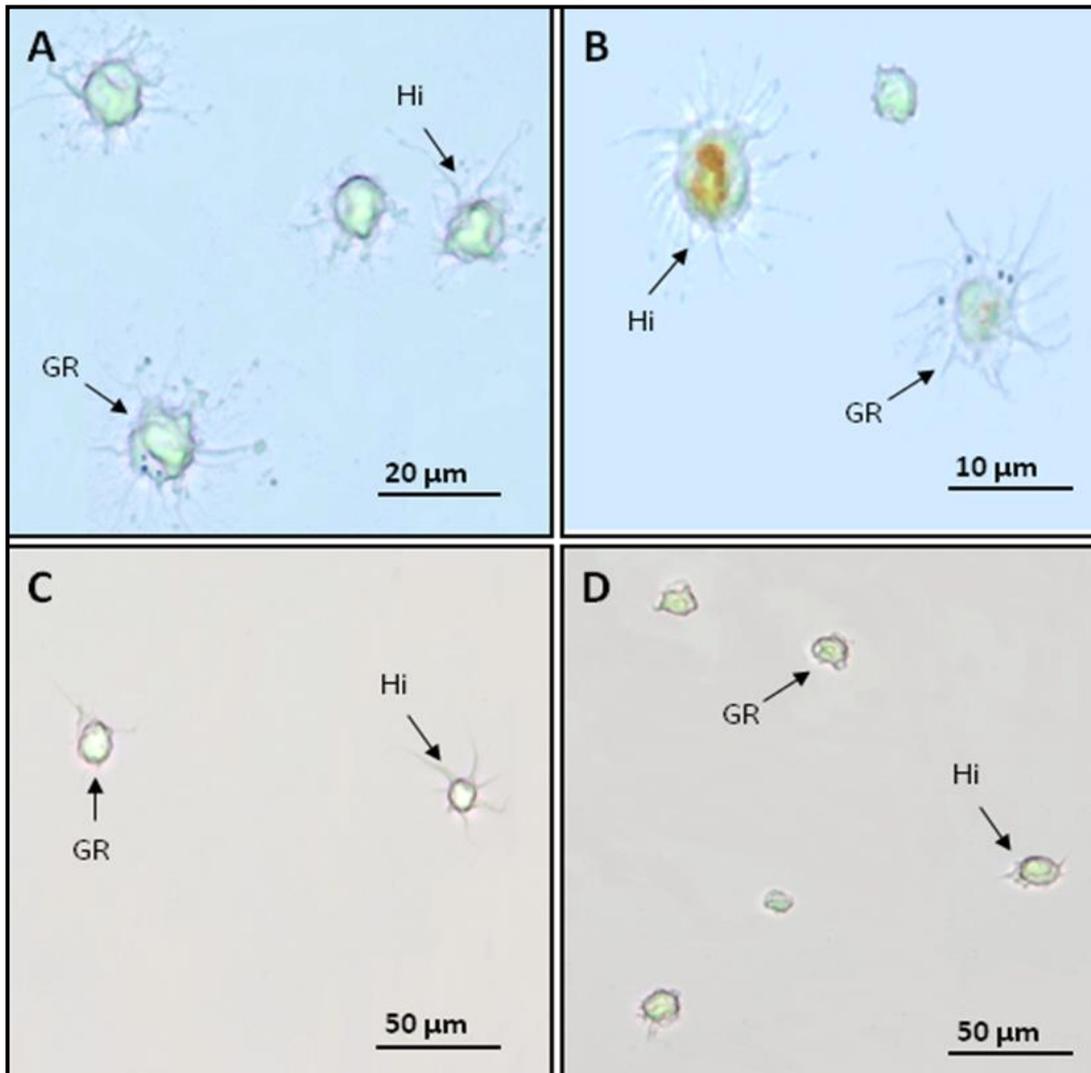
Quando comparado os sadios desses dois grupos pode-se ver que eles possuem uma cinética totalmente diferente considerando-se todos os tempos analisados, tendo o grupo sadio uma maior atividade quando comparado ao sadio sensibilizado. Ao se comparar os infectados de 2 horas dos dois grupos, percebe-se algo semelhante, eles possuem uma cinética completamente diferente se considerada desde a primeira leitura até a última com pouco mais de três horas, tendo o grupo infectado 2 horas não sensibilizado uma maior atividade enzimática na presença do substrato L-DOPA. Quando comparamos os dois grupos infectados (sensibilizado e não sensibilizado) 24 horas, percebemos que suas cinéticas se assemelham no primeiro momento de leitura de 10 minutos, a partir de quando começam a diferir um pouco, até a leitura de 130 minutos, quando então voltam a ter padrões de atividade enzimática semelhantes

Essa análise nos permite concluir que há diferença na atividade enzimática entre o grupo sensibilizado e não sensibilizado de *B. straminea* quanto a atividade da fenoloxidase. Entretanto não há diferença significativa entre os entre sadios e infectados (2h e 24h) dentro de um mesmo grupo, seja ele sensibilizado ou não.

7.3 Marcação dos hemócitos produtores de fenoloxidase

Para identificar quais os tipos celulares produzem a fenoloxidase, a hemolinfa dos grupos sadio e infectado 24h foi retirada, os hemócitos foram colocados para aderir em lamínulas de vidro, em seguida foram expostos a L-DOPA numa concentração de 1 mg/ml. A marcação indicativa da produção da fenoloxidase apresenta uma coloração marrom claro derivada da cascata da fenoloxidase tendo como substrato a L-DOPA. Tanto lâminas de *Biomphalaria glabrata* quanto as lâminas de *B. straminea* mostraram as mesmas células marcadas responsáveis pela produção da fenoloxidase, foi encontrado granulócitos e hialinócitos com marcações. Estas marcações geralmente são claras e se apresentam como pequenos pontos marrons até marcações maiores de coloração marrom bastante claro nas células (figura 7). Durante as análises também podemos perceber que o número de células marcadas em *B. glabrata* foi bem maior do que em *B. straminea*, isso pode ser justificado, pela queda no número de hemócitos nos grupos de *B. straminea* infectados, quando estas células devam esta sendo deslocada para o local da infecção.

Figura 7 A-D: Micrografias dos hemócitos de *Biomphalaria* spp. com atividade de fenoxidase.



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: (A): Controle negativo de *Biomphalaria glabrata*. (B): Controle positivo de *Biomphalaria glabrata*. (C): Controle negativo de *Biomphalaria straminea*. (D): Controle positivo de *Biomphalaria straminea*. GR=Granulócito e Hi=Hialinócito.

7.4 Padronização dos genes da qPCR

O RNA dos hemócitos obtidos foi extraído e armazenado a -80°C , parte do RNA foi utilizada para construção de cDNA, utilizado na etapa de padronização dos *primers* utilizados em qPCR.

Foram testados três pares de *primers* candidatos a controle endógeno para análise da expressão gênica dos FREPs: o *primer* do gene da proteína ribossomal 19S (CK988928) (GALINIER, 2013), o *primer* do gene endógeno da actina (LOCKYER *et al.*, 2008) e o *primer* do gene endógeno da proteína ribossomal 18S (HERTEL *et al.* 2005).

Inicialmente foram feitas reações de PCR convencionais para verificar a amplificação das bandas correspondentes aos amplicons de interesse, nesta fase do estudo o *primer* 19S foi excluído por apresentar inconsistência nos resultados.

Posteriormente foram realizadas qPCRs com os *primers* actina e 18S, onde o 18S apresentou um melhor resultado, sendo considerado a eficiência, o slope e a curva de melting. O *primer* 18S apresentou uma eficiência acima de 90% sendo considerado ótimo para fins de nosso estudo. Foi então realizado um experimento comparando todos os tratamentos, para assegurar de que não haveria variação na sua expressão, podendo desta forma ser utilizado para normalizar a reação. Nesse experimento foram comparados os Cts em todos os tratamentos para as espécies em estudo, sendo mostrado que a expressão do gene 18S variava em menos de 5% entre os tratamentos, não se mostrando significativa. Desta forma o *primer* para o gene 18S foi escolhido para este estudo com uma temperatura de anelamento de 60°C .

Com os *primers* dos FREP 3 e FREP 4 foram inicialmente realizadas PCRs convencionais com graduação de temperatura de anelamento, após a definição das mesmas foram realizadas PCRs em tempo real com construção de curva padrão. Para obter um amplificação mais específica do alvo foi aplicado o protocolo de PCR touchdown para esses genes de FREPs.

