

Thatiane Cristina Barros da Silva

EXPRESSÃO DE LECTINAS NOS TECIDOS DO HOSPEDEIRO
INTERMEDIÁRIO *Biomphalaria glabrata*, Say 1818 (Gastropoda: Pulmonata:
Planorbidae) DURANTE OS PERÍODOS PRÉ PATENTE E PATENTE DA
INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni*, Sambon 1907 (Trematoda:
Schistosomatidae)

Rio de Janeiro

2014

Thatiane Cristina Barros da Silva

**EXPRESSÃO DE LECTINAS NOS TECIDOS DO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO
Biomphalaria glabrata, Say 1818 (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae) DURANTE OS
PERÍODOS PRÉ PATENTE E PATENTE DA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni*,
Sambon 1907 (Trematoda: Schistosomatidae)**

Trabalho apresentado à coordenação do Curso de Especialização em Malacologia de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como requisito parcial necessário à obtenção do grau de Especialista em Malacologia de Vetores.

Rio de Janeiro
Fevereiro, 2014



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Especialização em Malacologia de Vetores

THATIANE CRISTINA BARROS DA SILVA

EXPRESSÃO DE LECTINAS NOS TECIDOS DO HOSPEDEIRO INTERMEDIÁRIO
Biomphalaria glabrata, Say 1818 (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae) DURANTE OS
PERÍODOS PRÉ PATENTE E PATENTE DA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni*,
Sambon 1907 (Trematoda: Schistosomatidae)

Trabalho apresentado à coordenação do Curso de Especialização em Malacologia de Vetores do Instituto Oswaldo Cruz, como requisito parcial necessário à obtenção do grau de Especialista em Malacologia de Vetores, pelo Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz avaliada pela comissão formada pelos professores:

Orientador(a): _____
Dra. Ester Maria Mota

1º Examinador: _____
Dra. Marta Júlia Faro dos Santos Costa

2º Examinador: _____
Dra. Clélia Christina Mello Silva

Suplente: _____
Lângia Colli Montresor

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

S586 Silva, Thatiane Cristina Barros da

Expressão de lectinas nos tecidos do hospedeiro intermediário *Biomphalaria glabrata*, Say 1818 (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae) durante os períodos pré patente e patente da infecção por *Schistosoma mansoni*, Sambon 1907 (Trematoda: Schistosomatidae) / Thatiane Cristina Barros da Silva. – Rio de Janeiro, 2014.

xx, 55 f. : il. ; 30 cm.

Monografia (Especialização) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Malacologia de Vetores, 2014.

Bibliografia: f. 46-50

1. *Biomphalaria glabrata*. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Lectinas.
I. Título.

CDD 616.963

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Orientadora
Dra. Ester Maria Mota

Aos meus pais Alidéa Barros da Silva e Luiz Carlos da Silva que tornaram este trabalho possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus.

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

Agradeço a minha avó Ruth Felipe da Silva por sua atenção, amor e carinho.

Agradeço ao meu irmão Evandro Luís Barros da Silva, minha sobrinha Manuela Lima Barros da Silva, minha cunhada Michele Lima e sua filha Larissa Lima por seu apoio, amizade e carinho.

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

Agradeço as minhas primas e primos: Érika, Christiany, Thaís (minha afilhada e prima em segundo grau), Cawanny (prima em segundo grau), Cleber, Anderson, Alcidir Júnior, Carlos Augusto, Marcos Vinícius, Bruno Leonardo e João Gabriel (primo em segundo grau) por seu amor, atenção e carinho.

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

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

Agradeço a minha orientadora, Dr^a. Ester Maria Mota pela oportunidade aprender, pelo conhecimento que me transmitiu, pelo auxílio na confecção da monografia, por sua amizade, companheirismo e por ter permitido que estagiasse no Laboratório de Patologia.

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

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

Agradeço ao Dr. Marcelo Pelajo Machado, chefe do Laboratório de Patologia, pela oportunidade de estagiar em seu departamento.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Patologia – IOC/Fiocruz: Alexandra, Bárbara, Dr. Henrique Lenzi (em memória), Fátima, Igor, Iolanda, José Mariano, Juciara (Ci), Luzia Barros, Luzia Caputo, Luciana, Márcia, Marcelo Barbosa, Pedro Paulo, Priscila, Sr. José Carvalho por sua amizade, carinho e apoio.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Referência Nacional em Malacologia: Dra. Silvana Thiengo, Dra. Mônica Ammon Fernandez, Lângia Colli Montresor, Paulo César dos Santos e Paula Thaise por terem cedido os moluscos utilizados nos experimentos desta monografia, por seu carinho, amizade e apoio.

Agradeço a Marta Júlia Faro por ser uma ótima amiga e por ter me ensinado a dissecar os moluscos utilizados neste experimento.

Agradeço a Clélia Christina Mello Silva por ter me ensinado a coletar a hemolinfa dos caramujos e por sua amizade.

Agradeço a Rodrigo Mexas do Centro de Tratamento de Imagens do IOC pelo excelente tratamento e impressão das imagens usadas neste trabalho.

Agradeço a Ana Paula Martin por seu carinho, amizade e apoio.

Agradeço aos professores do Curso de Pós-graduação *Latu Sensu* em Malacologia de Vetores, pelo seu apoio, ótimas aulas, e ótimas instruções durante todo o curso.

Agradeço aos amigos da turma do Curso de Pós-graduação *Latu Sensu* em Malacologia de Vetores, pelos momentos de descontração e apoio durante todo o curso.

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

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

RESUMO

O esclarecimento de mecanismos envolvidos na relação parasito/hospedeiro entre caramujos do gênero *Biomphalaria* e *S. mansoni* representa uma importante ferramenta epidemiológica para o controle da infecção. Vários estudos *in vitro* têm mostrado que o mecanismo de resistência de espécies e diferentes cepas de *Biomphalaria* está relacionado à presença de lectinas. Entretanto, não há estudos sobre a relação da expressão dessas proteínas nos tecidos e órgãos de moluscos infectados, uma vez que a maioria dos trabalhos são realizados *in vitro*, o que limita a quantidade de componentes envolvidos na interação parasito/hospedeiro. O estudo da expressão de carboidratos, ligantes de lectinas específicas, sobre cortes histológicos de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* pode contribuir para melhor caracterização da resposta imune no hospedeiro suscetível. Esse trabalho teve por objetivo verificar a expressão *in situ* de lectinas na superfície dos tecidos do hospedeiro suscetível *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 durante a infecção pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Para tal, 60 caramujos *B. glabrata* cepa Ressaca foram expostos individualmente a 5 miracídios. Os animais foram necropsiados com: 1, 7, 14, 21, 28, 42 e 62 dias após a infecção. Um grupo de 18 moluscos foi exposto individualmente a 30 miracídios. Estes foram estudados com: 1, 3 e 5 dias após a infecção. As partes moles foram fixadas em formalina Millonig de Carson, incluídas em parafina e coradas em Hematoxilina e Eosina, Tricrômica de Masson, PAS, Alcian Blue pH 1.0, Alcian Blue pH 2.5, Reticulina de Gomori e Von Kossa. Cortes histológicos foram usados para marcação de lectinas fluoresceinadas de *L. culinaris*, *A. hypogaea* e *G. simplicifolia*. Obtiveram-se os seguintes resultados: 1) Esporocistos secundários foram evidenciados na mufla, glândula digestiva e ovoteste com reação inflamatória composta por discreto infiltrado inflamatório com exceção da glândula digestiva que continha granulomas; 2) Esporocistos secundários foram observados pela primeira vez no 21º dia após a infecção na glândula digestiva sem reação hemocitária. O número de parasitos nessa fase de desenvolvimento aumentou muito no 42º dia de infecção, quando também puderam ser observados a formação de cercárias; 3) O prejuízo morfológico mais evidente no hospedeiro molusco ocorre na reprodução, com a redução gradativa e drástica do número de ácidos do ovoteste que passa a ser quase que totalmente ocupado por parasitos no período patente e; 4) Não houve alteração na expressão de carboidratos ligantes de lectinas de *L. culinaris*, *A. hypogaea* e *G. simplicifolia* nos tecidos de *B. glabrata* durante a infecção. A única exceção foi a ligação da lectina de *L. culinaris* com a glândula digestiva dos animais infectados. Concluímos que: 1) A resposta inflamatória, embora discreta e restrita a alguns

órgãos, parece estar relacionada diretamente a fase de esporocisto secundário e cercária. É possível que as alterações morfofuncionais durante o desenvolvimento dessas fases larvares possam ativar hemócitos levando a uma resposta tardia no transcurso da infecção. 2) As diferenças observadas entre este estudo e a literatura relacionadas à distribuição do parasito, possivelmente são devido à pequenas variações no padrão de resposta existente entre as várias cepas de *B. glabrata*.

Palavras-Chave: *Biomphalaria glabrata*. *Schistosoma mansoni*. Lectinas

ABSTRACT

The enlightenment of the mechanisms involved in the parasite/host relationship between *Biomphalaria glabrata* snail and the trematode *Schistosoma mansoni* represents an important epidemiological weapon to the infection control. Several *in vitro* studies have shown that the resistance mechanism of some species and strains of *B. glabrata* is related to the presence of lectins. Therefore, there's no studies about the expression of these proteins in tissues and organs of infected molluscs, scientific works are done *in vitro*, what limits the quantity of evolved components in parasite/host interactions. The carbohydrate expression study, specific lectins bindings, on histologic sections of infected *B. glabrata* by *S. mansoni* can contribute to the better characterization of immune response in susceptible host. This work aims to verify the *in situ* lectins expression on the surface of the tissues of the host *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 along *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 infection. 60 *B. glabrata* snails from Ressaca strain were individually exposed to 5 miracidia. The animals were killed on 1, 7, 14, 21, 28, 42 and 62 days after infection. A group of 18 snails were individually exposed to 30 miracidia were killed on the days 1, 3 and 5. The soft parts were fixed in Carson's Millonig Formalin, paraffin embedding and stained by Hematoxylin and Eosin, Masson's Trichromics, PAS, Alcian Blue pH 1.0, Alcian Blue pH 2.5, Gomori's Reticulin and Von Kossa. The fluorescent lectin labeling was done on histologic sections using lectins from *L. culinaris*, *A. hypogaea* and *G. simplicifolia*. The following results were obtained: 1) Daughter sporocysts were seen on the headfoot region, digestive gland and ovotestis with inflammatory reaction; 2) Daughter sporocysts were first seen on 21st day post infections on the digestive gland without hemocyte reaction. The parasites number on this development stage increased on the 42nd after infection, when also could be seen cercarie formation; 3) The most evident morphological injuries on the intermediate host occurs on the reproduction, with drastic and gradative reduction of ovotestis acina witch becomes almost completely occupied by the parasites on the patent period and; 4) There was no alterations in carbohydrates bindings expressions of lectins form *L. culinaris*, *A. hypogea* and *G. simplicifolia* in *B. glabrata* tissues during the infection. The one exception was the binding of *L. culinaris* lectin on the infected animal's digestive gland. We conclude that: 1) The inflammatory response, though discreet and restricted to some organs seems to be directly relationed with daughter sporocysts and cercarie stages. It's possible that the morphofunctional alterations along the development of these larvae stages can activate the hemocytes leading to a late response; 2) The observed differences between the literature studies and this work related to parasite's distribution are

possibly because of the small variations on the existing immune response patterns between the several *B. glabrata* strains.

Key Words: *Biomphalaria glabrata*. *Schistosoma mansoni*. Lectins

LISTA DE ABREVIACOES

FITC.....Fluoresceína de Isotiocianato (do ingls Fluorescein Isothiocyanate)

FREPs.....Proteínas relacionadas ao Fibrinognio (do ingls Fibrinogen-related Proteins)

HE.....Hematoxilina e Eosina

PAS.....Ácido Peridico de Schiff (do ingls Periodic Acid-Schiff)

PBS.....Tampo Fosfato Salino (do ingls Phosphate Buffered Saline)

TUF.....Fluido Revelador de Antgeno (do ingls Target Unmasking Fluid)

LISTA DE FIGURAS

1. Áreas endêmicas e focais da Esquistossomose Mansônica no Brasil.....3
 2. Distribuição geográfica das espécies e subespécies de moluscos do gênero *Biomphalaria* no Brasil.....6
 3. Esquema do Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni*, Sanbom 1907.....10
- Prancha 1:** Aspectos histopatológicos do ovoteste de *B. glabrata* normal e infectada por *S. mansoni* no transcurso da infecção.....25
- Prancha 2:** Aspectos histopatológicos da mufla, tentáculo e pé de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*.....27
- Prancha 3:** Aspectos histopatológicos da glândula de albúmem e do rim em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*.....29
- Prancha 4:** Aspectos histopatológicos da glândula digestiva de *B. glabrata* controle e infectada por *S. mansoni* com 28 dias de infecção.....31
- Prancha 5:** Aspectos histopatológicos da glândula digestiva de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* 28 dias após a infecção.....33
- Prancha 6:** Aspectos histopatológicos da glândula digestiva de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* 62 dias após a infecção.....35
- Prancha 7:** Expressão da lectina *Lens culinaris* em *B. glabrata* controle e infectada por *S. mansoni*.....37
- Prancha 8:** Expressão da lectina *Arachis hypogaea* em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*.....39

Prancha 9: Expressão da lectina *Griffonia simplicifolia* em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*.....**41**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Expectativa de vida de <i>S. mansoni</i> , mas suas diferentes fases durante o ciclo biológico.....	11
---	-----------

SUMÁRIO**I. INTRODUÇÃO**

1.1. A Esquistossomose.....	1
1.2. Importância da Esquistossomose.....	2
1.3. Hospedeiros Intermediários.....	4
1.4. Ciclo Biológico de <i>S. mansoni</i>	7
1.5. Sistema Imune dos Moluscos.....	12

II. JUSTIFICATIVA.....14**III. OBJETIVO**

3.1. Objetivos Específicos.....	14
---------------------------------	----

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais Utilizados.....	15
4.2. Infecção do Hospedeiro Definitivo e Obtenção dos Miracídeos.....	15
4.3. Infecção dos Moluscos.....	15
4.4. Sacrifício dos Moluscos.....	16
4.5. Técnicas Histológicas e Imunohistológicas.....	16
4.5.1. Processamento histológico semi-manual.....	16
4.5.2. Colorações e Imunomarcção.....	16

V. RESULTADOS

5.1. Aspectos Histológicos da Infecção por <i>S. mansoni</i> em <i>B. glabrata</i> da cepa Ressaca.....	17
5.1.1. Animal Não Infectado (Controle).....	17
5.1.2. 24 horas após a infecção por 5 miracídeos.....	17
5.1.3. 7 dias após a infecção por 5 miracídeos.....	17
5.1.4. 14 dias após a infecção por 5 miracídeos.....	17
5.1.5. 21 dias após a infecção por 5 miracídeos.....	18
5.1.6. 28 dias após a infecção por 5 miracídeos.....	18
5.1.7. 42 dias após a infecção por 5 miracídeos.....	18

5.1.8. 62 dias após a infecção por 5 miracídios.....	19
5.2. Análise das Lectinas Fluoresceinadas - Resultados dos Aspectos Imunohistológicos da Infecção <i>S. mansoni</i> em <i>B. glabrata</i>	20
5.2.1. <i>Lens culinaris</i>	20
5.2.1.1. Animal Não Infectado (Controle).....	20
5.2.1.2. 1 dia após a infecção por 30 miracídios.....	20
5.2.1.3. 5 dias após a infecção por 30 miracídios.....	20
5.2.1.4. 14 dias após a infecção por 5 miracídios.....	20
5.2.1.5. 28 dias após a infecção por 5 miracídios.....	20
5.2.1.6. 42 dias após a infecção por 5 miracídios.....	20
5.2.1.7. 62 dias após a infecção por 5 miracídios.....	21
5.2.2. <i>Griffonia simplicifolia</i>	22
5.2.2.1. Animal Não Infectado (Controle).....	22
5.2.2.2. 1 dia após a infecção por 30 miracídios.....	22
5.2.2.3. 3 dias após a infecção por 30 miracídios	22
5.2.2.4. 5 dias após a infecção por 30 miracídios	22
5.2.2.5. 14 dias após a infecção por 5 miracídios.....	22
5.2.2.6. 28 dias após a infecção por 5 miracídios.....	22
5.2.2.7. 42 dias após a infecção por 5 miracídios.....	22
5.2.3. <i>Arachis hypogaea</i>	23
5.2.3.1. Animal Não Infectado (Controle).....	23
5.2.3.2. 1 dia após a infecção por 30 miracídios.....	23
5.2.3.3. 3 dias após a infecção por 30 miracídios.....	23
5.2.3.4. 5 dias após a infecção por 30 miracídios.....	23
5.2.3.5. 14 dias de infecção por 5 miracídios	23
5.2.3.6. 28 dias após a infecção por 5 miracídios.....	23
VI. DISCUSSÃO	42
VII. CONCLUSÕES	45
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIODRÁFICAS	46
IX. ANEXO	51

1.1. A Esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma*. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013) mais de 243 milhões de pessoas precisariam de tratamento para a esquistossomose em 2011, embora apenas outras 28,1 milhões foram tratadas para a doença nesse mesmo ano. Isso ocorre devido a ausência de saneamento básico e acesso à água potável. Uma das formas de prevenção da doença consiste no controle de moluscos hospedeiros. Isto porque, nestes animais ocorre uma importante fase do ciclo do parasito que culmina com a eliminação de cercárias, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. Entretanto, o controle da esquistossomose é dificultado pelo desenvolvimento de projetos hídricos, como barragens, sistemas de irrigação e projetos de aquicultura que criam novos e, muitas vezes favoráveis, habitats para moluscos hospedeiros, oferecendo novas oportunidades para o contato humano com a água (Rey, 2011). O uso de moluscicidas é caro e nem sempre aplicável à maioria das áreas endêmicas. Entender quais são os mecanismos que favorecem o sucesso do parasitismo no hospedeiro intermediário podem fornecer dados para intervenções ou interrupções neste processo, impedindo ou dificultando a infecção humana.

