

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Cultivo primário e caracterização de células derivadas de diferentes tecidos
de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835)**

Por

Aristeu Silva Neto

**Belo Horizonte
Fevereiro de 2012**

TESE MDIP-CPqRR

A. SILVA-NETO

2012

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Cultivo primário e caracterização de células derivadas de diferentes tecidos de
Biomphalaria tenagophila (Orbigny, 1835)

Por

Aristeu Silva Neto

Dissertação apresentada com vistas à
obtenção do Título de Mestre em Ciências
na área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Dr. Paulo Marcos Zech
Coelho

Co-Orientadora: Dra. Luciana Maria Silva

Belo Horizonte
Fevereiro de 2012

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

S586c 2012	Silva Neto, Aristeu. Cultivo primário e caracterização de células derivadas de diferentes tecidos de <i>Biomphalaria tenagophila</i> (Orbigny, 1835) / Aristeu Silva Neto. – Belo Horizonte, 2012. XII, 104 f.: il.; 210 x 297mm. Bibliografia: f.: 107 - 116 Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1. Esquistossomose/prevenção & controle 2. <i>Schistosoma mansonii</i> /parasitologia 3. <i>Biomphalaria</i> /parasitologia I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação). III. Silva, Luciana Maria (Coorientação). CDD – 22. ed. – 616.963
---------------	---

*“É perigoso sair porta afora, Frodo.
Você pisa na Estrada, e, se não controlar
seus pés, não há como saber até onde
você pode ser levado.”*

Bilbo Bolseiro, personagem de John Ronald Reuel Tolkien,
em “O senhor dos anéis – A sociedade do anel”.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus orientadores, a Dra. Luciana Silva, Dr. Paulo Marcos e Dra. Consuelo Fortes-Dias, pelo apoio, suporte, paciência, incentivo e dedicação.

Aos doutores, Fábio Brayner e Luiz Carlos, por me receberem de braços abertos em Recife, com muito carinho e bondade, pela colaboração no projeto e pelas belas imagens de microscopia eletrônica, e pela amizade criada.

À Dra. Roberta Lima Caldeira pela atenção e dedicação ao ensinar a morfologia do molusco.

Ao excelente apoio técnico de Rafael Padilha, Rita de Cássia, Kevne, Bárbara, Elaine, Patrícia Panisa, Amanda Araújo, Mariana Garcia e Ana Valentim.

Aos amigos dos laboratórios de Biologia Celular e de Enzimologia Aplicada.

Aos amigos do CPqRR: lesquianos e companheiros de mestrado.

Aos amigos do LBCM/LIKA em Pernambuco, que muito bem me receberam durante minha estada no Nordeste, em especial ao Thiago e ao Rodrigo pela hospitalidade e companhia.

Aos membros do Sítio Santa Inês, em Bananal – SP.

Ao Dr. Paulo Pimenta, coordenador, e aos demais membros do colegiado e funcionários do curso de pós-graduação do CPqRR pela eficiência do curso e dos serviços prestados.

À CAPES, FAPEMIG, CNPQ, FIOCRUZ e FUNED pela estrutura e apoio financeiro.

Aos meus pais e minhas irmãs, pelas alegrias e incentivo.

Aos meus familiares, amigos, a todos que me são muito importantes... Muito Obrigado!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSONI	15
3.2 INTERAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO INVERTEBRADO	18
3.3 SISTEMA INTERNO DE DEFESA DE <i>Biomphalaria</i>	21
3.4 A PRODUÇÃO DE HEMÓCITOS EM <i>Biomphalaria</i>	26
4 METODOLOGIA	32
4.1 MANUTENÇÃO DE CARAMUJOS <i>Biomphalaria tenagophila</i> NO LABORATÓRIO	32
4.2 TRATAMENTO DE CARAMUJOS <i>Biomphalaria tenagophila</i> COM METRONIDAZOL	32
4.3 DISSECÇÃO E PREPARAÇÃO DE EXPLANTES	33
4.4 CULTURA CELULAR PRIMÁRIA	34
4.5 COLORAÇÃO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA	34
4.6 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	35
4.7 ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA <i>in vitro</i> (CÉLULAS VIVAS)	35
4.8 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES POR CITOMETRIA DE FLUXO	37
4.9 CARACTERIZAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS EM CULTURA	38
5 RESULTADOS	39
5.1 DISSECÇÃO DO MOLUSCO E CULTURAS PRIMÁRIAS	39
5.1.1 Condições de cultivo	41
5.1.2 Morfologia celular: Glândula de albume	45
5.1.3 Morfologia celular: Glândula Digestiva	48

5.1.4 Morfologia celular: Manto	51
5.1.5 Morfologia celular: Glândulas Nidamental e Prostática	55
5.1.6 Morfologia celular: Ovotesti	57
5.1.7 Morfologia celular: Papo	61
5.1.8 Morfologia celular: Píloro	62
5.1.9 Morfologia celular: Tentáculo	65
5.1.10 Morfologia celular: Tubo renal porção Sacular	65
5.1.11 Morfologia celular: Tubo renal porção Tubular	69
5.2 PERFIL DE AÇUCARES DE SUPERFÍCIE	72
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÕES	100
8 PERPECTIVAS	101
9 ANEXO – Legendas de figuras que aparecem ao verso da página anterior	102
10 REFERÊNCIAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo evolutivo das espécies de <i>Schistosoma</i>	16
Figura 2: Hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> em microscopia óptica e interface de contraste diferencial	24
Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão, hemócitos de <i>B. glabrata</i>	24
Figura 4: Dissecção parcial pelo lado direito de caramujo <i>B. glabrata</i>.	26
Figura 5: Cultura ovotesti	28
Figura 6: Órgão produtor de hemócitos (APO)	29
Figura 7: Cultura primária de células da região do APO de <i>B. glabrata</i>	31
Figura 8: Imagens dos explantes <i>in natura</i> obtidos após dissecção do caramujo <i>B. tenagophila</i>.	39
Figura 9: Vista interna do manto de <i>B. tenagophila</i>	40
Figura 10: Vista interna da região reno-pericárdica de <i>B. tenagophila</i>	41
Figura 11: Perfil de células cultivadas em meios distintos	43
Figura 12: Cultura de células da glândula de albume de <i>B. tenagophila</i>	46
Figura 13: Ultraestrutura de células de cultura da glândula de albume de <i>B. tenagophila</i>	47
Figura 14: Cultura de células da glândula digestiva de <i>B. tenagophila</i>	48
Figura 15: Ultraestrutura de células de cultura da glândula digestiva de <i>B. tenagophila</i>	50
Figura 16: Cultura de células do manto de <i>B. tenagophila</i>	51
Figura 17: Células da cultura do manto de <i>B. tenagophila</i> coradas com Giemsa	52
Figura 18: Ultraestrutura das células de cultura do manto de <i>B. tenagophila</i>	54
Figura 19: Cultura de células das glândulas nidamental e prostática de <i>B. tenagophila</i>	55
Figura 20: Ultraestrutura de células de cultura das glândulas nidamental e prostática de <i>B. tenagophila</i>	56
Figura 21: Células de cultura do ovotesti de <i>B. tenagophila</i>	57
Figura 22: Cultura de ovotesti de <i>B. tenagophila</i> corada com Giemsa	58
Figura 23: MEV das células de cultura do ovotesti de <i>B. tenagophila</i>	59
Figura 24: Ultraestrutura de células de cultura do ovotesti de <i>B. tenagophila</i>	60
Figura 25: Células de cultura do papo de <i>B. tenagophila</i>	61
Figura 26: Ultraestrutura de células de cultura do papo de <i>B. tenagophila</i>	62

Figura 27: Células de cultura do piloro de <i>B. tenagophila</i>	63
Figura 28: Ultraestrutura de células de cultura do piloro de <i>B. tenagophila</i>	64
Figura 29: Células de cultura do tentáculo de <i>B. tenagophila</i>	65
Figura 30: Células de cultura do TRpS de <i>B. tenagophila</i>	66
Figura 31: Cultura do TRpS de <i>B. tenagophila</i> corado com Giemsa	67
Figura 32: Ultraestrutura de células de cultura do TRpS de <i>B. tenagophila</i>	68
Figura 33: Células de cultura do TRpT de <i>B. tenagophila</i>	69
Figura 34: Cultura do TRpT de <i>B. tenagophila</i> corado com Giemsa	70
Figura 35: Ultraestrutura de células de cultura do TRpT de <i>B. tenagophila</i>	71
Figura 36: Microscopia de fluorescência para células da cultura primária do manto de <i>B. tenagophila</i>	72
Figura 37: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do manto de <i>B. tenagophila</i>	74
Figura 38: Microscopia de fluorescência para células da cultura primária de ovotesti de <i>B. tenagophila</i>	77
Figura 39: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do ovotesti de <i>B. tenagophila</i>	79
Figura 40: Microscopia de fluorescência para células da cultura primária da porção sacular do tubo renal de <i>B. tenagophila</i>	82
Figura 41: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção sacular do tubo renal de <i>B. tenagophila</i>	83
Figura 42: Microscopia de fluorescência para células da cultura primária da porção tubular do tubo renal de <i>B. tenagophila</i>	86
Figura 43: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção tubular do tubo renal de <i>B. tenagophila</i>	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Soluções de PBS e água com antibióticos.	33
Tabela 2 – Suplementação de meios de cultura para células de molusco	34
Tabela 3 – Viabilidade média das células em cultura no período de 24-48 horas	42
Tabela 4 – Perfil de marcação de lectinas em CTF (número de populações após marcação) e MF (intensidade de marcação visualizada) para células de culturas primárias de quatro tecidos distintos	72

LISTA DE ABREVIACOES

Co – Coração

Con A – Concanavalina A

CTF – Citometria de fluxo

GA – Glândula de albume

GD – Glândula digestiva

GSII – Lectina isolada de *Griffonia simplicifolia*

HPA – Lectina isolada de *Helix pomatia*

IB4 – Isolectina isolada de *Griffonia simplicifolia*

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MF – Microscopia de fluorescência

Mo – Moela

Mt – Manto

NP – Glândula nidamental e prostática

Ov – Ovotesti

PBS – Tampão salino de fosfato

PHA-L – Lectina fitohemaglutinina isolada de *Phaseolus vulgaris*

Pi – Píloro

PNA – Conjugado Alexa Fluor 488 com a lectina aglutinina isolada de *Arachis hypogaea*

Pp – Papo

SBA – Lectina aglutinina isolada de *Glycine max*

SSC – Side Scatter, parâmetro de complexidade celular ou granulidade.

Sto – Estômago

Te – Tentáculo

TRpS – Tubo renal porção sacular

TRpT – Tubo renal porção tubular

WGA – Lectina aglutinina isolada de grãos de arroz

RESUMO

Schistosoma mansoni, agente etiológico causador da esquistossomose no Brasil, necessita de passagem obrigatória em moluscos do gênero *Biomphalaria* como hospedeiros intermediários, para fechamento do ciclo da doença. Os mecanismos envolvidos na relação parasito-hospedeiro ainda não foram completamente elucidados e culturas celulares tem-se mostrado úteis para responder questões específicas. Dessa forma, nosso estudo teve como objetivo o estabelecimento de culturas celulares de diferentes tecidos de *Biomphalaria tenagophila* Taim, linhagem completamente resistente ao *S. mansoni*. Todos os tecidos selecionados estão suposta ou comprovadamente envolvidos no sistema interno de defesa desses moluscos. As culturas foram mantidas em dois meios distintos e a viabilidade celular foi avaliada nos dois casos. As células cultivadas foram caracterizadas através de microscopia óptica invertida e microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Foram obtidas, com sucesso, culturas celulares em dez dos doze tecidos dissecados a partir da *B. tenagophila*. Sob microscopia ótica, a maioria das células apresentou formato esférico, sem aderência, sem pseudópodes ou filapódios. Através da microscopia eletrônica de transmissão identificamos dez subtipos celulares na cultura do manto e quinze na cultura de porção sacular e tubular do túbulo renal. Nas culturas de glândula digestiva e piloro identificamos seis tipos celulares, além de cinco originadas de glândulas nidamental e prostática, quatro de ovotesti e papo, e três de glândula de albúmen. Em quatro dessas culturas (manto, ovotesti, porção renal e sacular) analisamos a complexidade celular e o perfil de açúcares de membrana através de citometria de fluxo com conjugados lectina-Alexa Fluor 488, em busca de marcadores específicos para tipos celulares. Com exceção de WGA (wheat germ agglutinin), que se ligou a todos os tipos celulares estudados, todas as outras lectinas podem ser consideradas potenciais marcadores de tipos celulares. Estudos mais detalhados estão em andamento visando a seleção das lectinas mais adequadas como marcadores de tipos celulares nesse modelo experimental de culturas celulares de *Biomphalaria*.

ABSTRACT

Schistosoma mansoni, the etiological agent for schistosomiasis in Brazil, has an obligatory passage through *Biomphalaria* snails as intermediate hosts to complete the disease cycle. The mechanisms involved in the interaction mollusk-parasite have not been totally clarified yet and cell culture models appear as potential tools to help clarify specific issues. With that in mind, we devoted our study to develop primary cell cultures from different tissues of *Biomphalaria tenagophila* belonging to Taim strain, which is completely resistant to *S. mansoni* infection. Those tissues were selected based on their known or putative importance to the internal defense system of the mollusk. The cultures were maintained at two different media and cell viability was evaluated for each condition. The cells in culture were characterized by optical inverted and transmission electronic microscopy. Primary cultures from ten out of twelve tissues of *B. tenagophila* were successfully obtained. Most of the cell subsets were round, mostly non-adherent, without pseudopodia or filapodia by optical microscopy. Under electronic microscopy we identified ten cell subsets in mantle culture and fifteen cell subsets in both saccular and tubular kidney sections. In digestive gland and pylorus six different cell subsets could be identified against five cell subsets in nidamental and prostatic gland, four in ovotestis and crop and three in albumen gland. Cell complexity and membrane sugar patterns of four different tissue-derived cultures (mantle, ovotesti, saccular and tubular kidney) were also analyzed by flow cytometry using different Alexa Fluor 488-lectin conjugates looking for subset-specific markers. Besides WGA (wheat germ agglutinin), which was found to bind to all kinds of mollusk cells, all the other lectins tested could be considered potential subset markers. Further studies are in progress to select the most suitable lectin to be used as subset marker in those cell culture-based experimental model for *Biomphalaria*.

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos conhecimentos obtidos nos últimos anos na interação *Biomphalaria/S. mansoni*, essa relação requer maiores estudos em alguns aspectos. A forma de atuação do sistema interno de defesa, como e por que ele elimina o trematódeo em certas linhagens e não em outras, ou quais as estruturas dos hemócitos e como estão envolvidas no reconhecimento do parasita. A compreensão dos diferentes graus de susceptibilidade das espécies do molusco, apresentando diferenças inter e intra-específicas, é um desafio a ser vencido e pode contribuir para o desenvolvimento de método para o controle da esquistossomose.

Culturas celulares de alguns tecidos de caramujos *Biomphalaria* já foram obtidas por Benex e Gantier (1975) que cultivaram a glândula digestiva e o hepato-pâncreas e Benex e Jacobelli (1980) cultivando a região sacular do tubo renal, obtendo uma cultura de hemócitos a partir dessa região. Esses estudos geraram um modelo que foi pouco explorado pelos autores, provavelmente devido às limitações tecnológicas da época em que foram conduzidos.

O cultivo de células da região do APO também foi realizado por Barbosa e cols. (2006b), que obtiveram células capazes de destruir esporocistos transformados *in vitro* (BARBOSA, 2007). Apesar do estabelecimento deste novo modelo, ele ainda não foi completamente explorado e as células de cultivo continuam pouco caracterizadas morfológicamente. Outra forma de obtenção de hemócitos é através da punção da hemolinfa, onde se obtém a população de hemócitos circulantes.

Estudos envolvendo a interação *Biomphalaria/S. mansoni* são, em sua maioria, conduzidos nos caramujos da espécie *B. glabrata*, principal vetor do *S. mansoni*, e cujos experimentos já estão padronizados. Os estudos utilizando cultivo de células, descritos anteriormente, foram desenvolvidos em *Biomphalaria glabrata*. No entanto, a espécie *B. tenagophila*, vem demonstrando importante atuação epidemiológica, e apresenta uma linhagem (*Biomphalaria tenagophila* TAIM) que se mostrou completamente resistente ao *S. mansoni* e está sendo introduzido em áreas de transmissão da esquistossomose visando o controle da doença. É de grande interesse o estudo da interação em um modelo completamente resistente, fenótipo não apresentado por nenhuma linhagem de *Biomphalaria glabrata*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar morfológicamente células em cultura primária a partir de diferentes regiões e tecidos de caramujos *Biomphalaria tenagophila* da linhagem resistente TAIM.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar anatomicamente diferentes regiões e tecidos do corpo do molusco e realizar sua dissecação.
- Estabelecer culturas primárias de células dos tecidos dissecados.
- Acompanhar a viabilidade das células em cultura.
- Caracterizar morfológicamente as células oriundas dos diferentes tecidos dissecados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

A esquistossomose, doença crônica causada por trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma* Weinland, 1858, acomete cerca de 230 milhões de pessoas em todo mundo, a cada ano. É uma doença que já foi notificada em 77 países nas regiões tropical e subtropical, sendo endêmica em 55 países, com 90% dos casos acontecendo na África (OMS, 2012).

Acredita-se que os agentes etiológicos das esquistossomoses tenham chegado às Américas por intermédio de escravos trazidos da África durante o período de colonização e imigrantes asiáticos. Com estes indivíduos, várias espécies de *Schistosoma* foram introduzidas no continente; entretanto, apenas a espécie *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907, encontrou hospedeiros intermediários viáveis, moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910). As demais espécies de *Schistosoma* não encontraram os hospedeiros intermediários para completar o ciclo, estabelecendo-se nas Américas apenas a esquistossomose mansoni, causada pelo *S. mansoni*. No Brasil o gênero *Biomphalaria* é composto por dez espécies e uma subespécie, sendo que apenas três espécies foram encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*. As espécies *Biomphalaria glabrata* (Say, 1918), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835), e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) (COELHO e cols. 2008; CALDEIRA e cols. 2009).

No Brasil, a esquistossomose mansoni, descrita pela primeira vez por Pirajá da Silva em 1908, é endêmica e considerada um grave problema de saúde pública. A prevalência da doença é incerta devido à defasagem de dados; entretanto, pesquisadores de todas as regiões do Brasil estão empenhados na realização do inquérito nacional de prevalência da esquistossomose e geo-helmintoses que fornecerá dados recentes e mais precisos sobre a situação da doença no país (COELHO e cols. 2008).

A doença ocorre principalmente em localidades sem saneamento ou com saneamento básico inadequado. A infecção acontece através da penetração ativa das formas infectantes do *S. mansoni* pela pele e mucosas quando o homem entra em águas contaminadas. O ciclo de transmissão da doença ocorre quando hospedeiros vertebrados infectados, principalmente o homem, excretam os ovos do parasita pelas fezes, que atingem o ambiente aquático dos

caramujos *Biomphalaria*, hospedeiros invertebrados, que liberam as larvas infectantes do *S. mansoni* nas coleções hídricas utilizadas pelos seres humanos (BRASIL, 2008; COELHO e cols. 2008).

O ciclo evolutivo do *S. mansoni* (figura 1) envolve reprodução assexuada, no hospedeiro invertebrado, e reprodução sexuada, no hospedeiro definitivo. O ciclo tem início com a eliminação dos ovos junto com as fezes do hospedeiro definitivo. Quando em contato com a água, os ovos liberam as larvas ciliadas, denominadas miracídeos, que são estimulados por temperatura média de 28 °C, luz intensa e oxigenação da água. As larvas são viáveis para infecção até por um período de até 8 horas após a eclosão. Os miracídeos apresentam movimentação ativa até encontrar um hospedeiro invertebrado suscetível, molusco do gênero *Biomphalaria*, e penetram em qualquer parte de um tecido exposto, com maior preferência pela base da antena e pés (COELHO e cols. 2008).

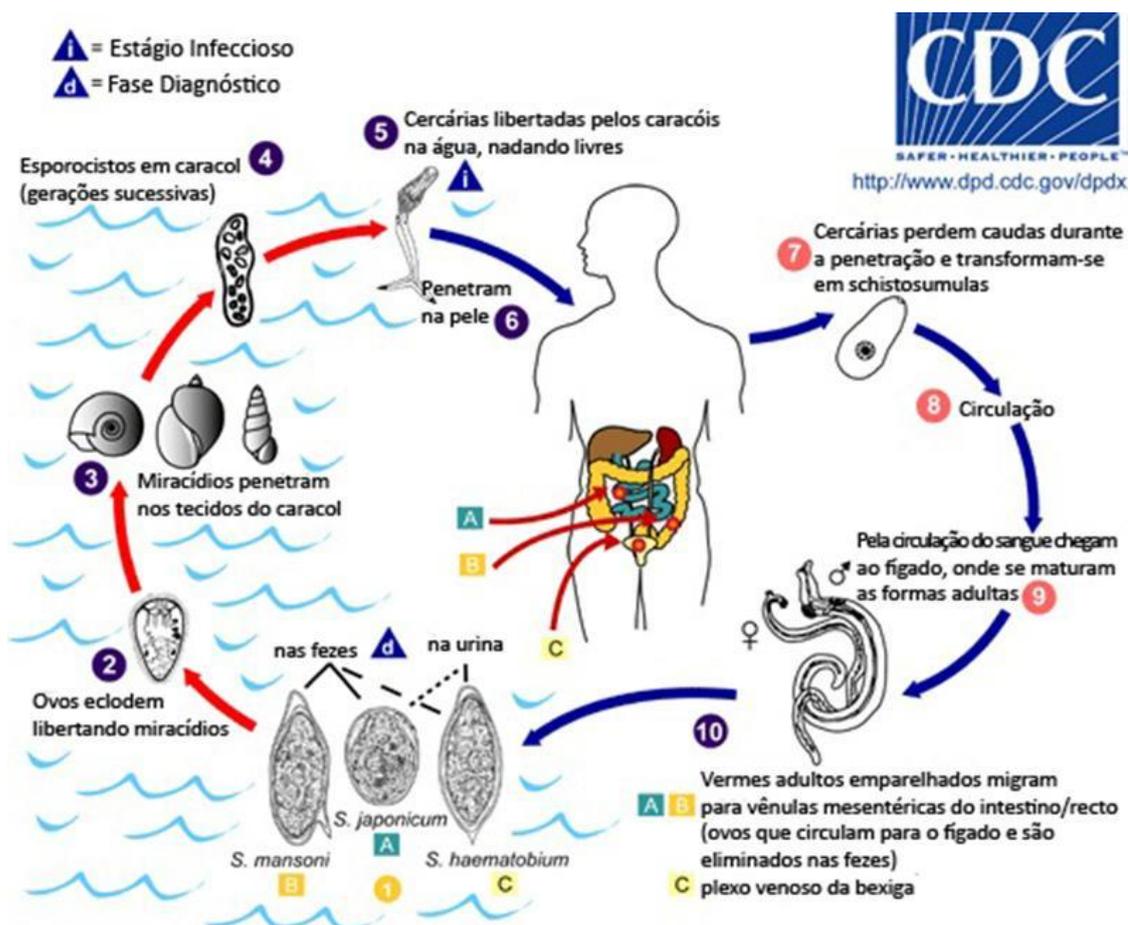


Figura 1: Ciclo evolutivo das espécies de *Schistosoma*.

A: *Schistosoma japonicum*; B: *Schistosoma mansoni*; C: *Schistosoma haematobium*; FONTE: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>.

Os miracídios, após a penetração, transformam-se em esporocistos primários, promovendo o desenvolvimento de células germinativas, ainda na região cefalopodal. Após 14 dias da penetração as células germinativas dos esporocistos primários geram os esporocistos secundários. No 18º dia após a penetração, os esporocistos secundários migram para os espaços intertubulares da glândula digestiva, em um processo que dura cerca de três dias, onde sofrem modificações que completam seu desenvolvimento e possibilitam que suas células germinativas originem as cercárias. A completa transformação em cercárias e sua liberação para o meio aquático ocorrem no período entre o 27º e 30º dia após a penetração, nas condições de luminosidade e temperatura adequada (28°C). Cada miracídio pode gerar de 100 a 300 mil cercárias (COELHO e cols. 2008).

As cercárias nadam ativamente no ambiente aquático até encontrarem um hospedeiro vertebrado suscetível, penetrando através da pele e mucosa exposta. Nesse processo de infecção as cercárias perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos. Os esquistossômulos migram pelo tecido subcutâneo, entrando num vaso sanguíneo, sendo passivamente levados para os pulmões. Dos pulmões eles se dirigem para o sistema porta hepático onde se alimentam e originam fêmeas e machos adultos em 25-28 dias de infecção. Os vermes se acasalam e migram contra o fluxo circulatório para a veia mesentérica inferior, onde farão a ovoposição, por volta do 35º dia de infecção. Cada fêmea produz cerca de 400 ovos, sendo que 50% destes atingem o meio externo após passarem por um período de maturação que leva em torno de uma semana, sendo eliminados a partir de 40 dias de infecção. Durante o processo de maturação os ovos saem da mucosa para a luz intestinal. Há a possibilidade dos ovos ficarem retidos na mucosa ou serem carregados para o fígado, ou outros órgãos, ocasionando a morte do miracídio, e também estimulando reações granulomatosas no hospedeiro, sendo tais reações importantes para a patogenia da esquistossomose mansoni (COELHO e cols. 2008).

A doença clínica pode ser classificada em duas fases principais: a fase inicial aguda, dermatite cercariana e esquistossomose aguda, e fase crônica, intestinal hepatointestinal e hepatoesplênica. Na forma hepatoesplênica pode ocorrer rompimento de varizes esofagianas, que resultam muitas vezes em óbito do paciente. Com menos frequência podem aparecer complicações e outras formas da doença, como as formas neurológicas, que apresentam grande prejuízo para o paciente podendo gerar invalidez e até mesmo o óbito. Muitas das mortes por esquistossomose podem estar relacionadas às manifestações neurológicas, porém

não há nenhum dado preciso de sua importância, uma vez que as complicações não são de notificação obrigatória (DRUMMOND e cols. 2006; COELHO e cols. 2008).

Devido aos sintomas inespecíficos e inconstantes da esquistossomose mansoni, o diagnóstico só pode ser confirmado com a presença de ovos eliminados nas fezes ou por biópsia retal dos pacientes. Os métodos imunológicos baseados na pesquisa de anticorpos específicos ainda não permitem certeza quanto à especificidade da doença. Pode haver reações cruzadas com outros helmintos e não fornece o diagnóstico de cura parasitológica, uma vez que os pacientes continuam com resposta imunológica após cura quimioterápica. Novos métodos como a PCR e a pesquisa por anticorpos circulantes se apresentam como promissores (COELHO e cols. 2008; OMS, 2012).

O praziquantel é atualmente o medicamento indicado para o tratamento da doença, sendo efetivo para todas as formas de esquistossomose, seguro e de baixo custo. Entretanto a cura parasitológica não resulta em resistência dos pacientes contra uma nova infecção, apesar de diminuir as chances desta evoluir para as formas mais graves da doença. O praziquantel tem sido usado para o controle da esquistossomose há mais de 20 anos em países como Arábia Saudita, Brasil, Camboja, China, Egito e Marrocos (OMS, 2012).

A prevenção e controle da esquistossomose baseiam-se no tratamento das pessoas infectadas em áreas endêmicas, controle dos vetores, melhoramento das condições de saneamento básico e educação em saúde (OMS, 2012).

3.2 INTERAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO INVERTEBRADO

A obrigatoriedade do parasitismo do caramujo dentro do ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* faz do hospedeiro invertebrado um elemento indispensável para a ocorrência da transmissão. Este constitui um importante alvo da pesquisa biomédica, onde estudos envolvendo a taxonomia, genética, distribuição, ecologia e a interação entre parasita e hospedeiro invertebrado, podem auxiliar na busca de uma alternativa do controle da doença tendo como alvo os caramujos transmissores (BRASIL, 2008; BAYNE, 2009).