7.5 Análise da expressão do FREP 3

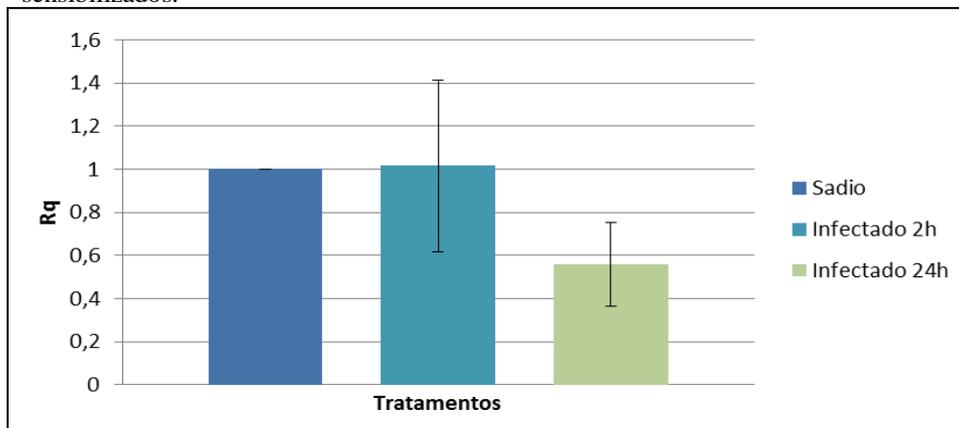
A fim de avaliar a expressão do FREP 3 em caramujos sensibilizados e não sensibilizados, em diferentes condições, foram criados dois grupos: caramujos que nunca foram desafiados (não sensibilizados) e caramujos que foram desafiados com o parasito particulado (sensibilizado), estes grupos foram divididos em caramujos sadios e infectados

com *S. mansoni* (2 e 24h horas pós-infecção). A hemolinfa destes grupos foi retirada e o RNA extraído dos hemócitos. A expressão gênica foi analisada dentro de cada grande grupo, em seguida, comparando-se entre sensibilizados e não sensibilizados.

7.5.1 Expressão do FREP 3 em *Biomphalaria glabrata*.

O gráfico 7 mostra a expressão do FREP 3 em caramujos não sensibilizados submetidos a diferentes condições (sadio e infectado). Nota-se que a expressão do FREP 3 praticamente não varia em relação ao sadio quando analisado o grupo infectado 2h. Ao analisarmos o grupo cujo hemócitos foram recuperados 24 horas após a infecção é possível observar uma queda de expressão de cerca de 20% em relação ao grupo sadio.

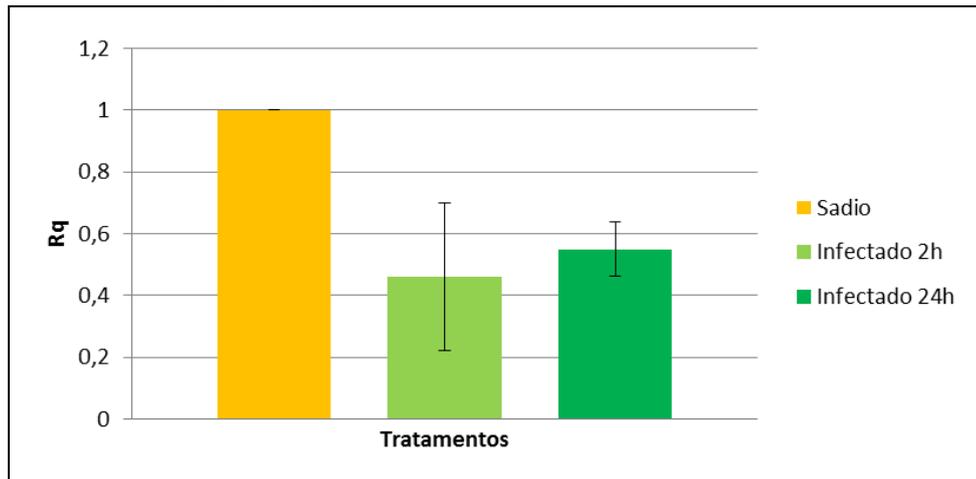
Gráfico 7 – Variação da expressão do FREP 3 em *Biomphalaria glabrata* não sensibilizados.



Fonte: Elaborado pelo autor

No grupo dos caramujos que foram previamente sensibilizados com o parasita particulado, há uma queda na expressão do FREP 3 logo após 2 horas de infecção (Gráfico 8), indicando uma mudança mais rápida no nível de expressão no grupo que já entrou em contato com o antígeno do parasito. Após 24 horas o nível de expressão do FREP 3 continua baixo, próximo ao mesmo patamar de expressão de 2 horas pós infecção, não havendo diferença significativa entre eles.

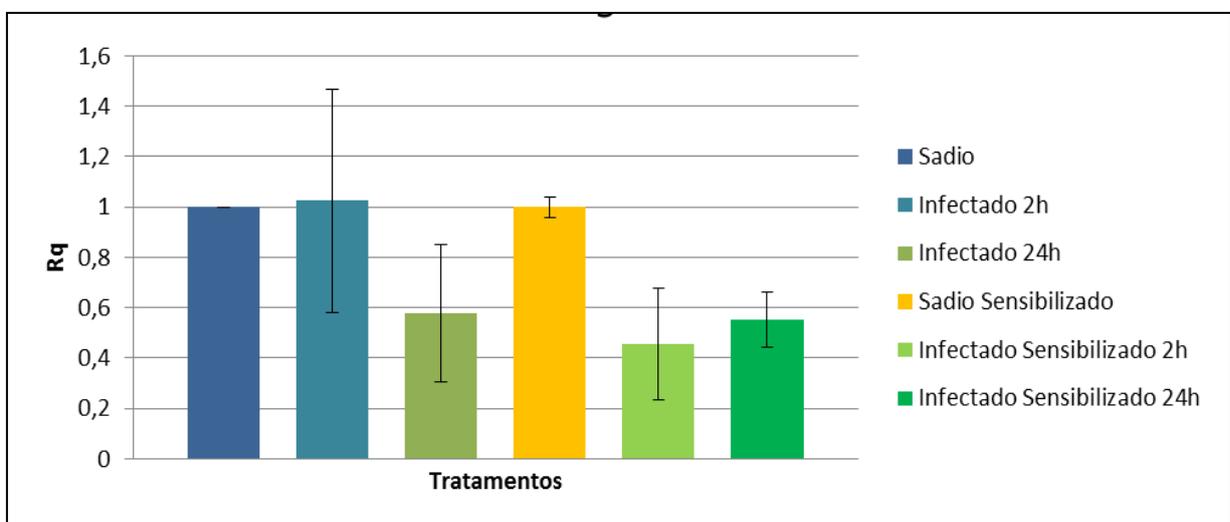
Gráfico 8 – Variação da expressão do FREP 3 em *Biomphalaria glabrata* sensibilizados.



Fonte: Elaborado pelo autor

Se considerarmos como calibrador da reação o grupo sadio não sensibilizado, podemos perceber o efeito da sensibilização sobre a expressão do FREP 3 (gráfico 9), nota-se que praticamente não há efeito de alterações na expressão quando comparado o grupo sadio sensibilizado e o sadio não sensibilizado (calibrador), uma vez que isso ocorre não há aumento ou diminuição da expressão entre os grupos infectados. Indicando que o processo de sensibilização de *B. glabrata* não aumenta o níveis de expressão basal do FREP 3, contudo torna sua queda mais precoce, com duas horas.

Gráfico 9 – Variação da expressão do FREP 3 em *Biomphalaria glabrata* infectado sensibilizado e não sensibilizado.



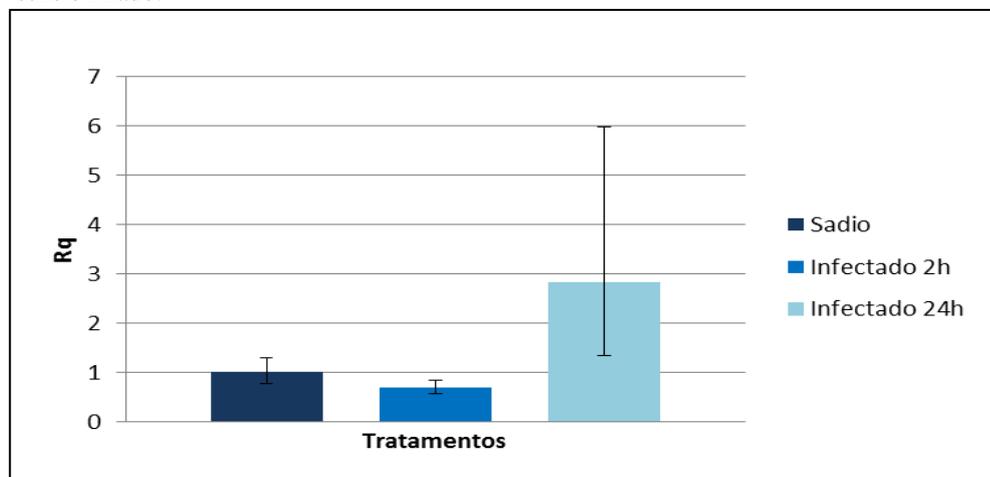
Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Calibrador da reação: grupo sadio

7.5.2 Expressão do FREP 3 em *B. straminea*.

O gráfico 10 mostra a expressão do FREP 3 em *B. straminea*, uma espécie mais resistente a infecção quando comparada a *B. glabrata*, estando não sensibilizado. Neste grupo percebemos que a expressão do FREP 3 não é alterada no período de duas horas após a infecção com *S. mansoni*. Após 24 horas de infecção o FREP 3 tem um aumento na sua expressão que não se mostra estatisticamente significativa, uma vez que o RQ mínimo e máximo são bastante grandes. Esse perfil se difere da dinâmica da expressão do FREP 3 em *B. glabrata* quando a expressão deste gene cai após 24h.