É conhecido que as três espécies de *Biomphalaria* hospedeiras de *Schistosoma mansoni* Sanbom, 1907, *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) e *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835), apresentam diferentes mecanismos de resposta imune que afetam diretamente a eficiência da transmissão. Na espécie mais resistente, *B. straminea* demonstrou-se que os hemócitos, principais componentes do sistema imune dos moluscos, reconhecem, tornam-se ativos e encapsulam esporocistos primários, levando a maioria dos parasitos à morte. O processo de reconhecimento e ativação hemocitária parece estar relacionado à presença de lectinas na hemolinfa (Loker, 2004). Em moluscos, essas proteínas são sintetizadas por hemócitos e podem permanecer expressas na membrana destas células, funcionando como receptores citofílicos, ou serem secretadas. Hemócitos de *B. glabrata*, hospedeiro mais suscetível, embora não se ligue ou encapsule esporocistos *in vitro*, o faz quando a hemolinfa de moluscos resistentes está presente no ensaio (Richards et al, 1991). Aspectos morfológicos e funcionais dessas células, frente à infecção por parasitos digenéticos, não estão bem esclarecidos.

Este trabalho descreve aspectos histopatológicos da infecção por *S. mansoni* no hospedeiro suscetível *B. glabrata* relacionando-a com a expressão de algumas lectinas sobre os tecidos.

1.2. Importância da Esquistossomose

A Esquistossomose mansônica, também popularmente conhecida como "xistose", "barriga-d'água", "bilharzíase" ou "mal-do-caramujo" é uma doença causada por endoparasitas trematódeos do gênero *Schistosoma* (Neves, 2011) que atinge milhões de pessoas, numa das maiores regiões endêmicas da doença em todo o globo. Existem seis espécies de *Schistosoma* que podem causar a esquistossomose no homem: *S. hematobium* Bilharz, 1852, *S. intercalatum* Fischer, 1934, *S. japonicum* Katsurada, 1904, *S. malayensis* Greer, Ow-Yang & Young, 1988, *S. mansoni* Sambon, 1907 e *S. mekongi* Voge, Brickner & Bruce, 1978. Apenas o *S. mansoni* é encontrada no continente sul-americano (Barbosa, 2007; Neves, 2011).

Essa doença é um indicativo sócio-econômico relacionado à pobreza. A presença de *B. glabrata* é responsável pela área contínua de transmissão que ocorre desde o Rio Grande do Norte até Rio Grande do Sul (Figura 1). A existência de clima apropriado para a transmissão e as condições socioeconômicas precárias (saneamento básico, educação sanitária, etc.) permite a manutenção da endemia nas áreas onde foi implantada. No Brasil estima-se que oito milhões de pessoas estejam infectadas e que trinta milhões estejam expostas ao risco da infecção, por residirem em regiões nas quais a transmissão ocorre (Neves, 2011).

Os vermes adultos vivem no sistema porta-hepático. Os esquistossômulos quando chegam ao fígado apresentam um ganho de biomassa exponencial e após atingirem a maturação sexual, em torno de 25 dias, migram para os ramos terminais da veia mesentérica inferior, principalmente na altura da parede intestinal do plexo hemorroidário, onde se acasalam e, em torno do 35º dia, as fêmeas iniciam a postura dos ovos (Neves, 2011).

Os sintomas da esquistossomose são: febre, diarreia com ou sem expulsão de fezes sanguinolentas, dor abdominal, fibrose hepática, hepatoesplenomegalia e ascite. A transmissão ocorre através da penetração ativa das cercárias na pele e mucosa (Neves, 2011). As cercárias penetram mais frequentemente nos pés e nas pernas por serem áreas do corpo que mais ficam em contato com águas contaminadas (Rey, 2011).

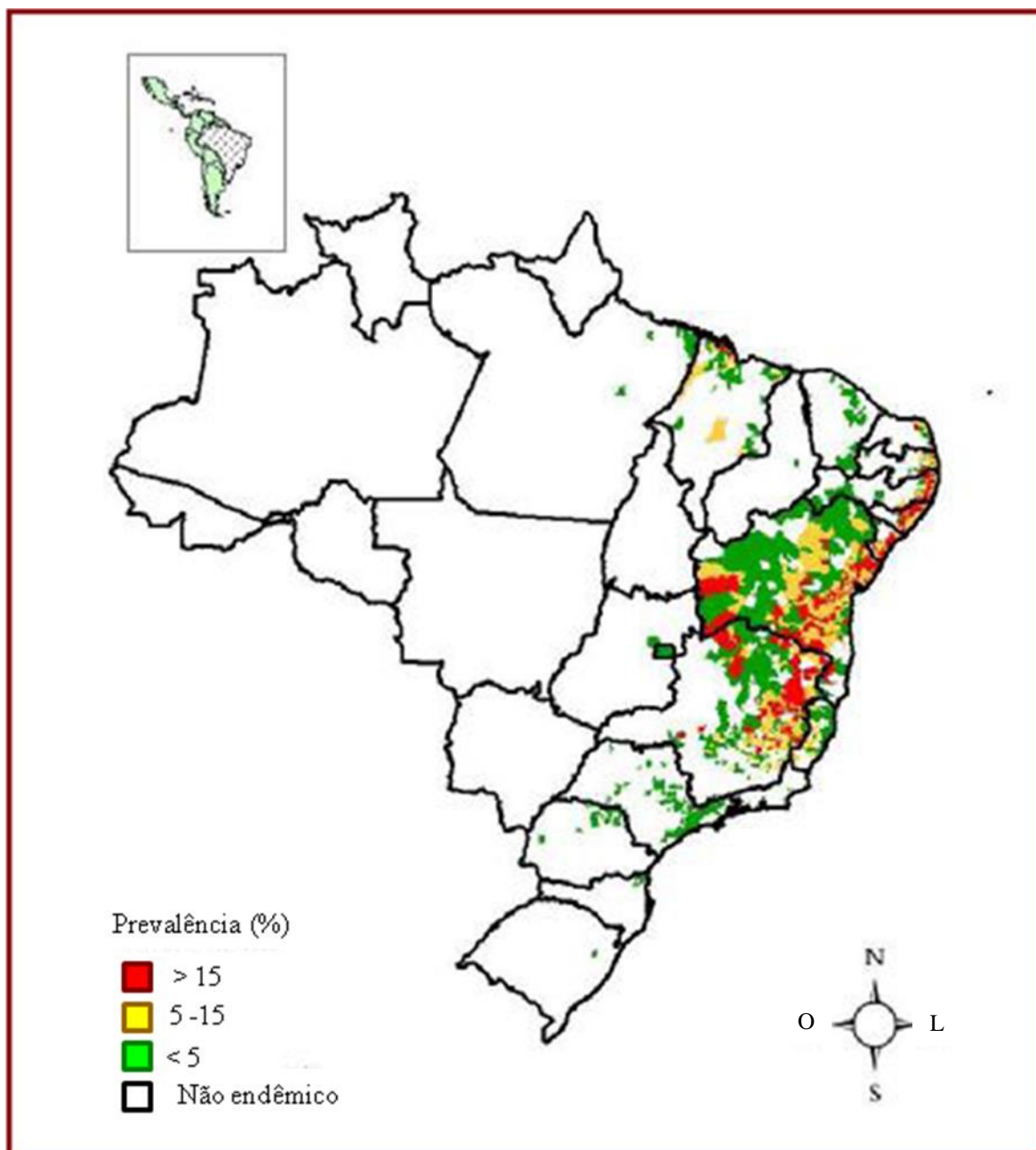


Figura 1: Áreas endêmicas e focais da Esquistossomose Mansônica no Brasil.

1.3. Hospedeiros Intermediários

O molusco límnico *B. glabrata*, é a principal espécie hospedeira de *S. mansoni* no Brasil, pois se infecta com todas as linhagens geográficas do trematódeo. É o maior molusco da família Planorbidae, sua concha pode atingir 40 mm de diâmetro, 11 mm de largura com seis a sete giros. Apresenta-se com uma periferia arredondada com tendências para a direita e o lado direito ligeiramente côncavo, com o giro central profundo, e o esquerdo formando cavidade rasa. A sutura encontra-se bem marcada em ambos os lados (Carvalho, 2008). A principal característica da sua anatomia interna é a presença de uma crista renal pigmentada, localizada ao longo da superfície ventral do tubo renal, em indivíduos adultos e uma linha pigmentada em indivíduos jovens. À medida que o animal cresce, ergue-se uma prega longitudinal sobre essa linha, formando a crista renal (Neves, 2011).

A distribuição de *B. glabrata* está quase sempre associada à distribuição da esquistossomose. É encontrada numa faixa contínua em quase todos os estados brasileiros situados entre o Rio Grande do Norte e o Paraná, estando presente em algumas áreas do Pará e Maranhão, havendo apenas uma população reportada no Piauí. Está ausente no estado do Ceará (Carvalho, 2008). Constitui o mais eficiente vetor da esquistossomose mansônica nas Américas, tendo sido encontrada em ambientes naturais com taxas de positividade de até 80%. Um exemplar infectado pode eliminar até 18 mil cercárias por dia (Neves, 2011).

A concha adulta de *B. tenagophila* alcança cerca de 35 mm de diâmetro e 11 mm de largura na abertura. Suas outras características são: sete a oito giros mais acentuadamente no lado esquerdo; lado esquerdo ligeiramente mais côncavo que o direito; sutura bem marcada em ambos os lados; periferia arredondada, tendendo para a direita. Em comparação com *B. glabrata*, apresenta maior largura, principalmente do lado esquerdo e abertura mais larga. A anatomia de *B. tenagophila* é quase idêntica a de *B. glabrata*, diferindo apenas pela ausência da crista renal ou da linha pigmentada. A sua distribuição está mais restrita ao sul do Brasil, sendo encontrada desde o sul da Bahia, leste do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (Neves, 2011). *B. tenagophila* é encontrada na natureza com baixas taxas de infecção, colonizando coleções hídricas permanentes, uma vez que esses moluscos seriam incapazes de resistir à dessecação (Carvalho, 2008). Segundo Mello-Silva et al (1998) há isolamento geográfico, mas não reprodutivo, uma vez que seus experimentos mostraram que o cruzamento interespecie entre *B. glabrata* e *B. tenagophila* é possível, porém a fertilidade e

fecundidade dos indivíduos decaem, após várias gerações, até o nascimento de descendentes estéreis.

B. straminea, a menor das três espécies, apresenta concha com até 16 mm de diâmetro, 6 mm de largura, cinco giros e paredes laterais arredondadas. A principal característica da anatomia interna é a presença de um enrugamento transversal nas paredes dorsal e esquerda da vagina, ausente em *B. glabrata*. O rim não apresenta crista. Encontrada em quase todas as bacias hidrográficas do Brasil, é a espécie predominante no Nordeste do país, tendo sido também responsável por focos em Fordlândia, no Pará, e em Goiânia. Apesar de apresentar taxas muito baixas de infecção a densidade desse molusco nos criadouros do nordeste é bastante alta (Neves, 2011).

A distribuição das espécies do gênero *Biomphalaria* no Brasil é mostrada na Figura 2.



Figura 2: Distribuição geográfica das espécies e subespécie de moluscos do gênero *Biomphalaria* no Brasil. **A:** *B. amazonica*; **G:** *B. glabrata*; **I:** *B. intermedia*; **K:** *B. kuhniiana*; **O:** *B. oligoza*; **Oc:** *B. occidentalis*; **P:** *B. peregrina*; **S:** *B. straminea*; **Sc:** *B. schrammi*; **T:** *B. tenagophila*; **TG:** *B. tenagophila guaibensis*. Segundo Souza & Lima, 1990.

1.4. Ciclo Biológico de *S. mansoni*

O miracídio penetra no caramujo e dentro deste sofre mitose dividindo-se em esporocistos primários que por sua vez, também sofrem mitoses podendo tornar-se outros esporocistos primários ou secundários. Os esporocistos secundários irão originar as cercárias que serão liberadas na água através do tegumento do caramujo. A liberação de cercárias só ocorre em presença de luz e temperatura por volta dos 26°C. Se a temperatura for mais alta ou mais baixa que esta, ou se a luminosidade não for suficiente, a liberação de cercárias é inibida (Carvalho, 2008) (Figura 3).

O hospedeiro definitivo se banha no rio ou lago contendo cercárias maduras. Estas irão penetrar na pele ou mucosas, podendo vir a perder ou não a cauda que lhes dava mobilidade na água. Uma vez dentro do vertebrado a cercária não mais se chama assim, adquirindo o nome de esquistossômulo (Carvalho, 2008) (Quadro 1).

Dentro do vertebrado, o esquistossômulo continua sua migração através da pele até chegar à circulação sanguínea. Uma vez na circulação, o esquistossômulo a utiliza como veículo, podendo passar por todo o corpo, inclusive coração e pulmões até chegar a seu habitat original: o sistema porta-hepático. Lá o esquistossômulo cresce e desenvolve-se em *Schistosoma mansoni* macho ou fêmea adultos (Neves, 2011).

No sistema porta-hepático ocorre o acasalamento dos vermes e a postura de ovos. Os ovos de *S. mansoni* são ovais e possuem um espinho. A pressão dos ovos no vaso provoca a obstrução do mesmo, facilitando a saída deles na luz do intestino, junto com as fezes, que serão depositados na beira de rios e lagos, contaminando-os (Neves, 2011).

Para ocorrer a eclosão dos miracídios, há a necessidade de luz e temperatura ideais, pois possuem fototropismo positivo. Uma vez fora do ovo, o miracídio estimulado pelo muco do molusco expelido na água, irá nadar até encontrar um hospedeiro intermediário suscetível, geralmente o caramujo *B. glabrata*, onde irá penetrar e sofrer mudas até chegar a forma infectante para o vertebrado, a cercária (Neves, 2011).