Os moluscos apresentam grande capacidade de defesa contra potenciais patógenos, devido à versatilidade tanto para detecção quanto destruição de micróbios por parte do seu

sistema interno de defesa. A resposta dos moluscos a patógenos é realizada por um sistema de defesa diferente dos mamíferos, pois atuam somente hemócitos fagocitários em cooperação com componentes humorais solúveis na hemolinfa. Não se pode afirmar que o sistema interno de defesa seja formado apenas de componentes constitutivos, uma vez que, a entrada de patógenos nos moluscos desencadeia uma série de respostas. Antes de entrar em contato com um hemócito, o patógeno desencadeia reações que mudam o comportamento do sistema de defesa do molusco, desde a marcação por opsoninas para facilitar a fagocitose, alterações no perfil de transcrição de proteínas, até o comportamento de migração, degranulação, encapsulamento promovido pelas células de defesa. Todas essas alterações constituem um repertório de vias orquestradas por esse sistema imune inato, o que permite concluir que na relação *Biomphalaria/S. mansoni* a resistência seria uma ocorrência normal e a susceptibilidade uma exceção (BAYNE, 2009).

Na relação entre parasita e hospedeiro (*S. mansoni/Biomphalaria*) considera-se como insucesso da infecção toda vez que o sistema de defesa do caramujo consegue evitar o estabelecimento e desenvolvimento do parasita, também chamado de resistência, enquanto o sucesso da infecção é devido à ineficácia das defesas do molusco em deter o desenvolvimento do parasita, também considerada como susceptibilidade (THÉRON e COUSTAU, 2005). Fatores fisiológicos do hospedeiro invertebrado e parasito também influenciam na infecção. Essa relação pode estar acompanhada de uma adaptação entre parasita e hospedeiro, como demonstrado por Paraense e Corrêa, em 1963, onde linhagens de *S. mansoni* isoladas em *B. glabrata* de Minas Gerais foram incapazes de infectar caramujos *B. tenagophila* em São Paulo, e sendo o oposto também verdadeiro. As linhagens de parasitas estariam mais adaptadas a infectar caramujos de suas próprias regiões, independente de uma espécie ser mais suscetível do que outra (PARAENSE e CORREA, 1963a; PARAENSE e CORREA, 1963b).

Caramujos susceptíveis à infecção por *S. mansoni* podem, eventualmente, apresentar esporocistos mortos por seu sistema de defesa e esporocistos viáveis, em um mesmo espécime. Naturalmente, a infecção pode variar desde a destruição rápida do esporocisto, momentos após penetrar no molusco, até o desenvolvimento completo e a liberação de cercárias. Esse fato ocorre provavelmente porque há um padrão individual de compatibilidade entre parasita e hospedeiro, tendo em vista que há uma grande variedade genética de ambos os seres envolvidos, sendo o sucesso ou insucesso da infecção determinada pelo status de

compatibilidade fenotípica entre molusco e trematódeo (THÉRON e COUSTAU, 2005; BAYNE, 2009).

Experimentos envolvendo características fenotípicas dos moluscos, idade e tamanho, demonstraram que esses fatores podem influenciar na infecção pelo *S. mansoni*. A infecção de moluscos em diferentes estádios de vida e portando diferentes tamanhos de concha, apontou que moluscos juvenis e sub-adultos são mais vulneráveis à infecção pelo trematódeo do que moluscos adultos maduros. No entanto essa regra não é absoluta na relação *Biomphalaria/S. mansoni* havendo exceções considerando-se todas as diferentes cepas e linhagens geográficas tanto do parasito quanto do hospedeiro invertebrado (FERNANDEZ, 2007).

Das espécies vetoras da esquistossomose mansoni no Brasil, considera-se *B. glabrata* como a mais suscetível, capaz de liberar mais cercarias após infecção, sendo apontada como a de maior importância epidemiológica, além de ser a espécie modelo para estudos da interação parasito/hospedeiro invertebrado. Outra espécie com grande potencial de transmissão é a *B. tenagophila*, que apresenta grande importância na transmissão da esquistossomose nas regiões Sul e Sudeste. Um fator interessante estudado em *B. tenagophila* é o seu variado grau de susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, podendo variar, conforme sua localização geográfica, desde parcialmente suscetível até completamente resistente, como a linhagem *B. tenagophila* TAIM. O caráter de resistência dessa linhagem já foi demonstrado ser dominante sobre a susceptibilidade, além de esta linhagem apresentar um marcador molecular único, quando comparado com outras espécies, evidenciando o potencial da utilização dessa linhagem no controle biológico da esquistossomose, sendo possível rastrear seu material genético após introdução no campo (COELHO, 1995; VIDIGAL e cols. 2000; ROSA e cols. 2004; ROSA e cols. 2005; FERNANDEZ, 2007; COELHO e cols. 2008a; COELHO e cols. 2008b).

Análises comparativas dos perfis diferenciais de expressão de genes de linhagens de *Biomphalaria*, expostos e não-expostos ao *S. mansoni*, demonstraram grande potencial para desvendar possíveis mistérios ainda não esclarecidos a respeito da susceptibilidade do molusco ao trematódeo. A expressão de diversos genes é potencializada após a estimulação de hemócitos com antígenos do parasita, em linhagens resistentes ao *S. mansoni*, sendo que o mesmo não ocorre nos moluscos susceptíveis. Alguns desses genes foram observados, dentro de uma mesma linhagem de caramujos, em alta-expressão em adultos resistentes e não-

expressos nos juvenis e sub-adultos susceptíveis. Entretanto, tais estudos ainda são preliminares e meramente especulativos, uma vez que o conhecimento do perfil de expressão de um gene não implica em desvendar completamente sua função e sua importância para a relação *Biomphalaria/S. mansoni* (RAGHAVAN e cols. 2003; LOCKYER e cols. 2008).

3.3 SISTEMA INTERNO DE DEFESA DE *Biomphalaria*

O sistema interno de defesa dos moluscos, como descrito anteriormente, é constituído por componentes humorais solúveis na hemolinfa e componentes celulares, com notória importância para os hemócitos. Levando-se em consideração todos os mecanismos envolvidos na relação parasito-hospedeiro, um cenário mais realístico para a parasitose do hospedeiro invertebrado deve considerar a capacidade do sistema interno de defesa em reconhecer e destruir o invasor, assim como, em contrapartida, as ações evasivas do parasita e sua capacidade de autodefesa contra o ataque deste sistema (BAYNE, 2009).

A compatibilidade entre trematódeo e molusco envolve vários mecanismos que regulam a intensidade de infecção e o grau de susceptibilidade, dependente da diversidade genética entre molusco e parasita. Mecanismos imunológicos do hospedeiro, componentes celulares e humorais, estão habilitados a reconhecer e diferenciar moléculas próprias de moléculas não próprias. Entretanto, o parasita possui uma série de mecanismos de evasão como o mascaramento e mimetismo das moléculas do molusco, sendo suas moléculas reconhecidas como próprias pelo sistema de defesa do hospedeiro, que não responde à infecção. O parasita também pode interferir no sistema interno de defesa do molusco excretando moléculas capazes de inibir a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (VAN DER KNAAP e LOKER, 1990; FERNANDEZ, 2007).

Durante o processo de infecção do molusco, alguns fatores solúveis na hemolinfa apresentam-se em maior expressão, como no caso da família de proteínas relacionadas com fibrinogênio (FREPs), um grupo de lectinas, não ligadas a membranas. Essas moléculas são capazes de promover a precipitação de antígenos do parasita ao ligar-se a estes e a açúcares da superfície do trematódeo. Outra característica dessas moléculas é a presença de até 2 domínios tipo-imunoglobulina, que apresentam grande diversidade. Atribui-se às FREPs um papel importante no reconhecimento do parasita; entretanto, sua presença não assegura a condição de resistência (ADEMA e cols. 1997; LÉONARD e cols. 2001; ZHANG e cols.

2001; ZHANG e LOKER, 2003; ZHANG e LOKER, 2004; HERTEL e cols. 2005; ZHANG e cols. 2008a; ZHANG e cols. 2008b; BAYNE, 2009; HANINGTON e cols. 2010).

Uma vez que o parasita seja reconhecido pelo sistema interno de defesa do molusco há uma série de reações e alterações no perfil de expressão de genes, principalmente nos hemócitos, que atuam como principais efetores da destruição do esporocisto. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (NOS) são produzidas pelos hemócitos, no evento conhecido como explosão respiratória leucocitária, presente em diversos organismos através do espectro evolucionário (DIKKEBOOM e cols. 1988; BOEMHLER e cols. 1996; HAHN e cols. 2000; HAHN e cols. 2001a; HAHN e cols. 2001b; BAYNE, 2009).

Através do transcriptoma de *Biomphalaria glabrata* foram identificados genes super-expressos em caramujos resistentes, infectados com *Schistosoma mansoni*, relacionados às vias de estresse oxidativo, sendo a enzima superóxido dismutase o gene mais expresso nos tegumentos adjacentes ao parasita. Apesar de ser prematuro apontar que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por si só, sejam suficientes para matar o esporocisto, é notável sua participação, atuando até mesmo como um mediador celular que potencializa os efeitos danosos da explosão respiratória no parasita. É interessante ressaltar a identificação de genes envolvidos em mecanismos de proteção contra a ação danosa dessas espécies reativas, em um mecanismo que visa proteger a célula do hospedeiro dos danos causados pela explosão respiratória (DIKKEBOOM e cols. 1988; BOEMHLER e cols. 1996; HAHN, 2000; HAHN, 2001a; HAHN, 2001b; LOCKYER e cols., 2008; BAYNE, 2009).

Os fatores da hemolinfa são incapazes de destruir os esporocistos sem a participação dos hemócitos, células circulantes que são os principais efetores da destruição do parasita pelo sistema interno de defesa do molusco, sendo capazes de migrar livremente de dentro para fora dos tecidos. Os hemócitos são capazes de realizar fagocitose e encapsulamento de patógenos, além de promover o fenômeno de explosão respiratória. Apesar da importância dos hemócitos, não se deve subestimar a importância dos fatores solúveis da hemolinfa, cujos fatores auxiliam a atuação dos hemócitos. Estudos realizados com caramujos resistentes e susceptíveis demonstraram que é possível aumentar a resistência de um caramujo suscetível contra *S. mansoni* apenas com a transferência da hemolinfa de caramujos resistentes (BAYNE e cols. 1980a; BAYNE e cols. 1980b; JEONG e cols. 1983; GRANATH e YOSHINO, 1984; VAN DER KNAAP e LOKER, 1990; FRYER e BAYNE, 1996; BAYNE, 2009).

As características morfológicas e bioquímicas dos hemócitos circulantes na hemolinfa do molusco permitem a classificação dessas células em mais de um tipo. Alguns autores sugerem sua classificação em duas populações distintas, a saber, hialinócitos e granulócitos. Os hialinócitos correspondem a 10% dos hemócitos circulantes, são células esféricas e pequenas com um grande núcleo circundado por uma fina camada de citoplasma, não apresentando pseudópodes ou filapódios. Seu citoplasma é rico em ribossomos e mitocôndrias, apresentando um retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido e pequena quantidade de lisossomos. Os granulócitos, que representam 90% dos hemócitos circulantes, são células maiores e polimórficas, com rápida adesão a superfícies devido à alta capacidade de emitir pseudópodes. Apresentam citoplasma grande, contendo grânulos basofílicos, complexo de Golgi bem desenvolvido, densos aglomerados de lisossomos e mitocôndrias, com grande presença da enzima fosfatase ácida (HARRIS, 1975; LOVERDE e cols. 1982; BARRACCO e cols. 1993; BEZERRA e cols. 1997; JOHNSTON e YOSHINO, 2001; MARTINS-SOUZA e cols. 2003).

Baseando-se no tamanho, outros estudos classificaram as populações de hemócitos em 3 subpopulações, pequenos, médios e grandes. Estudos mais recentes, utilizando citometria de fluxo, confirmaram tal classificação, além de apresentar uma pequena diferença nas populações de hemócitos de *B. glabrata* cuja maioria é composta por células menores e com menos grânulos se comparadas com a maioria dos hemócitos de *B. tenagophila* (MATRICON-GONDRAN e LETORCART, 1999; MARTINS-SOUZA e cols. 2009).

Através da microscopia óptica (figura 2) e microscopia eletrônica de transmissão (figura 3), Cavalcanti e cols. (2011), propõem uma nova classificação para os hemócitos circulantes em 5 tipos diferenciados. São eles células tipo blásticas, granulócitos e hialinócitos tipos I, II e III. Seus resultados apontaram a capacidade de emissão de filapódios e adesão de células hialinócitos tipo I, contrariando o que se pensava até então de apenas os granulócitos serem capazes de emitir filapódios.

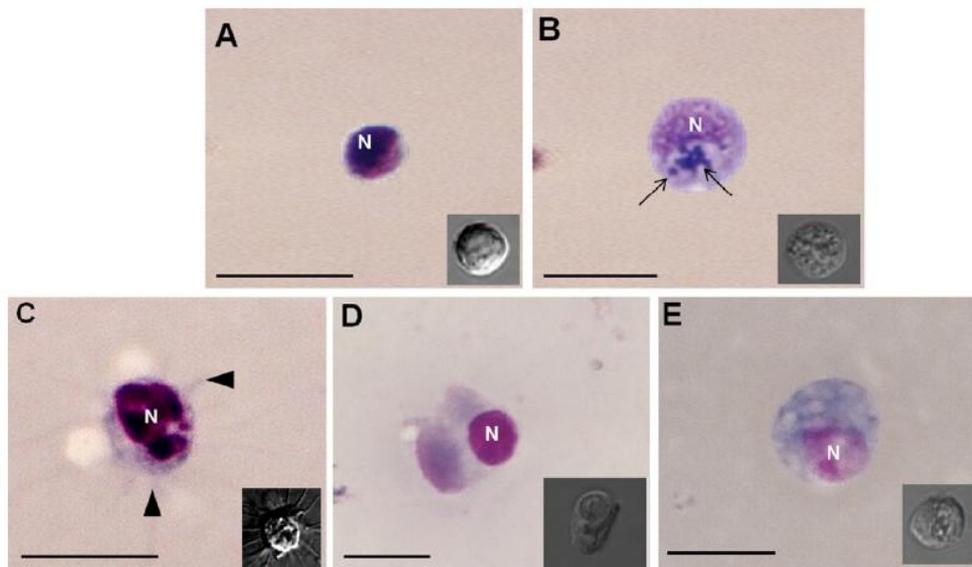


Figura 2: Hemócitos de *B. glabrata* em microscopia óptica e interface de contraste diferencial.

A. Células tipo blásticas com grande núcleo (N) ocupando quase toda a célula; **B.** Granulócito com vários grânulos (setas finas); **C.** Hialinócito tipo I, com formas que podem variar de redondas ou espinadas; **D.** Hialinócito tipo II e **E.** Hialinócito tipo III, células com formato oval. FONTE: CAVALCANTI e cols. 2011.

Hemocytes of *B. glabrata* (TEM)

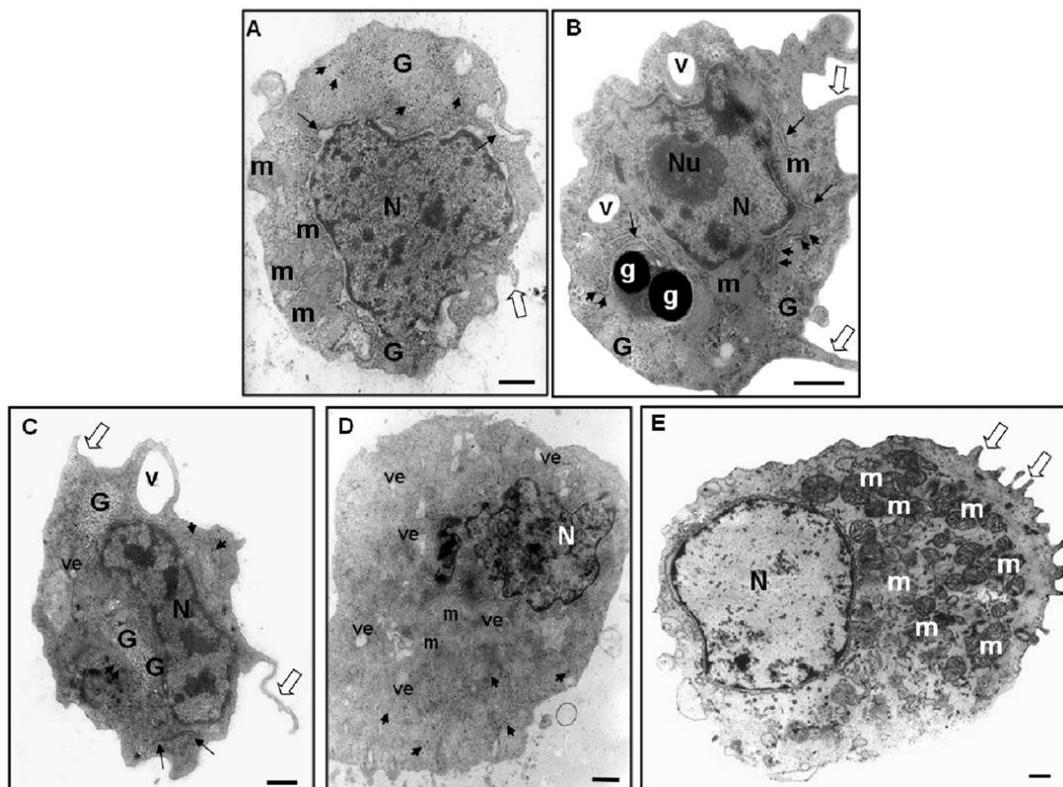


Figura 3: Microscopia eletrônica de transmissão de hemócitos de *B. glabrata*.

(A) célula tipo blástica apresentando perfil esférico e alta relação núcleo/células com um núcleo central de grande porte (N), citoplasma fino com ilhas de glicogênio (G) e ribossomos

dispersos (cabeça de seta). Mitocôndrias (m) e filopódios (seta aberta) também estão indicados. (B) Granulócitos apresentando perfil circular para fusiforme; essas células são polimórficas e apresentam grânulos (g). A membrana plasmática é irregular exibindo pseudópodes e filopódios (seta aberta), e nas células também foram observados: nucléolo proeminente (Nu), vacúolos (V), mitocôndrias (m), ilhas de glicogênio (G) e retículo endoplasmático rugoso (setas). (C) Hialinócitos tipo I apresentando superfície da membrana irregular, com filopódios (seta aberta) e núcleo polimórfico (N). Foram observados no citoplasma: vesículas (ve), vacúolos (V), as ilhas de glicogênio (G) e retículo endoplasmático rugoso (seta). (D) Hialinócitos Tipo II, caracterizado por ter um núcleo excêntrico (N), nenhum nucléolo proeminente, citoplasma com várias vesículas (VE), ribossomos dispersos (cabeça de seta) e mitocôndrias (m). (E) Hialinócitos tipo III apresentando perfil oval e grande núcleo (N). Citoplasma com muitas mitocôndrias (m) e filopódios (seta aberta) eletrodensos. Barras = 1 μ m. FONTE: CAVALCANTI e cols. 2011.

Outra classificação para as populações de hemócitos também já tinha sido proposta por Sminia (1983) revelando que as células do sistema de defesa dos moluscos provinham de um único tipo celular, sendo seu polimorfismo uma característica da diferenciação deste tipo celular. De acordo com o autor, conforme vai amadurecendo, a célula ganha capacidade de emissão de pseudópodes, desenvolve o complexo de Golgi e aumenta o número de lisossomos; entretanto, ela perde a capacidade mitótica.

Van der Knaap e Loker (1990) apontaram que o sistema interno de defesa dos caramujos era composto por quatro tipos celulares, sendo três tipos de células fixas em tecidos e um tipo de célula circulante. Borges e colaboradores (2006) demonstraram que hemócitos da hemolinfa e dos tecidos reagem, de forma independente, a partir de diferentes estímulos à infecção do *S. mansoni*, além de encontrar hemócitos com diferentes padrões bioquímicos, o que, segundo os autores, pode indicar células em diferentes estágios de atividade funcional.

A capacidade de lectinas (ConA, SBA, WGA, PNA, dentre outras) se ligarem à superfície do *S. mansoni* demonstrou um potencial para entendimento dos mecanismos de reconhecimento do parasito pelos hemócitos. Estudos revelaram que os hemócitos apresentam diferentes lectinas na superfície e respondem de forma diferente à infecção pelo *S. mansoni* em diferentes linhagens e espécies de *Biomphalaria*, sem, no entanto poder distinguir um padrão de lectinas que seja determinante na resistência ou susceptibilidade do hospedeiro invertebrado ao trematódeo (MARTINS-SOUZA e cols. 2003; MARTINS-SOUZA e cols. 2006;)

Apesar dos inúmeros estudos apresentados e desenvolvidos nos últimos anos a respeito do sistema interno de defesa dos moluscos, especialmente no gênero *Biomphalaria*, algumas questões continuam contraditórias e pouco exploradas.

3.4 A PRODUÇÃO DE HEMÓCITOS EM *Biomphalaria*

Os hemócitos de *Biomphalaria* parecem ser originados de forma multicêntrica a partir de uma camada endotelial de células que ocupam os espaços vasculares ao longo de todo o corpo do caramujo. A anatomia desses moluscos está representada pelo desenho na figura 4. Infiltrados e aglomerados de hemócitos já foram descritos em órgãos como ovotesti, glândula digestiva e tecido renal, de moluscos infectados. A cavidade do coração é outro local onde já foram encontrados aglomerados de hemócitos, mesmo em caramujos não infectados. A ausência de uma ‘leucocitose’, ou aumento significativo de hemócitos circulantes na hemolinfa dos caramujos infectados, durante a infecção, sustenta tal teoria, pois sendo produzidos em múltiplos centros, não haveria necessidade de distribuição dos mesmos pela hemolinfa (PAN, 1958; PAN, 1963; AZEVEDO e cols. 2006; BORGES e cols. 2006; SOUZA e ANDRADE, 2006).

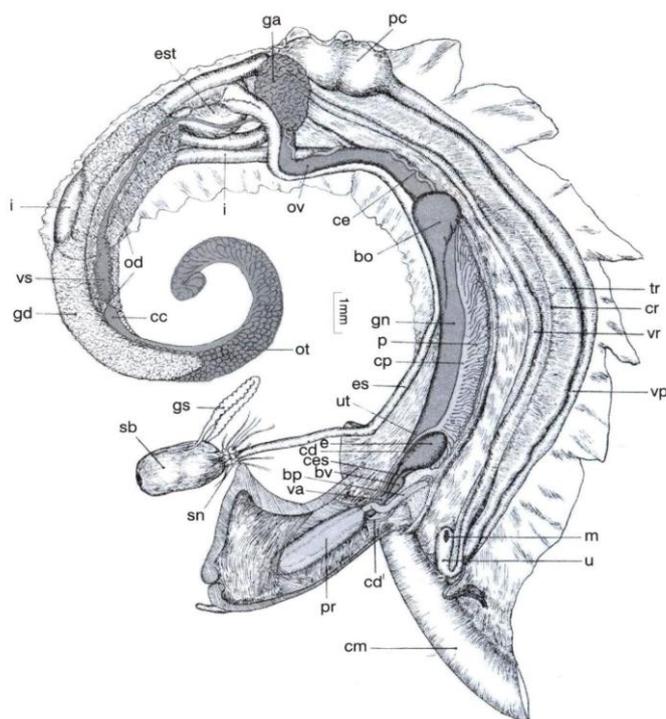


Figura 4: Dissecção parcial pelo lado direito de caramujo *Biomphalaria glabrata*.

bo – bolsa do oviduto; bp – bainha do pênis; bv – bolsa vaginal; cc – canal coletor do ovotesti; cd, cd' – canal deferente; ce – canal espermático; ces – canal da espermateca; cm – colar do manto; cp – canal prostático; cr – crista renal; e – espermateca; es – esôfago; est –

estômago; ga – glândula de albume; gd – glândula digestiva (hepatopâncreas); gn – glândula nidamental; i – intestino; m – meato do ureter; od – ovispermiduto; ot – ovotestí; p – próstata; pc – pericárdio; pr – prepúcio; sb – saco bucal; sn – sistema nervoso central; tr – tubo renal; u – ureter; ut – útero; va – vagina; vp – veia pulmonar; vr – veia renal; vs vesícula seminal. FONTE: PARAENSE, 2008.

Pan, em 1958, sugeriu, após detalhado estudo anatômico e histológico, alguns locais para a formação dos hemócitos em *B. glabrata*. Um dos principais locais de produção de hemócitos seria a partir de células presentes nos seios venosos, presentes ao longo de todo corpo do caramujo, que se diferenciariam em hemócitos quando houvesse estímulo adequado. As células localizadas na parede da região sacular do tubo renal, que compõem parte do saco pericárdico, foram descritas em seus estudos como oriundas de um tecido primitivo, com provável origem mesenquimal, sendo a região comparada com a medula dos linfonodos dos vertebrados, devido à sua aparência. Além desses dois locais já citados, Pan destaca em seus estudos que células do tipo fibroblasto, encontradas em diversas regiões e tecidos dos moluscos estudados, tem a capacidade de diferenciação em hemócitos quando devidamente estimuladas (PAN, 1958).

Explorando a hipótese da origem multicêntrica de hemócitos, alguns trabalhos visualizaram no modelo de cultura de células e tecidos uma oportunidade de obter *in vitro*, células capazes de se diferenciar em hemócitos, ou até mesmo obter culturas de hemócitos diretamente de tecidos. Além de aprimorar os estudos sobre a origem e função de hemócitos, estes estudos buscaram estabelecer ferramentas para auxiliar a compreensão dos processos e da interação parasito-hospedeiro invertebrado. Dentre os vários órgãos utilizados estão a glândula digestiva, o manto, o ovotestí (figura 5), o coração e a parede da região sacular do tubo renal, sendo obtidos hemócitos a partir da cultura de células desse último tecido, *in vitro*. (BENEX e GANTIER, 1975; BAYNE e cols. 1975; BENEX e JACOBELLI, 1980; IWANAGA, 2002).

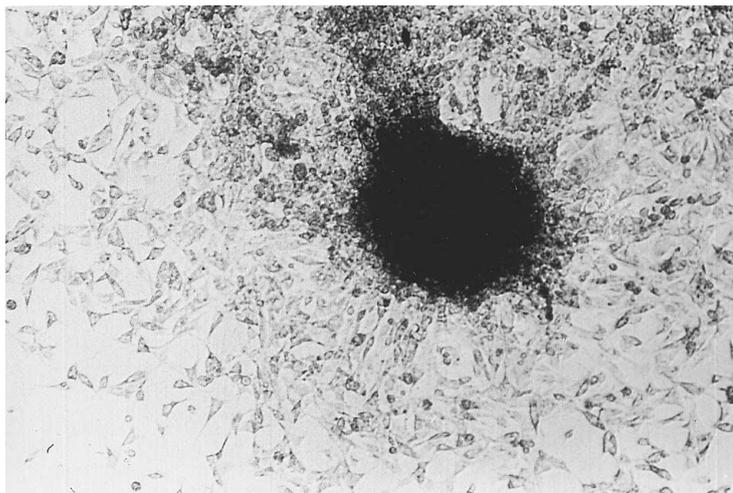


Figura 5: Cultura ovotesti.

Células epiteliais e tipo fibroblásticas migradas a partir da cultura de tecido da glândula ovotesti. FONTE: IWANAGA, 2002.