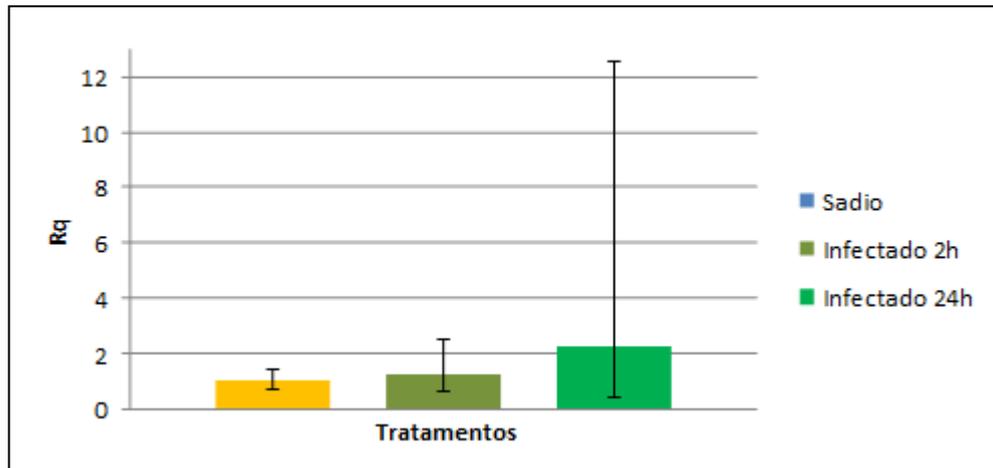
Gráfico 10 – Variação da expressão do FREP 3 em *Biomphalaria straminea* não sensibilizado.



Fonte: Elaborado pelo autor

No grupo sensibilizado (gráfico 11) não houve qualquer diferença de expressão em nenhum dos tratamentos. Resultado este, semelhante ao grupo não sensibilizado com partículas de *S. mansoni*. Indicando que o FREP 3 parece não ter sua dinâmica de expressão influenciada pela sensibilização.

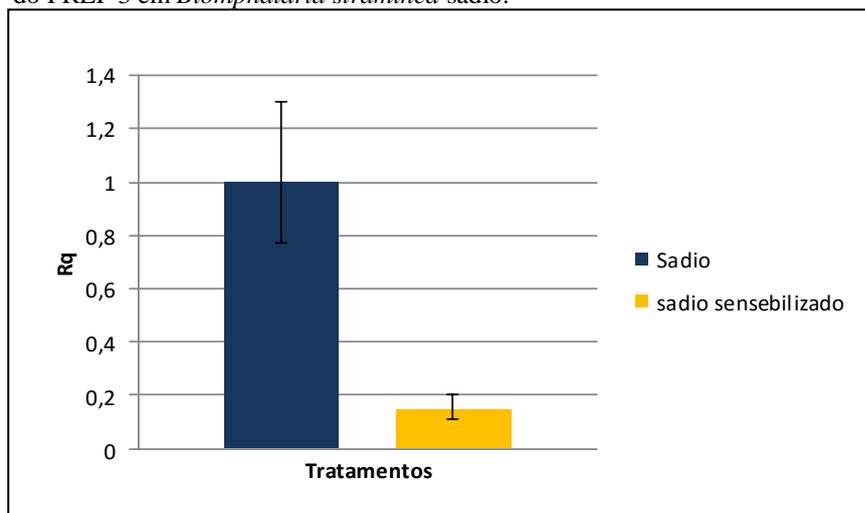
Gráfico 11 – Expressão do FREP 3 em *Biomphalaria straminea* sensibilizado.



Fonte: Elaborado pelo autor

Quando são comparados os grupos não sensibilizados e sensibilizados (gráfico 12), percebe-se que o processo de sensibilização interfere na expressão do FREP 3 em *B. straminea*. Nesta comparação houve uma redução brusca dos níveis basais da expressão do FREP 3 em mais de 60% no grupo sadio sensibilizado quando comparado com o grupo sadio que nunca entrou em contato com antígenos do parasito. Indicando que o contato com o parasito provoca um estímulo tardio para alteração da expressão deste FREP.

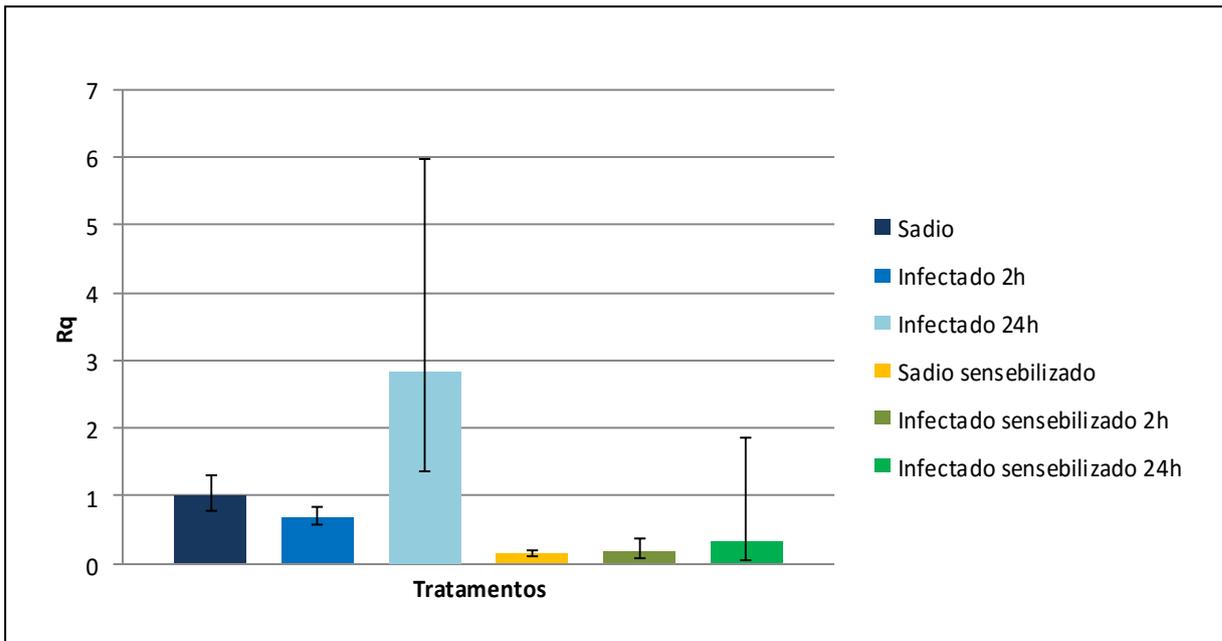
Gráfico 12 – Efeito da sensibilização a *Schistosoma mansoni* na expressão do FREP 3 em *Biomphalaria straminea* sadio.



Fonte: Elaborado pelo autor

Essa redução fica clara quando se comparam todos os tratamentos dos dois grupos (gráfico 13), onde a redução da expressão também ocorre nos grupos infectados.

Gráfico 13 – Expressão do FREP 3 em *Biomphalaria straminea* infectado sensibilizado e não sensibilizado.



Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Calibrador da reação: grupo sadio

Entretanto, apesar da sensibilização reduzir os níveis basais do FREP 3 em *B. straminea*, ela não altera o padrão de resposta imune em relação ao FREP 3, uma vez que não há nenhuma diferença na expressão entre os tratamentos: sadio, infectados 2h e infectados 24h, dentro dos grupos sensibilizados e não sensibilizados.

Quando comparamos as duas espécies percebemos que o FREP 3 em *B. straminea* não tem sua expressão reduzida nos primeiros instantes da infecção como ocorre em *B. glabrata*, porém tem uma queda de expressão de mais de 50% após 4 dias de contato com o antígeno de *S. mansoni*, não caindo novamente após um novo contato com esse antígeno. Já em *B. glabrata* após 4 dias de contato com o antígeno não há mais queda da expressão deste gene, contudo após uma segunda exposição ao patógeno, os níveis de expressão deste gene começam a cair.

É possível que a queda do FREP 3 nos primeiros instantes da infecção seja causada pelo parasito a partir de seus componentes excretórios/secretórios, propiciando-lhe um ambiente onde seu desenvolvimento seja mais fácil, isso acontece na espécie mais susceptível (*B. glabrata*), já na espécie mais resistente, *B. straminea*, o verme é incapaz de modular uma queda da expressão do FREP 3 logo nos primeiros instantes, isso faria com que o ambiente ficasse mais hostil para o verme, explicando porque o *B. straminea* é mais resistente. É

possível que essa permanência nos níveis de expressão do FREP 3 em *B. straminea* esteja ligada também a uma maior ativação dos hemócitos, que migram em maior número para o sítio de infecção do patógeno.

A queda da expressão do FREP 3 após 4 dias do primeiro contato de *B. straminea* com *S. mansoni* pode ser resultante de uma segunda secreção dos produtos do esporocisto, uma vez que este está se multiplicando a fim de gerar esporocistos secundários. Neste cenário a queda da expressão deste gene favoreceria o esporocisto, fazendo com que os sobreviventes a um primeiro momento pós infecção, possam agora se desenvolver completamente dentro do caramujo. Isso explicaria porque alguns deste caramujos *B. straminea* são capazes de manter a infecção.