A ação combinada dos intensos movimentos do miracídio e da ação enzimática constitui o elemento que permite a introdução da larva nos tecidos do molusco. O miracídio penetra no caramujo e dentro deste perde seu revestimento epitelial ciliado e imobiliza-se nas proximidades do local de penetração (Rey, 2008), que por sua vez, pode ser representado por qualquer ponto das partes expostas do caramujo, sendo, porém, a base dos tentáculos e o pé os pontos preferidos. Inicialmente, o esporocisto apresenta movimentos amebóides, que diminuem com o tempo, até a completa imobilidade da larva. As células germinativas, em

número de 50 a 100, iniciam, então, um intenso processo de multiplicação (poliembrião), fazendo com que, após 72 horas, a larva, chamada esporocisto primário, esporocisto-mãe ou, simplesmente, esporocisto I, dobre de tamanho (Neves, 2011). A parede do corpo compreende, externamente, uma membrana plasmática e, internamente uma camada sincicial. Grandes células germinativas isoladas, ou agrupadas, podem estar incluídas na parte do corpo ou livres no meio líquido que preenche o esporocisto (Rey, 2008).

Os maciços celulares diferenciam-se para constituir os esporocistos secundários. Em condições ideais de temperatura, entre 25 e 28°C, ocorre a formação dos esporocistos secundários, que se inicia a partir do 14º dia após a penetração do miracídio. Esta evolução pode ser significativamente retardada em temperaturas abaixo de 20°C (Neves, 2011).

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

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

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

Quando um caramujo infectado é retirado da água e levado a um estado de anidrobiose, a evolução do parasito interrompe-se por igual período, retomando seu curso assim que o planorbídeo voltar às condições normais de vida (Rey, 2008).

Os moluscos infectados por uma grande carga parasitária podem sofrer uma castração parasitária ou morrer em consequência das destruições causadas na glândula digestiva ou em outros órgãos (Rey, 2008).

A reação dos tecidos do molusco contra os parasitos (formação de granulomas e lise) tem lugar desde os primeiros dias de infecção e é tanto mais intensa quanto mais resistente ao parasitismo mostrar-se a espécie ou variedade de *Biomphalaria* à estirpe de *Schistosoma* em causa. Os hospedeiros mais favoráveis a transmissão da esquistossomose mansônica praticamente não reagem contra a presença dos esporocistos de *S. mansoni* em seus tecidos (Rey, 2008).

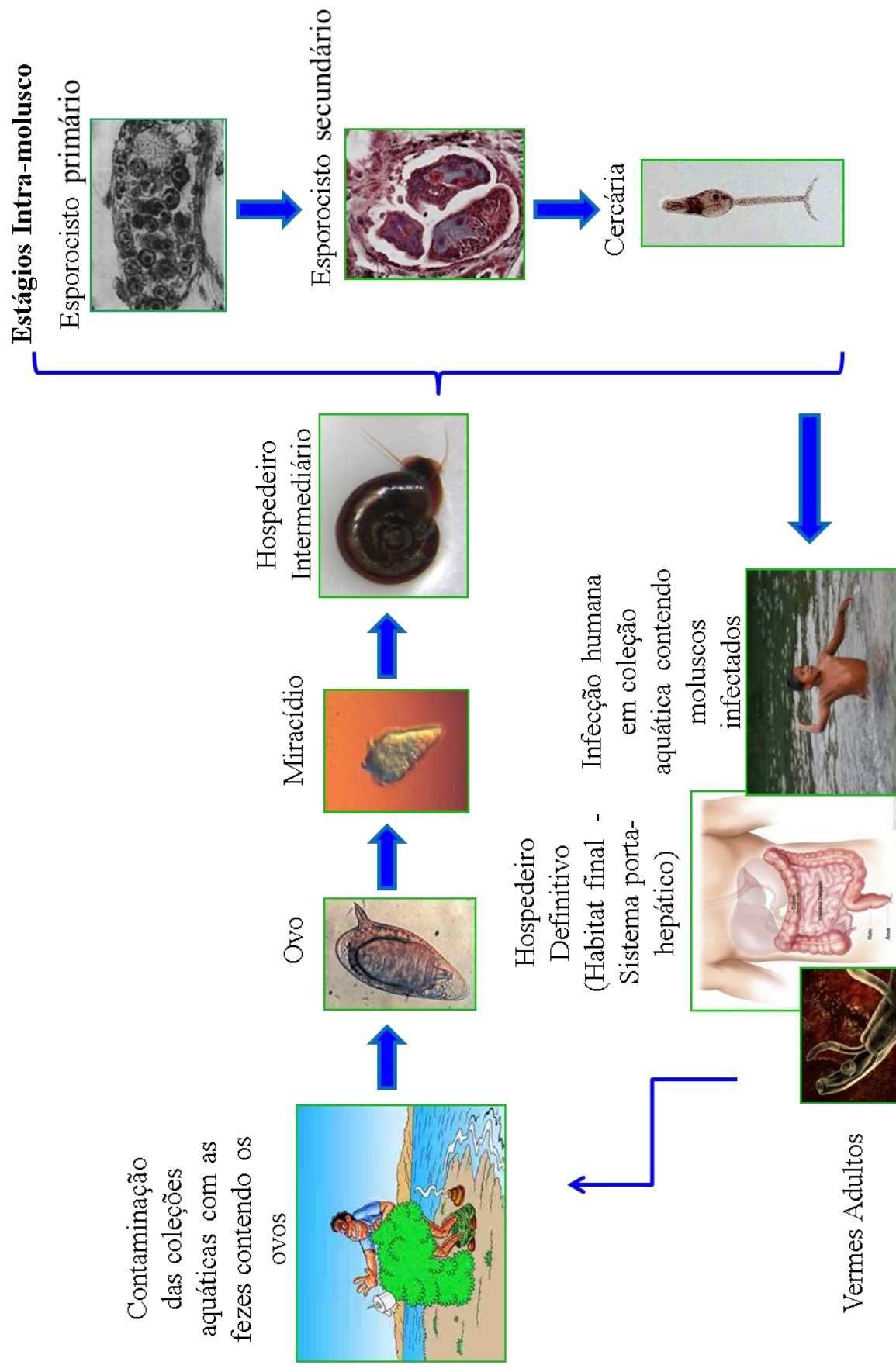


Figura 3: Esquema do Ciclo Biológico de *Schistosoma mansoni*, Sanbom 1907.

Quadro 1: Expectativa de vida de *S. mansoni*, nas suas diferentes fases durante o ciclo biológico. Adaptado de Rey (2008) e Carvalho (2008) (Extraído de: Passos, 1998).

Ovo Imaturo	Até 7 dias para maturação. A postura pode começar no 30º dia e a partir do 40º dia, podem ser encontrados ovos nas fezes, recomeçando o ciclo.
Ovo Maduro	Dentro do hospedeiro, até 20 dias.
Miracídio	Dentro do ovo, em fezes sólidas, sem exposição direta da luz, até 5 dias. Depois da eclosão do ovo, no meio aquoso, com temperatura adequada, até 24 horas. Segundo Rey (2008), entre 24°C e 28°C cerca de metade morre nas primeiras 8 horas de vida livre e os restantes entre 8 e 12 horas.
Esporocisto Primário	Cerca de 2 semanas até se transformar em esporocisto secundário. Resultam, aproximadamente, de cada esporocisto primário de 20 a 40 esporocistos secundários.
Esporocisto Secundário	3 a 4 semanas até a formação de cercárias. Segundo Rey (2008), os esporocistos secundários, depois de produzirem cercárias por um tempo, podem voltar a formar novas gerações de esporocistos capazes de retomar a produção de novas cercárias e este processo pode levar até mais de 8 meses. É importante destacar que cada miracídio pode gerar até 300.000 cercárias e que o molusco começa a eliminá-las por volta da quinta semana.
Cercária	Até 2 dias na água, embora a infectividade caia rapidamente. Leva entre 2 a 15 minutos para penetrar na pele, segundo Carvalho (2008).
Esquistossômulo	É formado logo após a penetração na pele. Segundo Carvalho (2008), em 27 dias, depois da penetração na pele, pode transformar-se em verme adulto.
Verme Adulto	Pode viver de 6 a 10 anos, segundo Rey (2008). Embora existam relatos de pacientes eliminando ovos até 30 anos após sair da área endêmica.

1.5. Sistema Imune dos Moluscos

O sistema imune dos moluscos, assim como de outros invertebrados consiste apenas na imunidade inata. Esta é considerada uma forma ancestral da imunidade presente nos vertebrados.

Barreiras externas de moluscos (conchas, muco, epitélio), constituem a primeira linha de defesa contra patógenos e parasitos. Quando estas barreiras são ultrapassadas, uma segunda linha de defesa interna, envolvendo componentes celulares solúveis da hemolinfa, começa a atuar. Componentes humorais do sistema imune dos moluscos incluem enzimas lisossomais, lectinas, aglutininas, proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs), lectinas do tipo C e peptídeos antimicrobianos. Tais componentes ajudam no reconhecimento de patógenos e parasitos ligando-se a estes, promovendo ou estimulando sua eliminação através da opsonização ou da morte direta (Sokolova, 2009).

Os hemócitos são os principais componentes efetores do sistema imune dos moluscos, sendo responsáveis pela fagocitose de parasitos, patógenos e partículas estranhas. Tal processo inclui várias etapas: reconhecimento, adesão, ingestão, destruição ou encapsulamento e eliminação final de células ou materiais estranhos (Ottaviani, 2006). A resistência de caramujos do gênero *Biomphalaria* à infecção por *Schistosoma mansoni* é diretamente proporcional à capacidade de seus hemócitos, em suspensão na hemolinfa, de envolverem as formas parasitárias recém penetradas, formando um encapsulamento em torno desta e terminando por destruí-la (Neves, 2011).

Em invertebrados, que não produzem imunoglobulinas, o reconhecimento é mediado por lectinas (Neves, 2011). As lectinas são definidas como proteínas ou glicoproteínas de natureza não enzimática que não pertencem a superfamília das imunoglobulinas. Reconhecem e se ligam especificamente a carboidratos (Barondes, 1988), podendo também reconhecer proteínas, enzimas e imunoglobulinas. Elas desempenham um importante papel no reconhecimento célula-célula e são consideradas como possíveis participantes nas interações imunes entre o caramujo e o trematódeo, num sistema onde não existem anticorpos (Horák; Van der Knaap, 1997). Em algumas espécies de caramujos, as lectinas são produzidas pela glândula de albúmem ou pelos hemócitos (Mullainadhan, 1989; Richards, 1991).

Segundo Knaap e Loker (1990), a infectividade do parasito envolve os seguintes mecanismos imunológicos: (i) mimetismo molecular, quando os parasitos compatíveis sintetizam e expõem moléculas que são reconhecidas como “self” pelos hemócitos do molusco; (ii) mascaramento molecular no qual o parasito compatível adquire moléculas do

hospedeiro ou passivamente ou via receptores específicos, e não é reconhecido pelo sistema imune do molusco; (iii) ausência de reconhecimento, onde o parasito compatível possui moléculas que não são reconhecidas pelos hemócitos do hospedeiro; (iv) produção de epítomos não reconhecíveis, onde o parasito compatível sintetiza epítomos capazes de lhe conferir proteção; e (v) mecanismo de interferência, quando o parasito produz e excreta produtos capazes de interferir na ação do sistema imune do molusco.

A suscetibilidade do molusco, associada as células da hemolinfa e aos fatores humorais, varia entre as espécies, entre as populações e entre os indivíduos (Fernandez, 2007).

II. JUSTIFICATIVA

O esclarecimento de mecanismos envolvidos na relação parasito/hospedeiro entre moluscos do gênero *Biomphalaria* e o *S. mansoni*, pode ajudar na elucidação de meios para interferir no desenvolvimento do parasito. Vários estudos *in vitro* têm mostrado que o mecanismo de resistência de espécies e diferentes cepas de *Biomphalaria* está relacionado à presença de lectinas. Entretanto, não há estudos sobre a relação da expressão dessas proteínas nos tecidos e órgãos de moluscos infectados, uma vez que a maioria dos trabalhos são realizados *in vitro*, o que limita a quantidade de componentes envolvidos na interação parasito/hospedeiro. O estudo da expressão de carboidratos, ligantes de lectinas específicas, sobre cortes histológicos de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* pode contribuir para melhor caracterização da resposta imune no hospedeiro suscetível.

III. OBJETIVO

Verificar a expressão *in situ* de lectinas nos tecidos do hospedeiro suscetível *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 durante a infecção pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1. Descrever histologicamente o desenvolvimento dos estágios larvares de *S. mansoni*, bem como as reações inflamatórias decorrentes da infecção no hospedeiro intermediário *B. glabrata*.

3.1.2. Verificar a expressão e/ou alteração na expressão de carboidratos, através da marcação de lectinas fluoresceinadas no transcurso da infecção.

4.1. Animais Utilizados

Foram utilizados exemplares de *B. glabrata* provenientes da cepa Ressaca, município de Belo Horizonte, Minas Gerais, provenientes do Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. A partir do 35º dia de infecção, os moluscos foram expostos à luz de 60 Watts para verificar a liberação de cercárias.

4.2. Infecção do Hospedeiro Definitivo e Obtenção dos Miracídios

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

O exame parasitológico de fezes foi feito a partir do 30º dia pós-infecção a partir da técnica de sedimentação na água (Hoffman, 1934) a fim de detectar a presença dos ovos do parasito. Uma vez confirmada presença dos ovos vivos, os sedimentos foram expostos à luz de 60 Watts, durante 15 minutos, para que ocorresse a eclosão dos miracídios que foram utilizados para infectar os moluscos.

4.3. Infecção dos Moluscos

Foram utilizadas *B. glabrata* da cepa Ressaca (Belo Horizonte), cujos diâmetros das conchas variaram entre 8 mm a 12 mm. Sessenta animais foram infectados individualmente com 5 miracídios da cepa BH de *S. mansoni*. Um grupo de 18 moluscos foi infectado individualmente com 30 miracídios da mesma cepa. Os miracídios foram contados em placas de cultura de células (com 24 poços) e foi realizada a exposição dos moluscos.

A exposição de 18 moluscos a 30 miracídios foi realizada com o fim de visualizar os esporocistos primários e as lesões decorrentes dos tempos iniciais de infecção. Para tanto, as necropsias foram realizadas com 1, 3 e 5 dias após a exposição. Após passarem 24h dentro dos poços, os animais foram colocados em aquários de vidro com as medidas: 20 cm de

diâmetro, 10 cm de altura, 5 mm de espessura e com capacidade para dois litros de água. Os animais foram mantidos nos aquários e foram alimentados com alface *ad libitum*. Seis animais foram usados como controles não infectados.

4.4. Sacrifício dos moluscos

Os animais foram mortos a partir do esmagamento dos mesmos entre duas placas de vidro. A concha foi retirada e os corpos foram preservados em Formalina Millonig de Carson (Carson et. al, 1973) para posterior processamento histológico.

4.5. Técnicas Histológicas e Imunohistológicas

4.5.1. Processamento histológico semi-manual

As partes moles dos moluscos foram fixadas por um tempo mínimo de 24 horas. Em seguida o material foi clivado, removido do fixador e lavado em água corrente por uma hora. Após a lavagem, foi imerso sequencialmente em cubas contendo álcool etílico nas seguintes concentrações: 20%, 30%, 50%, 70% e 95% durante 30 minutos cada banho. Logo após, foram colocados em cubas contendo álcool butílico a 100% por 30 minutos, 40 minutos e uma hora, cada banho. Em seguida, o aparelho histotécnico Shandon foi utilizado para impregnação do material em parafina (dois banhos de 30 e 60 minutos cada, sendo o último a vácuo). Foi feita a inclusão dos moluscos em blocos de parafina utilizando-se o aparelho de autoinclusão Shandon Histocentre 2. Utilizando-se o micrótomo Leica RM 2135 Rotary, foram feitos, em cada bloco, cortes de 5µm de espessura os quais foram aderidos a lâminas histológicas, onde foram realizadas as colorações e imunomarcação por lectinas fluoresceinadas.

4.5.2. Colorações e Imunomarcação

As lâminas foram coradas em Hematoxilina e Eosina, PAS (Reação do Ácido Periódico de Schiff), Alcian Blue pH 1.0, Alcian Blue pH 2.5, Tricrômica de Masson, Reticulina de Gomori e Von Kossa. Também foi feita a imunomarcação por lectinas fluoresceinadas, fazendo-se o uso das seguintes lectinas obtidas de vegetais: *Arachis hypogaea*, L., *Griffonia simplicifolia* (syn. *Bandeiraea simplicifolia*), (DC) Baill e *Lens culinaris*, Medik.