Dentre as possíveis regiões produtoras de hemócitos, a região reno - pericárdica vem sendo amplamente estudada por vários autores. Em 1975, Lie e colaboradores, divulgam em resultados obtidos através de estudos empregando caramujos *B. glabrata*, saudáveis e infectados com *Echinostoma lindoense*, *E. paraensei* e *E. liei*, um órgão que se apresenta em hiperplasia nos caramujos infectados. Este órgão, não descrito nos trabalhos de Pan de 1958 ou 1963, localizado entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto, apareceu como um dos responsáveis pela produção de hemócitos em larga escala, sob condições patológicas. Entre este órgão e a parede da região sacular do tubo renal encontra-se o coração (figura 6). Assim sendo, os autores consideraram esta região como um novo local para a produção de hemócitos, diferente da descrita por Pan, sendo posteriormente nomeada de Órgão Produtor de Amebócitos (hemócitos) ou APO – do inglês “Amebocyte Producing Organ”. O APO é uma fina camada de células, onde as reações mitóticas são muito ínfimas ou ausentes, em caramujos não infectados (SMINIA, 1974; LIE e cols. 1975; JEONG e cols. 1983; SULLIVAN e SPENCE, 1994; SULLIVAN e SPENCE, 1999; BARBOSA e cols. 2006a; BARBOSA e cols. 2006b; SOUZA e ANDRADE, 2006; VASQUEZ e SULLIVAN, 2001a; VASQUEZ e SULLIVAN, 2001b).



Figura 6: Órgão produtor de hemócitos (APO).

Secções da porção aumentada do órgão produtor de amebócitos de um caramujo *B. glabrata* infectado e re-infectado com uma mesma espécie de *Echinostoma*. Abreviações: a. átrio, c. veia cava, e. esôfago, i. pro - intestino, m. cavidade do manto, p. saco pericárdico, s. porção sacular do tubo renal, v. ventrículo. As setas indicam o APO. FONTE: LIE e cols. 1975.

Em estudos de transferência da resistência ao *S. mansoni*, entre caramujos resistentes e susceptíveis, foram utilizados vários tecidos para o transplante. O primeiro tecido transplantado foi a hemolinfa bruta, apenas porção solúvel e apenas porção celular. Em todos os casos foi possível transferir parte da resistência para caramujos susceptíveis. O transplante de outros tecidos do caramujo com ligação direta ou indireta na produção das células de defesa também foi realizado, no entanto apenas o transplante do APO obteve sucesso na transferência da resistência. O APO é uma estrutura microscópica, de difícil dissecação, inclusive para a rotina de secção serial, sendo complicado afirmar que o transplante deste órgão não implica no transplante do tecido endotelial vascular, ou de tecidos adjacentes localizados na região Reno - pericárdica. Apesar das dificuldades e do tamanho reduzido do órgão, os resultados com os transplantes contribuíram para o fortalecimento de um postulado unicêntrico para a origem dos hemócitos, baseado no APO, tido como o correspondente do molusco à medula óssea dos vertebrados (SMINIA, 1974; BAYNE e cols. 1980; LOKER e BAYNE, 1982; JEONG e cols. 1983; GRANATH e YOSHINO, 1984; SULLIVAN e SPENCE, 1994; SULLIVAN e SPENCE, 1999; VASQUEZ e SULLIVAN, 2001a;

VASQUEZ e SULLIVAN, 2001b; BARBOSA e cols. 2006a; BARBOSA e cols. 2006b; SOUZA e ANDRADE, 2006).

Vários estudos foram conduzidos para verificar a capacidade mitótica das células do órgão APO, tido como principal produtor de hemócitos no gênero *Biomphalaria*. Ensaios *in vitro* envolvendo a cultura do órgão hematopoiético em meio salino apontaram para o aumento do número de células do órgão em resposta a antígenos de *S. mansoni*, evidenciando um potencial mitótico das células do APO sob determinados estímulos (SULLIVAN e cols. 2004; SULLIVAN e CASTRO, 2005; SULLIVAN, 2007; SALAMAT e SULLIVAN, 2008; SALAMAT e SULLIVAN, 2009).

Entretanto, apesar dos resultados obtidos nos estudos envolvendo o APO, a participação e centralização da produção de hemócitos nesse órgão vêm sendo amplamente discutida e contestada pela comunidade científica. Muito se discute sobre a capacidade de um órgão, constituído por uma fina camada de células com características epiteliais, incluindo a presença de desmossomos, em produzir células de defesa que seriam distribuídas por todo o corpo do molusco. Achados histológicos apontam que em caramujos infectados, há presença de aglomerados de hemócitos em tecidos como a glândula digestiva e o ovotesti, anatomicamente distantes do APO, sem a certeza do aumento do número de hemócitos circulantes na hemolinfa (AZEVEDO e cols. 2006; BORGES e cols. 2006; SOUZA e ANDRADE, 2006; SILVA e cols. 2007).

Barbosa e colaboradores, em 2006b, realizaram a cultura primária de células retiradas da região do APO. Neste estudo, foram identificados três tipos celulares (figura 7), sendo mais predominante um tipo celular que apresentou núcleo grande e citoplasma delgado, descrição próxima a um hialinócito. Um segundo tipo celular, de núcleo menor e citoplasma largo, era encontrado em menor quantidade na cultura, porém era a forma predominante na hemolinfa. O terceiro tipo celular apresentava núcleo pouco visível, sendo especulado que esses três tipos poderiam ser derivados de um único tipo celular em diferentes estádios de desenvolvimento celular. De acordo com os autores, as células do APO migraram livremente em cultura, sem o emprego de tripsina. Em estudos posteriores a cultura de células da região do APO, de caramujos resistentes a infecção por *S. mansoni*, foi capaz de imobilizar e matar esporocistos primários *in vitro* (BARBOSA e cols. 2006b; BARBOSA 2007).

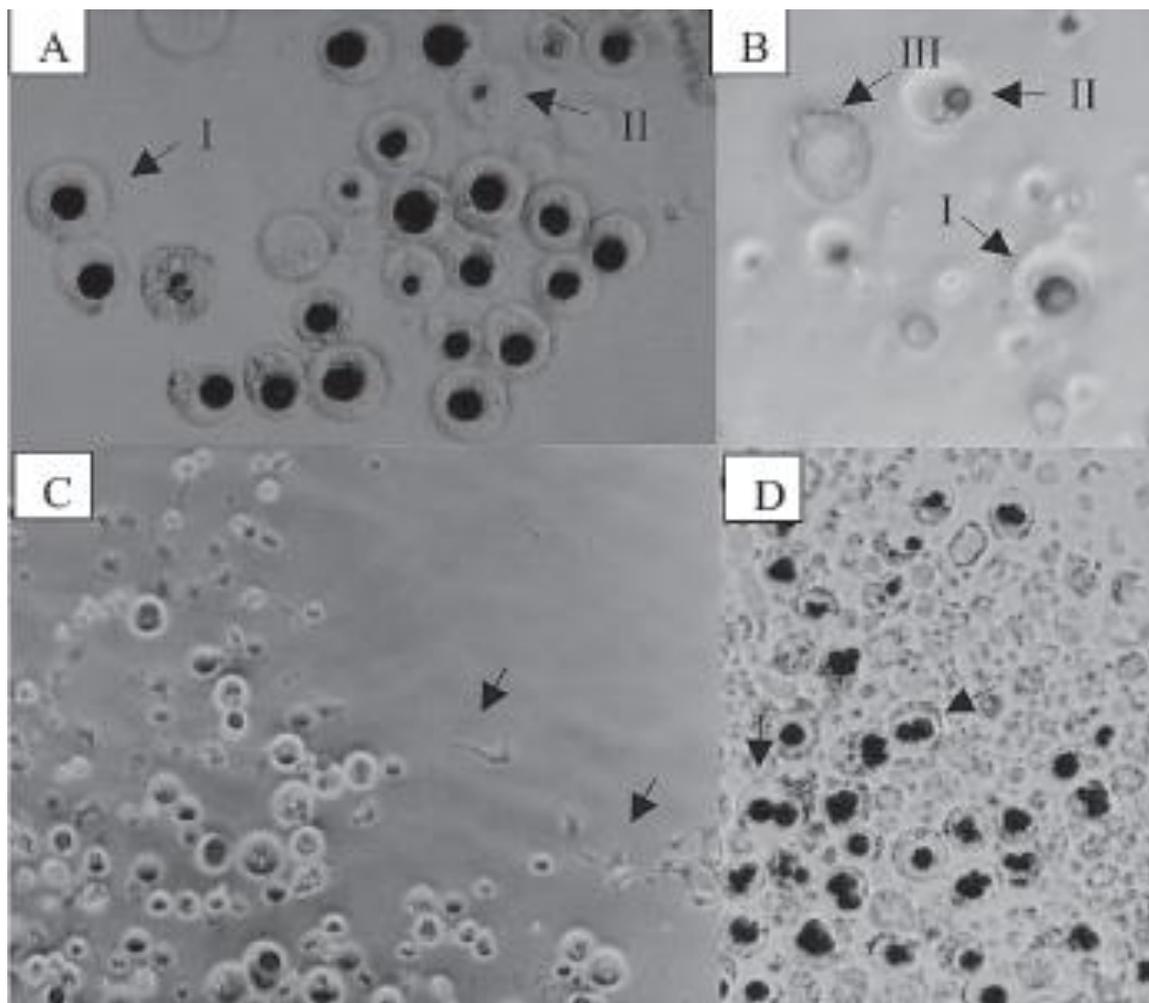


Figura 7: Cultura primária de células da região do APO de *B. glabrata*.

A: células do tipo I e II com predominância do primeiro. **B:** células tipo I, II e III. **C:** pseudópodes emitidos pelas células. **D:** células binucleadas. Aumento: 200x. FONTE: BARBOSA e cols. 2006b.

Fazem-se necessários estudos mais profundos, utilizando diferentes metodologias e aprofundando modelos ainda pouco explorados, para avaliar a real contribuição das possíveis regiões hematopoiéticas dos moluscos na produção de hemócitos.

4 METODOLOGIA

4.1 MANUTENÇÃO DE CARAMUJOS *Biomphalaria tenagophila* NO LABORATÓRIO

Os caramujos *Biomphalaria tenagophila* da linhagem TAIM, utilizados durante os experimentos, são produzidos Sítio Santa Inês, no município de Bananal em São Paulo, em instalações adaptadas para esse fim. Os moluscos foram enviados diretamente da fazenda para uso em laboratório, sendo mantidos no laboratório em reservatório plástico com volume para 40 litros, preenchido até 50% da sua capacidade com água sem cloro. O reservatório era mantido fechado, com filó e elástico, como medida de proteção contra fugas e proliferação de organismos externos. Os caramujos eram alimentados com folhas de alface limpas, tratadas com hipoclorito e lavadas em água corrente. A água do reservatório era trocada uma vez a cada duas semanas enquanto os caramujos estivessem em laboratório. Cada lote de caramujos enviados de Bananal era mantido isolado. Os caramujos mortos eram imediatamente removidos da cuba assim que constatada a sua morte, observada através da coloração da sua concha, pelo grande extravasamento de hemolinfa ou pela retração excessiva do animal para dentro da concha.

4.2 TRATAMENTO DE CARAMUJOS *Biomphalaria tenagophila* COM METRONIDAZOL

Os caramujos, mantidos no laboratório, foram submetidos a um tratamento anti-helmíntico, antes de todos os experimentos, com, metronidazol, pelo período de dois dias, como forma de amenizar contaminação das culturas celulares. Cada comprimido de metronidazol de 250 mg era dissolvido em 1 litro de água destilada. Para cada cuba com 1 litro da solução de metronidazol eram acomodados até 20 caramujos para tratamento por um dia. Após o primeiro dia de tratamento, a solução de Metronidazol era trocada e os caramujos mantidos em tratamento por mais um dia. Durante o processo de tratamento, os caramujos não foram alimentados. Ao final do segundo dia de tratamento os caramujos foram submetidos à anestesia com solução de pentobarbitol sódico 0,4 mg/mL ficando submersos na solução anestésica pelo menos 6 horas antes da dissecação.

4.3 DISSECÇÃO E PREPARAÇÃO DE EXPLANTES

Para realização dos experimentos foram escolhidos caramujos cujo diâmetro de concha estivesse entre 10-15 mm. A dissecção seguiu protocolo adaptado a partir do padrão empregado para técnicas malacológicas, descrito em CARVALHO e cols. 2008, gentilmente ensinado pela Dra. Roberta Lima Caldeira. Para assegurar esterilidade da cultura, toda metodologia de dissecção foi desenvolvida em câmara de fluxo laminar.

As conchas dos caramujos eram esterilizadas com etanol 70%, sendo posteriormente esmagadas em placas de vidro para sua remoção. Após esmagamento, o corpo do molusco era mergulhado em solução de antibióticos (tabela 1) e processava-se a remoção dos fragmentos de concha. O corpo do molusco, livre da concha, era então colocado sobre placa de Petri, sendo sempre hidratado com solução de PBS com antibióticos (tabela 1).

Tabela 1 – Soluções de PBS e água com antibióticos.

Suplemento	Solução PBS		Água	
	%	Concentração (µg/mL)	%	Concentração (µg/mL)
Água	-	-	99,0	-
PBS	99,0	-	-	-
Anfotericina B	0,4	10	0,4	10
Primocin	0,25	125	0,25	125
Gentamicina	0,10	25	0,10	25
Estreptomicina	0,25	25	0,25	25
Total	100	-	100	-

Com auxílio de uma lupa microscópica (Carl Zeiss, Alemanha) e utilizando pinças microcirúrgicas de extremidades finas, típicas de procedimentos oftalmológicos, a dissecção era realizada a partir do “fio columelar” (junção entre músculo columelar e manto), de ambos os lados do corpo do molusco até a altura da glândula digestiva. Após a remoção do fio columelar, o manto era destacado a partir da região cefalopodal, segurando-se pelo colar do manto, para exposição das estruturas internas. Com auxílio de bisturi, as tecidos foram removidos e lavados três vezes com 10 mL de PBS com antibióticos, fragmentados e colocados em placas de 24 poços.

4.4 CULTURA CELULAR PRIMÁRIA

Explantos das regiões dissecadas, medindo em torno de 1 mm, foram plaqueados em placas de 24 poços com 300 µL/poço de meio de cultura Schneider ou Hansen (HANSEN, 1976), suplementados conforme tabela 2. As placas foram mantidas em câmara úmida, sob a temperatura de 15 °C. Eram eliminados todos os poços que apresentaram contaminação por bactérias, fungos, protozoários ou pequenos helmintos, parasitas dos moluscos.

Os reagentes utilizados na confecção dos meios de cultura empregados eram de procedência da Sigma-Aldrich, Estados Unidos. Em todos os experimentos, a água utilizada era bidestilada milli Q grau Biologia Molecular obtida através de equipamentos de tratamento de água da Millipore.

Tabela 2 – Suplementação de meio de cultura para células de molusco.

Suplemento	Meio Schneider		Meio de Hansen	
	%	Concentração (µg/mL)	%	Concentração (µg/mL)
Schneider's	87,9	-	20	-
Água	-	-	60,8	-
Soro Fetal Bovino	10,0	-	-	-
Soro Fetal Bovino inativado	-	-	10	-
Insulina Bovina	0,1	11	-	-
Glutamina	1,0	296	-	-
D-Galactose	-	-	1,1	1060
Lactoalbumina hidrolisada	-	-	3,5	354
Trealose	-	-	3,6	3600
EGF	0,001	0,0001	-	-
Anfotericina B	0,4	10	0,4	10
Primocin	0,25	125	0,25	125
Gentamicina	0,10	25	0,1	25
Estreptomicina	0,25	25	0,25	25
Total	100	-	100	-

Os procedimentos de caracterização foram realizados no meio que ofereceu a melhor condição de viabilidade celular.

4.5 COLORAÇÃO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

Para visualização e identificação de estruturas celulares em microscopia óptica convencional foi utilizada a coloração através de azul de metileno segundo Giemsa, de procedência da Merck, Alemanha. As células em cultura, após 24 horas, eram retiradas,

lavadas em PBS e então fixadas com solução de metanol/ácido acético (3:1) por 30 minutos. Após fixação era aplicado em lâminas o volume de 100 µL da suspensão de células, dentro de um cilindro de clonagem, e então deixadas para fixar até evaporar todo fixador. Após fixação em lâminas, as mesmas eram coradas com solução de azul de metileno segundo Giemsa por 4 minutos e posteriormente lavadas com água destilada. Após lavagem, as lâminas eram deixadas para secar a temperatura ambiente. Após estarem secas, eram adicionadas lamínulas, fixadas com Entellan (USB, Estados Unidos) para visualização em microscopia óptica e documentação.

4.6 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada através do corante Azul de Tripán, capaz de diferenciar células vivas e mortas, através de visualização em microscopia óptica, utilizando como instrumento de contagem uma câmara de Neubauer. As células eram retiradas da cultura no período entre 24-48 horas de cultivo, homogeneizadas e retirada uma alíquota de 50 µl para análise. A esta alíquota era adicionado 1 volume de azul de tripan, sendo aplicados 10 µl à câmara de Neubauer para realização da contagem. Para análise da viabilidade celular foram realizadas contagens em quatro amostras de poços distintos ou mesmos poços.

4.7 ENSAIO DE FLUORESCÊNCIA *in vitro* (CÉLULAS VIVAS)

Os procedimentos para marcação fluorescente das células vivas foram realizados em condições estéreis, com aplicações em condições fixas para todos os poços de cultura, em penumbra e sempre no segundo dia de cultivo (período entre 24 e 48 horas). Foi realizada a marcação de açúcares na superfície das células dos tecidos porção tubular e sacular do tubo renal, manto e ovotesti. Os marcadores utilizados foram de procedência da Molecular Probes, Invitrogen, EUA. O microscópio de fluorescência empregado nos estudos foi o Axiovert 200, Carl Zeiss, Alemanha.

Para identificação dos açúcares de superfície de membrana presentes nas populações celulares obtidas foram utilizados as lectinas ConA, GS-II, HPA, IB₄, PHA-L, PNA, SBA e WGA. Todas as lectinas utilizadas eram conjugadas ao fluorocromo Alexa Fluor[®] 488 de emissão máxima a 519 nm emitindo fluorescência na cor verde.

Todas as soluções estoque destes marcadores fluorescentes eram centrifugadas antes de sua utilização na tentativa de evitar agregados de proteínas presentes na solução, segundo alerta do fabricante. Antes da aplicação, os marcadores eram diluídos em 50 μ L do meio de cultura, sendo aplicadas nas culturas das células para uma concentração final de 25 μ g/mL. O período de incubação foi de 5 minutos em temperatura ambiente antes da visualização em microscópio de fluorescência.

ConA (Invitrogen - C11252) se liga em resíduos de α -manopirranose e α -glicopirranose. A solução estoque de 5 mg/mL foi preparada em solução de bicarbonato de sódio 0,1 M pH 8,3. Diferentemente das demais lectinas, esta foi utilizada em uma concentração final de 100 μ g/mL, conforme instruções do fabricante.

GS-II (Invitrogen - L-21415) é uma lectina capaz de detectar resíduos terminais de *N*-acetil-D-glicosamina. A solução estoque foi preparada em tampão salino 1,0 mM de cálcio, essencial para ligação da lectina, na concentração de 1 mg/mL.

A glicoproteína Isolectina IB₄ (Invitrogen - I-21411) é composta por duas subunidades similares, com apenas um aminoácido de diferença, com a subunidade A apresentando afinidade com resíduos de *N*-acetil-D-galactosamina e a com a subunidade B apresentando afinidade com resíduos de α -D-galactosil. A solução estoque de 1 mg/mL foi preparada em solução de cálcio 1 mM, pH neutro.

HPA (Invitrogen - L-11271) é capaz de ligar-se seletivamente a α -*N*-acetil-galactosamina e eritrócitos do tipo A. A solução estoque foi preparada em PBS na concentração de 1 mg/mL.

A lectina PHA-L (Invitrogen - L-11270) é conhecida por aglutinar leucócitos e promover atividade mitótica de linfócitos T. A solução estoque foi preparada na concentração de 2 mg/mL em água.

A solução estoque da sonda PNA (Invitrogen - L-21409), que reconhece resíduos de β -galactose, foi preparada em água, na concentração de 1 mg/mL.

A lectina SBA (Invitrogen - L-11272) reconhece glicoconjugados ligando-se seletivamente a α -N-acetil-galactosamina e β -N-acetil-galactosamina, e resíduos galactopiranosil. A solução estoque desse marcador foi preparada em água na concentração de 2 mg/mL.

WGA (Invitrogen - W11261) é uma lectina capaz de ligar-se seletivamente à resíduos de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). A solução estoque de 1 mg/mL de WGA foi preparada em PBS.

4.8 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES POR CITOMETRIA DE FLUXO

Ensaio de caracterização de subpopulações celulares encontradas nas culturas dos tecidos foram realizados para determinação de padrão na marcação com lectinas em cada grupo de células trabalhadas. As lectinas foram utilizadas como marcadores de tipos celulares diferenciados. Foram submetidas aos ensaios de citometria de fluxo, as culturas estabelecidas a partir dos explantes obtidos do tubo renal, manto e ovotesti. Os ensaios foram realizados no citômetro de fluxo FACS CANTO II, BD Biosciences, Estados Unidos, instalado no Serviço de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias.

A suspensão de células em cultura foi obtida a partir da retirada do meio das placas de 24 poços. As células foram lavadas em 2 mL de solução de PBS contendo HSA e azida sódica. A contagem e viabilidade celular foram verificadas com azul de Tripán, sendo então preparada uma solução de células na concentração mínima de $1,0 \times 10^4$ células/mL, correspondente a um poço de cultura. Após lavagens era realizada a marcação das células com as lectinas, adicionando-se cada lectina na concentração final de 25 μ g/mL, com exceção à ConA que foi utilizada na concentração final de 100 μ g/mL. A suspensão celular e a solução do marcador foram adicionadas em tubos de fundo em U e mantidas protegidas da luz até o momento de sua manipulação no citômetro.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS EM CULTURA

A caracterização da ultraestrutura das células dos diversos tecidos obtidos foi realizada em colaboração com o grupo do Dr. Luiz Carlos Alves no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz unidade Pernambuco, Brasil e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram realizadas *in loco* culturas celulares dos tecidos trabalhados para obtenção de material para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV).

Células de cinco poços diferentes foram coletadas nos períodos 24 e 48 horas de cultivo foram lavadas em solução de PBS e fixadas com solução de Karnofsky (glutaraldeído 2,5%, formoldeído 4% e tampão cacodilato 0,1 M). As amostras fixadas foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato. As amostras foram então gradualmente desidratadas em acetona para MET e embebidas em resina de Epon, ou etanol para MEV. Cortes ultrafinos foram realizados dos blocos e montados em grade para dupla contrastação com citrato de chumbo e acetato de uranila (MET). Para análises de MEV o material foi metalizado com partículas de ouro. As amostras foram então observadas ao microscópio eletrônico. Das amostras obtidas, apenas células da região do ovotesti foram submetidas a tanto a MET e MEV, sendo as demais submetidas somente a MET.

5 RESULTADOS

5.1 DISSECÇÃO DO MOLUSCO E CULTURAS PRIMÁRIAS

Através da metodologia aplicada foi possível dissecar e identificar as regiões cefalopodal, manto, tubo renal, coração, glândula de albume, estômago, glândula digestiva, ovotesti e glândulas nidamental e prostática dos corpos dos moluscos (figura 8).

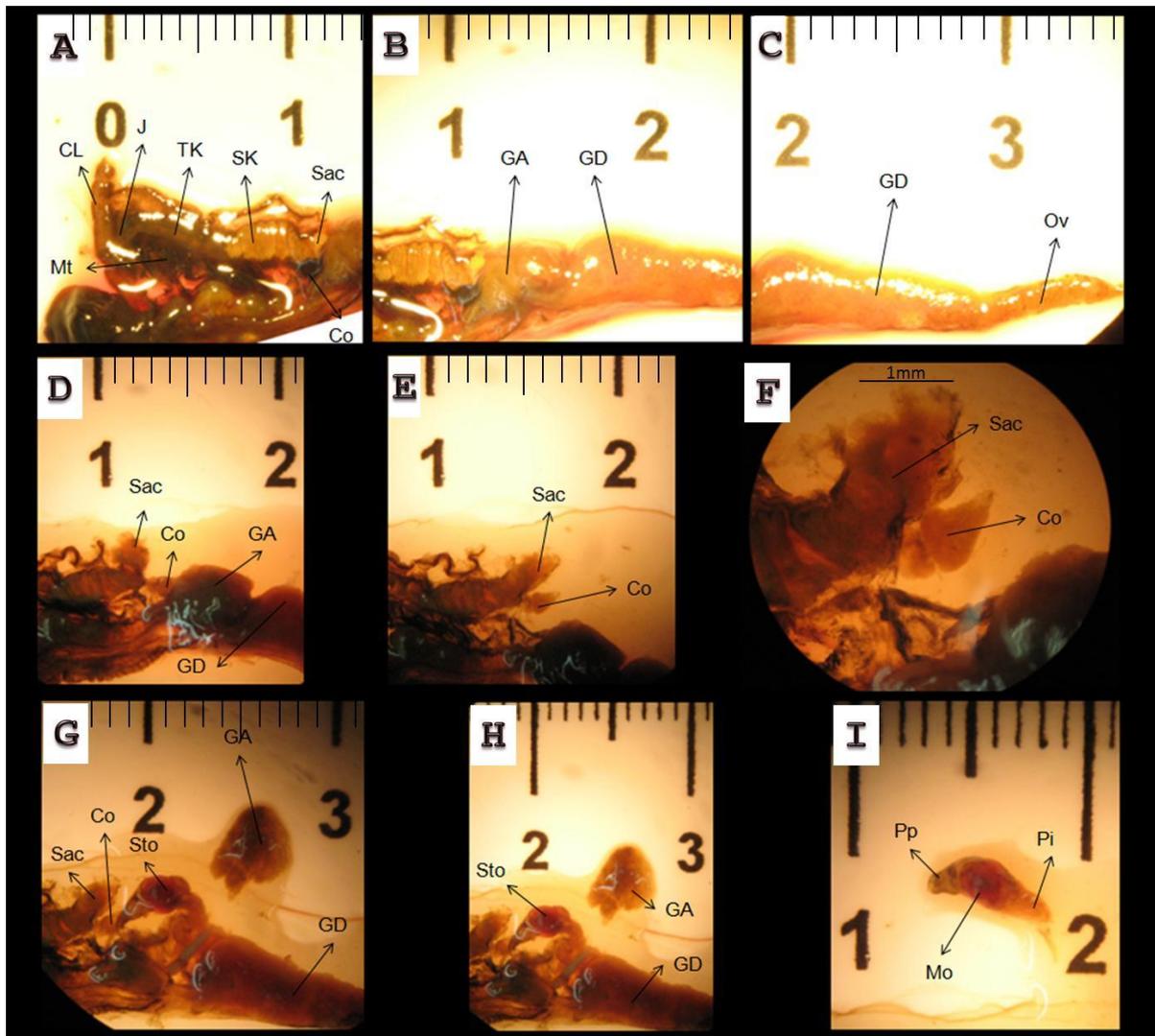


Figura 8: Imagens dos explantes *in natura* obtidos após dissecção do caramujo *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

Os explantes dos tecidos mediam aproximadamente 1 mm cada sendo cultivados de forma independente. A partir da dissecção foram realizadas as seguintes culturas celulares: Te (região do tentáculo na porção do cefalopodal); Mt (tecidos do manto localizados ao redor do

tubo renal – figura 8A); Sto (porções do papo – Pp – e piloro – Pi – do estômago – figura 8I); GD (glândula digestiva – figura 8B-C); GA (glândula de albume – figura 8B); Ov (ovotesti – figura 8C); NP (glândulas nidamental e prostática); TRpT (porção tubular do tubo renal incluindo a região do ureter “J” e rim tubular “TK” – figura 8A); TRpS (porção sacular do tubo renal incluindo a porção final “Sac” e rim sacular “SK” – figura 8A/D/E/F/G).

Após remoção do manto foi possível separar o tubo renal em duas grandes porções, a saber, tubular e sacular. Essa classificação já havia sido adotada por Pan em 1958 e está demonstrada na figura 9. Não foi possível localizar, através da metodologia empregada, o órgão produtor de amebócitos (APO), conforme demonstrado por Sullivan em 1990.