7.6 Análise da expressão do FREP 4

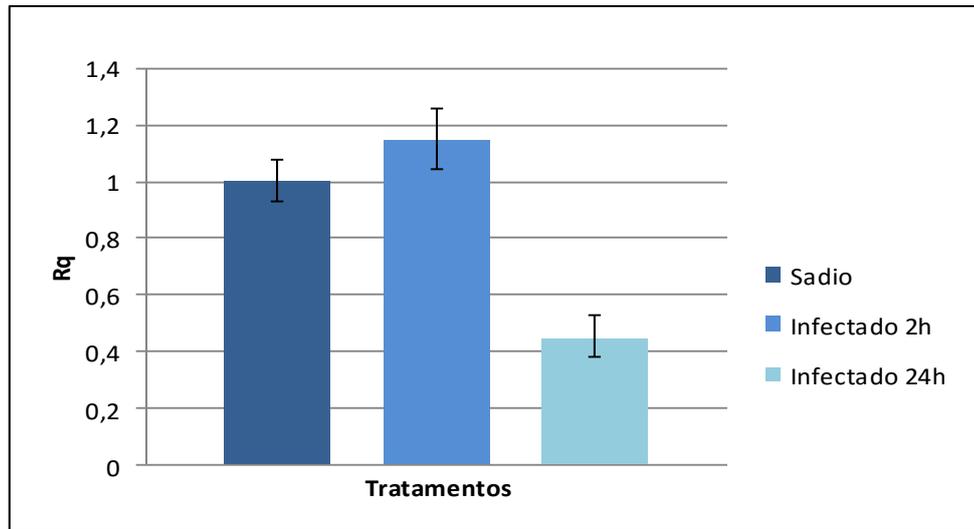
O perfil de expressão do FREP 4 se apresentou de modo diferente ao perfil de expressão do FREP 3 para *Biomphalaria glabrata*.

Neste trabalho não foi possível localizar o FREP 4 de *B. straminea*, foram testados alguns pares de iniciadores para amplificação do FREP 4, porém, nenhum deles foi capaz de amplificar o FREP 4 desta espécie. Já é relatado que os genes dos FREPs possuem alto polimorfismo sendo dividido em 14 famílias, das quais algumas possuem dezenas de subfamílias geradas a partir de mutações pontuais na estrutura principal de cada família de FREP. Uma vez que nossos iniciadores para este gene conseguiram amplificar o FREP 4 em *B. glabrata* mas não na espécie *B. straminea*, podemos sugerir que há grandes diferenças entre as subfamílias que compõe o FREP 4 entre estas duas espécies, alterações essas que podem resultar num padrão diferente de susceptibilidade entre estas duas espécies.

7.6.1 Expressão do FREP 4 em *Biomphalaria glabrata*

O gráfico 14 mostra a expressão do FREP 4 em caramujos não sensibilizados submetidos a diferentes condições (sadios e infectados). Nota-se um discreto aumento da expressão no grupo infectado 2h que não se mostrou significativo. No período de 24 horas pós infecção houve então uma queda de cerca de 50% na expressão do FREP 4, mostrando um padrão semelhante ao FREP 3 em *B. glabrata* quando a expressão do gene não muda com duas horas pós infecção, caindo em seguida no período de 24 horas pós infecção.

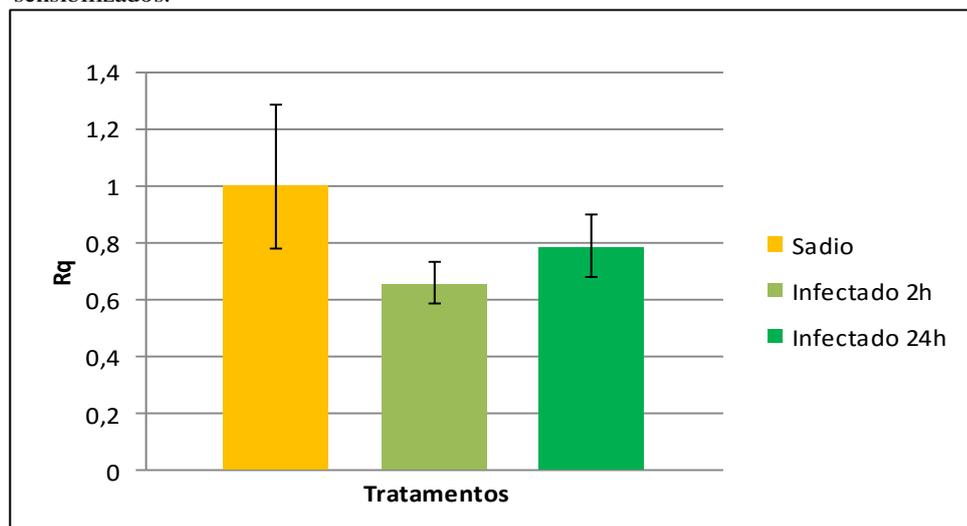
Gráfico 14 – Variação da expressão do FREP 4 em *Biomphalaria glabrata* não sensibilizados.



Fonte: Elaborado pelo autor

No grupo dos caramujos que foram previamente sensibilizados com o parasita particulado (gráfico 15), houve uma leve redução da expressão do FREP 4 logo 2 horas pós infecção com *S. mansoni*. Com 24h houve um aumento da expressão do FREP 4 quando comparado ao período de 2h pós infecção, não havendo queda significativa em relação ao caramujo sadio. Esta queda precoce no perfil após duas horas, assim como a normalização com 24 horas quando comparado ao perfil do não sensibilizado indica que a pré-exposição a antígenos de *Schistosoma mansoni* interfere na dinâmica da expressão do FREP 4.

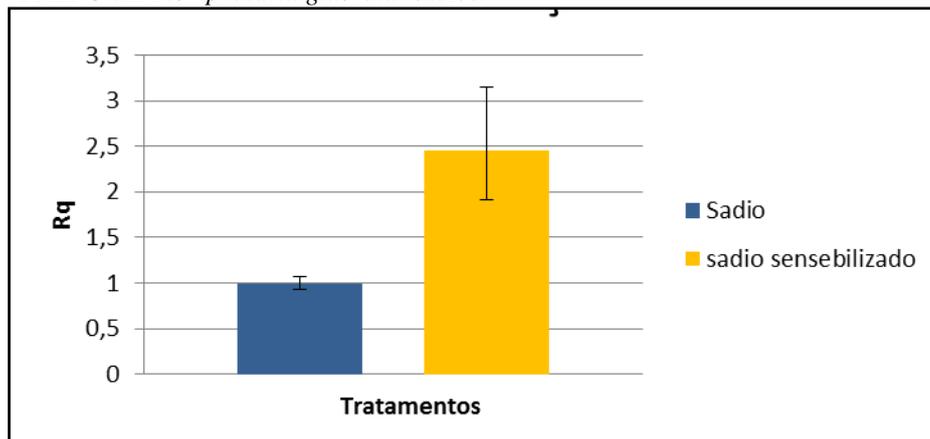
Gráfico 15 – Variação da expressão do FREP 3 em *Biomphalaria glabrata* sensibilizados.



Fonte: Elaborado pelo autor

Quando são comparados os grupos não sensibilizados e sensibilizados (gráfico 16) percebe-se que o processo de sensibilização interfere na expressão do FREP 4. Isso se torna claro quando a sensibilização eleva os níveis basais da expressão FREP 4, uma vez que o caramujo sadio sensibilizado tem um aumento em mais de 100% de expressão deste gene após 4 dias de exposição ao antígeno.

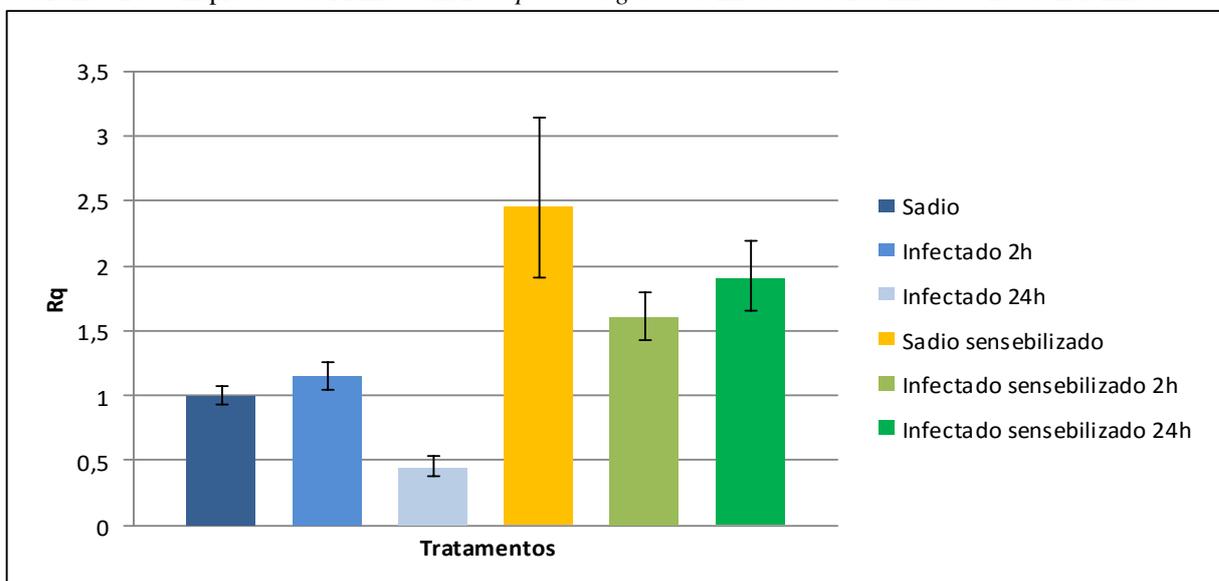
Gráfico 16 – Efeito da sensibilização ao *Schistosoma mansoni* na expressão do FREP 3 em *Biomphalaria glabrata* sadios.