As técnicas foram devidamente detalhadas e encontram-se em anexo.

5.1. Aspectos Histológicos da Infecção por *S. mansoni* em *B. glabrata* da cepa Ressaca

5.1.1. Animais expostos a 30 miracídios

Em decorrência da difícil observação tanto dos esporocistos primários quanto das lesões causadas por estes, a captação das imagens da histologia e da imunomarcação por lectinas destes animais não foi realizada, porém os resultados da leitura das lâminas de imunomarcação foram relatados neste trabalho.

5.1.2. Animal Não Infectado (Controle)

Na coloração Alcian Blue pH 1.0, as secreções das glândulas dos tentáculos e do ovoteste apresentaram-se mais acentuados que o restante do tecido. A glândula de albúmem estava negativa ao Alcian Blue, mas positiva para o Reagente de Schiff. O tecido conjuntivo da cavidade do manto também se encontrou positivo ao Alcian Blue pH 1.0. A próstata apresentou-se negativa ao Alcian Blue pH 2.5 e positiva ao Reagente de Schiff.

No ovoteste observou-se ácinos repletos de espermatozoides e áreas de espermatogênese (Figura 1). Ao passo que, em HE, os ácinos da glândula digestiva exibiram núcleos corados em hematoxilina na região basal da célula (Figura 19).

5.1.3. 24 horas após a infecção por 5 miracídios

As glândulas de albúmem e nidamental estavam mais positivas ao Reagente de Schiff, porém algumas regiões da glândula nidamental também se encontravam positivas ao Alcian Blue pH 1.0. A próstata e glândula nidamental estavam positivas ao Reagente de Schiff e Alcian Blue pH 1.0, sendo que na próstata o Alcian Blue pH 1.0 estava restrito a algumas áreas com células caliciformes. Nos demais tecidos repetiu-se o padrão do animal controle.

5.1.4. 7 dias após a infecção por 5 miracídios

Nos tecidos dos animais deste tempo de infecção, repetiu-se o padrão do animal controle (Figuras 2 e 7).

5.1.5. 14 dias após a infecção por 5 miracídios

Havia a presença de granulomas nos tentáculos e na região do manto próxima a glândula digestiva. Nos demais tecidos repetiu-se o padrão do animal controle.

5.1.6. 21 dias após a infecção por 5 miracídios

A partir do 21º dia após a infecção foi possível observar a presença de esporocistos secundários na glândula digestiva. Simultâneo à presença desta fase parasitária ocorreu diminuição do produto de secreção da glândula. Poucos granulomas exsudativos compostos por células semelhantes a fibroblastos foram observados na região dorsal dos moluscos (Figura 8). O número de ácinos do ovoteste diminuiu e vários espaços claros passaram a ser observados (Figura 3). Nesta etapa da infecção ocorreu aumento na quantidade de ovócitos.

5.1.7. 28 dias após a infecção por 5 miracídios

Esporocistos secundários estavam presentes predominantemente no ovoteste e glândula digestiva (Figuras 20 a 30), havendo invasão dos ácinos do ovoteste, porém ainda ocorrendo a gametogênese (Figuras 4 e 5). Os esporocistos encontrados próximos à glândula digestiva apresentaram-se negativos ao PAS. Parasitos PAS positivos indicavam a transformação cercariana (Figuras 23 e 24). Também neste órgão, os parasitos puderam ser observados sem reação ou acompanhados por granulomas exsudativos-produtivos que não continham os mesmos (Figuras 21, 22, 25, 26 e 28).

O ovoteste e a glândula digestiva, assim como os parasitos situados nestes órgãos, encontravam-se negativos ao Alcian Blue pH 1.0. Entretanto os parasitos estavam positivos ao Reagente de Schiff e ao Alcian Blue pH 2.5.

5.1.8. 42 dias após a infecção por 5 miracídios

O 42º dia pós-infecção caracterizou-se pela reação inflamatória em torno dos esporocistos secundários. Havia sinais de degeneração e espaçamento dos ácinos na glândula digestiva e a mesma encontrava-se parasitada por esporocistos secundários. Os infiltrados e os granulomas eram constituídos por hemócitos semelhantes a fibroblastos (fusiformes) e algumas destas células apresentavam granulações castanhas escuras à preta na coloração HE. Esporocistos secundários e formas cercarianas estavam abundantes na região da mufla e tentáculo (Figura 9). O rim e glândula de albúmem também apresentaram parasitos envoltos por uma reação moderada a intensa (Figuras 13 a 18).

O ovoteste encontrava-se intensamente parasitado, principalmente em sua porção final (Figura 6). Houve uma diminuição drástica do número de ácinos, que se encontrava ocupado

por esporocistos secundários, já iniciando a formação de cercárias. Neste órgão o infiltrado inflamatório foi discreto, a não ser na interseção com a glândula digestiva.

5.1.9. 62 dias após a infecção por 5 miracídios

Esporocistos secundários estavam presentes nas seguintes estruturas: parede da cavidade do manto (Figuras 10 e 11), próximo ao intestino (Figura 12), glândula digestiva (Figuras 31 a 36) e ovoteste, havendo reação inflamatória próxima a mufla. Havia esporocistos secundários na glândula digestiva com formação de cercárias positivas ao PAS. A glândula digestiva, incluindo o interior de seus ácinos, encontrou-se positiva à coloração Alcian Blue pH 1.0 e ao Reagente de Schiff.

Houve reação inflamatória na mufla e no tentáculo em virtude da presença de esporocistos secundários. Cercárias ainda estavam positivas ao Reagente de Schiff e à coloração Reticulina de Gomori, mas negativas ao Alcian Blue pH 2.5.

Estruturas marrons encontradas nos parasitos denotaram a presença de cálcio na coloração Von Kossa.

5.2. Análise das Lectinas Fluoresceinadas - Resultados dos Aspectos Imunohistológicos da infecção por *S. mansoni* em *B. glabrata*

5.2.1. *Lens culinaris*

5.2.1.1. Animal Não Infectado (Controle)

Houve uma expressão menos intensa do que nos animais parasitados. A lectina estava distribuída no epitélio glandular e de revestimento da mufla. Células granulares da mufla (Figura 37) e glândula prostática também estavam positivas. Os demais locais estavam negativos.

5.2.1.2. 1 dia após a infecção por 30 miracídios

Ocorreu maior expressão da lectina do que no animal não exposto. Só houve positividade na mufla e na porção apical do epitélio.

5.2.1.3. 5 dias após a infecção por 30 miracídios

Os tecidos conjuntivo e epitelial da mufla e do tentáculo estavam positivos.

5.2.1.4. 14 dias após a infecção por 5 miracídios

Repetiu o mesmo padrão dos animais expostos com cinco dias após a infecção por 30 miracídios.

5.2.1.5. 28 dias após a infecção por 5 miracídios

Células granulares do tecido conjuntivo da mufla continuaram positivas neste tempo de infecção. A parede dos esporocistos secundários também se mostrou positiva. Estes parasitos foram vistos na glândula digestiva, próximo a um segmento intestinal.

5.2.1.6. 42 dias após a infecção por 5 miracídios

Os casos examinados apresentaram muitos parasitos na fase de esporocisto secundário que estavam localizados na mufla e na glândula digestiva (Figuras 39 e 40). Os parasitos estavam positivos para *Lens culinaris*. A distribuição da lectina tornou-se menos intensa quando comparados aos animais com 1 dia de exposição, porém evidencia as células granulares do tecido conjuntivo (Figura 38).

5.2.1.7. 62 dias após a infecção por 5 miracídios

O grupo exposto, mas sem parasitos apresentou positividade para *Lens culinaris* em diversos tecidos, principalmente em células granulares do tecido conjuntivo da mufla e tentáculo.

A positividade distribuiu-se no contorno da vagina, na secreção da glândula de albúmem, no tecido conjuntivo entorno dos ácinos da glândula digestiva, na parede da cavidade do manto, no rim e próximo a glândula nidamental.

5.2.2. *Arachis hypogaea*

5.2.2.1. Animal Não Infectado (Controle)

Células granulares do tecido conjuntivo e células epiteliais da mufla positivas (repete o padrão de *Griffonia simplicifolia*).

5.2.2.2. 1 dia após a infecção por 30 miracídios

As células granulares do tecido conjuntivo não se apresentaram positivas, entretanto o epitélio encontra-se com positividade.

5.2.2.3. 3 dias após a infecção por 30 miracídios

Células granulares da mufla negativas, mas outros elementos do tecido conjuntivo estavam positivos, bem como entorno dos feixes das células musculares.

5.2.2.4. 5 dias após a infecção por 30 miracídios

Mesmo padrão de 1 e 3 dias. Apresentando apenas um maior número de células positivas do que nos pontos anteriores.

5.2.2.5. 14 dias de infecção por 5 miracídios

Diminuiu a intensidade da expressão da lectina, porém com repetição dos padrões.

5.2.2.6. 28 dias após a infecção por 5 miracídios

O tecido apresentou autofluorescência mais acentuada nas células granulares e epiteliais da mufla (Figura 41). O revestimento dos parasitos estava positivo (Figura 42).

5.2.3. *Griffonia simplicifolia*

As lâminas de controle da técnica de imunofluorescência estavam negativas, exceto o epitélio de revestimento e glandular da mufla que exibiram autofluorescência.

5.2.3.1. Animal Não Infectado (Controle)

As células do tecido conjuntivo da mufla e do tentáculo estavam positivas e também no meio das fibras musculares.

5.2.3.2. 1 dia após a infecção por 30 miracídios

Células do tecido conjuntivo positivas na mufla. Algumas células positivas foram observadas trespassando o epitélio.

5.2.3.3. 3 dias após a infecção por 30 miracídios

Repetição do mesmo padrão do animal com um dia de infecção.

5.2.3.4. 5 dias após a infecção por 30 miracídios

Repetição do mesmo padrão do animal com um dia de infecção.

5.2.3.5. 14 dias após a infecção por 5 miracídios

Foram observadas células granulares positivas do tecido conjuntivo e epitelial da mufla e da cavidade do manto.

5.2.3.6. 28 dias após a infecção por 5 miracídios

Os animais exibiram uma grande quantidade de esporocistos secundários que estavam negativos a *Griffonia simplicifolia*. Foi observado um aumento no número de células granulares no tecido conjuntivo da mufla positivas. As células epiteliais também exibiram positividade.

5.2.3.7 42 dias após a infecção por 5 miracídios

Apenas o revestimento dos esporocistos secundários estava positivo para esta lectina e a reação inflamatória estava negativa (Figuras 43 e 44).

5.3. Pranchas

Prancha 1

Aspectos histopatológicos do ovoteste de *B. glabrata* normal e infectada por *S. mansoni* no transcurso da infecção.

Figura 1: *B. glabrata* controle sem infecção (Seta azul mostrando espermatozoides);

Figura 2: *B. glabrata* com 7 dias de infecção (Seta azul mostrando espermatozoides);

Figura 3: *B. glabrata* com 21 dias de infecção (Setas mostrando gametogênese [ovócitos em vermelho e espermatozoides em azul]);

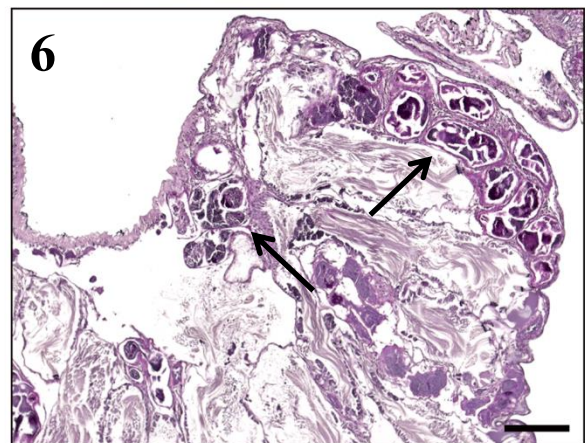
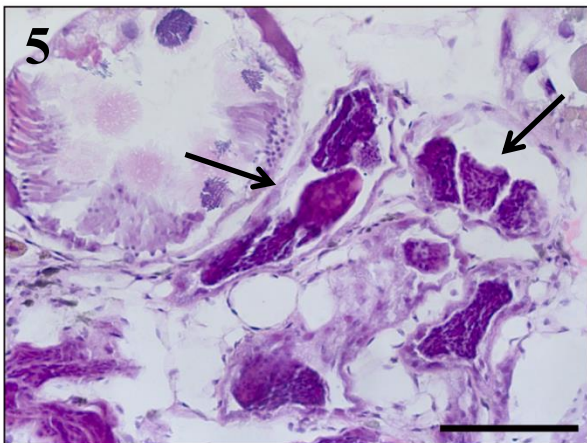
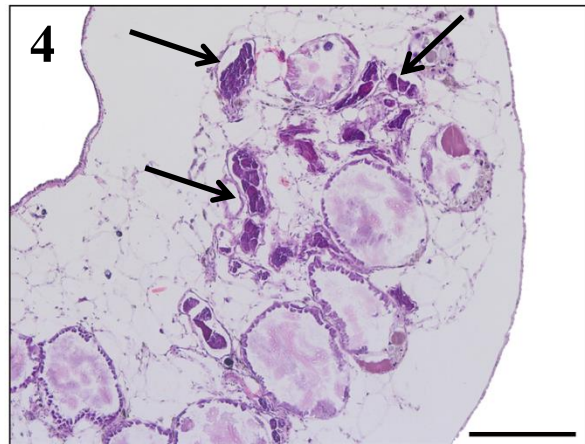
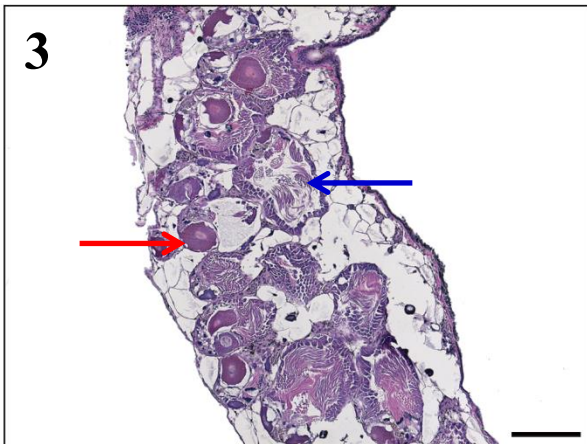
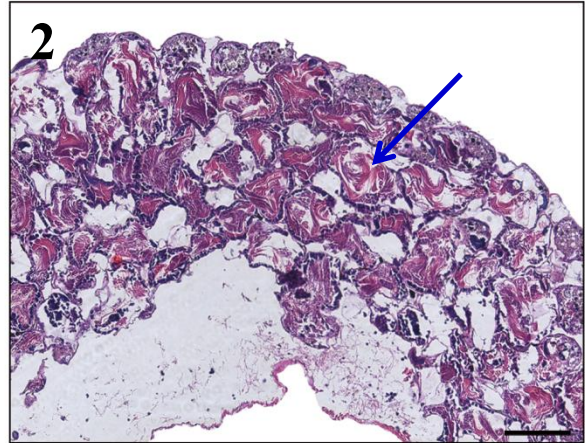
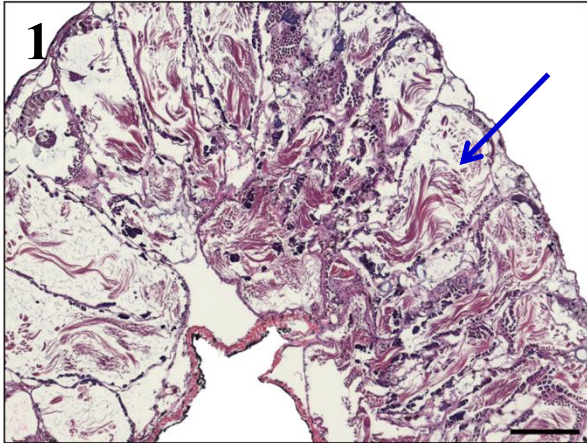
Figura 4: *B. glabrata* com 28 dias de infecção (Setas);

Figura 5: *B. glabrata* 28 dias de infecção com eliminação de cercárias (Setas) (detalhe da Figura 4);

Figura 6: *B. glabrata* com 42 dias de infecção, mostrando parasitos no ovoteste (Setas);

Figuras 1, 2, 3, 4 e 6: HE, 10X; Figura 5: HE, 40X.