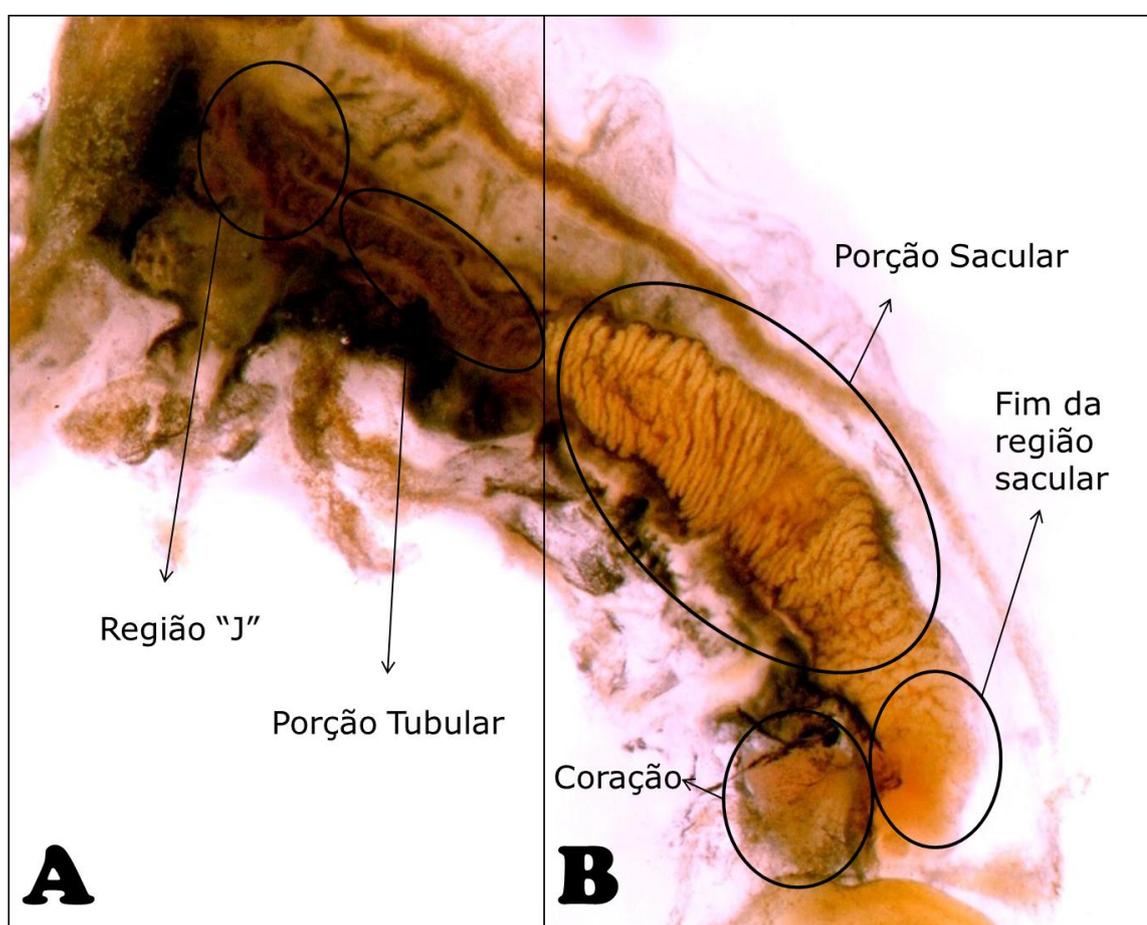


Figura 9: Vista interna do manto de *B. tenagophila*.

A: Tubo renal porção Tubular, com destaque para região do ureter. **B:** Tubo renal porção Sacular, mostrando a região final, também conhecida como saco renal e coração. Aumento de 12x.

Na dissecação da região reno-pericárdica, o coração mostrou-se intimamente ligado à região sacular do tubo renal; entretanto, foi possível separar estas duas regiões (figura 10). O saco pericárdico, formado pela parede do tubo renal e coração mostrou-se uma estrutura extremamente delicada e sua dissecação é bastante complicada, sendo mais viável sua retirada em conjunto com o coração.

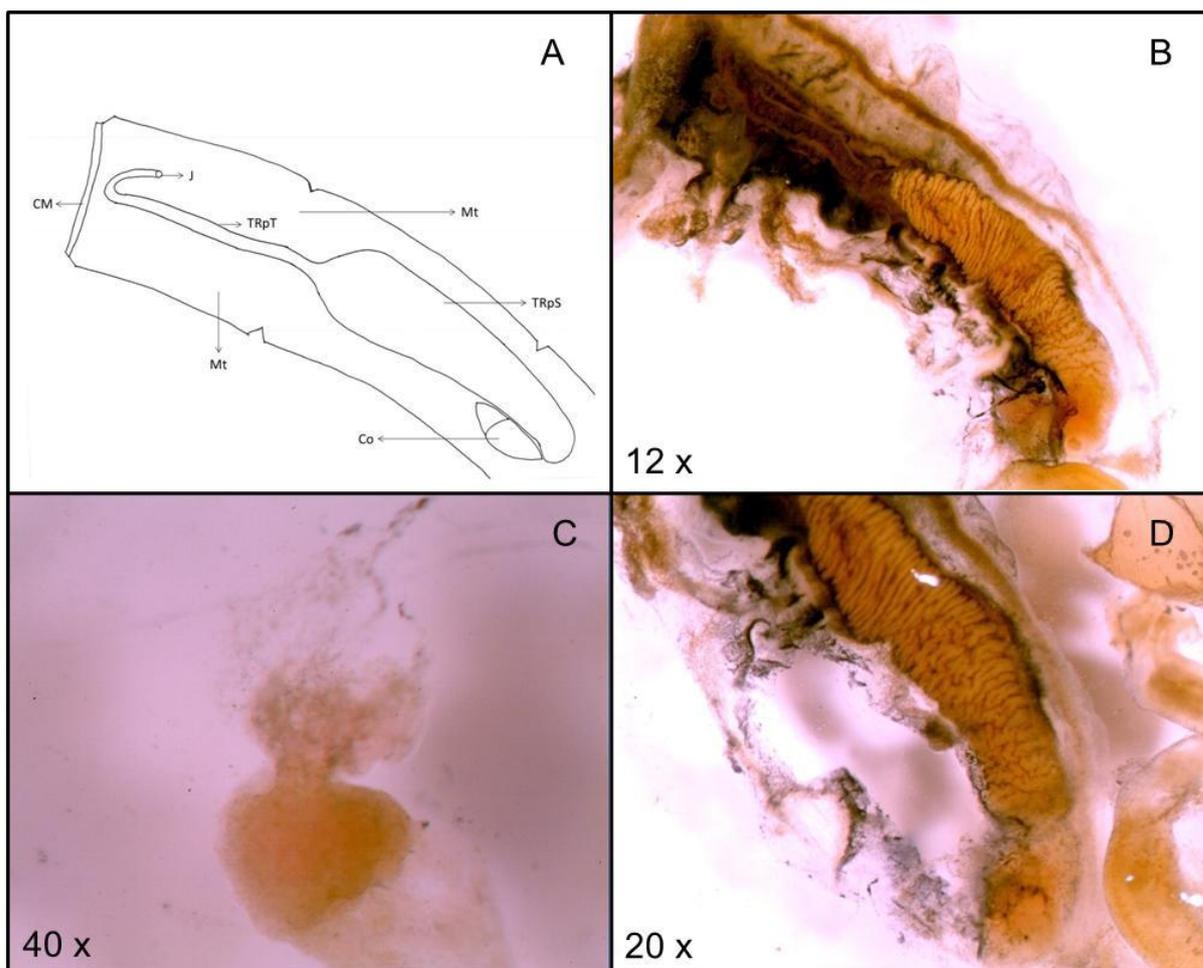


Figura 10: Vista interna da região reno-pericárdica de *B. tenagophila*.

Vista da parte interna do manto expondo estruturas do tubo renal, coração e saco pericárdico. **A.** Desenho esquemático. **B.** Vista interna do manto. **C.** Coração. **D.** Tubo renal sem o coração.

5.1.1 Condições de cultivo

Cada explante originou uma população de células em cultura extremamente heterogênea, com viabilidade entre 50-75%, medida por azul de Tripán e analisada em câmara de Neubauer, em ambos os meios testados (tabela 3).

Tabela 3 – Viabilidade média das células em cultura no período de 24-48 horas.

Tecido	Viabilidade média	
	Meio Schneider	Meio de Hansen
GA	62%	63%
GD	66%	65%
Mt	67%	67%
NP	67%	50%
Ov	62%	62%
Pp	59%	59%
Pi	57%	76%
Te	65%	68%
TRpS	58%	58%
TRpT	75%	54%
Média	63%	62%
Desvio Padrão	5,5%	7,5%

A quantidade de células obtidas nas culturas, contadas em câmara de Neubauer, foi de $1,0 \times 10^4$ células/mL para todos os tecidos, com exceção a Te que apresentou $1,0 \times 10^3$ células/mL. A quantidade de células foi influenciada principalmente pelos fatores matéria prima e tempo de cultura. Quanto maior o número de dias de cultura, maior a quantidade de célula nos poços.

Observadas ao M.O. invertido, as culturas apresentaram poucas diferenças quando cultivadas com os distintos meios de culturas (figuras 11 e 12). Apesar de, aparentemente, a maioria das culturas apresentarem mais células quando cultivadas em meio Schneider do que em meio de Hansen, não houve nenhuma diferença na contagem das células obtidas em diferentes meios.

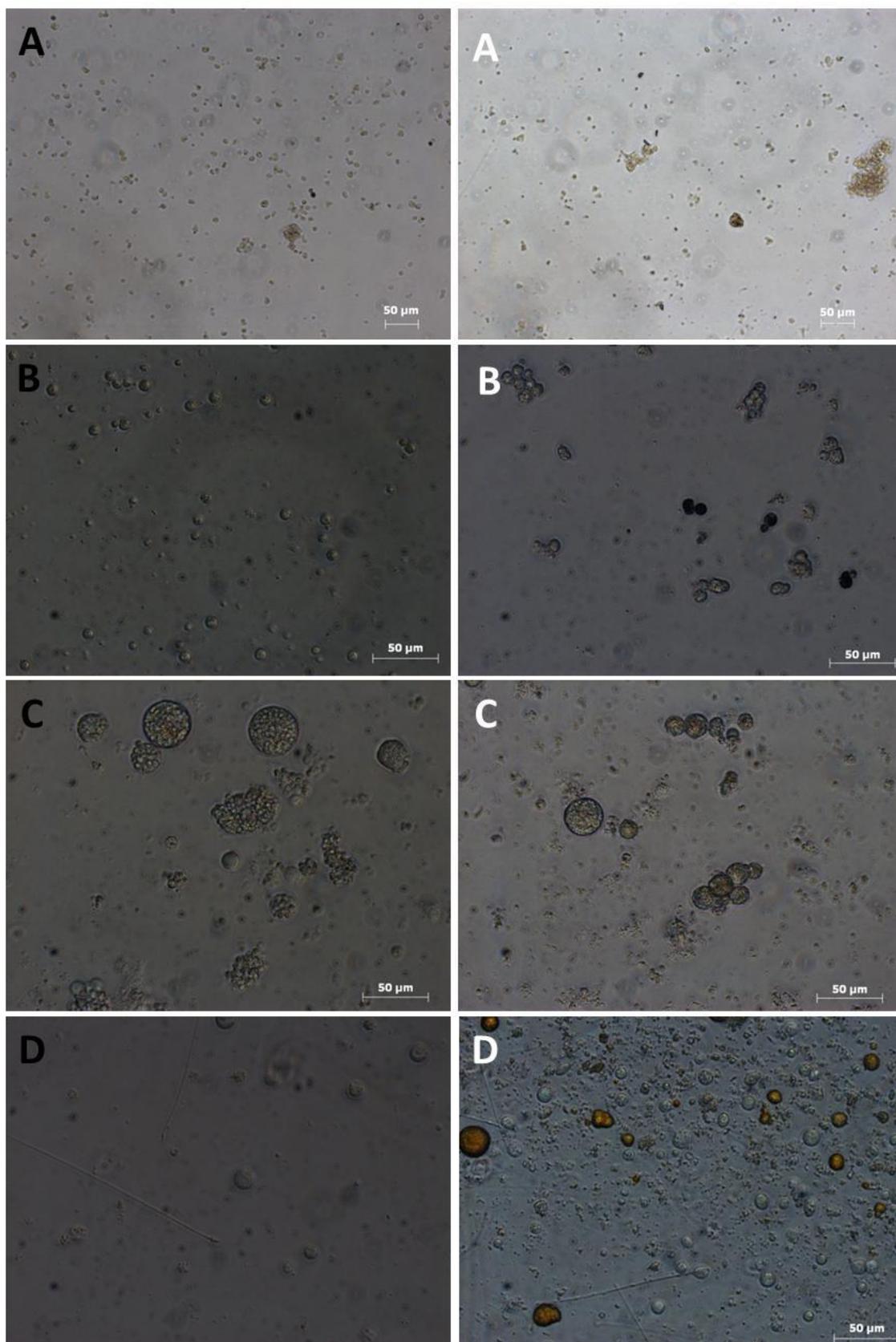


Figura 11-1: Perfil de células cultivadas em meios distintos.

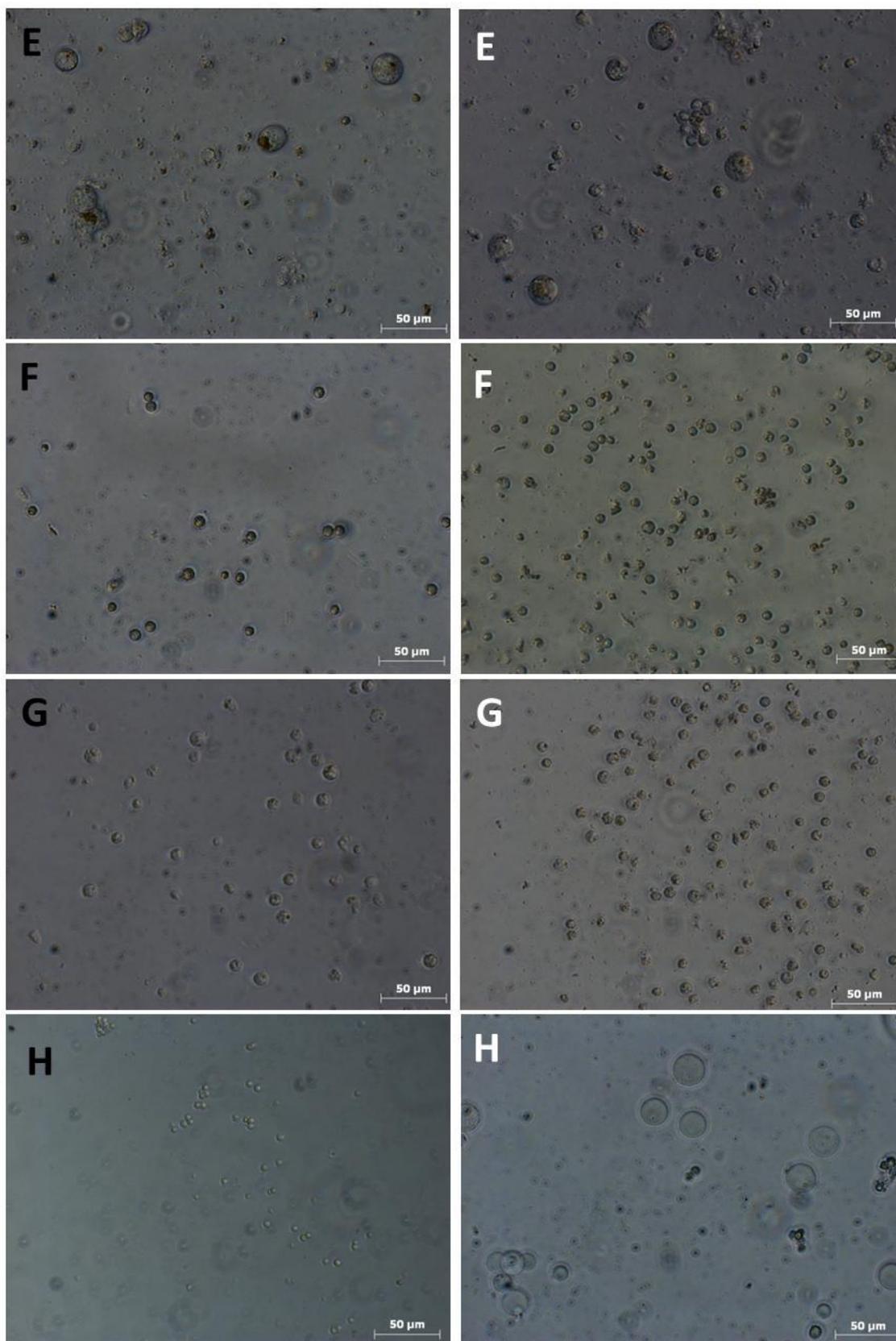


Figura 11-2: Perfil de células cultivadas em meios distintos.

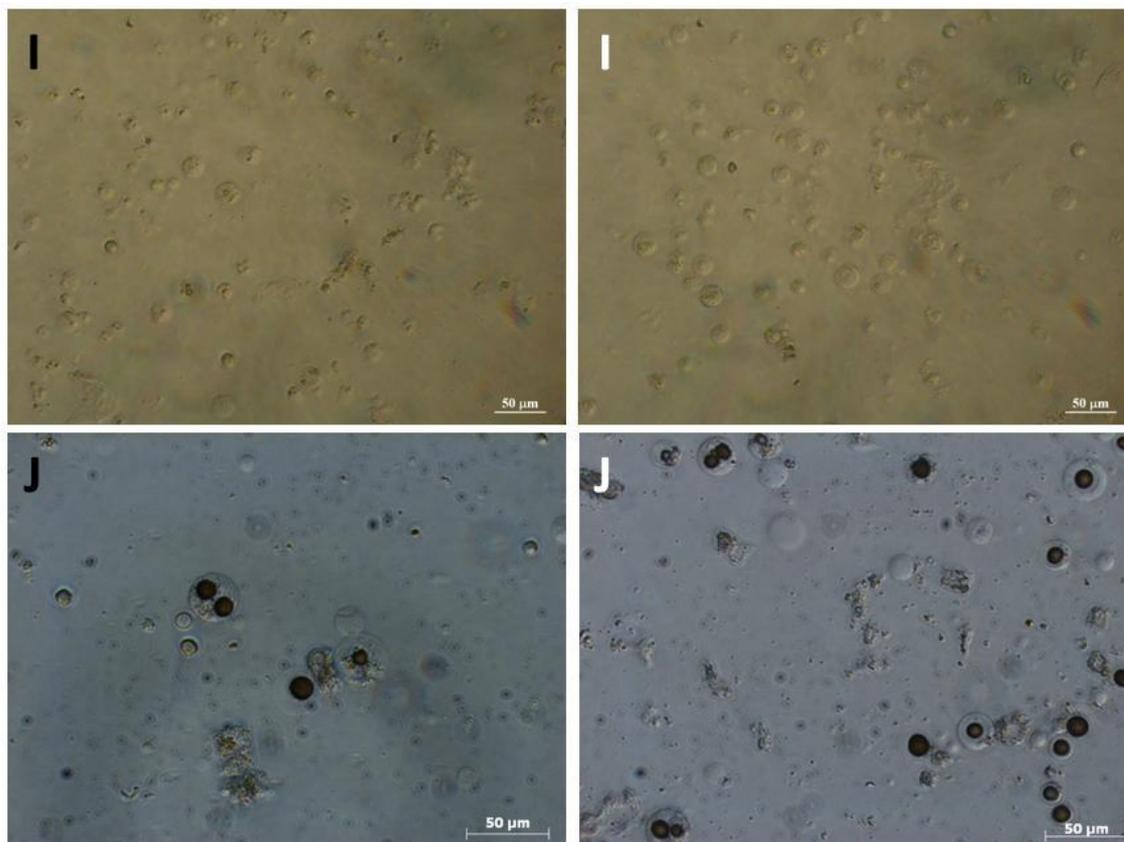


Figura 11-3: Perfil de células cultivadas em meios distintos.

Células obtidas através da cultura de regiões similares de caramujos *B. tenagophila*, cultivadas nos meios Hansen (letras escuras) e Schneider (letras claras). Legenda: **A.** GA; **B.** Mt; **C.** NP; **D.** Ov; **E.** GD; **F.** Te; **G.** Pp; **H.** TRpS; **I.** Pi; **J.** TRpT.

5.1.2 Morfologia celular: Glândula de albume

Na microscopia óptica invertida da glândula de albume foi obtida uma população predominantemente composta por células redondas, não aderentes e de pequeno porte (figura 12A). A análise destas células coradas por Giemsa (Fig. 12B) mostrou citoplasma denso e núcleo pequeno e excêntrico.

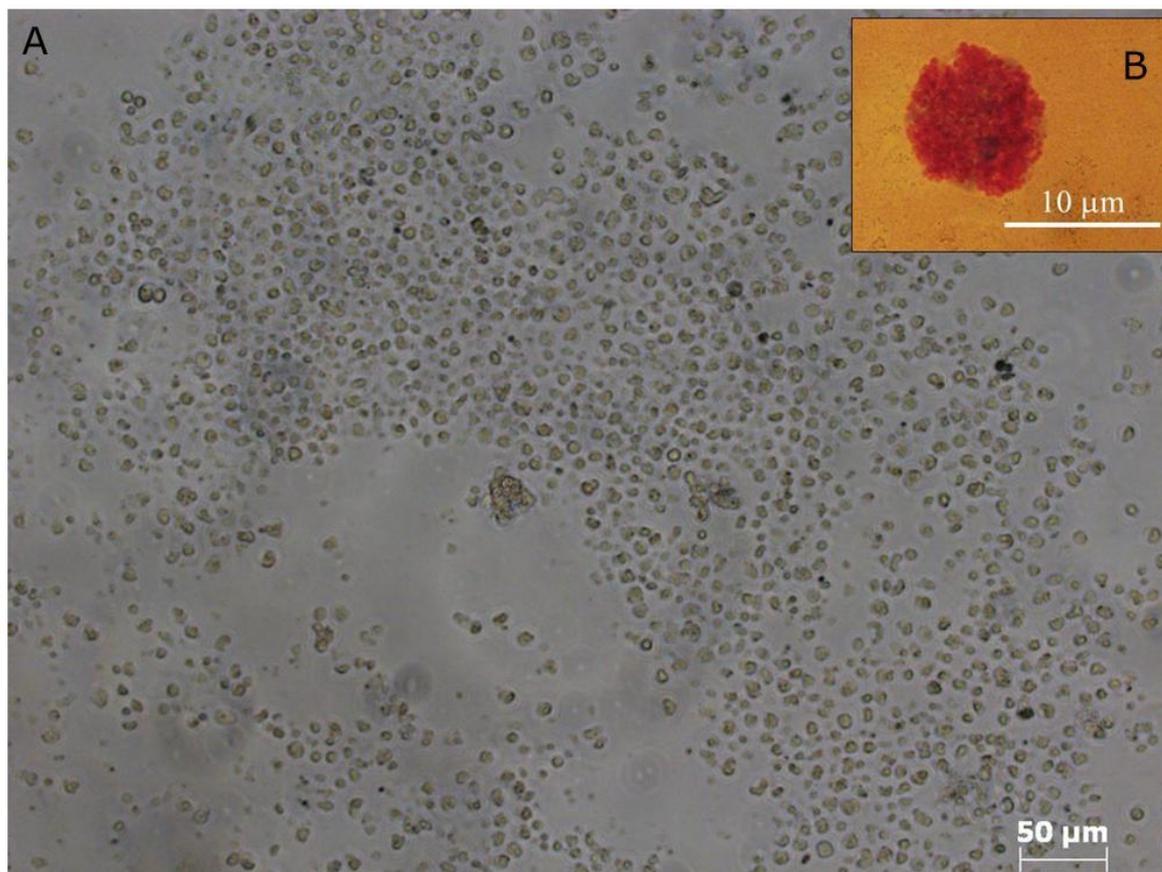


Figura 12: Cultura de células da glândula de albume de *B. tenagophila*.

A. Campo de cultura de células da glândula de albume observada ao M.O. **B.** célula da cultura corada com Giemsa.

Através da análise em MET, foram encontrados dois tipos celulares na cultura de células da glândula de albume, sendo um com núcleo eletrodenso, grande e central ocupando grande parte do citoplasma (figura 13B) e outra subpopulação com núcleo menor, eletrolucente, e citoplasma rico em grânulos e cisternas (figura 13A/C).

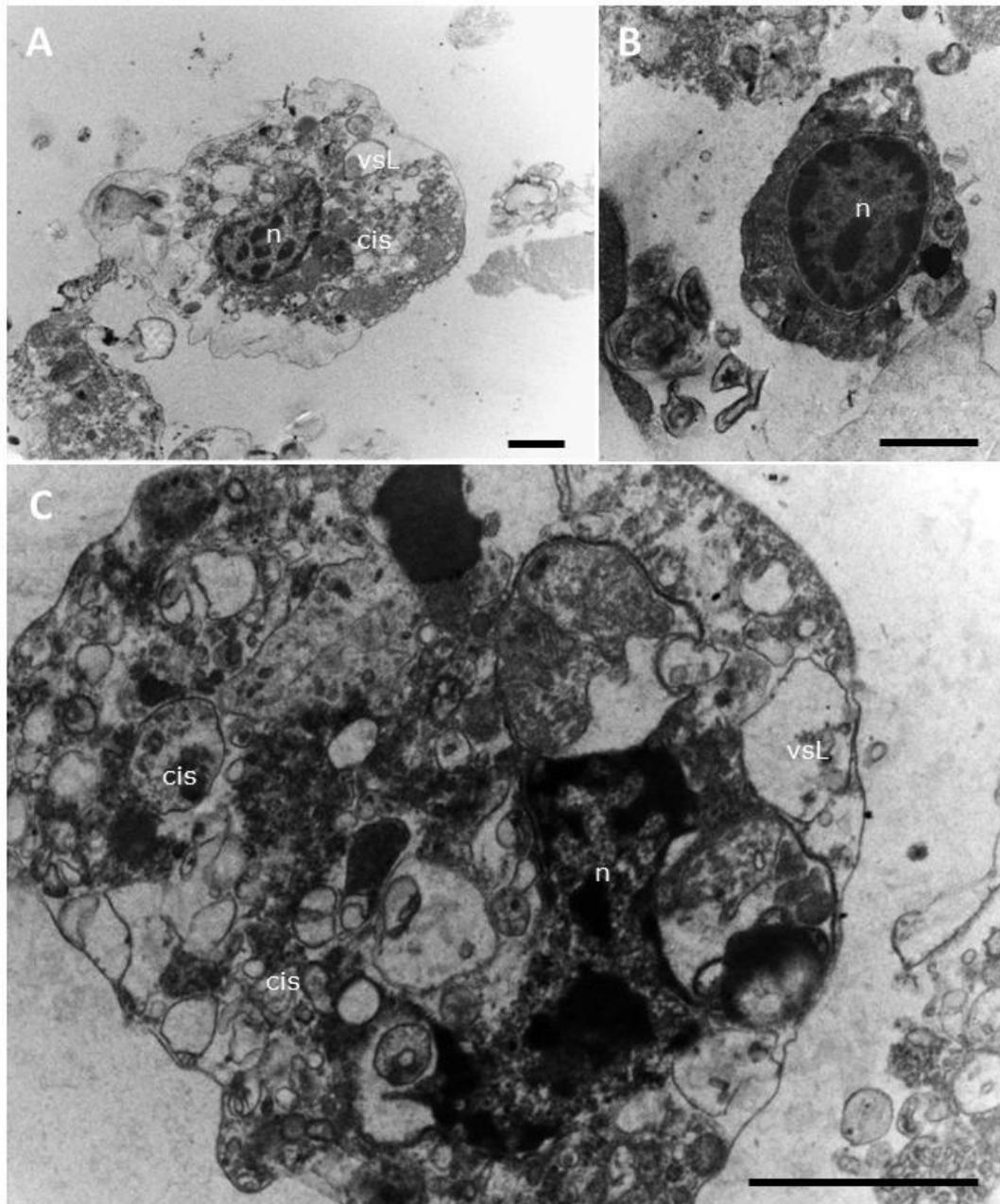


Figura 13: Ultraestrutura de células de cultura da glândula de albume de *B. tenagophila*. **A.** Célula com núcleo (n) central e muitas cisternas (cis) espalhadas no citoplasma, e algumas vesículas eletrolúcidas (vsL). **B.** Núcleo central, grande em relação ao citoplasma e muito eletrodense, citoplasma muito eletrodense, com poucas organelas distinguíveis. **C.** Célula apresentando citoplasma com muitas cisternas (cis), algumas vesículas eletrolúcidas (vsL) e um núcleo próximo a região central sem formato definido. Barras medem 1 μm .