Fonte: Elaborado pelo autor

Essa elevação do FREP 4 no grupo sensibilizado está presente também nos grupos infectados assegurando que a sensibilização resulta numa resposta secundária por elevação dos níveis basais da expressão do gene do FREP 4 (gráfico 17).

Gráfico 17 – Expressão do FREP 4 em *Biomphalaria glabrata* infectado sensibilizado e não sensibilizado.



Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Calibrador da reação: grupo sadio

Ao compararmos a expressão do FREP 3 e 4 em *B. glabrata*, percebemos que estes dois genes tem sua expressão reduzida 24 horas após a infecção por *S. mansoni* em caramujos não sensibilizados, já em caramujos sensibilizados essa queda ocorre logo no primeiro momento da infecção. Se compararmos o resultado da sensibilização na expressão destes genes percebemos que após 4 dias de contato com o antígeno o FREP 3 volta a ter seus níveis de expressão normalizados, já o FREP 4 apresenta uma maior expressão após a sensibilização mesmo nesta espécie altamente susceptível, concordando com o fato de o FREP 4 ser um marcador da infecção pelo *S. mansoni*.

8 DISCUSSÃO

Não são muitos os estudos envolvendo resposta secundária em invertebrados. Esse questionamento surgiu há mais de duas décadas quando já se tinha bastante conhecimento sobre a resposta imune de vertebrados, entretanto a resposta de invertebrados ainda era pouco estudada, em 1993 foram publicados menos de 100 artigos sobre a resposta imune de desses (KURTZ, 2004). A falta de conhecimento sobre os mecanismos moleculares do sistema interno de defesa dos invertebrados levou muitos pesquisadores a classificarem sua resposta como apenas uma resposta inata, gerando controvérsias até os dias atuais, quando os mecanismos do sistema imune dos invertebrados passaram a ser melhor caracterizados. Em 2003 num artigo publicado na revista Nature, Kurtz e Franz (2003) mostraram, ao estudar o copépoda *Macrocyclops albidus*, que o sistema interno de defesa dos copépodos poderia reagir de maneira mais eficiente ao segundo contato com o parasito e que esse contato prévio diminuía as taxas de reinfecção com cestodas.

Esses estudos nos levaram a questionar o comportamento do sistema imune de *Biomphalaria* sp. frente a um segundo contato com o antígeno do parasito *Schistosoma mansoni*. Para esclarecer o papel da imunidade celular nesta relação parasita/hospedeiro e também frente a um segundo contato com o antígeno do parasito, nós realizamos uma contagem total de hemócitos, quando foi observada que a quantidade de hemócitos em caramujos não varia significativamente entre caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* após duas horas de infecção com *S. mansoni*, esse resultado difere de um estudo publicado por Stumpf e Gilbertson (1978) no qual caramujos *B. glabrata* apresentavam um aumento no número de hemócitos após duas horas de infecção, e com um estudo publicado por Seta *et al.* (1996) que também descreveram um aumento do número de hemócitos em *B. glabrata*, aumento esse que se dá após trinta minutos de infecção até o período de duas horas após a infecção, a partir do qual o número de hemócitos começa a cair gradativamente até se normalizar com 24 horas pós infecção, não havendo mais alteração no número de hemócitos neste período. No nosso estudo o número de hemócitos também não varia com 24 horas semelhantemente a este estudo de Seta *et al.* (1996). É possível que a variação no número de células possa ter ocorrido mais tardiamente (após 2 horas de infecção), como ocorre com *B. tenagophila* e se normalizado antes do período de 24h, quando foi realizada nossa segunda contagem. Uma outra possibilidade é que a elevação no número de hemócitos pode ser muito tardia assim como no trabalho de Santos e Rodrigues (2003) onde o pico de elevação hemocitário ocorreu após 48 horas de infecção.

Ao estudar *B. tenagophila* susceptível e não susceptível ao *S. mansoni*, Oliveira *et al.* (2010) mostrou que em caramujos susceptíveis não há variação hemocitária no período 24h pós infecção, existindo uma pequena variação de hemócitos nos períodos de 2h. Enquanto que caramujos resistentes a quantidade de hemócitos varia no período de 2h e 12h pós infecção, quando há uma queda no número de células. Considerando a espécie *B. straminea* como uma espécie bem menos susceptível ao *S. mansoni*, também houve no nosso estudo uma queda no número de hemócitos no período de 2 e 24 horas pós infecção com *S. mansoni*.

É possível que a variação da dinâmica hemocitária de *B. straminea* tenha apresentado uma queda em seu número 2 horas pós infecção por ser uma espécie mais resistente ao parasito *S. mansoni* em comparação ao *B. glabrata*. Neste contexto, os hemócitos, que são bem mais ativos numa linhagem resistente, teriam migrado rapidamente para as áreas de penetração do patógeno e que isso tenha diminuído a quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa. Esses resultados são embasados em um estudo feito por Araque *et al.* (2003) quando ele mostrou a migração de hemócitos para o sítio de penetração do parasito. Nosso resultado também mostrou que com 24 horas pós-infecção ainda há uma queda no número de hemócitos no grupo não sensibilizado, porém essa amplitude de queda é bem menor que quando comparados caramujos sadios e infectados após 2h, isso pode indicar que neste período, enquanto alguns hemócitos migram para o sítio de entrada do parasito, outros são produzidos pelo hospedeiro, relação que também ocorre no grupo sensibilizado, indicando que a pré-exposição a antígenos do parasita não altera a quantidade de células circulantes. O estudo realizado por Santos e Rodrigues (2003) que analisaram a dinâmica hemocitária de *B. straminea*, mostrou que o pico hemocitário se dá às 48 horas pós infecção, havendo uma intensa produção de hemócitos entre as 24 e 48 horas. Em conjunto com nossos resultados, esses dados nos levam a um cenário onde inicialmente os hemócitos migrariam para o local de penetração do parasito, havendo neste momento uma queda dos hemócitos circulantes, logo em seguida novas células seriam produzidas em resposta à infecção até o momento em que o número de hemócitos produzidos superassem o número de hemócitos que migraram em resposta à infecção, havendo assim um pico hemocitário em tempos posteriores.

Além de realizar a fagocitose, nodulação e encapsulação dos parasitos, os hemócitos são responsáveis por produzir uma gama de substâncias efetoras do sistemas de defesa (COUSTAU *et al.*, 2015; GALINIER *et al.*, 2013; MITTA *et al.*, 2005), uma dessas substâncias é a enzima fenoloxidase (BAHGAT *et al.*, 2002) que se apresenta relacionada a imunidade em muitos invertebrados. Sendo uma enzima de grande importância no sistema

imune de insetos, responsável pelo processo de melanização ao redor do patógeno (GONZÁLEZ-SANTOYO; CÓRDOBA-AGUILAR, 2012).

A fim de identificar os tipos celulares envolvidos com a produção desta enzima, nós realizamos a marcação dos hemócitos como descrito por Ling e Yu (2005) e identificamos os granulócitos e hialinócitos como os tipos de hemócitos produtores da fenoloxidase. Esses dois tipos de hemócitos juntos são responsáveis por cerca de 55% dos tipos de hemócitos circulantes das espécies *B. glabrata* e *B. straminea*, sendo os outros 45% compostos por “blast-like cells” (CAVALCANTI *et al.*, 2012). Os hialinócitos são divididos em três categorias, contudo devido a limitações da técnica de visualização da marcação dos hemócitos para fenoloxidase, não foi possível identificar se todos os três tipos de hialinócitos são capazes de produzir a fenoloxidase, entretanto observamos que o hialinócito tipo 1 em *B. glabrata* é um dos tipos de hialinócitos responsáveis pela produção desta enzima.

Mesmo que os hemócitos identificados tenham sido do tipo granulócitos e hialinócitos, nem todas essas células foram marcadas em 100% das ocorrências, havendo também células destes dois tipos sem marcação em ambas as espécies, sendo que na espécie *B. straminea* o número de células marcadas é bem menor em relação a *B. glabrata*. A produção de fenoloxidase por apenas algumas células dentro de um mesmo tipo de hemócitos também foi visto por Ling *et al.* (2005) que mostraram que apenas metade dos pro-hemócitos do bicho da seda *Bombyx mori* eram ativos para fenoloxidase enquanto a outra metade não apresentou marcação, fato que também ocorria com os granulócitos onde nem todos se apresentavam marcados, e que hemócitos denominados plasmatócitos eram 100% ativos para fenoloxidase.

A atividade dos granulócitos para fenoloxidase também foi mostrada por Wang *et al.* (2011) ao estudar os tipos de hemócitos produtores da fenoloxidase na espécie *Culex pipiens quinquefasciatus*, mostrando que esse tipo celular se encontrava marcado para fenoloxidase em fêmeas que se alimentaram de sangue, juntamente com outro tipo de hemócito denominado oenocitóide, havendo uma variação do tipo de célula produtora da fenoloxidase de acordo com a fase de desenvolvimento do mosquito.