PRANCHA 1



Todas as figuras com escala de 50 μ m.

Prancha 2

Aspectos histopatológicos da mufla, tentáculo, pé, cavidade do manto e parede do intestino de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*.

Figura 7: Mufla sem reação inflamatória (7 dias de infecção HE, 40X);

Figura 8: Granulomas (Setas amarelas) e células pigmentadas (Setas amarelas) do tecido conjuntivo da mufla (21 dias de infecção HE, 40X);

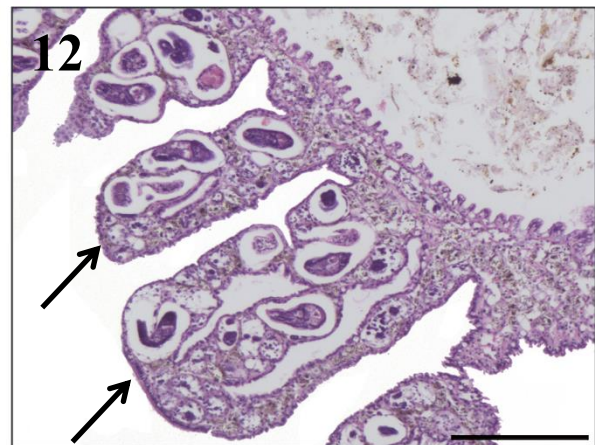
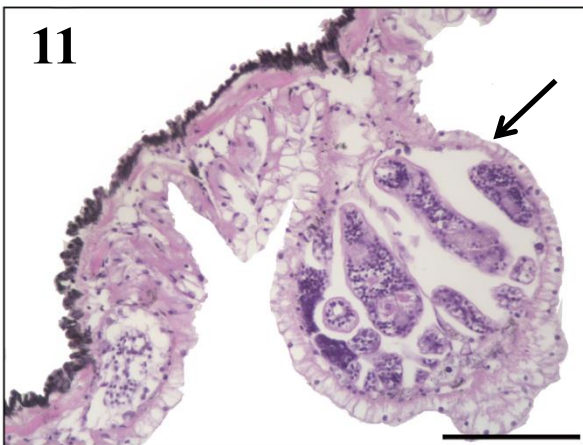
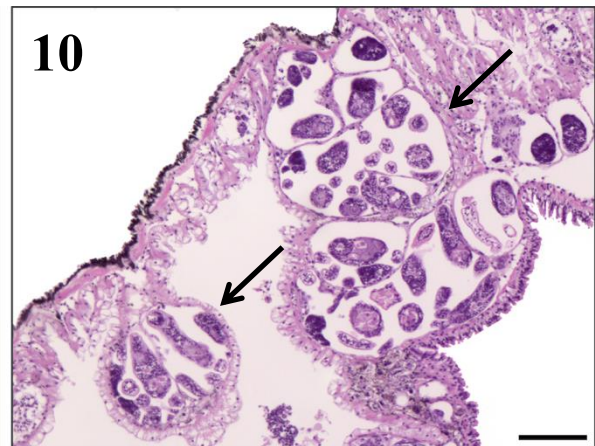
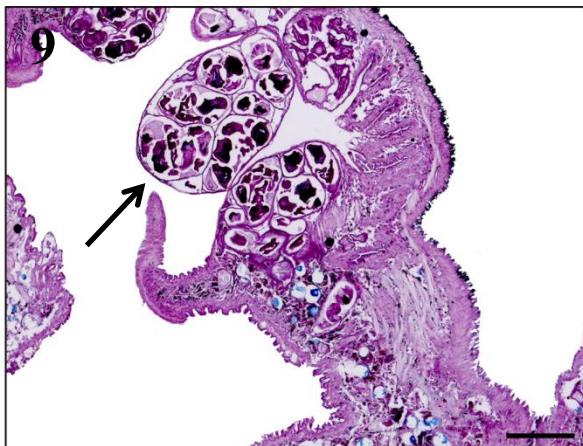
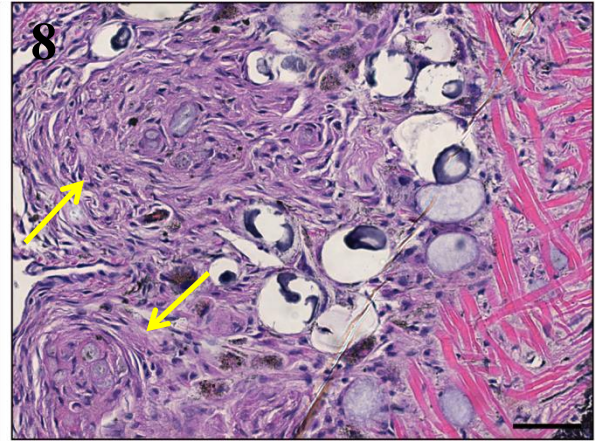
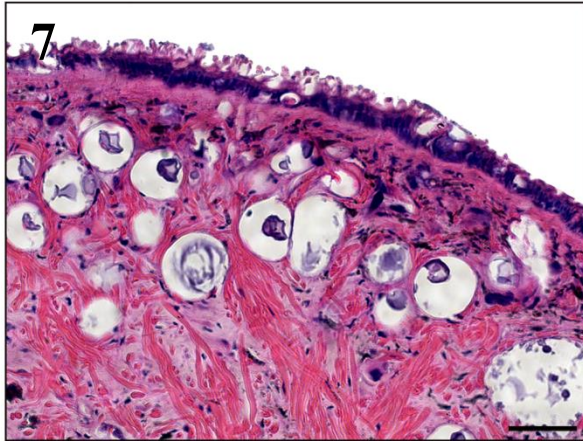
Figura 9: Esporocistos e formas cercarianas (Setas) na região da mufla e tentáculo (42 dias de infecção AB pH 2.5, 10X);

Figura 10: Esporocistos secundários (Setas) na parede da cavidade do manto causando espessamento da mesma (62 dias de infecção HE, 10X);

Figura 11: Detalhe da figura 10 (62 dias de infecção HE, 40X);

Figura 12: Esporocistos secundários (Setas) presentes na parede do intestino (62 dias de infecção HE, 10X);

PRANCHA 2



Todas as figuras com escala de 50 μ m.

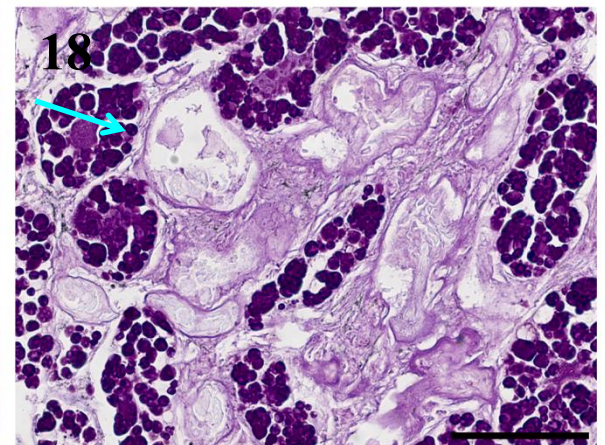
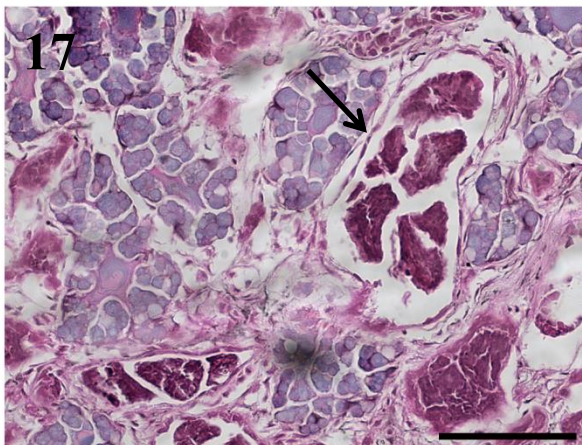
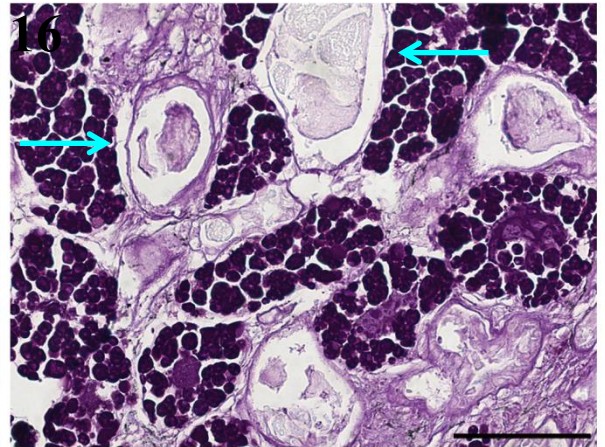
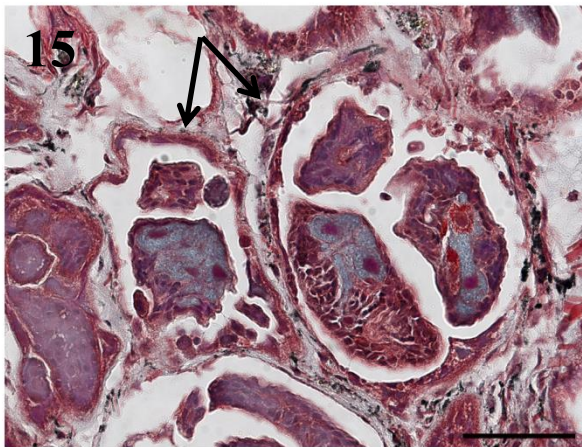
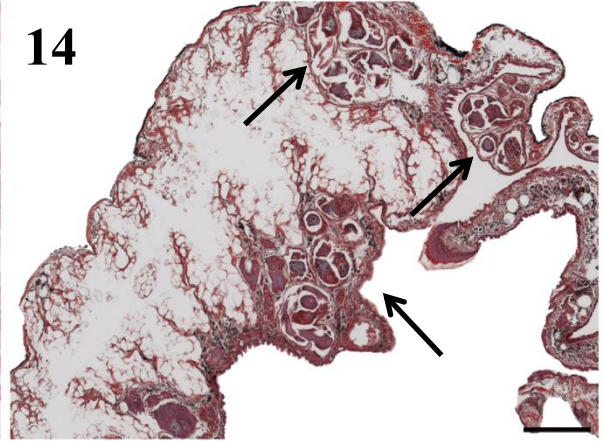
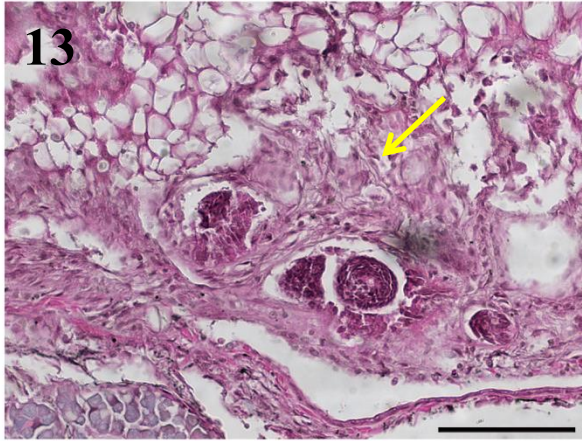
Prancha 3

Aspectos histopatológicos da glândula de albúmem e do rim em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* 42 dias após a infecção.

Figuras 13, 14 e 15: Presença de parasitos envolvidos (Fig 13, seta amarela) ou não (Figs 14 e 15, setas) por reação hemocitária no rim (Fig 13 PAS, 40X; Fig 14 Tricrômica de Masson, 10X; Fig 15 Tricrômica de Masson, 63X);

Figuras 16, 17 e 18: Detalhes da glândula de albúmem parasitada por esporocistos secundários (Setas) (Fig 16 e 18 AB pH 1.0, 40X; Fig 17 PAS, 40X).

PRANCHA 3



Todas as figuras com escala de 50 μ m.

Prancha 4

Aspectos histopatológicos da glândula digestiva de *B. glabrata* controle e infectada por *S. mansoni* 28 dias após a infecção.

Figura 19: Glândula digestiva de *B. glabrata* controle (HE 10X);

Figura 20: Parasitos na glândula envoltos por discreta reação inflamatória (Setas) (HE 10X);

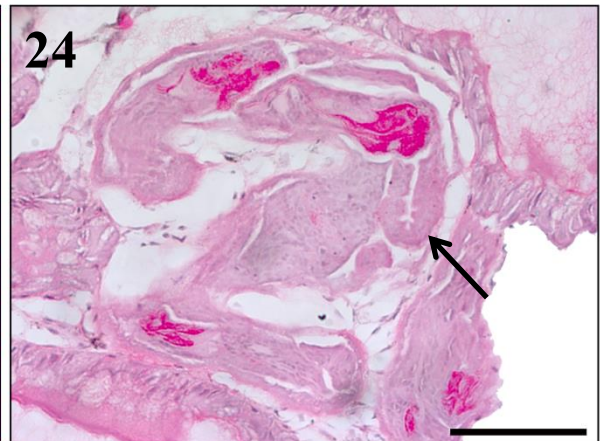
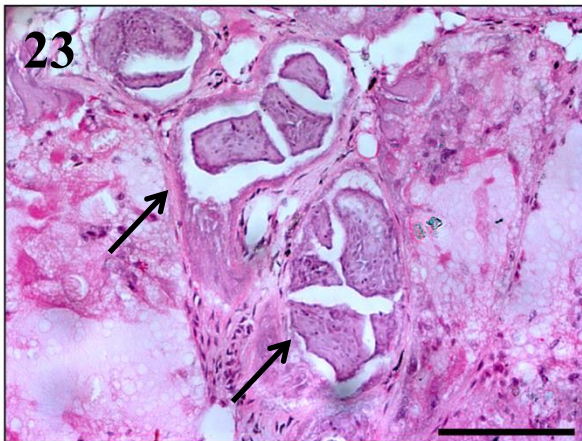
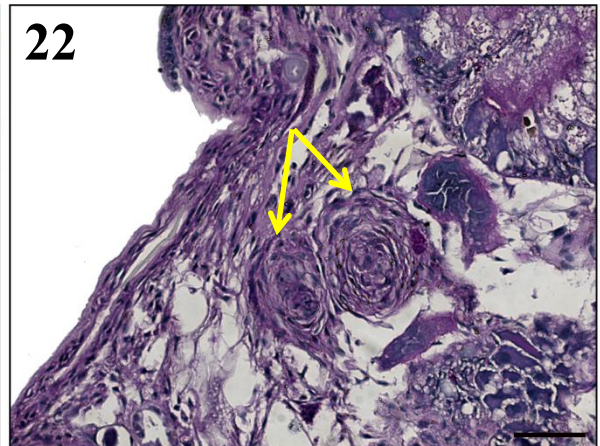
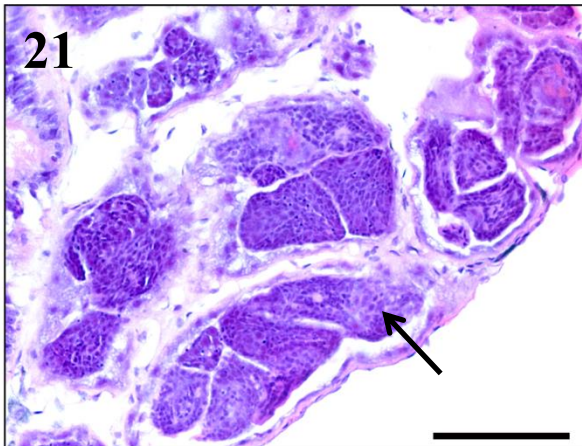
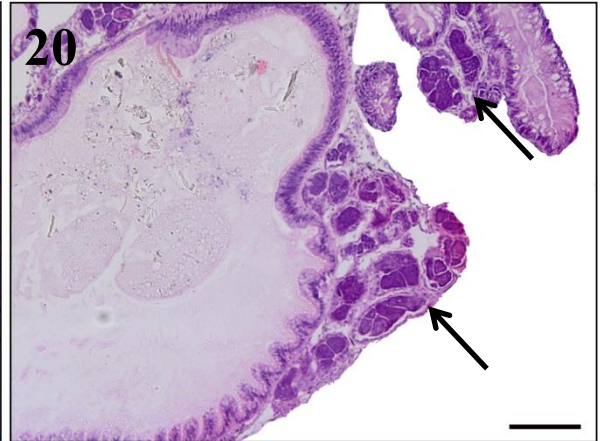
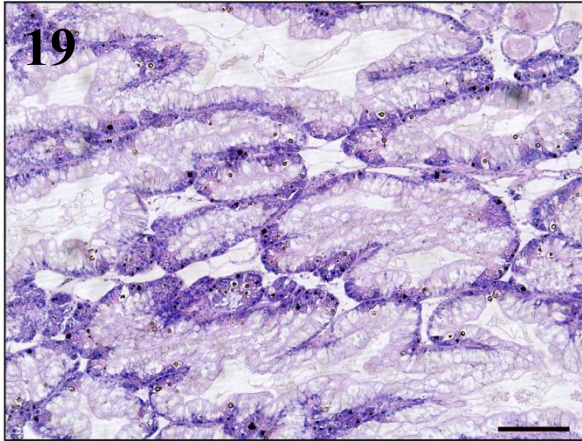
Figura 21: Detalhe dos parasitos da figura 20 (Seta) (HE 40X);

Figura 22: Granulomas na glândula digestiva sem envolver o parasito (Setas amarelas) (HE 10X);

Figura 23: Esporocistos secundários na glândula digestiva negativos à coloração (Setas) (PAS 40X);

Figura 24: Esporocisto secundário formando cercaria positivo ao PAS (Seta) (PAS 40X).