5.1.3 Morfologia celular: Glândula Digestiva

A cultura de células da glândula digestiva apresentou uma população composta por células de diâmetros variados, formato circular sem núcleo visível na microscopia óptica (figura 14). Para esta cultura não foram obtidas imagens das células coradas com Giemsa.

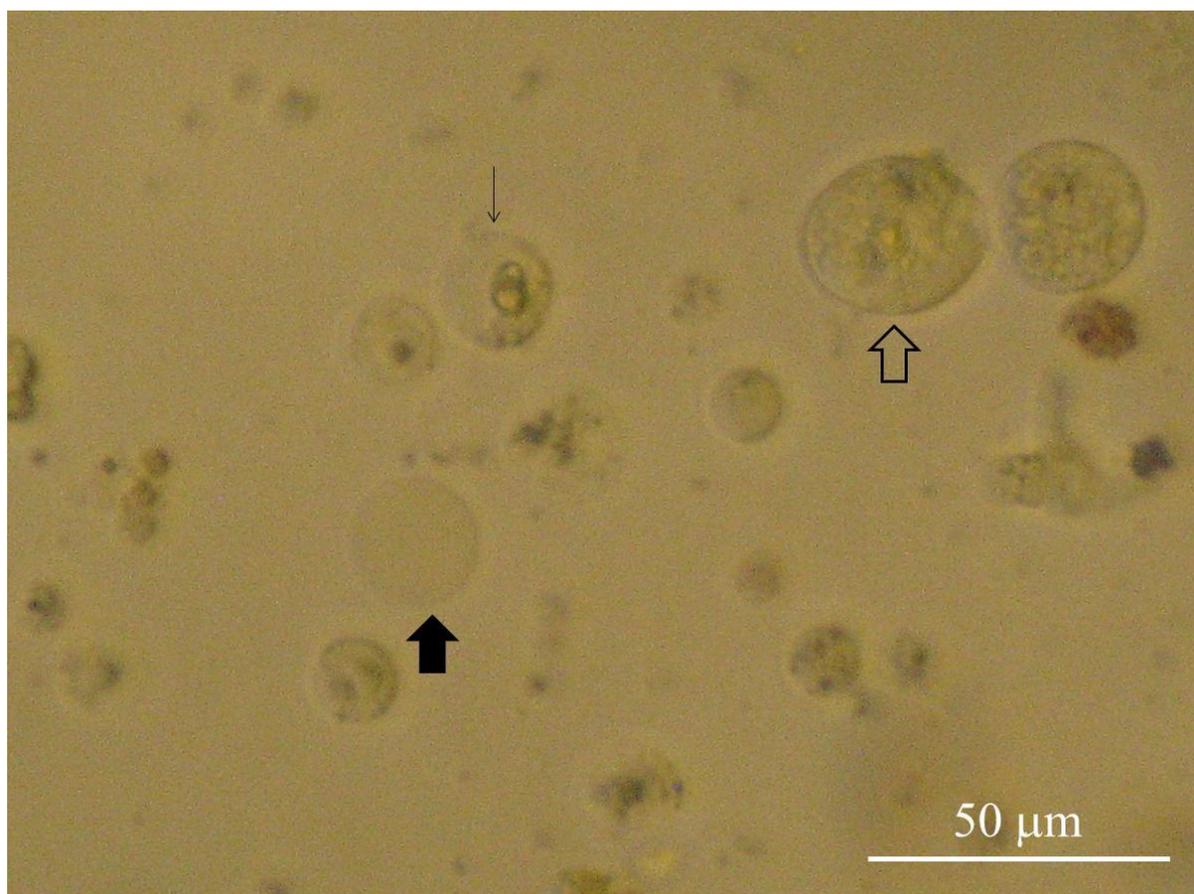


Figura 14: Cultura de células da glândula digestiva de *B. tenagophila*.

Campo da cultura de células da glândula digestiva.

Através da análise da ultraestrutura das células do cultivo da glândula digestiva foi possível identificar seis tipos celulares distintos. Nos diferentes subtipos foram encontradas muitas vesículas secretoras com variada eletrodensidade e texturas (figura 15), com exceção a um subtipo celular que apresentou um citoplasma e núcleo mais denso do que as demais e sem vesículas, apenas citoplasma rugoso (figura 15B).

Na figura 15 A encontramos um tipo celular com citoplasma rico em pequenas vesículas de secreção eletrodensas e grandes vesículas eletro-lucentes.

A figura 15 C, mostra célula com núcleo grande, evidente e vesículas secretoras espalhadas por todo citoplasma celular. Na figura 15 D, a célula apresenta algumas vesículas eletro-lucentes e rugosas, cujo tamanho ocupavam cerca de 1/3 do volume celular, sendo possível visualizar a liberação de uma dessas vesículas na imagem.

Outro subtipo celular (figura 15E) apresentou estruturas de aspecto singular, circular delimitada por estrutura semelhante à membrana. Essas estruturas membranosas, mas não circulares, foram encontrada próxima ao núcleo e na periferia da célula (figura 15F).

Em outro subtipo celular foram encontrados grânulos (figura 15G), além das vesículas, com detalhe para a exclusão desses grânulos pela célula (figura 15H) e uma estrutura aparentemente anexada à superfície celular (figura 15I), não comunicante com o citoplasma da mesma.

Em resumo as células encontradas apresentam-se com citoplasma rico em grânulos de secreção, condizente com o tecido estudado.

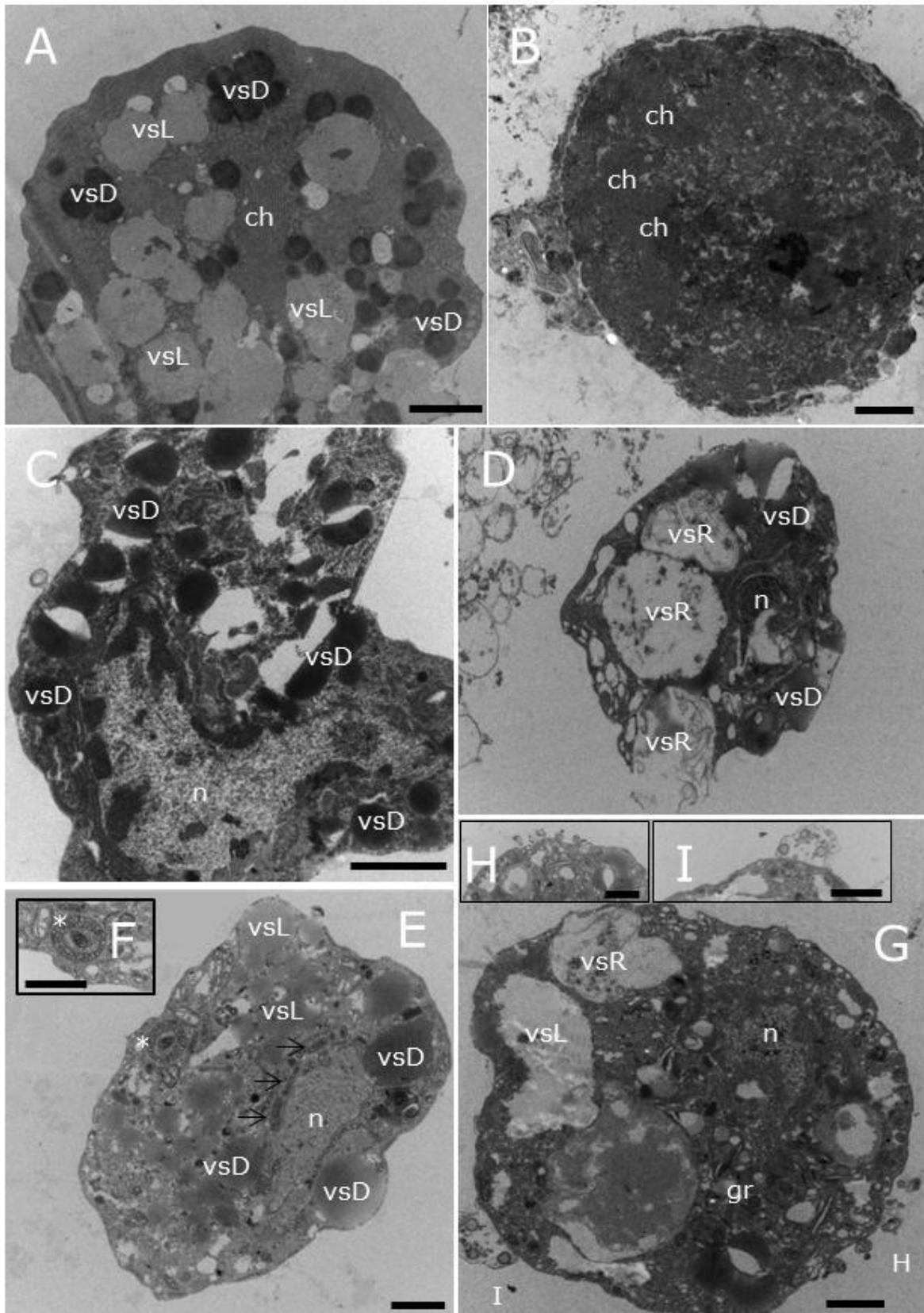


Figura 15: Ultraestrutura de células de cultura da glândula digestiva de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

5.1.4 Morfologia celular: Manto

As culturas de células do manto apresentaram células esféricas, de diâmetro variado podendo ou não apresentar granulosidades visíveis na microscopia óptica (figura 16).

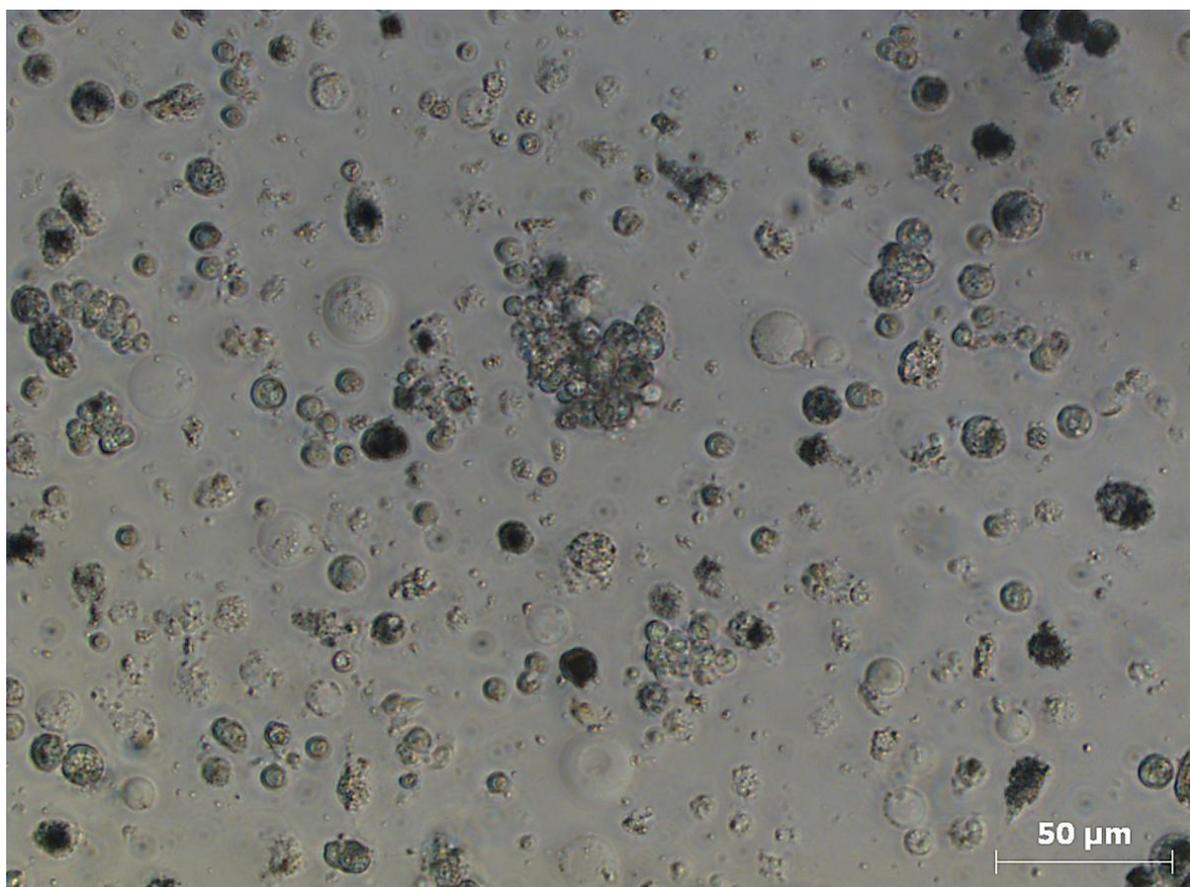


Figura 16: Cultura de células do manto de *B. tenagophila*.

Campo da cultura de células do manto observada ao M.O. (colocar nas outras tb).

Na análise das células por Giemsa, o tipo mais frequente foi de células de tamanho pequeno, de aspecto circular, aparecendo dispersas no meio ou formando estruturas em forma de cachos (figura 17A). Células apresentando granulação escura (figura 17B) ou com citoplasma livre de grânulos (figura 17C) também foram observadas.

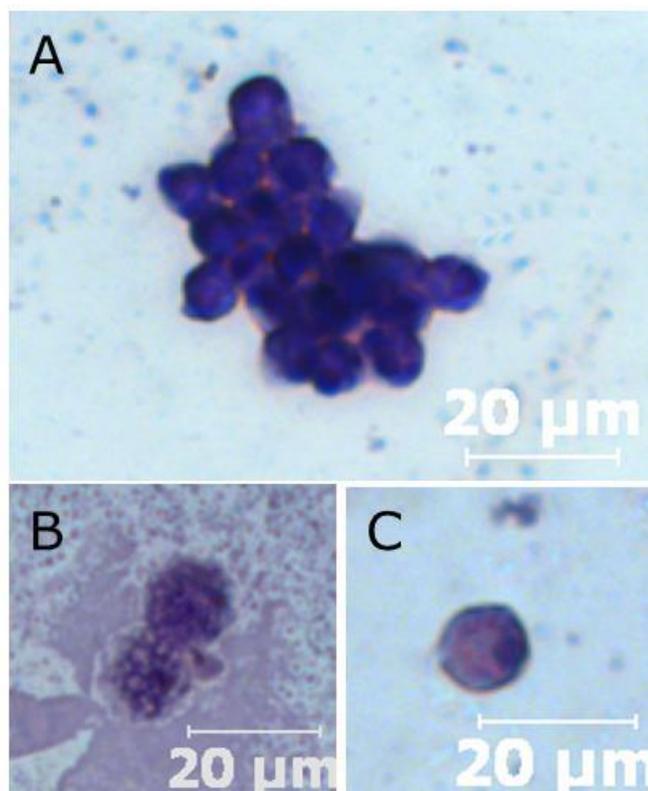


Figura 17: Células da cultura do manto de *B. tenagophila* coradas com Giemsa.

A. Célula globosa de tamanho pequeno. B. Célula com grânulos de maior porte. C. Célula sem grânulos de maior porte.

Nas culturas do manto, observando imagens da MET, foram encontrados dez tipos celulares diferentes, diferenciadas de acordo com o perfil de vesículas, densidade do citoplasma, organelas visíveis e formato celular. Dentro desses vários subtipos a presença de vesículas se destaca em quase todos, além da presença de canalículos em alguns tipos celulares. (figura 18A-B).

Em algumas células a grande quantidade de vesículas, de eletrodensidades distintas, distribuídas por todo o citoplasma celular, impediu a identificação do núcleo (figuras 18C).

Além das vesículas, esse tipo celular apresentou um citoplasma de densidade alta, contendo alguns canais que margeavam a periferia das células.

Dois tipos de células com citoplasma eletrolúcidos foram encontrados nas análises dessa região. Um deles apresentou citoplasma com muitas mitocôndrias enquanto outro se destacou pela presença de estruturas ciliares ao seu redor (figura 18D).

Outro tipo celular que apresentou o citoplasma um pouco menos eletrodense, canais ao longo do citoplasma e na periferia da célula. Esta célula tem vesículas grandes e rugosas, ocupando mais de 50% do volume celular (figura 18E).

A grande presença de mitocôndrias também foi observada em células cujo citoplasma apresentou aspecto granuloso e mais eletrodense do que o descrito anterior (figura 18F). Em outro corte foi possível visualizar a sombra do possível núcleo em uma posição basal, com as vesículas se posicionando na parte apical das células (figura 18G).

Em resumo os resultados de MET para a cultura deste tecido mostraram a existência de uma grande variedade de tipos celulares, o que mostra a complexidade deste órgão.

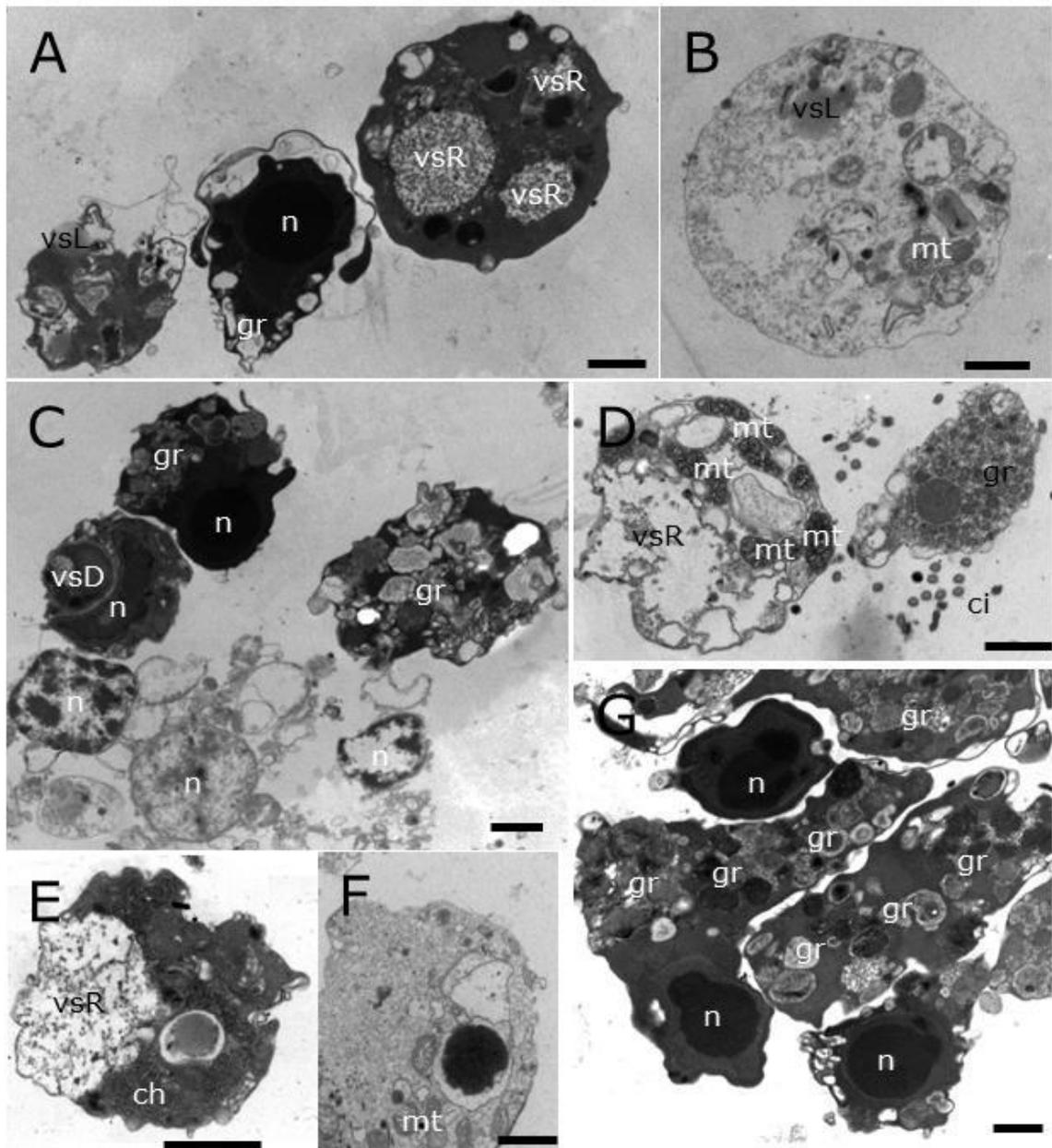


Figura 18: Ultraestrutura das células de cultura do manto de *B. tenagophila*.

A. Três subtipos celulares distintos, com núcleo oculto, e grande número de vesículas (vsR e vsL) e grânulos (gr). **B.** Subtipo celular apresentando citoplasma eletrolúcido. **C.** Três subtipos celulares, sendo um parcialmente repleto de grânulos (gr), outro com citoplasma repleto de grânulos (gr) e um terceiro de tamanho pequeno, apresentando algumas vesículas eletrodensas (vsD) e de núcleo (n) com formato de meia lua, muito eletrodense. Núcleos de células estouradas (parte inferior). **D.** Dois subtipos celulares sendo um com citoplasma repleto de mitocôndrias (mt) e grande vesícula rugosa (vsR) e outro com muitos grânulos e apresentando cílios (ci). **E.** Subtipo celular apresentando grande vesícula secretora rugosa (vsR) e citoplasma eletrodense, repleto de canalículos (ch). **F.** Célula com citoplasma pouco eletrodense e algumas mitocôndrias na parte inferior. **G.** Células ricas em granulações com possível identificação do núcleo (n). Barras medem 1 μm .

5.1.5 Morfologia celular: Glândulas Nidamental e Prostática

A cultura das células das glândulas nidamental e prostática foi realizada em conjunto, devido à dificuldade de separação das mesmas no processo de dissecação. Em microscopia óptica foi possível constatar a presença de células com forma circular, de médio porte médio e sem núcleo visível à microscopia óptica (figura 19A). Na coloração por Giemsa, as células dessa cultura apresentaram citoplasma denso, núcleo excêntrico e de pequeno porte (figura 19B).

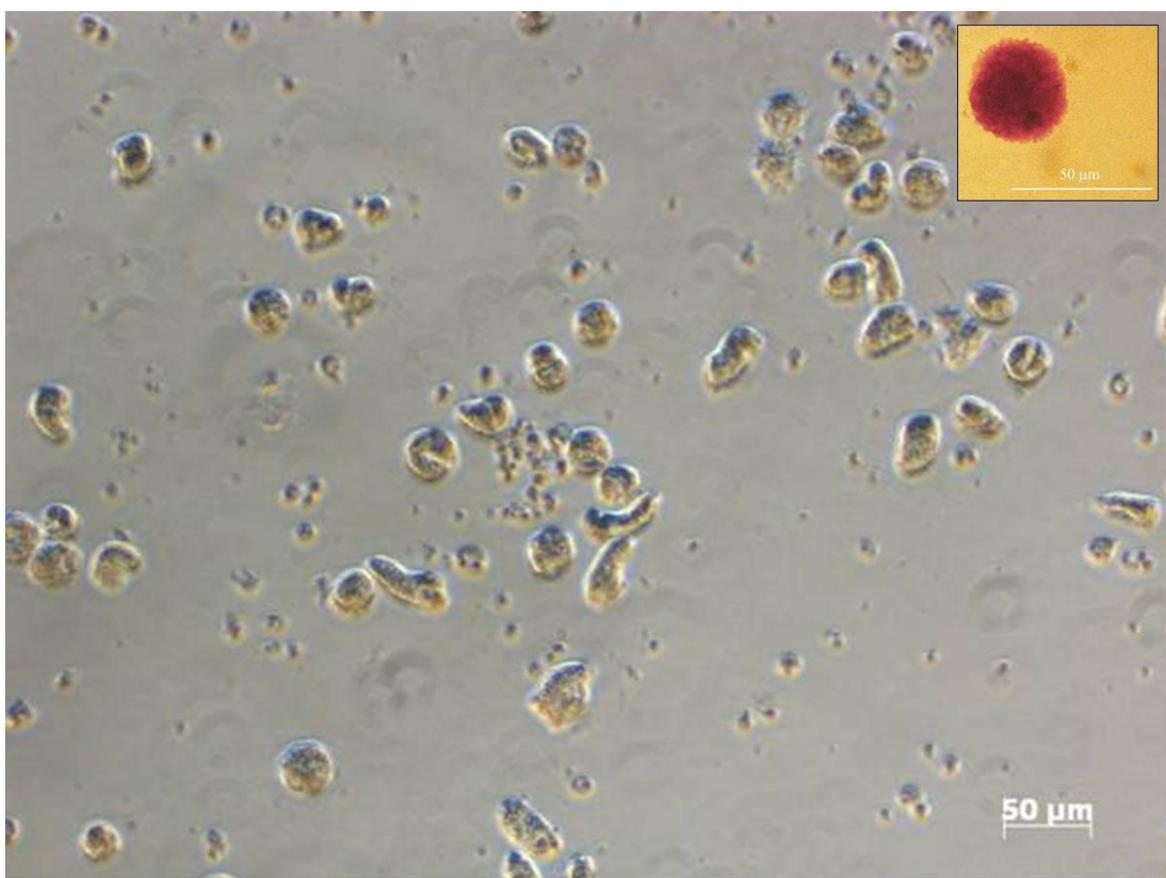


Figura 19: Cultura de células das glândulas nidamental e prostática de *B. tenagophila*.

A. Campo da cultura de células das glândulas nidamental e prostática apresentando células em forma cone (seta cheia) e a forma circular (seta vazia). **B.** célula corada com Giemsa, evidenciando citoplasma denso e rugoso da célula circular.

Através da análise de ultraestrutura foi possível identificar cinco tipos celulares distintos. Todos os tipos celulares apresentaram muitas vesículas (figura 20A). Células com grande número de vesículas comportaram-se como glândulas holócrinas, definido pelo extravasamento do conteúdo celular (figura 20E-F).