Uma vez que os tipos de hemócitos em caramujos do gênero *Biomphalaria* difere dos tipos encontrados em artrópodes (CAVALCANTI *et al.*, 2012; MARTINS-SOUZA *et al.*, 2009; STRAND, 2008; WANG *et al.*, 2011) não é possível fazer uma extensa comparação entre seus tipos celulares quanto a produção da enzima fenoloxidase.

Quanto à variação de sua atividade, nosso trabalho mostrou que essa enzima não parece ter a mesma função chave em caramujos *B. glabrata* e *B. straminea* na defesa contra o trematódeo *S. mansoni* logo após a infecção, uma vez que não houve variação da atividade enzimática dentre os tratamentos. Em outros moluscos como o bivalve *Venerupis philippinarum* a atividade enzimática da fenoloxidase na hemolinfa é capaz de aumentar simplesmente com o aumento de temperatura do ambiente por um período de tempo (RICHARD *et al.*, 2015) aumento que varia quando analisados diferentes tecidos (LE BRIS, *et al.*, 2015), já no bivalve *Chlamys farreri* a atividade desta enzima na hemolinfa aumenta quando em contato com LPS de *Escherichia coli* (ZHOU *et al.*, 2012). Considerando-se outros modelos, como insetos, a enzima tem um aumento da sua atividade quando um organismo é infectado com algum parasito ou vírus, assim como ocorre com células de *A. albopictus* infectadas com o arbovírus Semliki Forest vírus (SFV) e a bactéria *E. coli* (RODRIGUEZ-ANDRES *et al.*, 2012), ou durante o processo de encapsulação como ocorre em uma linhagem resistente de *Drosophila melanogaster* quando expostas a *Leptopilina boulardi* (NAPPI *et al.*, 1991). Entretanto ao estudar uma linhagem susceptível de *D. melanogaster* este mesmo autor mostrou que neste caso a atividade da fenoloxidase permaneceu-se inalterada. O mesmo pode ter ocorrido com o caramujo *B. glabrata* no presente estudo, que apresenta alta susceptibilidade ao *S. mansoni*, não apresentando assim mudança na atividade desta enzima mesmo após a sensibilização. A enzima fenoloxidase também pode estar ligada a outros processos do organismo, Bai *et al.* (1996) mostram que a enzima fenoloxidase está presente na glândula de albúmem de *B. glabrata*, podendo ter importante papel na formação dos seus ovos. Entretanto quando se analisa a espécie *B. straminea* percebe-se que, embora não haja diferenças significativas na atividade desta enzima em caramujos sadios e infectados, um pequeno decréscimo da atividade da fenoloxidase ocorre em caramujos que sofreram o processo de sensibilização, indicando que a cascata da fenoloxidase pode estar envolvida com a resposta imune do gênero *Biomphalaria*, no entanto não é um dos seus pontos chave.

Quanto à variação da expressão dos genes, em *B. glabrata* o FREP 3 apresentou uma suave queda na sua expressão após 24 horas de infecção com o parasita nos caramujos não sensibilizados, não apresentando qualquer alteração no período de duas horas. Este resultado se mostra diferente em parte do mostrado por Hertel *et al.* (2005), que mostraram que a expressão do FREP 3 não varia significativamente após a infecção com *S. mansoni* nem em linhagens resistentes nem em linhagens susceptíveis. Há no entanto uma variação de

resultados na literatura quando outros autores mostraram que em uma linhagem susceptível de *B. glabrata* o FREP 3 tem sua expressão aumentada após 24 e 48 horas da infecção por *S. mansoni* (HANINGTON; LUN; *et al.*, 2010), nos levando a considerar que o perfil de expressão desse gene varia dependendo das linhagens de parasita/hospedeiro utilizadas, nos levando assim ao modelo de polimorfismo de compatibilidade sugerido por Mitta *et al.* (2012). Ao se trocar a espécie do parasito a expressão do FREP também muda, ao utilizar outro trematódeo (*Echinostoma paraensei*) como modelo, percebeu-se que a expressão do FREP 3 cai nos períodos de 2, 4 e 8 dias pós infecção, havendo uma queda maior da expressão com 4 dias (HANINGTON; LUN; *et al.*, 2010), sendo esses resultados mais semelhantes aos nossos onde não há variação inicial da expressão seguida por uma decréscimo da expressão após 24h. Após a sensibilização essa queda aconteceu mais precocemente, logo após as 2 horas de infecção, indicando que a sensibilização interferiu na dinâmica da expressão do FREP 3 em *B. glabrata*. Além de variar de acordo com o patógeno a expressão do FREP 3 também varia dentre os hemócitos, estudos mostraram que o FREP 3 não é expresso em todos hemócitos e que a proporção de hemócitos que produzem FREP 3 são aumentadas após uma infecção (GORDY *et al.*, 2015).

Em *B. straminea*, uma espécie bem menos susceptível, a expressão do FREP 3 não se altera nem nos caramujos não sensibilizados nem nos sensibilizados, semelhantemente ao que ocorre com caramujos *B. glabrata* resistentes como mostrado por Hertel *et al.* (2005). Bouchut *et al.* (2006) mostraram que o FREP 3 é menos expresso cerca de 4,5 vezes quando comparada a uma linhagem mais resistente (índice de susceptibilidade de 1%) com uma susceptível de *Biomphalaria glabrata* frente a uma infecção com *Echinostoma caproni*, a partir do RNA extraído do corpo inteiro. Ao estudar hemócitos de outras linhagens Lockyer *et al.* (2012) mostraram que o FREP 3 tem um aumento da expressão em uma linhagem resistente em comparação com uma susceptível 2 horas pós infecção com *S. mansoni*.

Ao compararmos o comportamento da expressão do FREP 3 nas duas espécies estudadas percebemos que em *B. straminea* a expressão do FREP 3 não cai após a infecção, já em *B. glabrata* há uma queda na expressão deste gene, isso está ligado ao fato do parasito conseguir modular a expressão de alguns genes no hospedeiro. Em linhagens resistentes alguns genes são super-expressos como resultado da infecção, já em linhagens susceptíveis os produtos produzidos pelo parasita são capazes de reduzir a expressão de genes relacionados à imunidade, a fim de propiciar um ambiente menos hostil (Hanington *et al.* 2010b).

Os resultados de expressão do FREP 4 em hemócitos de *B. glabrata* mostraram uma redução de sua expressão após 24 horas no grupo não sensibilizado e quase nenhuma alteração na sua expressão quando comparados sadios e infectados do grupo sensibilizado. Este resultado é muito semelhante aos resultados publicados por Hertel *et al.* (2005), onde em um caramujo susceptível praticamente não há variação da expressão do FREP 4. Havendo discordância quanto à expressão após 24 horas de infecção em linhagens susceptíveis, uma vez que Hanington *et al.* (2010) mostraram que a expressão deste gene é aumentada 24 horas após infecção ao *S. mansoni* e também 24h após o *E. caproni*. Já em linhagens resistentes há uma super-expressão do FREP 4 24h pós infecção, não havendo alteração da expressão antes desse período. De acordo com Zhang *et al.* (2008) a subfamília do FREP 4 é a que mais responde a infecção com trematódeos.

O fato de nossos iniciadores não terem localizado o FREP 4 em *B. straminea*, pode indicar que esta espécie não possui as mesmas subfamílias desse FREP que ocorrem na espécie *B. glabrata*, uma vez que os FREPs são moléculas altamente diversificadas (ZHANG *et al.*, 2004), sendo possível também que a espécie *B. straminea* possua uma gama de subfamílias de FREP 4 completamente diferentes de *B. glabrata* uma vez que, dentro da espécie *B. glabrata* de diferentes continentes, já há alterações na estrutura de algumas subfamílias dos FREPs e algumas linhagens possuem subfamílias que outras não possuem (DHEILLY *et al.*, 2015), o que estaria ligado ao fenótipo de susceptibilidade ou resistência de uma linhagem ou espécie. Entretanto não conseguimos afirmar com certeza que a família inteira do FREP 4 inexistente em *B. straminea*, uma vez que as famílias de FREPs admitem até 15% de diferenças na sua sequência de nucleotídeos (ZHANG; LOKER, 2003).

Ao se comparar os grupos sensibilizados e não sensibilizados de *B. straminea* percebe-se uma forte queda dos níveis basais da expressão no grupo sensibilizado, o que pode proporcionar um ambiente no qual o parasito pode se desenvolver com menos barreiras. Hanington *et al.* (2012) mostraram que o processo de sensibilização com o parasito *E. paraensei* altera os níveis de expressão de gene relacionados à imunidade e que os níveis de expressão desse gene passaram a variar de acordo com cada indivíduo. Eles mostraram que o processo de sensibilização com *E. paraensei* não deixa os caramujos mais resistentes a uma segunda infecção com trematódeo (neste caso o *S. mansoni*), ao invés disso parte dos caramujos que antes era resistentes passaram a se tornar susceptíveis, e nesses o FREP 3 era menos expresso após a sensibilização com *E. paraensei* seguida de infecção com *S. mansoni*. Eles atribuíram essa redução na expressão à influência que o parasito tem sobre linhagens que

não são resistentes. O que também pode ser atribuído a nossa espécie *B. glabrata*, que teve uma queda na expressão do FREP 3 ocorrendo logo após 2h da infecção em caramujos sensibilizados.