PRANCHA 4



Todas as figuras com escala de 50 μ m.

Prancha 5

Aspectos histopatológicos da glândula digestiva de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* 28 dias após a infecção.

Figura 25: Esporocistos secundários e cercárias na glândula digestiva (Setas) (com eliminação de cercárias, HE 10X);

Figura 26: Reação hemocitária circundando esporocistos secundários na glândula digestiva (Setas amarelas) (sem eliminação de cercárias, HE 40X);

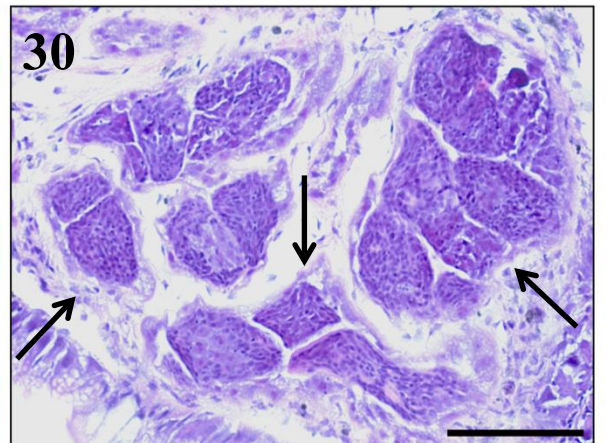
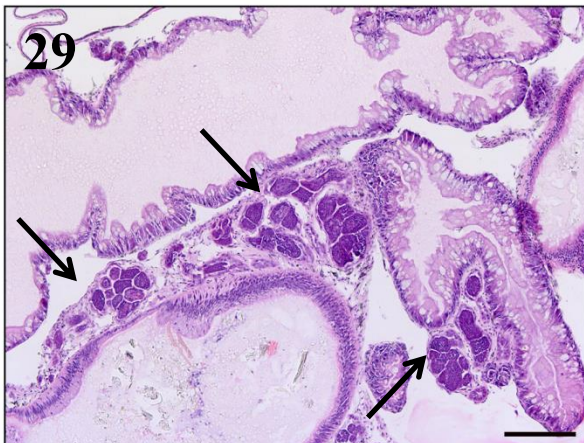
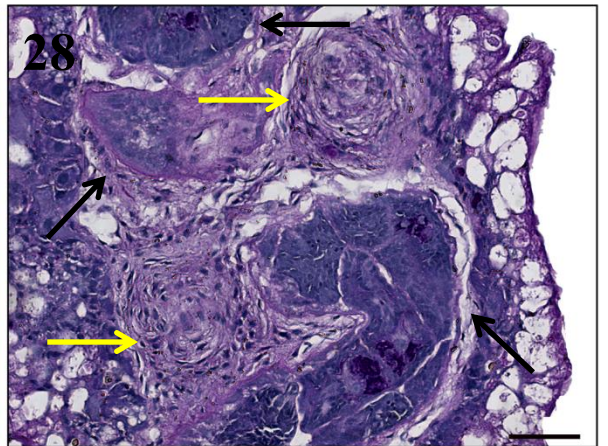
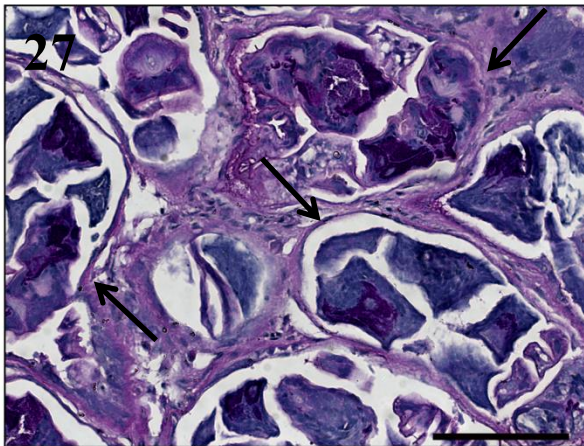
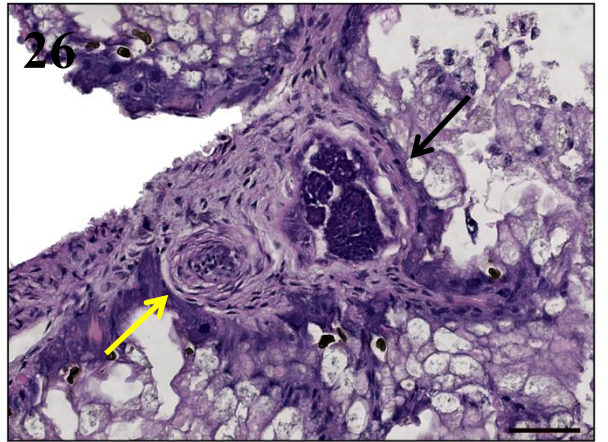
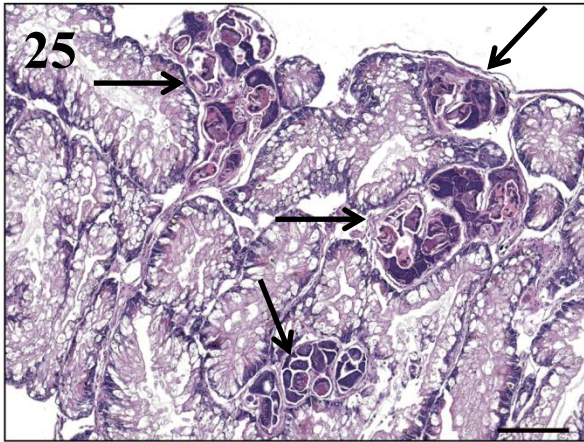
Figura 27: Detalhe dos parasitos na glândula digestiva (Setas) (sem eliminação de cercárias, PAS 40X);

Figura 28: Detalhe da reação hemocitária constituindo pequenos granulomas na glândula digestiva (Setas amarelas) (sem eliminação de cercárias, PAS 40X);

Figura 29: Esporocistos secundários no tecido conjuntivo entre os ácinos da glândula digestiva (Setas) (HE 10X);

Figura 30: Detalhe dos esporocistos secundários na imagem anterior com discreta reação inflamatória entorno dos mesmos (Setas) (HE 40X).

PRANCHA 5



Todas as figuras com escala de 50 μ m.

Prancha 6

Aspectos histopatológicos da glândula digestiva de *B. glabrata* infectada por *S. mansoni* 62 dias após a infecção.

Figura 31: Esporocistos secundários envolvidos por discreta reação inflamatória (Setas);

Figura 32: Esporocistos secundários ocupando o lugar dos ácinos da glândula (Setas);

Figura 33: Presença de parasitos na glândula, mostrando uma parte da luz intestinal (Setas);

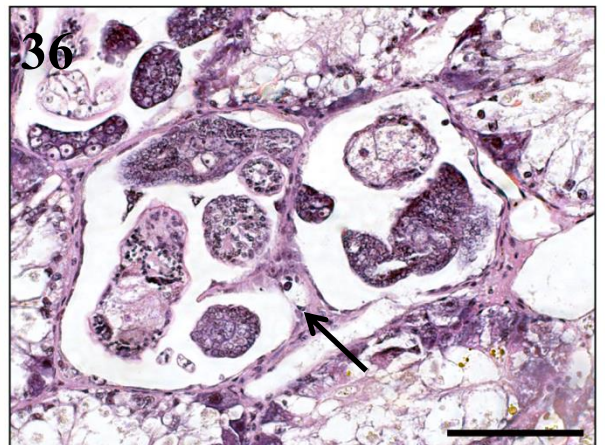
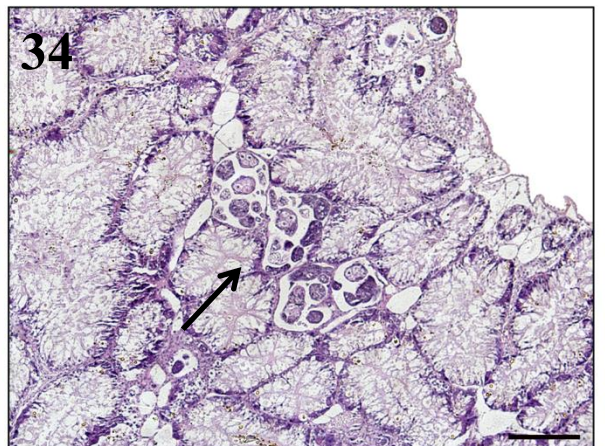
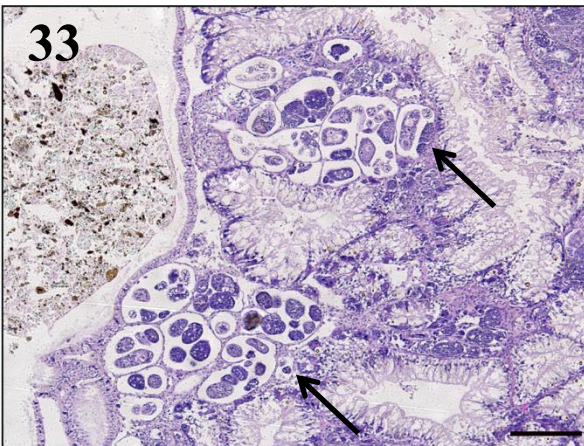
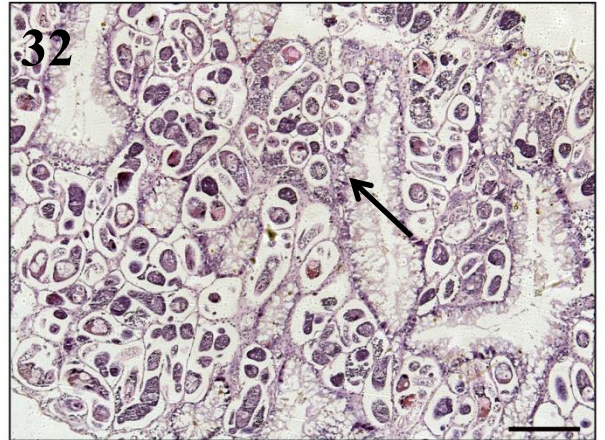
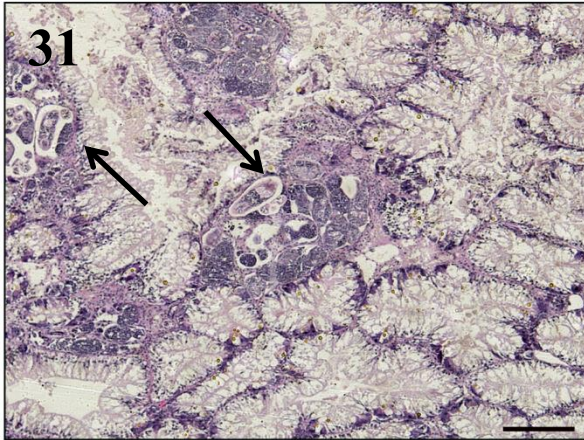
Figura 34: Presença de parasitos na glândula, mostrando uma leve reação hemocitária (Setas);

Figura 35: Detalhe da figura 34 (Setas);

Figura 36: Detalhe (Fig. 34) dos parasitos na glândula (Setas);

Figuras: 31 a 34 HE 10X; 35 e 36 HE 40X.

PRANCHA 6



Todas as figuras com escala de 50 μ m.

Prancha 7

Expressão da lectina *Lens culinaris* em *B. glabrata* controle e infectada por *S. mansoni*.

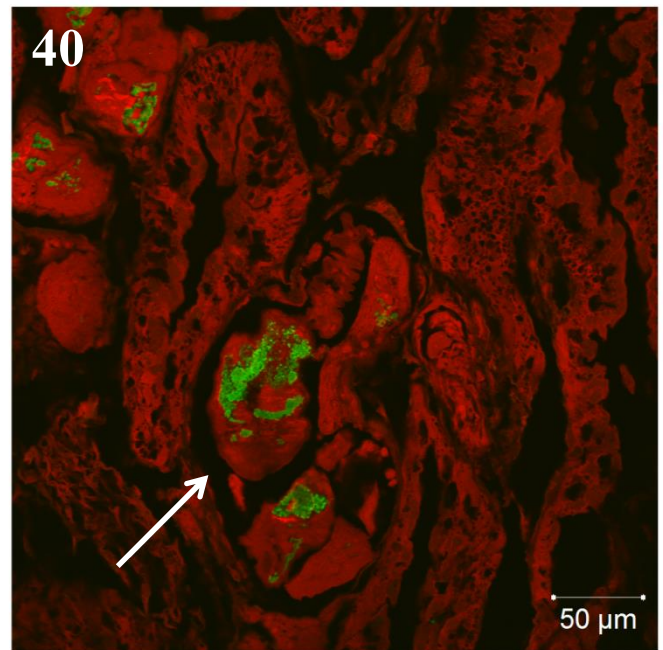
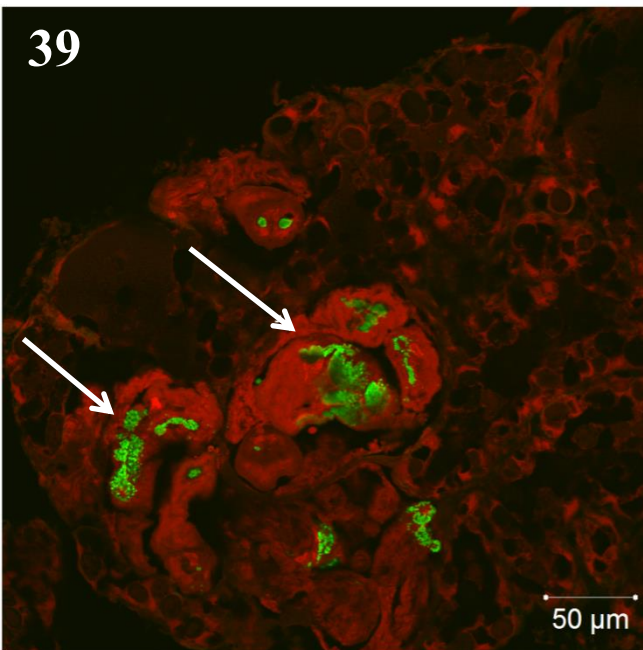
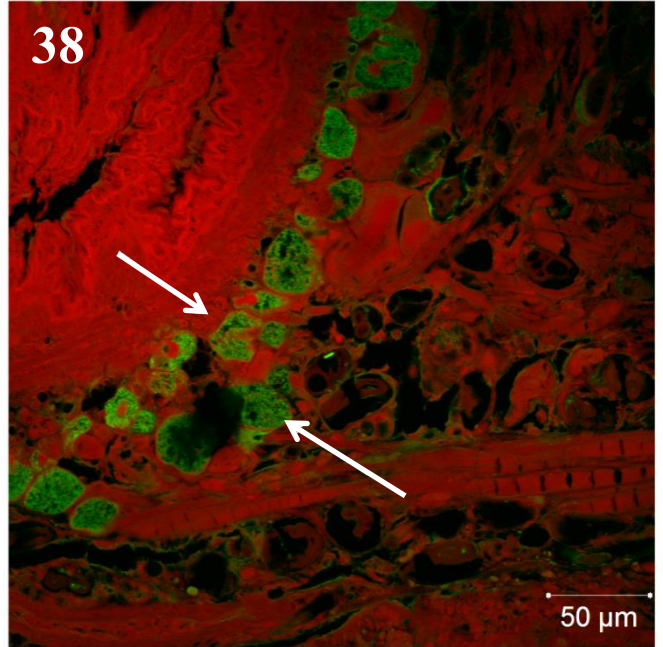
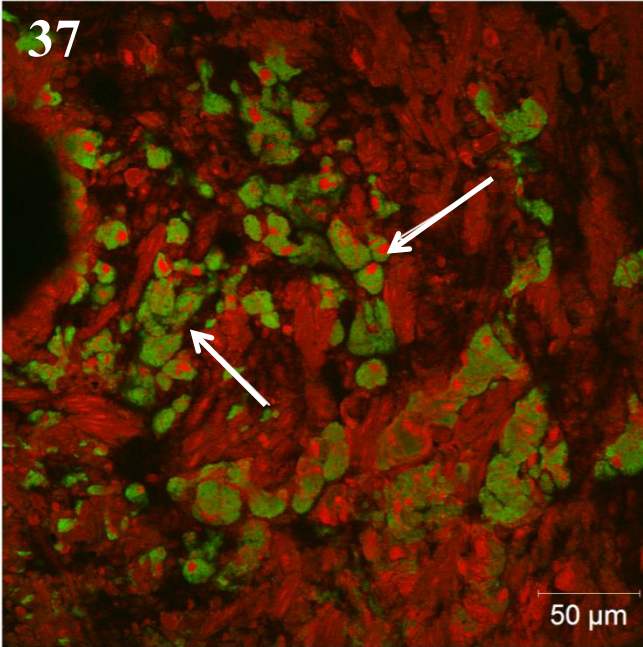
Figura 37: Glândulas secretoras de muco da mufla (Setas) (Controle);