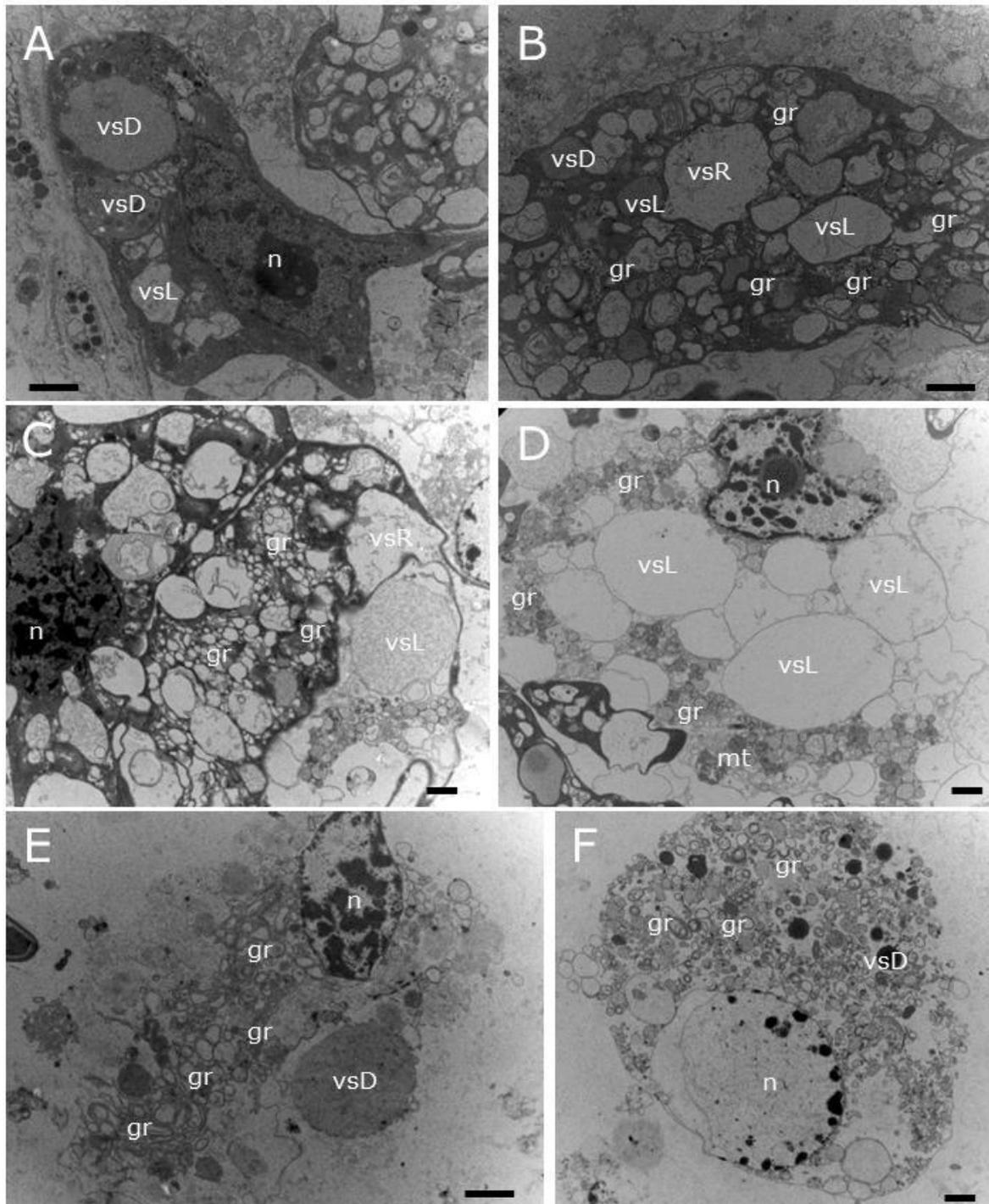


Figura 20: Ultraestrutura de células de cultura das glândulas nidamental e prostática de *B. tenagophila*.

A. Núcleo (n) em formato irregular e presença de vesículas secretoras eletrodensas (vsD) e eletrolúcidas (vsL) de grande porte no citoplasma celular. **B.** Célula com citoplasma celular repleto de grânulos (gr) e vesículas eletrodensas (vsD), eletrolúcidas (vsD) e rugosas (vsR), sem núcleo aparente. **C.** Núcleo (n) com formato indefinido eletrodenso, vesículas eletrodensas (vsD) e rugosas (vsR), e muitos grânulos (gr). **D.** Núcleo (n) e vesículas (vs) eletrolúcidas. **E-F.** Citoplasma celular repleto de grânulos (gr), algumas vesículas eletrodensas (vsD), núcleo (n) eletrolúcido e sem visualização do limite celular, a membrana. Barras medem 1 μm .

5.1.6 Morfologia celular: Ovotesti

A cultura do ovotesti originou dois tipos celulares distintos na análise ao microscópio óptico invertido. O primeiro semelhante à espermatozoides, dotado de flagelo, e outro tipo celular esférico, de tamanho variado (figura 21).

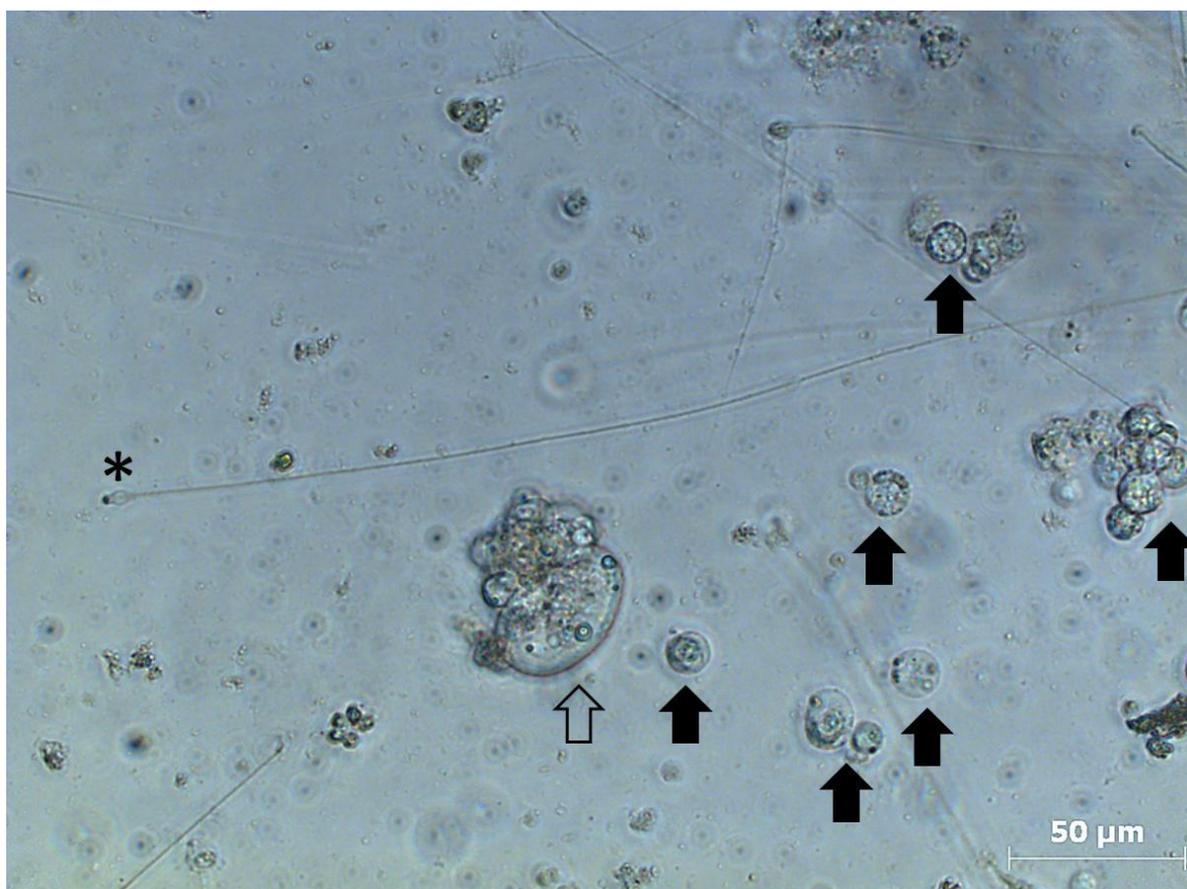


Figura 21: Células de cultura do ovotesti de *B. tenagophila*.

Campo de células em cultura do ovoteste evidenciando células tipo espermatozoide (*) e células esféricas de porte variado (setas).

Os dois tipos celulares estão identificados através da microscopia óptica com coloração por Giemsa (figura 22).

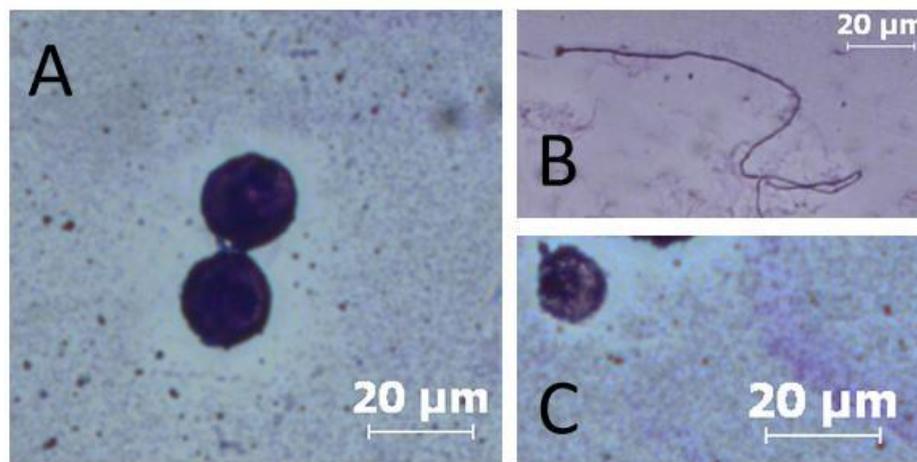


Figura 22: Cultura de ovotesti de *B. tenagophila* corado com Giemsa.

A. Célula globosa de maior porte. **B.** Espermatozoide. **C.** Célula globosa de menor porte.

Através da análise em MET foram encontrados três tipos celulares distintos. Um de aparência ameboide, com reentrâncias em sua superfície celular, servindo de apoio para outros tipos celulares (figura 23A/C). Um segundo, de aparência irregular apresentando vesículas secretoras em seu citoplasma (figura 23B/E/F). E um terceiro, com aspecto circular, com um núcleo central ocupando grande parte do volume celular (23C-D).

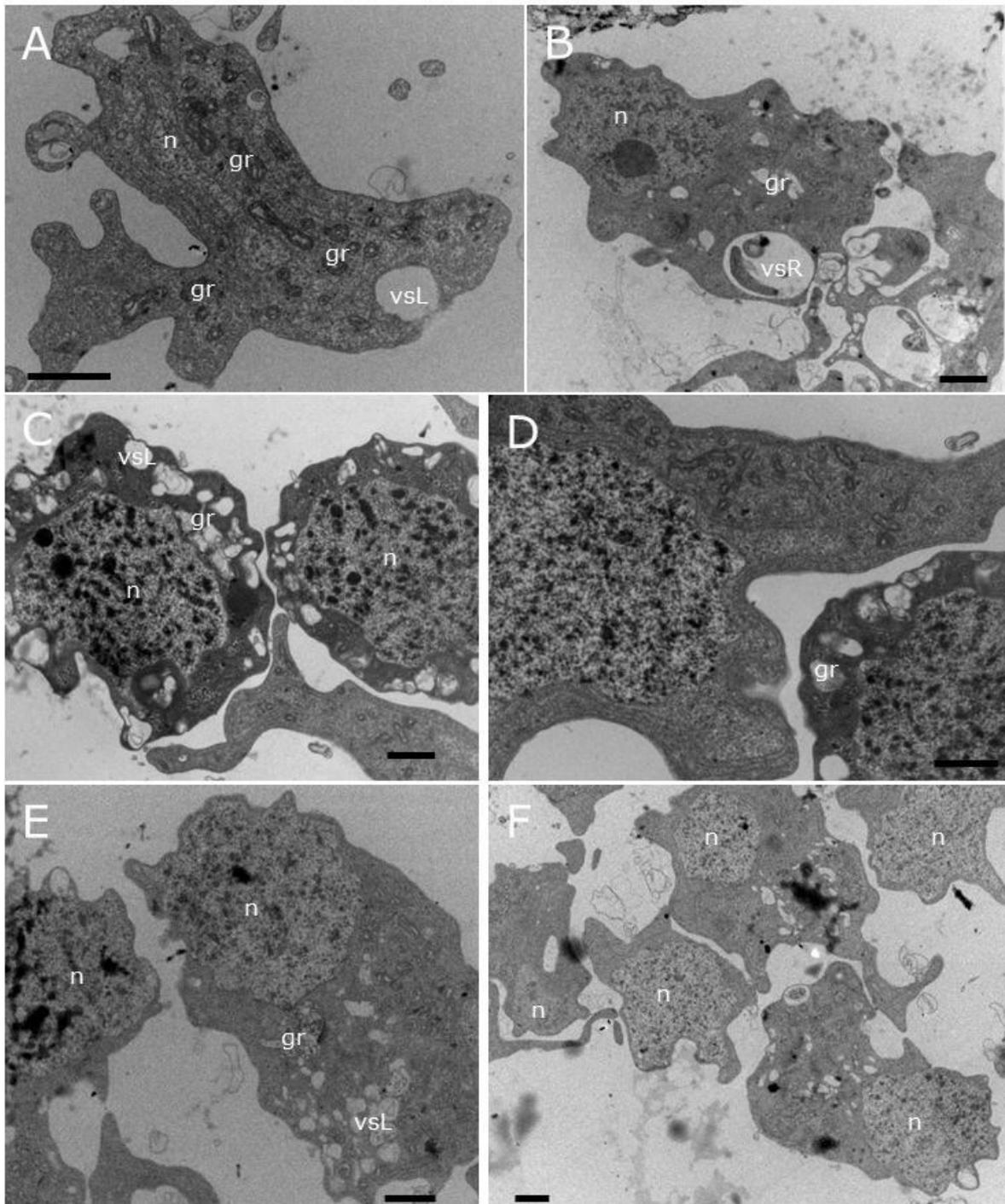


Figura 23: Ultraestrutura de células de cultura do ovotesti de *B. tenagophila*.

A. Célula em formato ameboide com núcleo (n) sem forma definida, grânulos (gr) e poucas vesículas secretoras eletrolúcidas (vsL). **B.** Núcleo excêntrico e citoplasma com vesícula de secreção rugosa (vsR) e alguns grânulos (gr). **C.** Células globosas com núcleo circular central, apoiadas por projeções citoplasmáticas de célula ameboide. Citoplasma com muitas vesículas eletrolúcidas e grânulos (gr). **D.** Célula ameboide (esquerda) e circular (direita). **E.** Célula com citoplasma contendo vesículas eletrolúcida (vsL). **F.** Conjunto de células com núcleo eletrolúcido. Barras medem 1 μm.

Através da MEV foi possível visualizar os 3 tipos celulares já identificados (figura 24A). Nas imagens de varredura foi possível visualizar que o corpo celular dos espermatozoides apresenta um formato achatado, medindo em torno de 10 μm (figura 24B-C). Foram encontradas células de 10 μm e 20 μm com a superfície lisa (figura 24D-F). Um tipo celular, de aproximadamente 10 μm , foi encontrado nas imagens, apresentando reentrâncias na sua superfície (figura 24G-I).

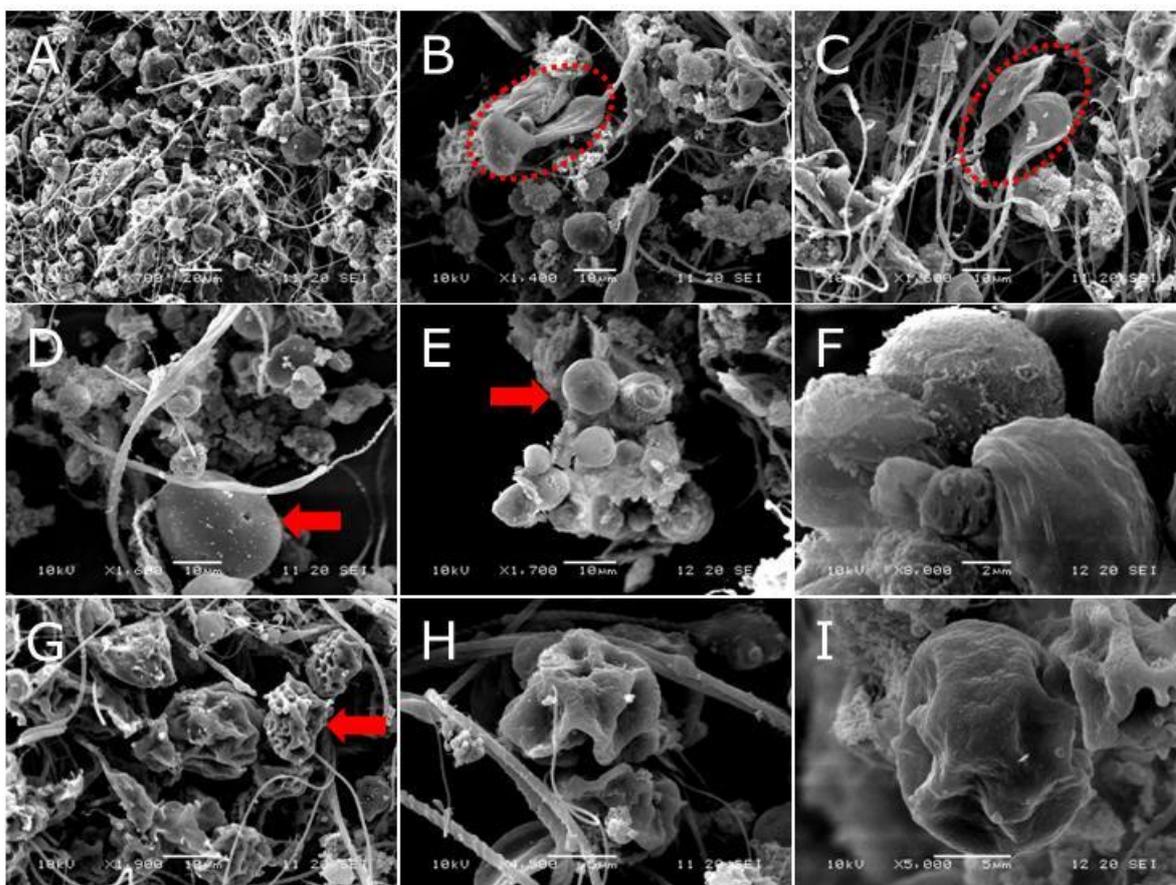


Figura 24: MEV das células de cultura do ovotesti de *B. tenagophila*.

A. Visão geral. **B-C.** Destaque corpo celular de espermatozoides (círculo pontilhado). **D.** Célula globosa, de superfície lisa, medindo em torno de 20 μm (seta vermelha). **E-F.** Células globosas, de superfície regular, medindo em torno de 10 μm (seta vermelha). **G-H-I.** Célula de formato circular, com superfície contendo reentrâncias, medindo em torno de 10 μm (seta vermelha).

5.1.7 Morfologia celular: Papo

Na cultura de células da região do papo, parte não muscular do estômago, predominaram células esféricas, de diâmetro variado, e sem núcleo visível na microscopia óptica (figura 25). Não foi obtido material de qualidade desta amostra nas colorações por Giemsa.

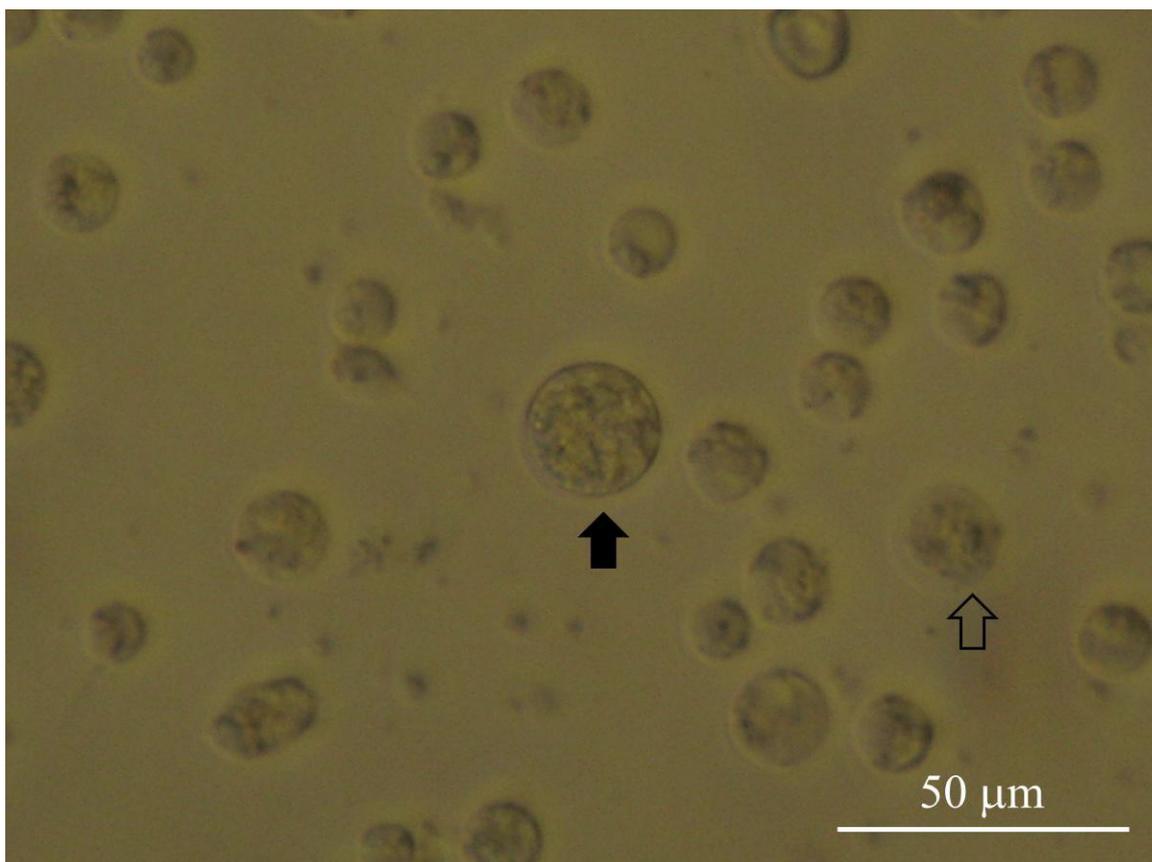


Figura 25: Células de cultura do papo de *B. tenagophila*.

Campo de células em cultura da região do papo evidenciando células esféricas de tamanho variado.

Nas análises em MET foram identificados três tipos celulares diferentes, todas com citoplasma repleto de vesículas secretoras. Um tipo celular de citoplasma eletrodense apresentou vesículas de tamanho e densidade variada (figura 26A/C). Outro subtipo celular apresentou alguns grânulos no citoplasma, núcleo denso evidente e algumas vesículas (figura 26B). No terceiro tipo celular foi possível visualizar o núcleo menos eletrodense, vesícula grande, algumas mitocôndrias e poucas cisternas no citoplasma celular (figura 26D).

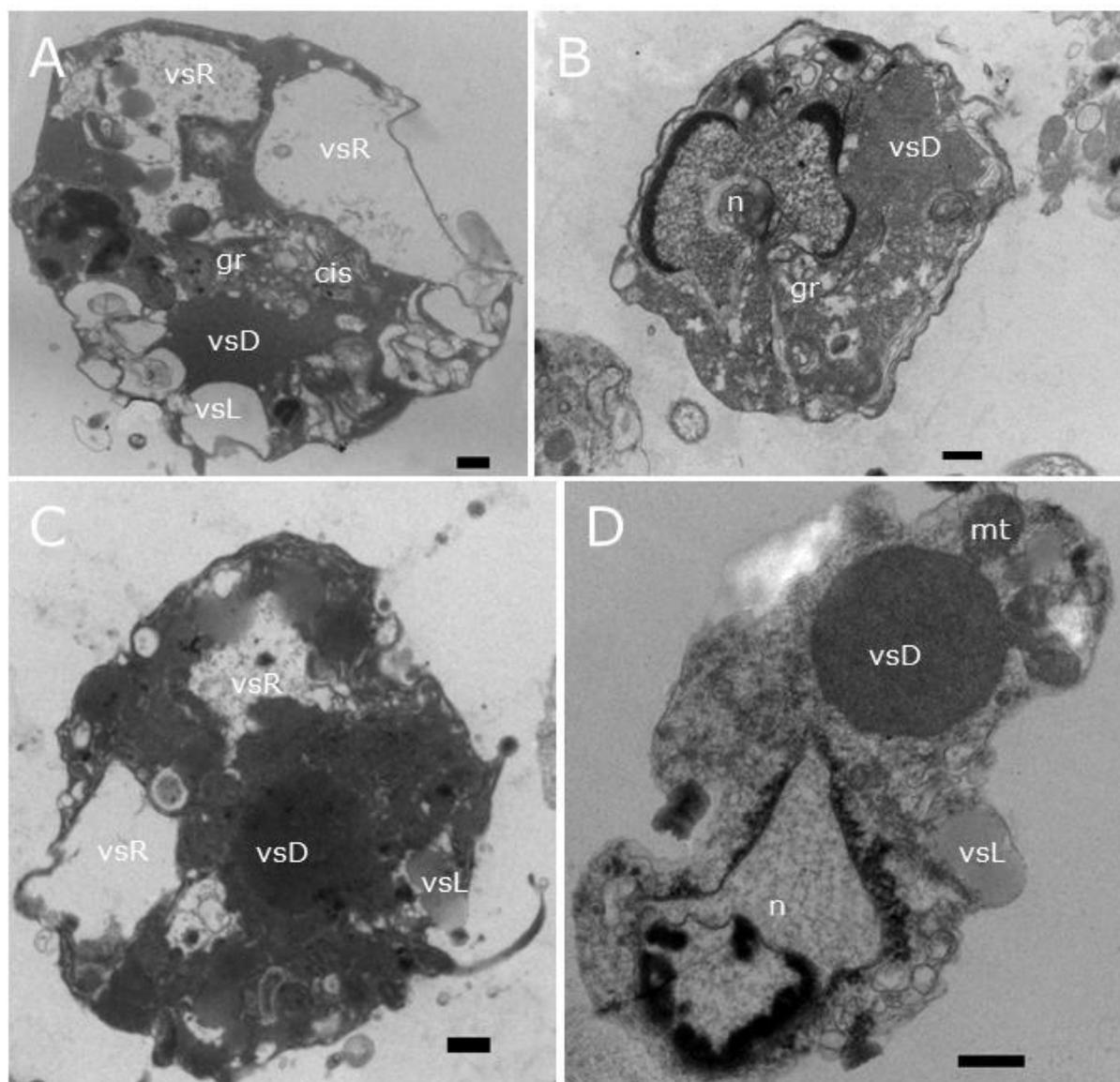


Figura 26: Ultraestrutura de células de cultura do papo de *B. tenagophila*.

A. Célula circular sem núcleo aparente e inúmeras vesículas eletrodensas (vsD) e rugosas (vsR) de vários tamanhos, e presença de cisternas (cis) e grânulos (gr) pelo citoplasma celular.

B. Célula circular, núcleo (n), de eletrodensidade moderada, e presença de algumas vesículas eletrodensas (vsD) e grânulos (gr). **C.** Mesmo tipo de célula em A, com vesículas de grande porte eletrodensas (vsD), rugosas (vsR) e pequenas eletrolúcidas (vsL). **D.** Célula de formato irregular com grande vesícula eletrodensa (vsD), pequenas vesículas eletrolúcidas (vsL), núcleo pouco denso (n), cisternas e mitocôndrias espalhadas pelo citoplasma. Barras medem 1 μm .

5.1.8 Morfologia celular: Píloro

As culturas de células da região do píloro, outra porção não muscular do estômago, apresentaram células em sua maioria esféricas, de pequeno porte e sem núcleo visível (figura 27). Não foram obtidas, para esse material, imagens da coloração por Giemsa.