Quando comparamos *B. glabrata* sensibilizados e não sensibilizados quanto à expressão do FREP 4, ficou claro que a sensibilização aumentou após 4 dias os níveis basais de expressão deste gene, esse resultado pode ter relação com a super expressão do FREP 4 no quarto dia de exposição ao patógeno, que já foi mostrada por Hanington *et al.* (2010). Apenas estes resultados não nos permite inferir uma resposta secundária, mas é possível indagar um cenário onde em uma segunda exposição os níveis de expressão gênica poderiam ser alterados gerando um novo ambiente de reconhecimento do parasita, o que poderia levar a um dos dois estados de resposta secundária levantados por Hanington *et al.* (2010) onde um organismo poderia ter após o primeiro contato com um parasita um estado imunológico ativado fazendo com que a infecção por qualquer patógeno fique mais difícil ou mais fácil (HANINGTON *et al.*, 2012), ou até mesmo a um segundo estado de especificidade. Entretanto de acordo com nossos experimentos esse novo ambiente não contemplaria uma diferença no número de hemócitos dessas espécies pós sensibilização, tendo contudo um aumento na velocidade de produção dessas células.

Os mecanismos de resistência/susceptibilidade dos hospedeiros do gênero *Biomphalaria* que determinam a infecção pelo parasito se mostram determinados por famílias multigênicas e variam entre diferentes linhagens e até mesmo dentro de uma linhagem (COUSTAU *et al.*, 2015). Isso serve de base para explicar algumas diferenças dos nossos resultados em comparação com estudos anteriores, uma vez que a resposta imunológica deste hospedeiros varia entre linhagens, espécies e tipos de organismos parasitas.

9 CONCLUSÃO

A dinâmica hemocitária na espécie *Biomphalaria glabrata* não apresentou variação significativa do número de hemócitos entre sadios e infectados, concordando com o fato dos hemócitos dessa espécie falharem no bom reconhecimento dos parasitas. Para a espécie *B. straminea* o número de hemócitos foi menor nos grupos infectados em relação aos indivíduos sadios, apesar de não ocorrer variação significativa na dinâmica hemocitária entre caramujos sensibilizados e não sensibilizados, o que indica que o processo de sensibilização não interfere na quantidade dos hemócitos circulantes.

A dosagem da enzima fenoloxidase mostrou que não há variação da atividade enzimática entre sadios e infectados da espécie *B. glabrata* e que o processo de sensibilização não acarreta nenhuma variação nesta espécie. Em *B. straminea* se percebeu que caramujos não sensibilizados possuem a atividade da fenoloxidase diferente dos sensibilizados, entretanto, a atividade desta enzima não variou entre sadios e infectados do mesmo grupo.

A identificação dos tipos celulares produtores de fenoloxidase mostrou que os hemócitos responsáveis pela produção desta enzima nas espécies de *Biomphalaria* estudadas são os granulócitos e hialinócitos.

Quanto à expressão do FREP 3, esse gene tem sua expressão reduzida em *B. glabrata* infectado em ambos os grupos sensibilizados e não sensibilizados, já em *B. straminea* não há diferença de expressão entre sadio e infectado. Entretanto, após a sensibilização os níveis basais de expressão do FREP 3 caem mais de 80%. Em *B. glabrata* o FREP 4 é super expresso em caramujos previamente sensibilizados, e cai quando o caramujo é infectado com *S. mansoni*.

O número de estudos envolvendo a resposta imune desses hospedeiros vem aumentando desde a última década, porém poucos abordam a questão de resposta imune secundária. Este estudo mostrou que a atividade da fenoloxidase varia após a sensibilização numa espécie menos susceptível e que o FREP 3 e 4 são capazes de ter seus níveis basais e expressão alterados após a sensibilização, porém muitos estudos ainda são necessários para poder elucidar varias questões sobre resposta secundária, principalmente se é possível existir uma certa resposta de memória nestes e em outros invertebrados.

REFERÊNCIAS

- ADEMA, C. M. *et al.* Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes). **Molecular Immunology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 849–860, Jan. 2010.
- ADEMA, C. M. *et al.* A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 16, p. 8691–8696, Aug. 1997.
- ARAQUE, W. *et al.* Ultrastructural study of the in vitro interaction between *Biomphalaria glabrata* hemocytes and *Schistosoma mansoni* miracidia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 905–908, 2003.
- BAHGAT, M. *et al.* Serine protease and phenoloxidase activities in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* snails with varying susceptibility to infection with the parasite *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 88, n. 6, p. 489–494, 2002.
- BAI, G.; LI, J.; CHRISTENSEN, B. M.; YOSHINO, T. P. Phenoloxidase activity in the reproductive system and egg masses of the pulmonate gastropod, *Biomphalaria glabrata*. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B – Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 114, n. 4, p. 353–359, 1996.
- BARON, O. L. *et al.* Parental Transfer of the Antimicrobial Protein LBP/BPI Protects *Biomphalaria glabrata* Eggs against Oomycete Infections. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. 1–10, 2013.
- BAYNE, C. J. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1, p. 8–18, May 2009.
- BECH, N. *et al.* Follow-up of the genetic diversity and snail infectivity of a *Schistosoma mansoni* strain from field to laboratory. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 10, n. 7, p. 1039–1045, 2010.
- BECK, G. *et al.* Invertebrate cytokines III: Invertebrate interleukin-1-like molecules stimulate phagocytosis by tunicate and echinoderm cells. **Cellular Immunology**, New York, v. 146, p. 284–299, 1993.
- BOUCHUT, A. *et al.* Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: new candidate genes evidenced by a suppressive subtractive hybridization approach. **Parasitology**, Londres, v. 134, n. Pt 4, p. 575–588, Apr. 2007.
- BOUCHUT, A. *et al.* Compatibility in the *Biomphalaria glabrata*/*Echinostoma caproni* model: potential involvement of adhesion genes. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 36, n. 2, p. 175–184, Feb. 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas**. 2. ed. Brasília: Ed. Ministério da Saúde, 2007.

BRIS, C. *et al.* Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* – Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 42, n. 1, p. 16–24, 2015.

BURKE, R. D.; WATKINS, R. F. Stimulation of starfish coelomocytes by interleukin-1. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 180, n. 2, p. 579–584, Oct. 1991

CAVALCANTI, M. G. S. *et al.* Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**, Oxford, v. 43, n. 2-3, p. 285–291, 2012.

CONTRERAS-GARDUÑO, J.; LANZ-MENDOZA, H.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. The expression of a sexually selected trait correlates with different immune defense components and survival in males of the *American rubyspot*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 612–621, 2007.

CORRÊA, R. *et al.* Dispersão de *Biomphalaria straminea*, hospedeira intermediária do *Schistosoma mansoni*, através da distribuição de peixes. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 117–127, 1970.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, Suppl. 1, p. 13–19, jan. 2004.

COUSTAU, C. *et al.* Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. **Fish and Shellfish Immunology** v. 46, n. 1, p. 5-16, Sep. 2015.

CRIBB, T. H. *et al.* Life Cycle Evolution in the Digenea: A New Perspective from Phylogeny. **Advances in Parasitology**, Londres, v. 54, n. 69, p. 197–254, 2003.

DIAS, L. C. S. *et al.* Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 205–212, 1987.

EVELAND, L. K.; RITCHIE, L. S. Infectivity of cercariae of *Schistosoma mansoni* from snails on inadequate diets. **Parasitology**, v. 64, n. 03, p. 441–444, 1972.

FERNANDEZ, M. A.; THIENGO, S. C. Susceptibility of *Biomphalaria straminea* from Peixe Angical dam, Tocantins, Brazil to infection with three strains of *Schistosoma mansoni*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 488–491, 2010.

- GALINIER, R. *et al.* Biomphalysin , a New b Pore-forming Toxin Involved in *Biomphalaria glabrata* Immune Defense against *Schistosoma mansoni*. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 1–16, 2013.
- GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil**: Tratado de Medicina Interna. 22 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- GONZÁLEZ-SANTOYO, I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Phenoloxidase: a key component of the insect immune. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 142, n. 1, p. 1–16, 2012.
- GORDY, M. A.; PILA, E. A.; HANINGTON, P. C. The role of fibrinogen-related proteins in the gastropod immune response. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 46, n. 1, p. 39–49, 2015.
- GRANATH Jr., W. O.; CONNORS, V. A., TARLETON, R. L., Interleukin-1 activity in hemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: Presence, differential expression, and biological function. **Cytokine**, San Diego, v. 6, n. 1, p. 21–27, Jan. 1994.
- GUARALDO, A. M. A. *et al.* Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D’Orbigny, 1835). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 15, p. 436–448, 1981.
- GUILLOU, F. *et al.* Identification and expression of gene transcripts generated during an anti-parasitic response in *Biomphalaria glabrata*. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 31, n. 7, p. 657–671, Jan. 2007.
- HANELT, B.; LUN, C. M.; ADEMA, C. M. Comparative ORESTES-sampling of transcriptomes of immune-challenged *Biomphalaria glabrata* snails. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 99, n. 2, p. 192–203, Oct 2008.
- HANINGTON, P. C.; FORYS, M. A.; LOKER, E. S. A somatically diversified defense factor, FREP 3, is a determinant of snail resistance to schistosome infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 3, p. 1–9, 2012.
- HANINGTON, P. C. *et al.* Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 49, p. 21087–21092, Dec. 2010.
- HANINGTON, P. C. *et al.* Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 40, n. 7, p. 819–831, June 2010.
- HERTEL, L. A.; ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 29, n. 4, p. 295–303, Jan. 2005.