Figura 38: Células granulares do tecido conjuntivo (Setas) (42 dias de infecção);

Figura 39: Parasitos na glândula digestiva (Setas) (42 dias de infecção);

Figura 40: Parasitos na glândula digestiva (Seta) (42 dias de infecção).

PRANCHA 7



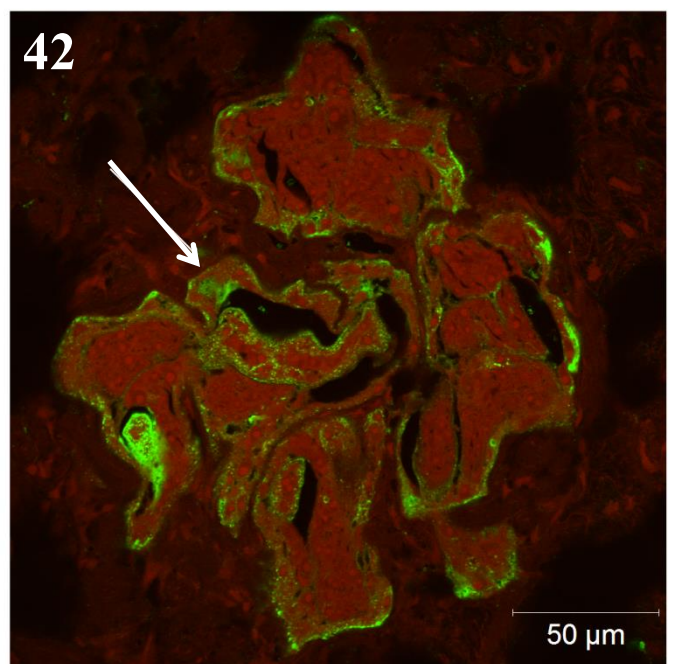
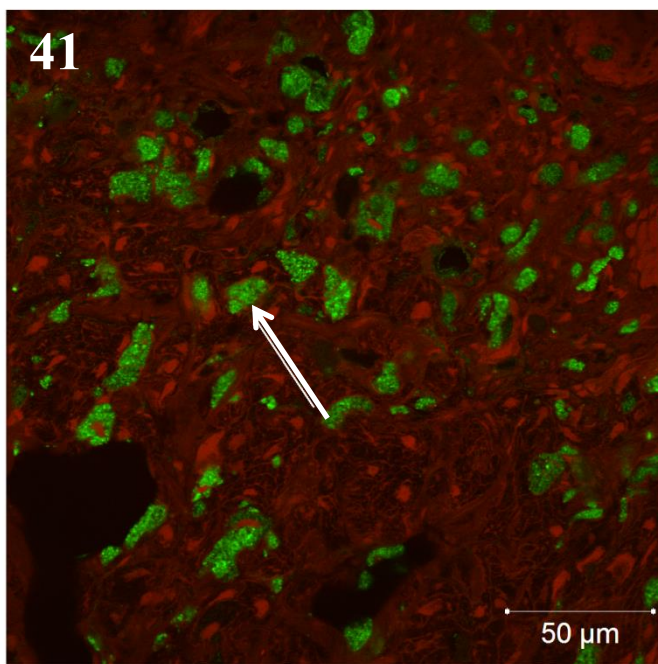
Prancha 8

Expressão da lectina *Arachis hypogaea* em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*.

Figura 41: Tecido apresentando autofluorescência mais acentuada nas células granulares e epiteliais da mufla (Seta) (28 dias de infecção);

Figura 42: Parasitos na glândula digestiva (Seta) (28 dias de infecção).

PRANCHA 8



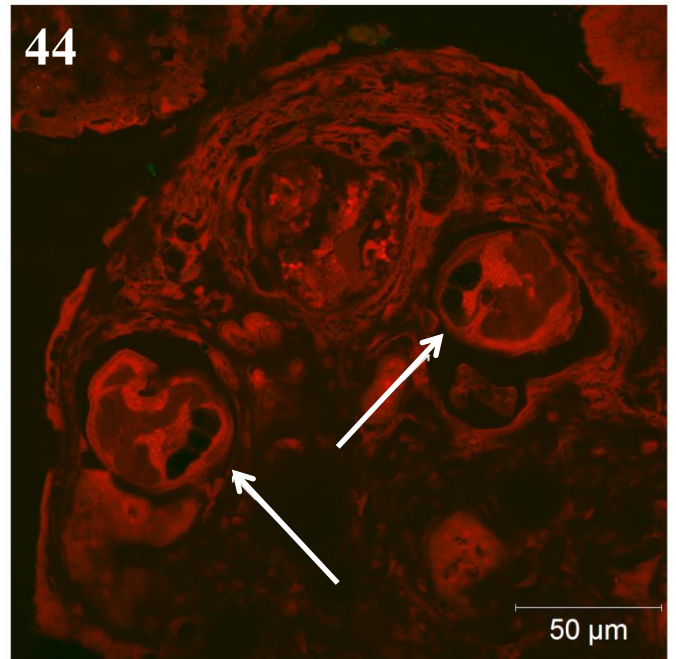
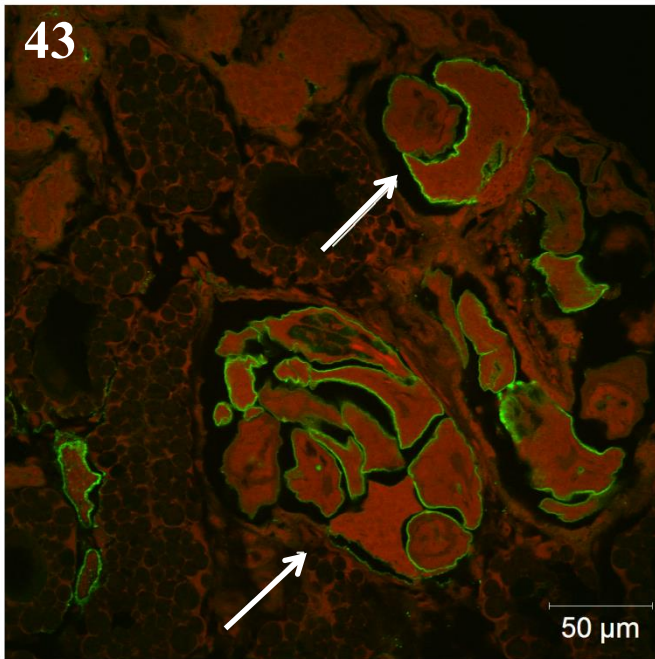
Prancha 9

Expressão da lectina *Griffonia simplicifolia* em *B. glabrata* infectada por *S. mansoni*.

Figura 43: Esporocistos secundários na glândula digestiva (Setas) (42 dias de infecção);

Figura 44: Mufla negativa a *G. simplicifolia* (Setas) (42 dias de infecção).

PRANCHA 9



Este trabalho descreveu características da histopatologia da esquistossomose mansônica no hospedeiro *B. glabrata* da cepa Ressaca, proveniente de Belo Horizonte, Minas Gerais e aborda o papel de algumas lectinas na resposta imune durante a infecção. Embora outros autores já tenham descrito as etapas de desenvolvimento do miracídio até cercária nas três espécies de hospedeiros invertebrados, nesse trabalho encontramos algumas diferenças relacionadas à distribuição do parasito, possivelmente devido à pequenas variações no padrão de resposta existente entre as várias cepas de *B. glabrata*. Em cepas mais suscetíveis dessa espécie ocorre o desenvolvimento de um grande número de parasitos, sem indução de resposta celular (Godoy et al, 1997). Segundo Pan (1963), uma pequena porcentagem dos miracídios que penetra no molusco transforma-se em esporocistos primários que usualmente ficam localizados no pé. Souza (1995) não detectou a presença de parasitos em animais com 72 horas de infecção. Em nosso trabalho, não detectamos esporocistos primários nos tempos iniciais do estudo e também não foi observada reação hemocitária nesse período, entretanto, notou-se o aumento de células pigmentadas do tecido conjuntivo da mufla a partir do 14º dia após a exposição. Segundo Pan (1963), o período de produção de esporocistos primários é curto e limitado ao período pré-patente.

Os esporocistos secundários migram rápida e diretamente para a glândula digestiva (Théron, 1989). Souza (1995) observou em secções histológicas de *B. glabrata* com 31 dias de infecção, esporocistos em diferentes fases de crescimento e diferenciação até a formação de cercárias, sem qualquer reação inflamatória do hospedeiro. O parasito estava localizado principalmente na glândula digestiva, na região da mufla e pé e no colar do manto. O presente trabalho, esporocistos secundários passaram a ser observados pela primeira vez no 21º dia após a infecção na glândula digestiva sem reação hemocitária. O número de parasitos nessa fase de desenvolvimento aumentou muito no 42º dia de infecção, quando também puderam ser visualizados a formação de cercárias. O número de órgãos parasitados neste ponto de infecção também aumentou, além da mufla, pé, tentáculo, glândula digestiva e ovoteste, a glândula de albúmem também estava parasitada. Nessa ocasião foram visualizadas reações inflamatórias constituídas por pequenos infiltrados hemocitários e granulomas na glândula digestiva, rim e mufla. Esta resposta inflamatória embora discreta e restrita a alguns órgãos pareceu estar relacionada diretamente a fase de esporocisto secundário e cercária. Acreditamos que as alterações morfológicas durante o desenvolvimento dessas fases larvares podem ativar hemócitos levando a uma resposta tardia no transcurso da infecção. Contudo,

observou-se que o maior prejuízo fisiológico para o hospedeiro intermediário ocorreu na reprodução, com a redução gradativa e drástica do número de ácidos do ovoteste que passou a ser quase que totalmente ocupado por parasitos no período patente.

O processo de castração parasitária vem sendo estudado por alguns autores. Crews e Yoshino (1989) detectavam redução da postura de ovos entre o 14º e o 21º dia de infecção e aumento do número de ovócitos no 14º dia após a infecção. Em *B. glabrata*, cepa Ressaca, usada neste trabalho, observou-se maior número de ovos nas secções histológicas de animais com 21 dias de infecção, seguido de redução nos demais pontos estudados.

A glândula digestiva estava intensamente parasitada no 62º dia de infecção e exibiu, diferente dos tempos anteriores, positividade ao Alcian Blue pH 1.0 e ao Reagente de Schiff, o que evidencia alteração metabólica em virtude do parasitismo. De fato, Faro (2011) detectaram alterações nas concentrações de glicogênio nessa glândula com o avanço da infecção.

A interação lectina/carboidrato tem sido associada ao reconhecimento da larva de trematódeos e conseqüente aumento da atividade fagocitária dos hemócitos, que também é influenciada pela presença de cálcio e fatores plasmáticos (Zelck, 1992; Martins-Souza et al, 2006). Em nosso trabalho não houve alteração na expressão de carboidratos ligantes de lectinas de *L. culinaris*, *A. hypogaea* e *G. simplicifolia* nos tecidos de *B. glabrata* durante a infecção. A única exceção foi a ligação da lectina de *L. culinaris* com a glândula digestiva dos animais infectados. A presença de carboidratos ligantes da lectina *L. culinaris* nos esporocistos secundários e não sobre os hemócitos sugere que possa haver ausência ou alteração do carboidrato ligante do hemócito, interferindo no reconhecimento do parasito pela célula. Isso pode contribuir para inibição ou redução da resposta imune. O modelo estudado *B. glabrata* (Ressaca) mostrou-se semelhante a *B. glabrata* (BH) quanto à baixa expressão de *A. hypogaea* nos animais infectados. Essa lectina foi detectada em abundância em *B. tenagophila* resistente ao *S. mansoni* (Taim) (Martins-Souza et al, 2006). Martins-Souza et al (2006) demonstraram, em ensaios *in vitro*, que existem diferenças na quantidade e no tipo de carboidrato expresso na membrana de hemócitos de hospedeiros suscetíveis e resistentes. Neste trabalho, a ausência ou a baixa reatividade celular observada em *B. glabrata* no transcurso da infecção esquistossomótica pode ser explicada pela baixa concentração de lectinas capazes de agir como mediadores citofílicos entre o hemócito e o esporocisto. Baseamos esta hipótese no fato de que ensaios *in vitro* mostraram que hemócitos de moluscos suscetíveis aumentam a capacidade de encapsulamento e fagocitose de esporocistos, quando a

hemolinfa de moluscos resistentes está presente no experimento (Loker, 2010). A ligação lectina/carboidrato tem sido associada ao reconhecimento trematódeo/larva, e poderia exercer influência sobre a capacidade do hemócito em encapsular as larvas do parasito (Van Der Knaap & Loker 1990; Yoshino et al, 2001; Guillou et al, 2004). Vários autores já demonstraram que, o tegumento do estágio larval do trematódeo *S. mansoni* é coberto por um grande numero de componentes glicosídicos, e a maioria das lectinas testadas era especificamente capaz de ligar-se tanto a larvas (Uchikawa & Loker, 1991) quanto às proteínas isoladas de seu tegumento (Johnson & Yoshino, 1996). Experimentos para identificação e quantificação de lectinas e seus ligantes presentes na hemolinfa de *B. glabrata* suscetíveis e resistentes poderiam auxiliar na caracterização de diferentes perfis proteicos e glicoproteicos associando-os a diferentes padrões de resposta imune dos moluscos infectados. Assim, a comparação entre perfis genéticos poderiam fornecer pistas sobre o processo evolutivo/adaptativo que permitiu o sucesso do parasitismo de *S. mansoni* em planorbídeos.