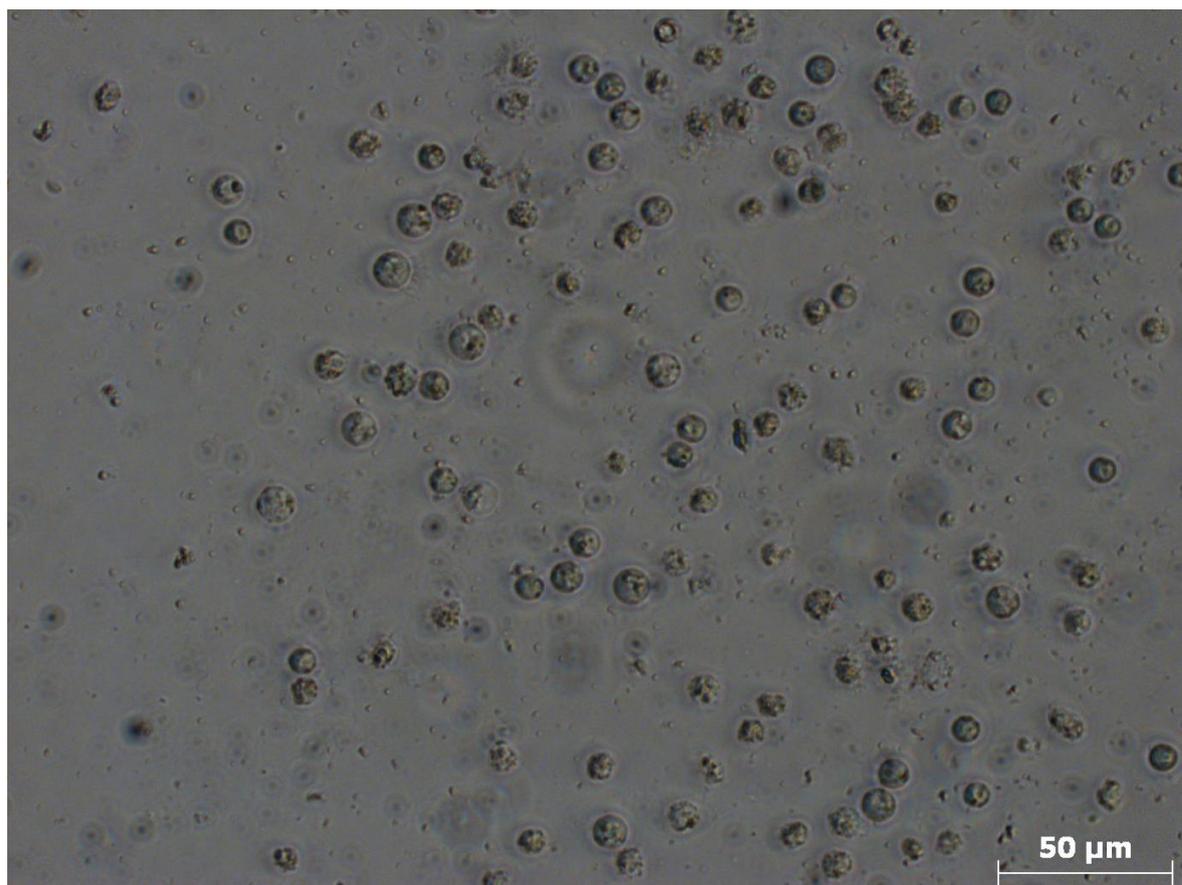


Figura 27: Células de cultura do piloro de *B. tenagophila*.

Cultura de células do piloro composta apenas por células pequenas e esféricas.

Observadas na MET, as células do piloro foram classificadas em seis tipos distintos. Três tipos apresentaram, como estrutura comum, a presença de vacúolos, sendo a primeira com um citoplasma de eletrodensidade média (figura 28A), a segunda, citoplasma de pouca eletrodensidade, mitocôndrias grandes e muitas cisternas no citoplasma (figura 28B) e a terceira de citoplasma eletrodenso, com vesículas grandes, mitocôndrias pequenas e muitas cisternas pelo citoplasma (figura 28C/F). Um quarto tipo celular, sem vacúolo aparente, apresentou um complexo de estruturas semelhantes lembrando a um processo de fagocitose (figura 28D), citoplasma denso, com algumas cisternas, e vesícula grande. Em outros dois tipos celulares, foi possível visualizar a estrutura do núcleo (figuras 28E/G). As células do papo apresentaram também estruturas de cílios, evidenciadas nos cortes mostrando o formato tubular, composto por nove filamentos duplos de dineína, na periferia da estrutura, e um par central (figuras 28H-J).

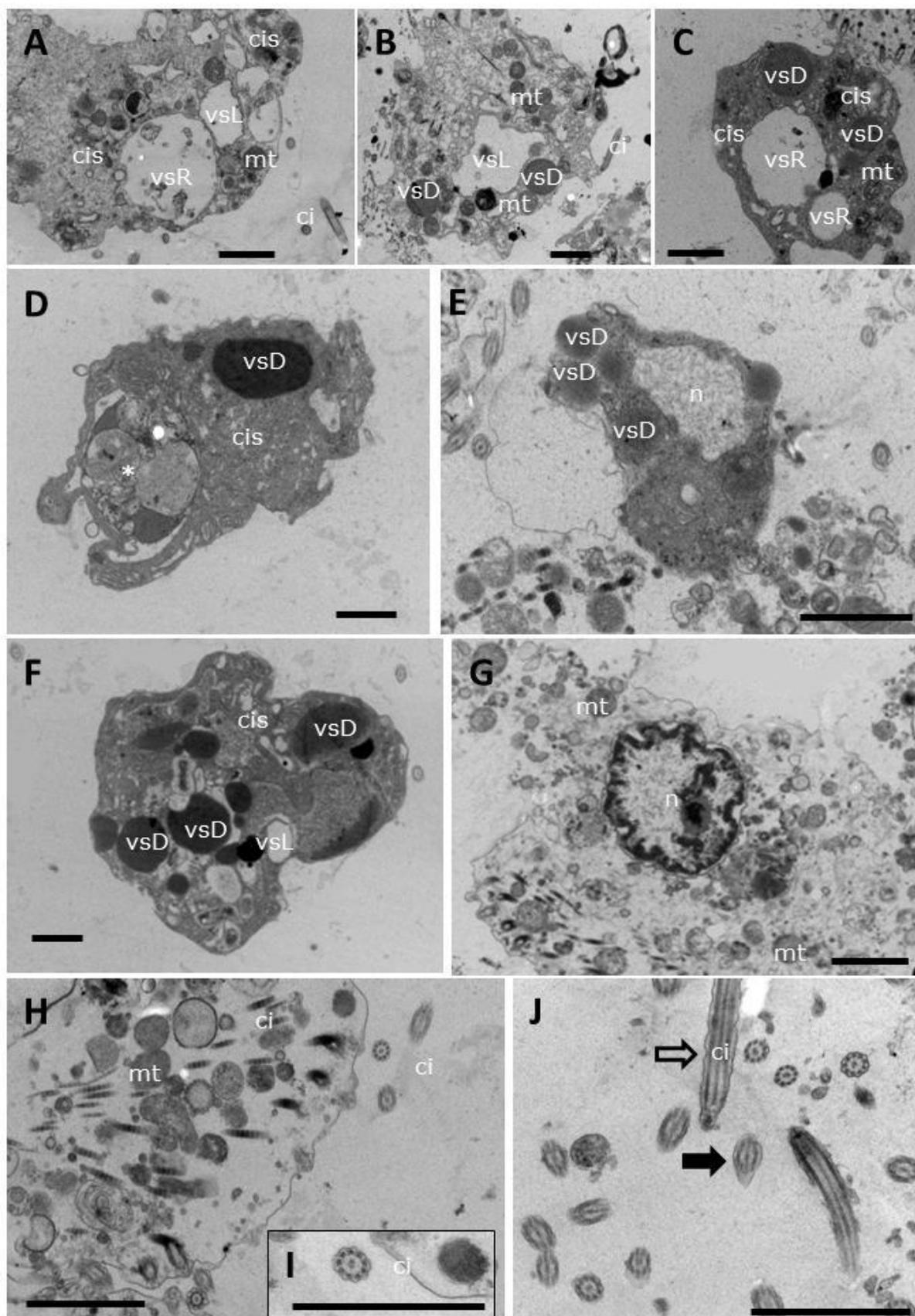


Figura 28: Ultraestrutura de células de cultura do piloro de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

5.1.9 Morfologia celular: Tentáculo

A cultura primária da região do tentáculo na porção cefalopodal do corpo do caramujo originou uma cultura predominantemente composta de células esféricas, de pequeno porte e sem núcleo visível (figura 29). No entanto, o baixo número de células obtidas a partir dessa cultura não possibilitou a obtenção de material corado para estudos de marcação por Giemsa nem em MET.

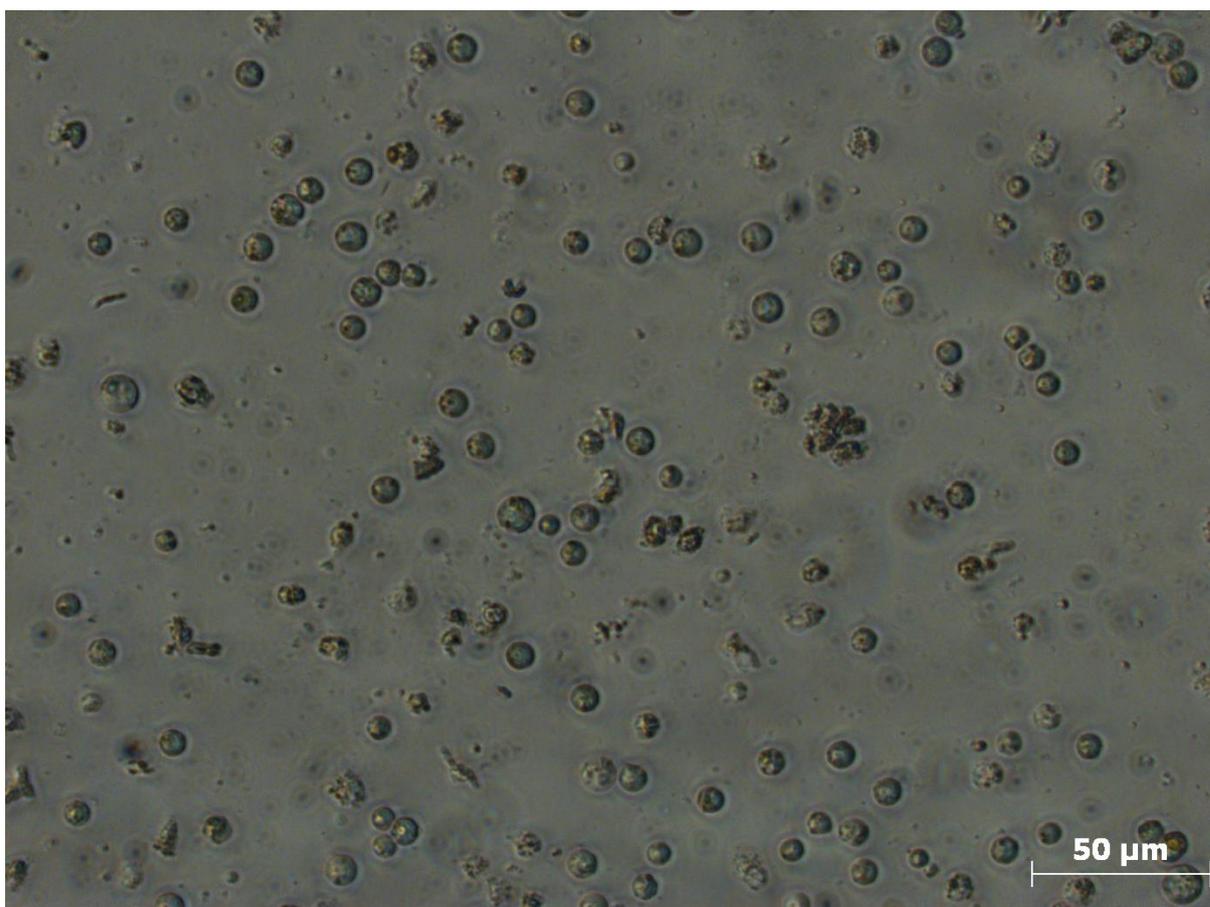


Figura 29: Células de cultura do tentáculo de *B. tenagophila*.

Cultura de células do tentáculo composta predominantemente por células pequenas e esféricas.

5.1.10 Morfologia celular: Tubo renal porção Sacular

A cultura da região sacular do tubo renal apresentou uma população predominantemente composta por células com núcleo visível na microscopia óptica. O tamanho do núcleo variava entre as células podendo ser pequeno até de grande porte, com a

célula apresentando um citoplasma reduzido (figura 30). Em algumas células foram identificadas capsulas provavelmente de secreção. Além das células com núcleo visível, também foram encontradas células cujo núcleo não foi visível ao microscópio óptico, e diâmetros variados.

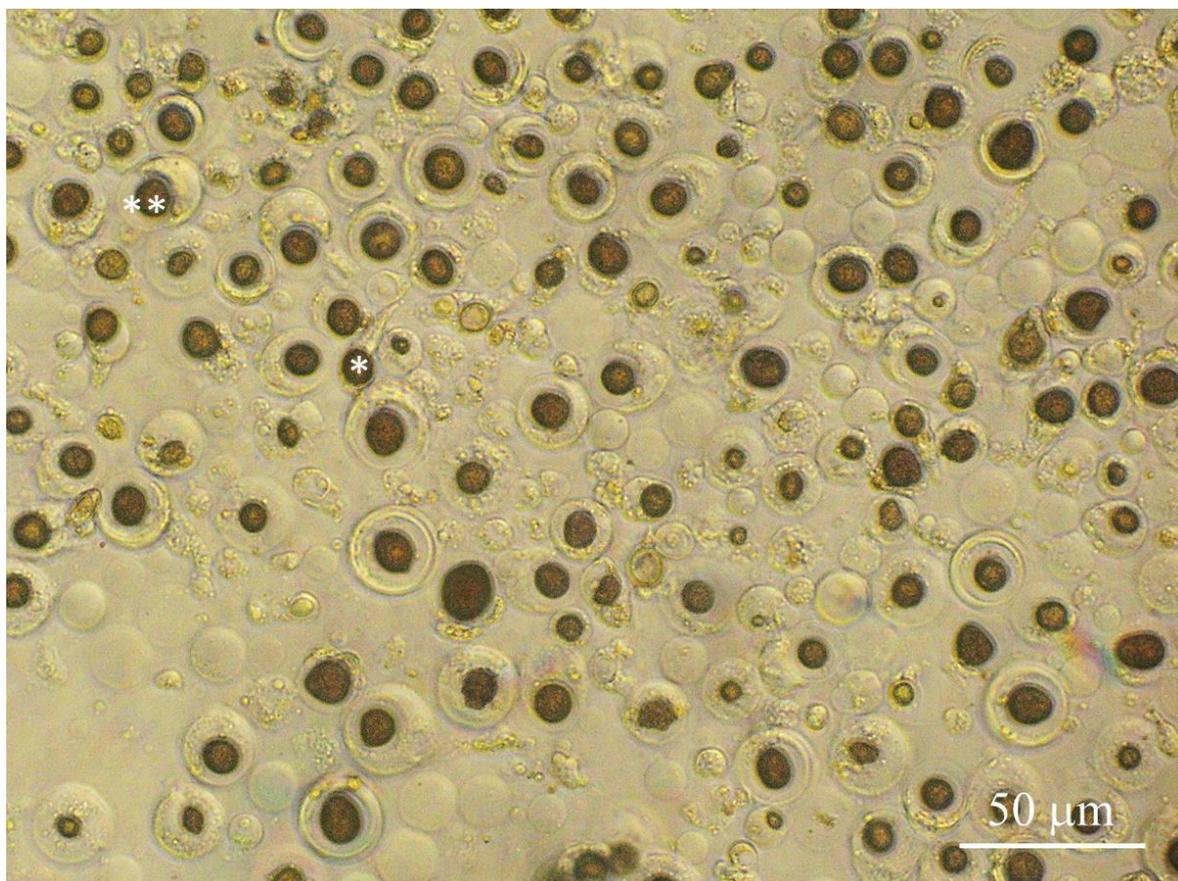


Figura 30: Células de cultura do TRpS de *B. tenagophila*.

Campo da cultura de células do TRpS, mostrando células de porte variado, com algumas apresentando núcleo visível na M.O. Algumas células (*) aparecem estendendo parte do citoplasma. Outras células aparecem eliminando parte do citoplasma (**) em uma capsula.

Na coloração por Giemsa foi possível identificar apenas dois tipos celulares devido à fragilidade do material, que não se adaptou bem às condições de fixação (figura 31).

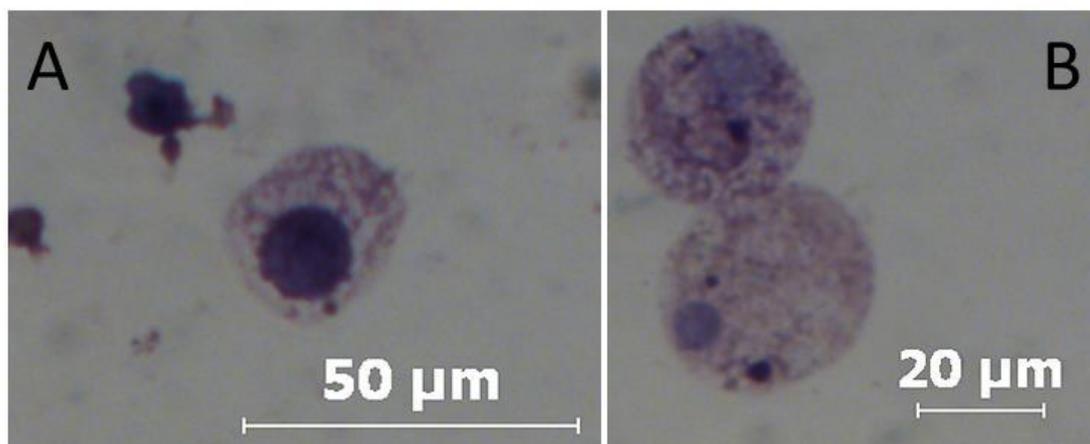


Figura 31: Cultura do TRpS de *B. tenagophila* corado com Giemsa.

A. Célula globosa com núcleo grande e excêntrico. **B.** Células globosas, com núcleo esférico, excêntrico e pequeno.

Uma das características observadas nas células dessa região foi a presença de uma ‘capsula’ em torno de algumas células e o alongamento do citoplasma apresentado por outras poucas células em cultura. Este prolongamento do citoplasma desse tipo celular foi identificado através de MET, mostrando que este fragmento é uma projeção citoplasmática rica em organelas, principalmente mitocôndrias (figura 32B). Esta célula apresentou um núcleo menor do que o padrão observado para outras células nessa cultura.

Em muitas células de cultura a capsula que aparece em torno da célula aparenta estar sendo descartada por ela. Através da MET, foi possível visualizar um tipo celular que parece descartar parte do citoplasma celular (figura 32A). O mesmo fato repete-se em outras imagens do tecido (figura 32D-E), indicando um possível padrão destas células.

Ao todo, foram identificados oito tipos celulares diferentes nas células da cultura do TRpS em MET. Uma característica muito comum a estas células foi a grande quantidade de mitocôndrias presentes nas células desse tecido. Algumas dessas apresentaram núcleo com baixa eletrodensidade e muitas cisternas no citoplasma celular (figura 32).

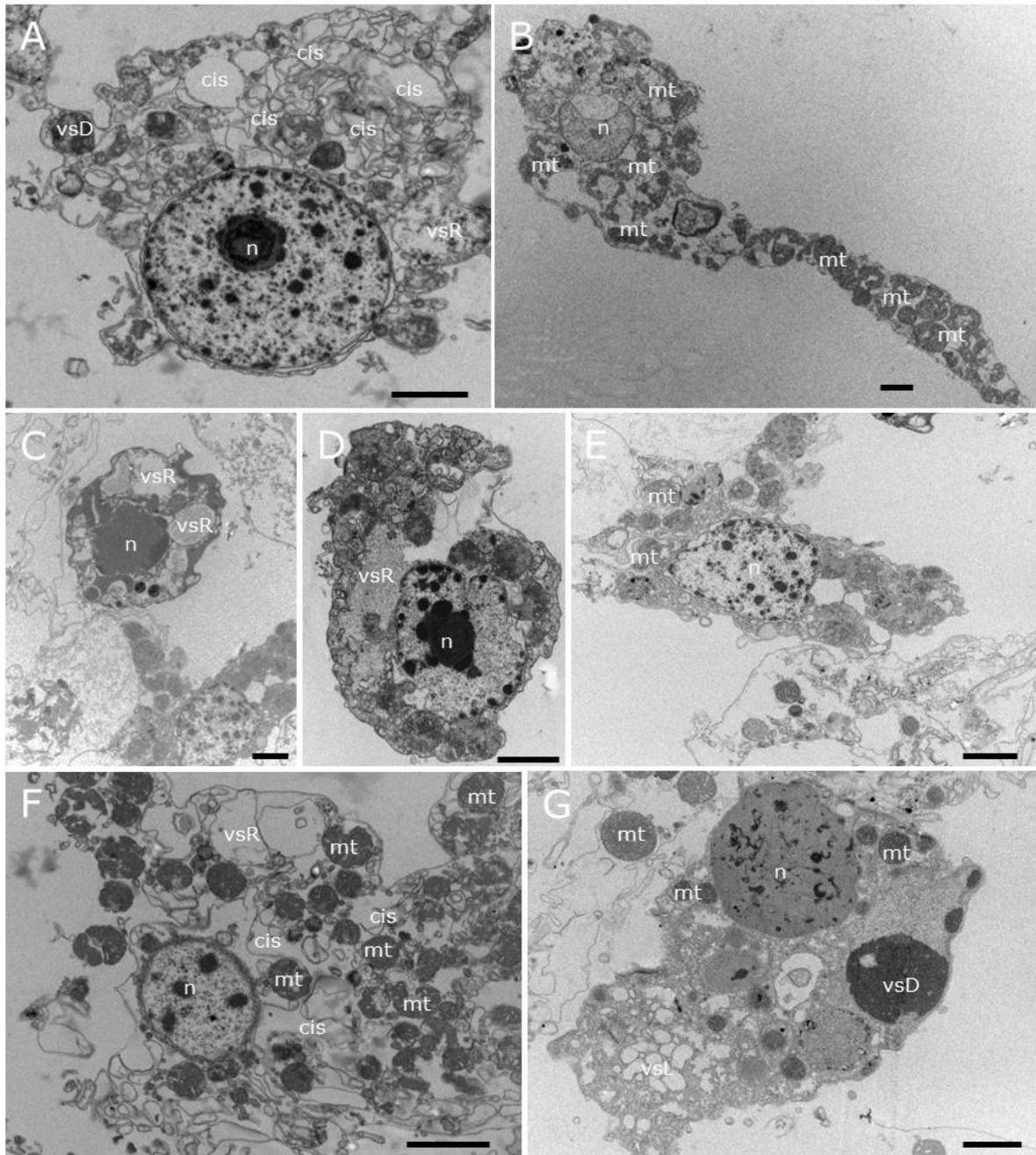


Figura 32: Ultraestrutura de células de cultura do TRpS de *B. tenagophila*.

Imagens mostrando cada um dos oito tipos celulares encontrados nas análises em MET da cultura do TRpS (A – G). Dois tipos distintos podem ser vistos na mesma foto (C). Prolongamento celular atípico, rico em mitocôndrias (mt), pode ser visto em um dos tipos celulares (E). Células com núcleo pouco denso, indicando grande atividade celular (A/D/E/F). Citoplasma das células com muitas mitocôndrias (mt) e cisternas (cis), poucas vesículas eletrodensas (vsD) e rugosas (vsR). Barras medem 1 μ m.

5.1.11 Morfologia celular: Tubo renal porção Tubular

As culturas da porção tubular do tubo renal apresentaram populações com predomínio de células esféricas, de grande porte e sem núcleo visível. Uma parte da população apresentou pequeno porte (figura 33).

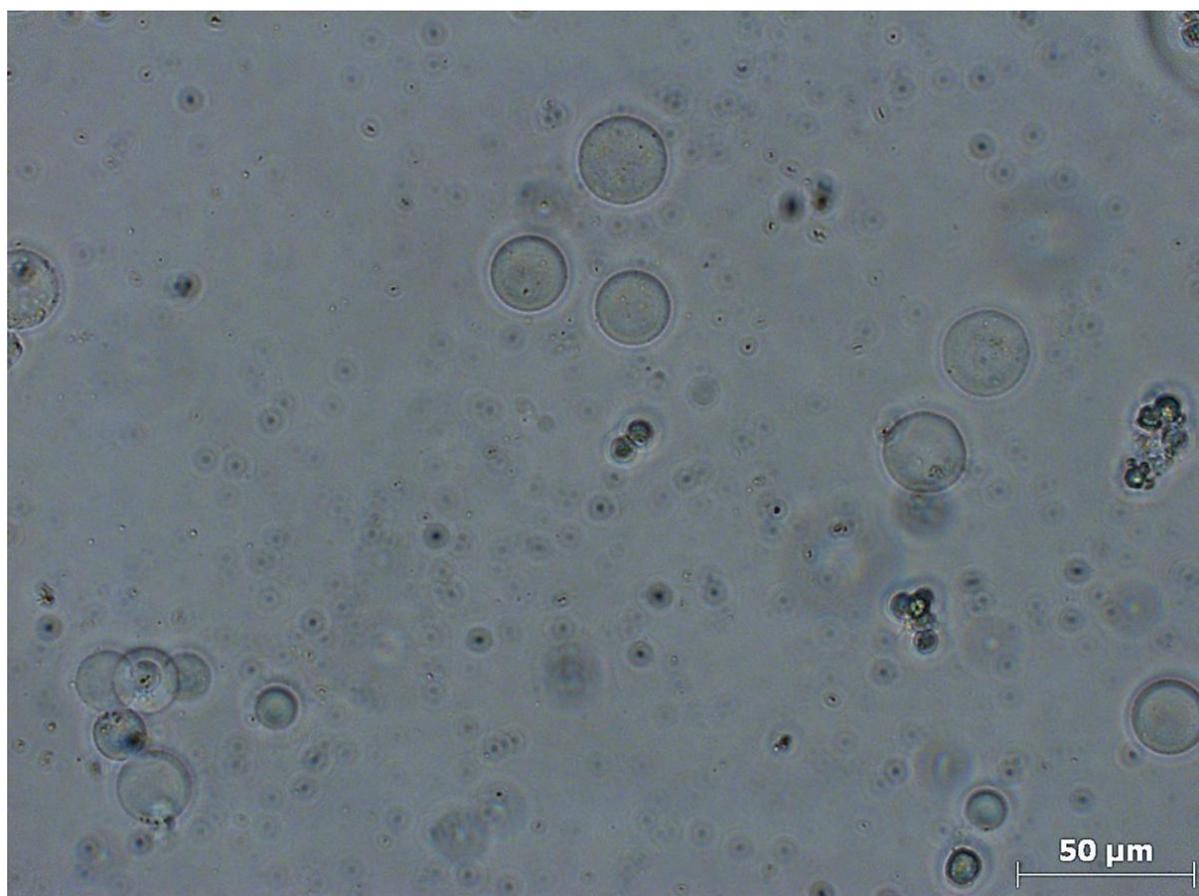


Figura 33: Células de cultura do TRpT de *B. tenagophila*.

Campo da cultura de células do TRpT, mostrando células de tamanhos variados.

Através da coloração por Giemsa foi possível visualizar grânulos nos citoplasmas das células maiores (figura 34A/C).

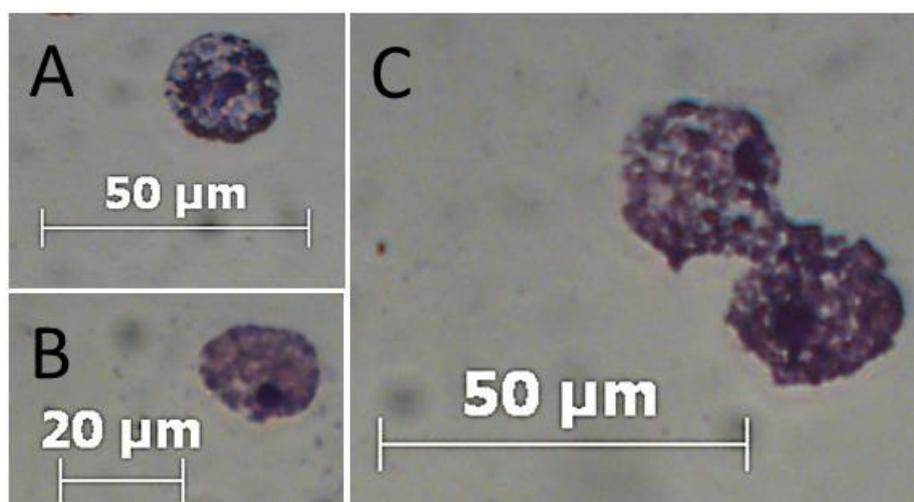


Figura 34: Cultura do TRpT de *B. tenagophila* corado com Giemsa.