HUGHES, T. K. *et al.* LPS stimulated invertebrate hemocytes: A role for immunoreactive TNF and IL-1. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v.15, n. 3, p. 117–122, 1991.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 303–308, 2000.

KURTZ, J. Memory in the innate and adaptive immune systems. **Microbes and infection**, Paris, v. 6, n. 15, p. 1410–1417, Dec. 2004.

KURTZ, J.; FRANZ, K. Evidence for memory in invertebrate immunity. **Nature**, Londres, v. 425, n. 6953, p. 37–38, Sept. 2003.

LARSON, M. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Resistance of *Biomphalaria glabrata* 13-16-R1 snails to *Schistosoma mansoni* PR1 is a function of haemocyte abundance and constitutive levels of specific transcripts in haemocytes. **International Journal for Parasitology**, Nova York, v. 44, n. 6, p. 343–353, 2014.

LÉONARD, P. M. *et al.* Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Gene**, Amsterdam, v. 269, n. 1-2, p. 155–165, May 2001.

LING, E. *et al.* Reexamination of phenoloxidase in larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. **Tissue and Cell**, Edimburgo v. 37, n. 2, p. 101–107, 2005.

LING, E.; YU, X. Q. Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 1356–1366, Dec. 2005.

LOCKYER, A. E. *et al.* Early differential gene expression in haemocytes from resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* strains in response to *Schistosoma mansoni*. **PloS One**, São Francisco, v. 7, n. 12, Jan 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0051102>>. Acesso em 10 mar. 2014.

LOCKYER, A. E. *et al.* *Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni*. **BMC genomics**, Londres, v. 9, p. 634, jan 2008.

MACHADO, S. M. P. *et al.* Verificação de antagonismo entre larvas de *Schistosoma mansoni* e larvas de outros Digenea em *Biomphalaria tenagophila*, molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP, Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 6, p. 484–488, 1988.

MARTINS-SOUZA, R. L. *et al.* Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology**, Londres, v. 136, n. 1, p. 67–76, Jan. 2009.

- MILLER, A N. *et al.* Differential gene expression in haemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*: effects of *Schistosoma mansoni* infection. **International Journal for Parasitology**, Nova York, v. 31, n. 7, p. 687–696, May 2001.
- MITTA, G. *et al.* Compatibility polymorphism in snail/schistosome interactions: From field to theory to molecular mechanisms. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 37, n. 1, p. 1–8, May 2012.
- MITTA, G.; GALINIER, R.; TISSEYRE, P.; *et al.* Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, n. 5, p. 393–407, jan 2005.
- MONÉ, Y. *et al.* A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 4, n. 9, Jan. 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000813>>. Acesso em 14 jul. 2014.
- MUCKLOW, P. T. *et al.* Variation in phenoloxidase activity and its relation to parasite resistance within and between populations of *Daphnia magna*. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, Londres, v. 271, n. 1544, p. 1175–1183, 2004.
- NACIF-PIMENTA, R. *et al.* *Schistosoma mansoni* in Susceptible and Resistant Snail Strains *Biomphalaria tenagophila*: In Vivo Tissue Response and In Vitro Hemocyte Interactions. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 7, n. 9, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0045637>>. Acesso em 23 jan. 2014.
- NAPPI, A J.; CARTON, Y.; FREY, F. Parasite-induced enhancement of hemolymph tyrosinase activity in a selected immune reactive strain of *Drosophila melanogaster*. **Archives of insect biochemistry and physiology**, Nova York, v. 18, n. 3, p. 159–168, 1991.
- NEGRÃO-CORRÊA, D. *et al.* Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts and hemocytes of *Biomphalaria*. **Journal of Parasitology Research**, Nova York, v. 2012, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3395257/>>. Acesso em 23 jan. 2014.
- NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- OLIVEIRA, A. L. *et al.* Differences in the number of hemocytes in the snail host *Biomphalaria tenagophila*, resistant and susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 4, p. 2436–2445, 2010.
- PIERI, O. S. Perspectivas no controle ambiental dos moluscos vetores da esquistossomose. In: BARBOSA, F. S. (Org.). **Tópicos em malacologia médica**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 1995. p. 239–252.
- RAFTOS, D. A. *et al.* Invertebrate cytokines II: Release of interleukin-1-like molecules from tunicate hemocytes stimulated with zymosan. **Lymphokine and Cytokine Research**, Nova York, v. 11, n. 4, p. 235–240, Aug. 1992.

RAFTOS, D. A. *et al.* Invertebrate cytokines :Tunicate cell proliferation stimulated by an interleukin-1-like molecule. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, n. 21, p. 9518–9522, Nov. 1991.

RICHARD, G. *et al.* Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis* e Part II : Combined effect of temperature and two *V. tapetis* strains. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 44, n. 1, p. 79–87, May 2015.

RICHARDS, C. S.; KNIGHT, M.; LEWIS, F. A. Genetics of *Biomphalaria glabrata* and its effect on the outcome of *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology today**, Cambridge, v. 8, n. 5, p. 171–174, 1992.

RODRIGUEZ-ANDRES, J. *et al.* Phenoloxidase Activity Acts as a Mosquito Innate Immune Response against Infection with Semliki Forest Virus. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 8, n. 11, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002977>>. Acesso em 30 Dec. 2014.

SANTOS, M. A. V.; RODRIGUES, I. R. C. Produção de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* infectadas com *Schistosoma mansoni*. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 17, n. 3, p. 17–21, 2003.

SANTOS, M. A. V.; RODRIGUES, I. R. C. Estudo in vitro da ação letal da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* sobre os miracídios de *Schistosoma mansoni*. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 20, n. 2, p. 13–16, 2006.

SETA, L.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. Comportamento dos amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni* , inoculação de tinta nanquim e fratura da concha. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 332–340, 1996.

SILVA, P. B. *et al.* Aspectos físico-químicos e biológicos relacionados à ocorrência de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 901–906, 2006.

SOUZA, C. P. *et al.* Comparative Histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with Variable Degrees of Resistance to *Schistosoma mansoni* Miracidia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 4, p. 517–522, 1997.

SOUZA, C. P. *et al.* Suscetibilidade de populações de *Biomphalaria straminea* (Dunke, 1848) de Minas Gerais, à infecção por *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 212–216, 1987.

SOUZA, F. P.; BARBOSA, N. D. C.; RESENDE, D. F. Effect of temperature on the reproduction of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 5, p. 441–449, 1990.

TOLEDO, R.; FRIED, B. *Biomphalaria* Snails and larval Trematodes. 1ed. Nova York: **Springer Science**, 2011.

VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. Defense mechanisms in bivalve mollusks , with emphasis in pectinids. In: MAEDA-MARTÍNEZ, A. N. (Ed.). **Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica**: Ciencia y Acuicultura. México D.F.: Noriega Editores, 2001. p. 127–146.

WANG, Z. *et al.* A systematic study on hemocyte identification and plasma prophenoloxidase from *Culex pipiens quinquefasciatus* at different developmental stages. **Experimental Parasitology**, Nova York, v. 127, n. 1, p. 135–141, 2011.

Organização Mundial da Saúde. Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010. **Weekly epidemiological record**, Geneve, n. 4, p. 37–44, 2012.

WOOD, W.; JACINTO, A. *Drosophila melanogaster* embryonic haemocytes: masters of multitasking. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, Londres, v. 8, n. 7, p. 542–551, 2007.

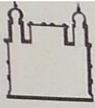
ZHANG, S. M.; LOKER, E. S. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. **Developmental and Comparative immunology**, Elmsford, v. 27, n. 3, p. 175–187, Mar 2003.

ZHANG, S. M.; LOKER, E. S. Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **Gene**, Amsterdam, v. 341, p. 255–266, Oct 2004.

ZHANG, S. M.; ZENG, Y.; LOKER, E. S. Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*. **Innate Immunity**, Los Angeles, v. 14, n. 3, p. 175–189, June 2008.

ZHOU, Z. *et al.* The phenoloxidase activity and antibacterial function of a tyrosinase from scallop *Chlamys farreri*. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 33, n. 2, p. 375–381, 2012.

ANEXO A – PARECER DO CEUA



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

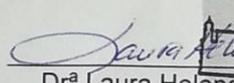
Certificamos que o projeto intitulado: **Estudo comparativo da expressão de genes de adesão celular entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. occidentalis*, frente à infecção por *Schistosoma mansoni***, protocolado sob nº 58/2014 pelo (a) pesquisador (a) Luiz Carlos Alves.

Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 15/09/2014. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 17 de setembro de 2016.

| Quantitativo de Animais Aprovados | |
|---------------------------------------|---------------|
| Espécie | Nº de Animais |
| Camundongo heterogênico Swiss Webster | 100 |

We certify that project entitled **Estudo comparativo da expressão de genes de adesão celular entre as espécies *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. occidentalis*, frente à infecção por *Schistosoma mansoni***. Protocol nº 58/2014, coordinated by Luiz Carlos Alves. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on September, 15, 2014. In present version this project is licensed and valid until September, 17, 2016.

Recife (PE, Brazil) September, 17, 2014.


DRA. LAURA GIL
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no Uso de Animais - CEUA
 Mkt. SIAPE 015831077
 E-mail: laura@cpqam.fiocruz.br
Dr^a Laura Helena Vegetal Zales Gil
 Coordenadora CEUA/CPqAM