VII. CONCLUSÕES

8.1. No modelo *B. glabrata* cepa Ressaca, a resposta inflamatória ao parasitismo por *S. mansoni*, embora discreta e restrita a alguns órgãos, parece estar relacionada diretamente a fase de esporocisto secundário e cercária. É possível que as alterações morfológicas durante o desenvolvimento dessas fases larvares possam ativar hemócitos levando a uma resposta tardia no transcurso da infecção.

8.2. As diferenças observadas entre este estudo e a literatura relacionadas à distribuição do parasito, possivelmente são devido a pequenas variações no padrão de resposta existente entre as várias cepas de *B. glabrata*.

8.3. Confirmando os dados da literatura, os sítios preferenciais de desenvolvimento de esporocistos secundários e cercarias são a glândula digestiva, ovoteste e mufla.

8.4. O prejuízo morfológico mais evidente no hospedeiro molusco ocorre na reprodução, com a redução gradativa e drástica do número de ácidos do ovoteste que passam a ser quase que totalmente ocupados por parasitos no período patente.

8.5. Não houve alteração na expressão de carboidratos ligantes de lectinas de *A. hypogaea* e *G. simplicifolia* nos tecidos de *B. glabrata* durante a infecção. A única exceção foi a ligação da lectina de *L. culinaris* com a glândula digestiva dos animais infectados aos 42 dias de infecção.

8.6. O sucesso do parasitismo pode ser favorecido pela diminuição ou inibição da expressão e/ou distribuição das lectinas nos tecidos do hospedeiro intermediário durante a infecção, contribuindo para o processo de adaptação entre os dois coabitantes sem lesões significativas que comprometam alguma das partes.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bachère E, Chagot D, Grizel H. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 549-559, 1988.

Barbosa L. Cultivo primário do órgão hematopoiético de moluscos do gênero *Biomphalaria*: caracterização morfológica e funcional das células, 2007. Tese de doutorado aprovada em 2007. 104 páginas.

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

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

Borges CMC, Andrade ZA. Extra-cellular matrix changes in *Schistosoma mansoni* infected *Biomphalaria glabrata*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98: 135-139, 2003.

Carballal CJ, López MC, Azevedo C, Villalba A. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. 29: 127-135, 1997.

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

Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose – Uma versão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2008.

Center for disease control and prevention, [2013]. Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/S-Z/Schistosomiasis/body_Schistosomiasis_page1.htm. Acesso em: 14/10/2013.

Crews AE, Yoshino TP. *Schistosoma mansoni*: Effect of infection on reproduction and gonadal growth in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology.* 68: 326-334, 1989.

Fernandez MA 2007. Compatibilidade entre *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 e *Biomphalaria* Preston, 1910. p, 259-266. Em: Tópicos em Malacologia – Ecos do XVIII Encontro Brasileiro de Malacologia, Editora Sociedade Brasileira de Malacologia. RJ. 365p.

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

Guillou F, Mitta C, Dissous R, Pierce R, Coustau C. Use of individual polymorphism to validade potencial functional markes: case of a candidate lectin (Bgsel) differentially expressed in susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. Com Biochem Physiol 138: 175-181, 2004.

Harris KR. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 266: 446-464, 1975.

Heyneman D. Dams and disease. Hum. Nat. 2: 50-57, 1979.

Hoffman WA, Pons JA, Janer JL. The sedimentation-concentration method in schistosomiasis mansoni. The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine. 9: 283-291, 1934.

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

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

Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D. Molluscan host reactions to helminthic infection. In: Soulsby EJJ (ed), Protozoa, Arthropods and Invertebrates, CRC-Press Inc., Boca Raton, Florida, USA, pp 211-270, 1987.

Loker ES, Adema CM, Zhang S-M, Kepler TB. Invertebrate immune systems - not homogeneous, not simple, not well understood. Immunol. Rev. 198: 10-24, 2004.

Loker ES. Gastropod Immunobiology. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, 2010.

Mallory FB. Pathological Technique. New York, Hafner Publishing Co. 1961, p. 144.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Martins-Filho OA, Coelho PMZ, Correa JR, Negrão-Corrêa D. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and

Biomphalaria tenagophila resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. Mem. Inst. Osw. Cruz. 101: 185-192, 2006.

Matricón-Gondran M. The site of ultrafiltration in the kidney sac of pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. Tissue Cell. 22: 911-923, 1990.

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

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

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

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

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

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

Passos ADC, Silveira AC, Madruga JP, Silva JTF, Porto MAS, Oliveira MAHT, Alves MRL, Silva PC, Amaral RS, Guida U. Controle da Esquistossomose – Diretrizes Técnicas. 2.ed. (português). Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde; 1998.

Platt JL, Michael AF. 1983. Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence by *p*-phenylenediamine. *J. Histochem. Cytochem.* 31: 840-842.
Sanderson, JB. 1994. *Biological Microtechnique*. (Royal Microscopical Society Handbook No. 28) Oxford: BIOS Scientific Publishers.

Prata A. Esquistossomose mansoni, In: Veronesi, R. Doenças infecciosas e parasitárias. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1230p, 1987.

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

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4.ed. (português). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2008.

Richards CS, Renwrantz LR. Two lectins on surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca^{2+} -dependent, GalNac-specific lectin and a Ca^{2+} -independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognizes activated homologous opsonins. J. Comp. Physiol. 161: 43-54, 1991.

Santos Costa MJF. Estudo da interação *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Pulmonata: Planorbidae) - *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda: Schistosomatidae): aspectos biológicos, bioquímicos e histológicos da reprodução do hospedeiro intermediário, 2011. Tese de doutorado aprovada em 2011. 120 páginas.

Schwarz FP. Thermodynamics of monosaccharide ending to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin and lentil (*Lens culinaris*) lectin. The I. of Biol. Chem. 268: 7668-7677, 1993.

Secretaria de vigilância em saúde, [2013]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresent_esquistossomose_mansoni_30_05_2011.pdf. Acesso em 03/10/2013.

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

Souza CP, Janotti-Passos LK, Freitas JR. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. Mem. Inst. Osw. Cruz. 90: 5-10, 1995.

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

Souza SS. Origem das células de defesa (hemócitos) em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), 2006. Dissertação de mestrado aprovada em 2006. 57 páginas.

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

Théron A, Touassen R. *Schistosoma rodhaini*: intramolluscan larval development, migration and replication processes of daughter sporocysts. Acta trop. (Basel), 46: 39-45, 1989.

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

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

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

Volnei WG, Siqueira WC. *Histologia Básica*, 2ª ed. (português). Rio de Janeiro; 1981.

World health organization, [2013]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>. Acesso em: 14/10/2013.

Yoshino TP, Boyle JP, Humphries JE. Receptor-ligand interactions and cellular signaling at the host-parasite interface. *Parasitology* 123 (Suppl. SL): 43-57, 2001.

Yoshino TP, Cheng TC, Renwranz LR. Lectin and blood group determination of *Schistosoma mansoni*: alteration following *in vitro* transformation of miracidium to mother sporocyst. *J Parasitol* 63: 818-824, 2001.

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

9.1. Descrição das Técnicas Histológicas e Imunomarcção por Lectinas Fluoresceïnadas

9.1.1. Hematoxilina e Eosina

A coloração de Hematoxilina e Eosina ou simplesmente HE, é utilizada na histologia para corar todo tipo de tecido, seja em blocos de parafina ou em blocos congelados. A Hematoxilina é um corante básico, portanto cora estruturas ácidas, como o núcleo das células e a Eosina é um corante ácido, portanto cora estruturas básicas como o citoplasma.

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

9.1.2. Alcian Blue pH 1.0

Esta coloração é usada para verificar a presença de proteoglicanos sulfatados. As lâminas com os cortes histológicos passaram pelo mesmo processo de remoção da parafina descrito acima. Em seguida, foram banhadas em solução tampão pH 0,65 durante cinco minutos (o tampão foi desprezado após o uso) e logo após, coradas pelo Alcian Blue pH 1.0 durante 45 minutos. O excesso do corante foi removido com a mesma solução tampão acetato de sódio 1M pH 0,65, durante cinco minutos. O tampão foi desprezado e as lâminas foram oxidadas pelo Ácido Periódico a 1% durante 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por cinco minutos e coradas pelo Reagente de Schiff durante 20 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente por cinco minutos e em água destilada

por três minutos. Por último, as lâminas passaram pelo mesmo processo de desidratação, clarificação e montagem em goma de Damar descritos acima (Tolosa, 2003).

9.1.3. Alcian Blue pH 2.5

Esta coloração é usada para verificar a presença de proteoglicanos carboxilados. As lâminas com os cortes histológicos passaram pelo mesmo processo de remoção da parafina descrito na técnica de Hematoxilina e Eosina. Em seguida, foram banhadas em solução tampão acetato de sódio 1M pH 2,32 durante cinco minutos (o tampão foi desprezado após o uso) e logo após coradas pelo Alcian Blue pH 2.5 durante 45 minutos. O excesso do corante foi removido com a mesma solução tampão de pH 2,32 durante cinco minutos. O tampão foi desprezado e as lâminas foram oxidadas pelo Ácido Periódico a 1% durante 15 minutos e em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por cinco minutos. Logo após, as lâminas foram coradas pelo Reagente de Schiff durante 20 minutos e depois passaram por dois banhos de metabissulfito de sódio a 5% durante cinco minutos cada. As lâminas foram lavadas em água destilada por 10 minutos. Por último, as lâminas passaram pelo mesmo processo de desidratação, clarificação e montagem em goma de Damar descritos acima (Tolosa, 2003).

9.1.4. P.A.S. (Reação do Ácido Periódico de Schiff)

Esta coloração é usada para mucoproteínas e carboidratos em geral. As lâminas com os cortes histológicos passaram pelo mesmo processo de remoção da parafina descrito nas técnicas acima. Em seguida foram embebidas em Ácido Periódico a 1% durante 15 minutos e depois foram lavadas em água destilada por cinco minutos. Logo após, as lâminas foram coradas pelo Reagente de Schiff (guardado na geladeira), por 15 minutos à temperatura ambiente e lavadas em água destilada por quatro minutos. Depois as lâminas foram coradas pela Hematoxilina de Mayer durante 10 minutos e lavadas em água corrente por cinco minutos. Por último, as lâminas passaram pelo mesmo processo de desidratação, clarificação e montagem em goma de Damar descritos acima (Tolosa, 2003).

9.1.5. Tricrômica de Masson

A coloração Tricrômica de Masson marca três tipos de estruturas: fibras colágenas, fibras musculares e tecido conjuntivo. As lâminas com os cortes histológicos passaram pelo mesmo processo de remoção da parafina descrito nas técnicas acima. Em seguida foram colocadas em Bouin pré-aquecido a 56°C por uma hora, lavadas em água corrente até o

desaparecimento da cor amarela e coradas pela Hematoxilina Férrica de Weigert durante 10 minutos (a solução foi desprezada após o uso). Logo após as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos e em água destilada por um minuto. Em seguida elas foram coradas em Solução de Biebrich Escarlat-Fucsina Ácida por cinco minutos e logo após foram muito bem lavadas em água destilada com várias trocas durante 20 minutos. Elas foram colocadas em Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico a 5% durante 30 minutos, depois a solução foi escorrida das lâminas e elas foram coradas pelo Azul de Anilina durante 30 minutos e lavadas em água destilada por cinco minutos. Por último, as lâminas passaram pelo mesmo processo de desidratação, clarificação e montagem em goma de Damar descritos acima (Tolosa, 2003).

9.1.6. Reticulina de Gomori

A coloração Reticulina de Gomori cora fibras colágenas de acordo com sua abundância no tecido. As lâminas com os cortes histológicos passaram pelo mesmo processo de remoção da parafina descrito nas técnicas acima. Depois foram banhadas em solução de Permanganato de Potássio a 1% durante um minuto e lavadas em água destilada por dois minutos. Em seguida, foram descoradas pelo Ácido Oxálico a 3% durante três minutos e lavadas em água corrente por três minutos e foi aplicado a elas Alúmen de Ferro a 2%, também podendo ser usado o Sulfato de Ferro e Alumínio por um minuto. As lâminas foram lavadas em água destilada por dois minutos. Logo após, foram banhadas em solução de uso de Nitrato de Prata Amoniacal durante um minuto, lavadas em água destilada por cinco minutos, em formol a 10% por três minutos e em água corrente por cinco minutos. Depois as lâminas foram banhadas em Solução de Cloreto de Ouro a 1% durante três minutos, lavadas em água destilada por dois minutos, banhadas em Tiossulfato de Sódio a 5% por dois minutos, lavadas em água corrente por dois minutos. Por último, as lâminas passaram pelo mesmo processo de desidratação, clarificação e montagem em goma de Damar descritos acima (Volnei, 1981).

9.1.7. Von Kossa

A coloração de Von Kossa é utilizada para destacar cálcio presente nos tecidos e cultura de células analisadas. As lâminas com os cortes histológicos passaram pelo mesmo processo de remoção da parafina descrito nas técnicas acima. Após a hidratação do tecido, as lâminas foram embebidas na solução de Nitrato de Prata 5% por uma hora e expostas a lâmpada de 100 watts. Após a imersão na solução, as lâminas foram lavadas em água destilada. Em seguida, elas foram embebidas na solução de Tiossulfato de Sódio 5% por dois minutos e

lavadas em água destilada. Após a imersão, as lâminas foram contrastadas em solução de Vermelho Rápido Nuclear por cinco minutos e lavadas em água destilada. Para finalizar, as lâminas passaram pelo mesmo processo de desidratação, clarificação e montagem em goma de Damar descritos acima.

Durante o banho pela solução de Nitrato de Prata 5%, a luz de 100 watts pode ser substituída por luz solar ou lâmpada ultravioleta (Mallory, 1961).

9.1.8. Marcação com Lectinas Fluoresceinadas

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

Foi realizada a marcação com lectinas fluoresceinadas nos tecidos de *B. glabrata* controles e infectadas por *S. mansoni*.

As lâminas foram desparafinizadas e em seguida lavadas em tampão PBS 0,01M pH 7.4 por 10 minutos e em seguida foi feita a revelação antigênica em tampão TUF (Target Unmasking Fluid – Pan Path Z000R0000 – 3x concentrado). O tampão TUF foi diluído em água destilada, aquecido em microondas a 90°C. As lâminas foram imersas por 10 minutos com a temperatura mantida em 90°C e esfriadas lavando-as duas vezes em água destilada e depois em PBS 0,01M pH 7.4 por 15 minutos.

Após a Revelação Antigênica, as células presentes nas lâminas foram permeabilizadas com “detergente” Triton diluído a 0,05% em PBS por 15 minutos. Em seguida, foi feito o bloqueio das lâminas com o uso de uma solução de bloqueio feita a partir de: 8% de soro fetal bovino, 1% de leite em pó desnatado (de cabra ou Molico) e 2,5% de albumina bovina, diluídos em PBS ligeiramente aquecido a 0,01M com pH entre 7.2 e 7.6 por 15 minutos.

As lectinas fluoresceinadas (FITC): 1 – *Arachis hypogaea* L.; 2 – *Griffonia simplicifolia* (sin. *Bandeiraea simplicifolia*) (DC) Baill e 3 – *Lens culinaris* Medik foram diluídas em PBS 0,01M pH 7.4 (1:50) e incubadas “overnight” a 4°C. Os cortes foram corados com Azul de Evans por 10 minutos e as lâminas foram lavadas em PBS a 1% três vezes por 3, 5 e 7 minutos respectivamente. Por último, as lâminas foram montadas com Glicerol Anti *fading* [100mg de ρ -Phenylenediamine (Sigma 6001), 10 ml de PBS 0,01M pH 7.4 e 90 ml de

Glicerol] (Platt & Michael, 1983) e armazenadas a -20°C, onde permaneceram até o momento da observação. As lâminas foram observadas ao Microscópio Confocal LSM 510 META da empresa Zeiss. As lectinas usadas neste trabalho são produtos da empresa Sigma-Aldrich, com as seguintes especificações: *Arachis hypogaea* (FITC conjugado): L7381, *Griffonia simplicifolia* (syn. *Bandeiraea simplicifolia* - FITC conjugado): L9381 e *Lens culinaris* (FITC conjugado): L9262.