A. Célula globosa de maior porte apresentando grânulos no citoplasma. **B.** Célula globosa de menor porte. **C.** Duas células globosas, grandes, com aparente comunicação entre seus citoplasmas.

Através da MET foi possível distinguir sete subtipos morfológicos diferentes de células da cultura primária do TRpT (figura 35).

Uma estrutura, até então não identificada na microscopia óptica, foram os cílios, presentes nessas células, sendo encontrado em cortes longitudinais de sua raiz intracelular (figura 35E) ou cortes transversais de sua estrutura (figura 35C/J/K).

O citoplasma, rico em organelas, apresentou muitas vesículas (figura 35A/D) e cisternas (figura 35G-H). Em algumas células dessa cultura a quantidade de mitocôndrias presentes no citoplasma foi extremamente alta, sendo estas organelas de tamanho robusto, podendo medir até 1 µm (figura 35E-I).

Além das vesículas intracelulares, foi identificada a presença de estruturas vesiculares próximo às células, como corpos recentemente externados por estas células (figura 35B).

O núcleo, quando identificado (figura 35E/F/G/J), apresentou-se pouco eletrodense, em formato circular ou sem forma definida.

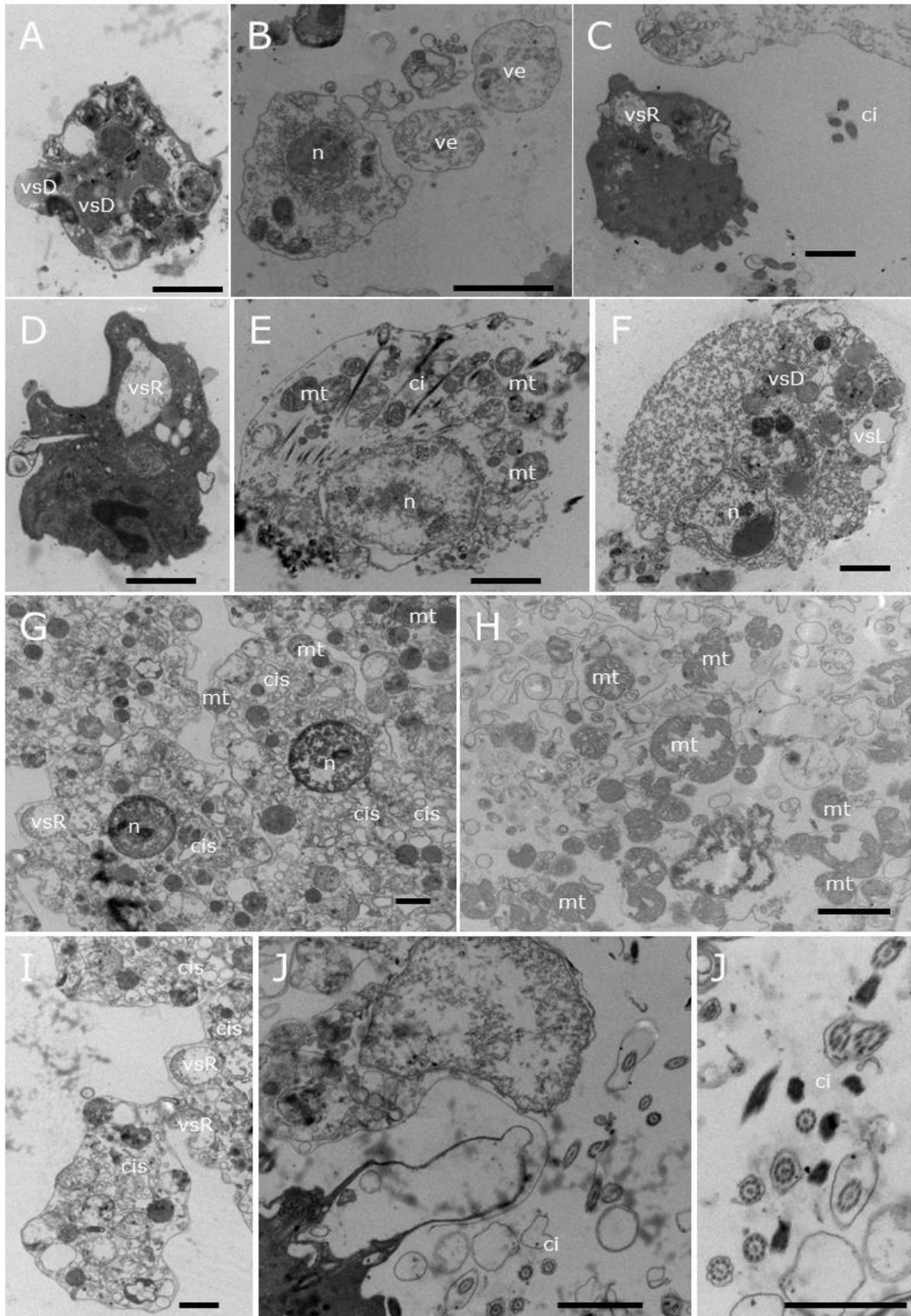


Figura 35: Ultraestrutura de células de cultura do TRpT de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

5.2 PERFIL DE AÇUCARES DE SUPERFÍCIE

Utilizando lectinas conjugadas como sondas fluorescentes, foi possível identificar subpopulações celulares nas culturas do manto, ovotesti e tubo renal porção sacular e tubular.

As células marcadas para os açúcares de superfície foram agrupadas na tabela 4, descrevendo o número de subpopulações obtidas em citometria de fluxo (CTF) e intensidade da marcação em microscopia de fluorescência (MF) para cada cultura analisada.

Tabela 4 – Perfil de marcação de lectinas em CTF (número de populações após marcação) e MF (intensidade de marcação visualizada) para células da cultura primária de quatro tecidos distintos.

Resíduos reconhecidos	Tecidos								Lectina
	Mt		Ov		TRpS		TRpT		
	MF	CTF	MF	CTF	MF	CTF	MF	CTF	
α -manopirranose	-	4	-	4	-	4	*	3	ConA
α -glicopirranose	-	4	-	4	-	4	*	3	ConA
<i>N</i> -acetil-D-glicosamina	-	4	-	4	-	4	-	4	GS-II
<i>N</i> -acetil-D-galactosamina	*	4	*	4	-	4	-	4	IB ₄
α -D-galactosil	*	4	*	4	-	4	-	4	IB ₄
α - <i>N</i> -acetil-galactosamina	-	4	**	4	-	4	*	4	HPA
Aglutinação de Leucócitos	-	4	*	4	-	4	-	3	PHA-L
β -galactose	-	4	-	3	-	5	-	4	PNA
α - <i>N</i> -acetil-galactosamina	*	4	***	4	*	4	*	4	SBA
β - <i>N</i> -acetil-galactosamina	*	4	***	4	*	4	*	4	SBA
galactopiranosil	*	4	***	4	*	4	*	4	SBA
<i>N</i> -acetilglicosamina	***	4	***	3	***	3	***	3	WGA
ácido <i>N</i> -acetilneuramínico	***	4	***	3	***	3	***	3	WGA

- marcação negativa * marcação leve ** marcação moderada ***marcação forte

A intensidade de marcação para MF foi obtida através da análise das imagens, de forma subjetiva. Quando após marcação com as lectinas nenhuma estrutura com formato de célula era encontrada a cultura era considerada negativa. Na presença de células marcadas a intensidade foi determinada a partir da quantidade de espécimes marcados.

O perfil de marcação no manto em MF apresentou marcação positiva apenas para as lectinas IB₄, SBA e WGA (figura 36).

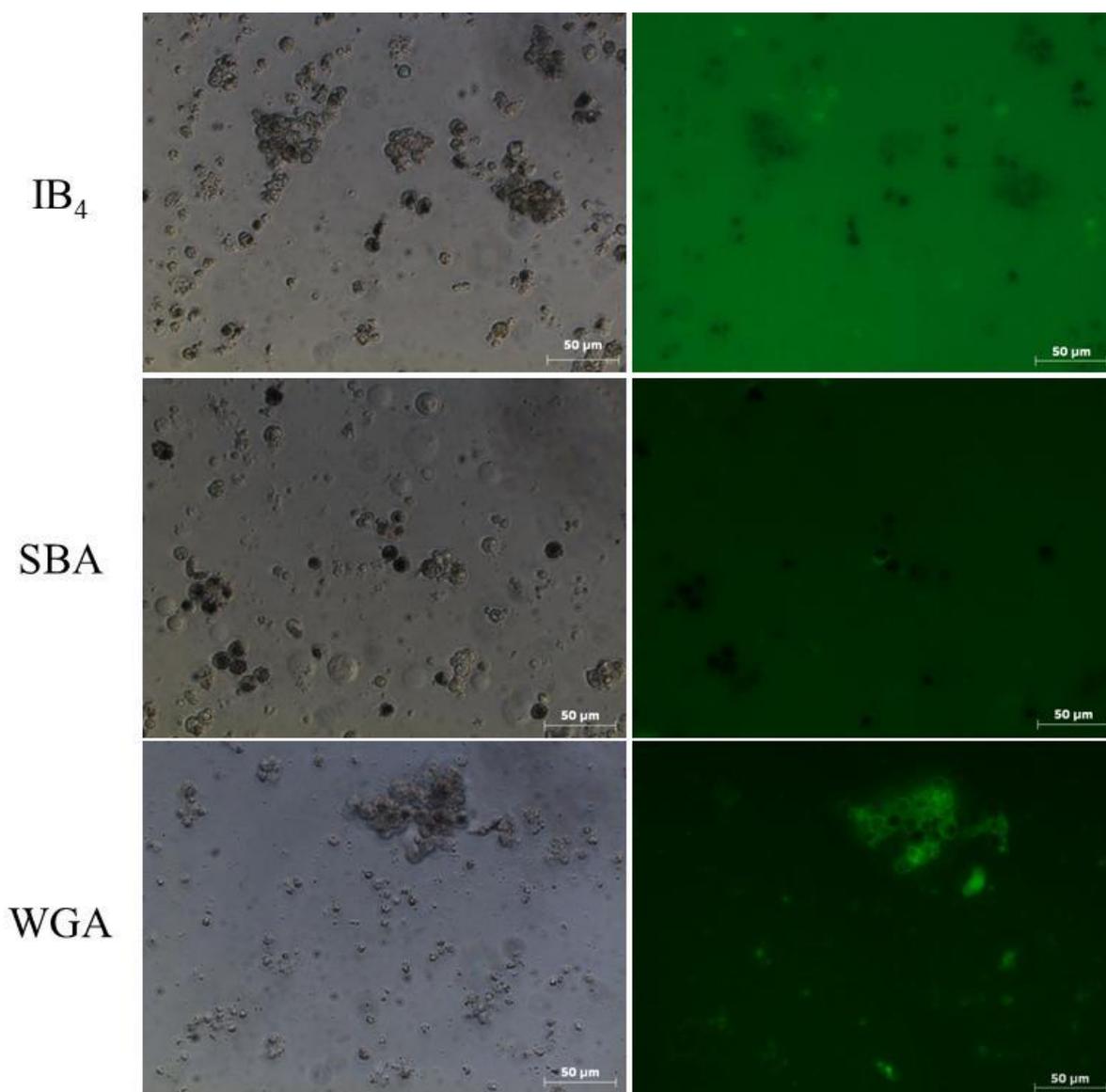
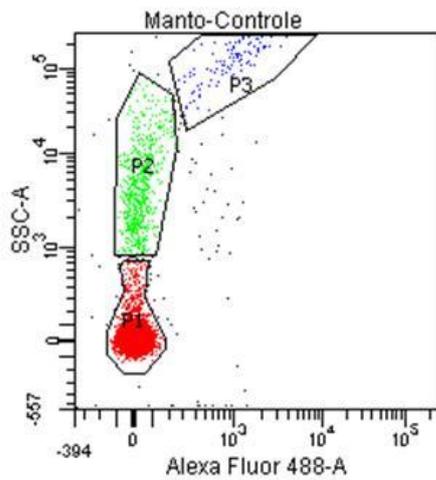


Figura 36: Microscopia de fluorescência para células da cultura primária do manto de *B. tenagophila*.

A cultura apresentou somente células marcadas pelas lectinas, IB₄, SBA e WGA. Coluna da esquerda: microscopia óptica invertida; coluna da direita; microscopia de fluorescência. À esquerda de cada fila está a lectina representada na foto de marcação.

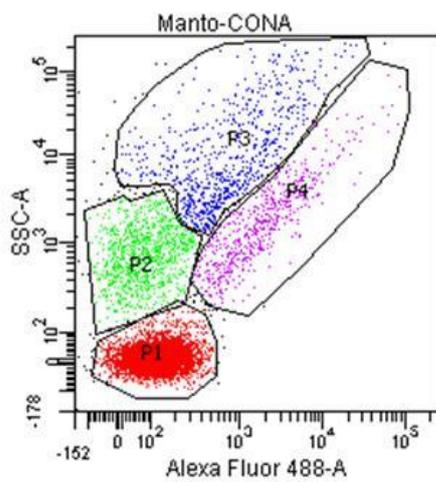
As análises por citometria de fluxo para a cultura de células do manto mostraram que este tecido, de acordo com o padrão de granulosidade, está dividido em três subpopulações quando não marcadas por nenhum fluorocromo. Todas as análises com as lectinas testadas mostraram que existem quatro subpopulações, sendo que para WGA todas as populações foram positivas, para HPA, ConA, PNA, PHA-L e IB₄ foram encontradas duas sub negativas e duas positivas para estas marcações. Já para as lectinas SBA e GSII a cultura do manto apresentou um padrão de três subpopulações negativas e uma positiva (figura 37).



A

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: Manto
 Tube Name: Controle

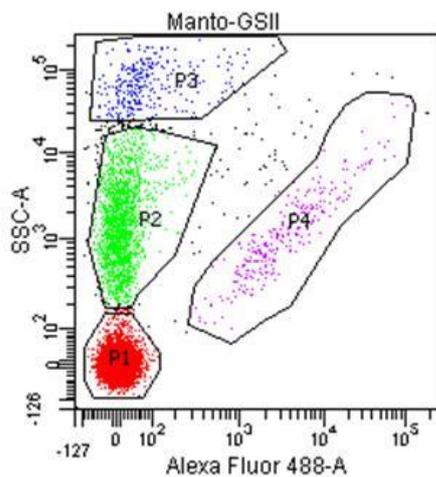
Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor... Mean	Mean
All Events	10,000	###	2,786	27
P1	9,069	90.7	-3	1
P2	676	6.8	7,290	34
P3	110	1.1	126,054	1,043



B

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: Manto
 Tube Name: CONA

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor... Mean	Mean
All Events	10,000	###	2,179	510
P1	7,550	75.5	2	139
P2	986	9.9	854	84
P3	753	7.5	21,919	1,542
P4	564	5.6	3,201	4,164

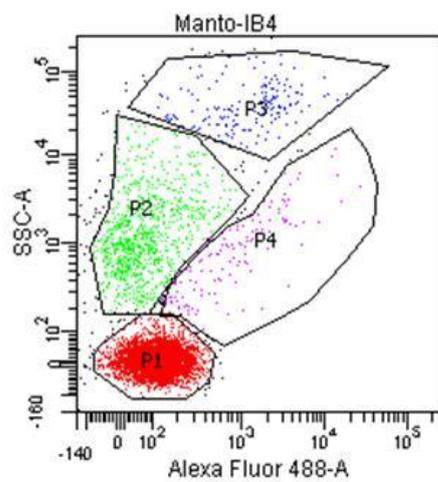


C

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: Manto
 Tube Name: GSII

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor... Mean	Mean
All Events	10,000	###	3,343	297
P1	7,431	74.3	0	7
P2	1,816	18.2	2,597	15
P3	294	2.9	76,884	142
P4	271	2.7	2,178	7,686

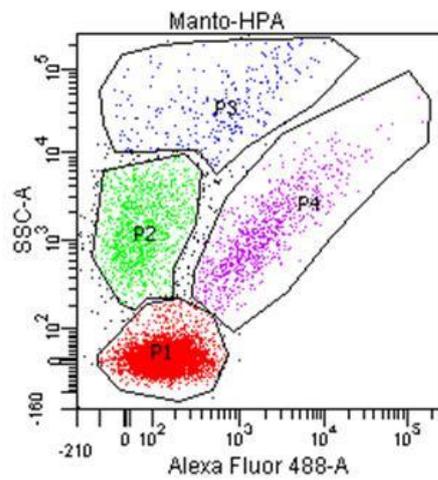
Figura 37-1: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do manto de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)



D

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: Manto
 Tube Name: IB4

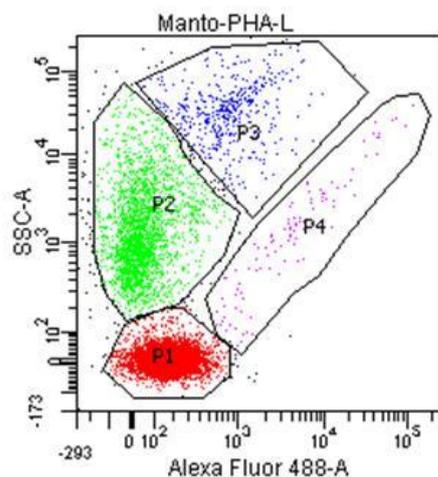
Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	1,200	179
P1	8,658	86.6	-1	118
P2	879	8.8	2,124	93
P3	171	1.7	47,010	2,007
P4	144	1.4	1,224	1,809



E

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: Manto
 Tube Name: HPA

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	2,185	498
P1	7,474	74.7	2	167
P2	1,217	12.2	1,842	66
P3	275	2.8	54,107	1,303
P4	826	8.3	2,052	3,874



F

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: Manto
 Tube Name: PHA-L

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	3,065	326
P1	6,820	68.2	-1	190
P2	2,477	24.8	2,816	59
P3	446	4.5	42,074	1,113
P4	106	1.1	3,448	11,008

Figura 37-2: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do manto de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

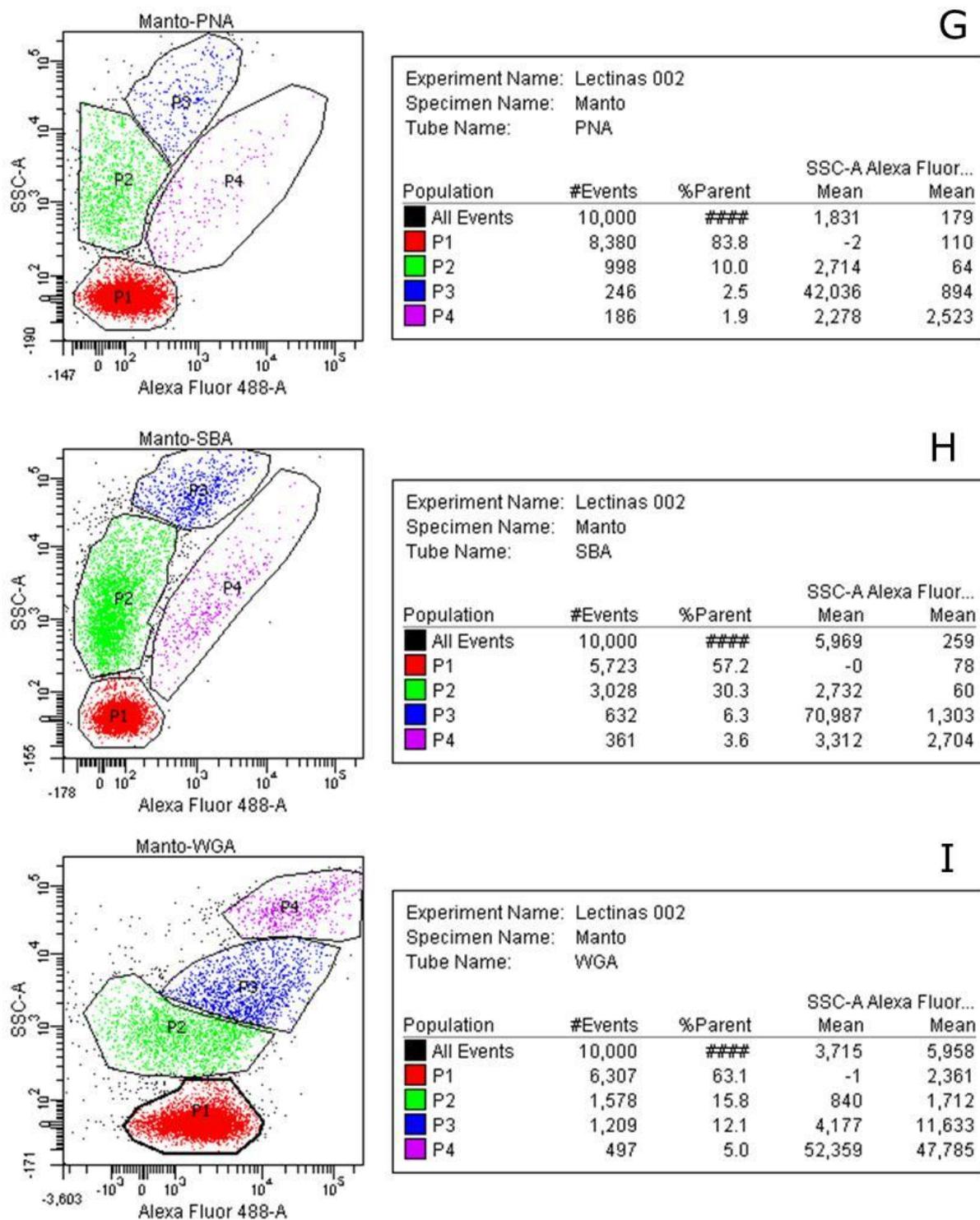


Figura 37-3: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do manto de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

Para cultura primária do ovotesti, a MF foi capaz de identificar positividade nas células marcadas pelas lectinas HPA, IB₄, PHA-L, SBA e WGA (figura 38).

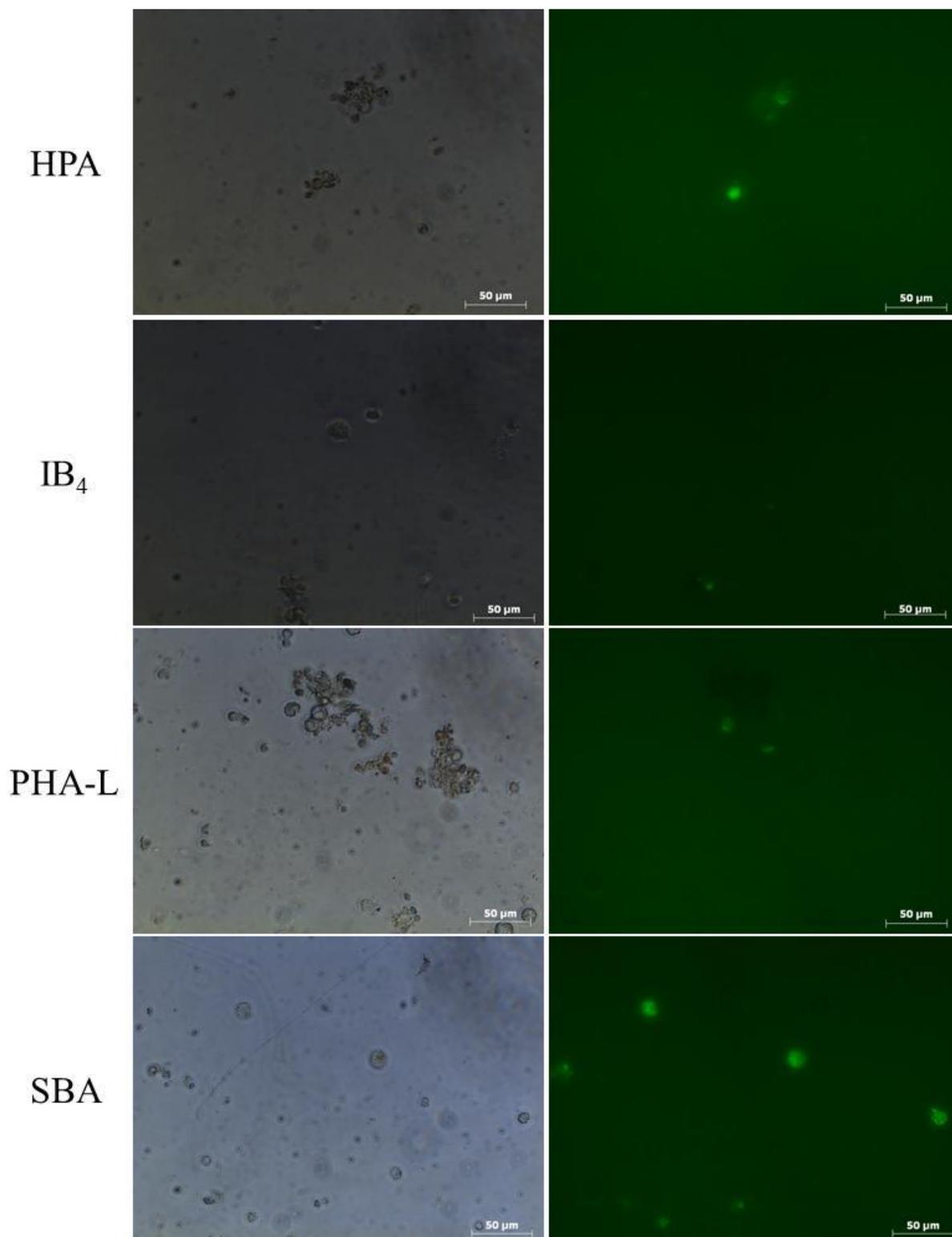


Figura 38-1: Microscopia de fluorescência para células da cultura primária de ovotestis de *B. tenagophila*.

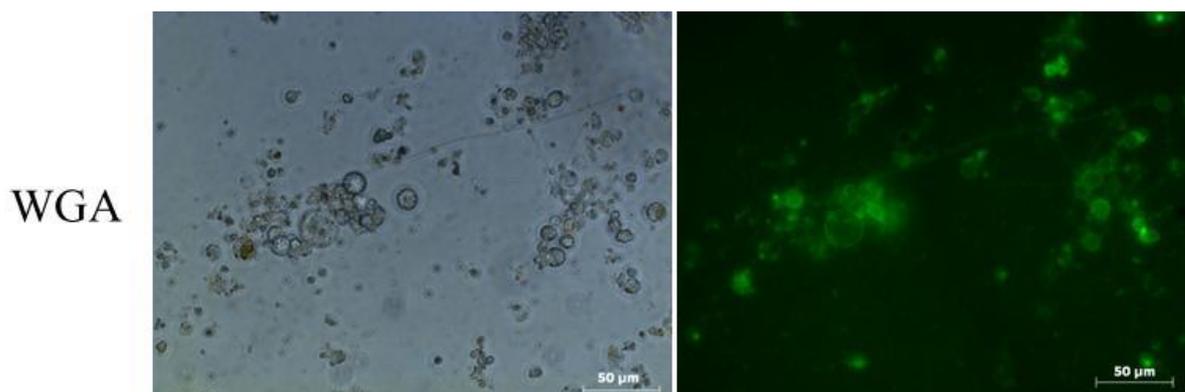
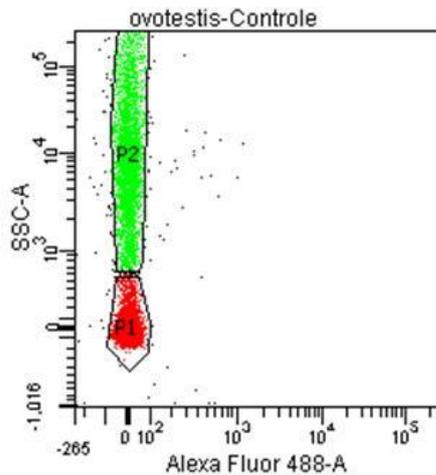


Figura 38-2: Microscopia de fluorescência para células da cultura primária de ovotesti de *B. tenagophila*.

Células positivas para as lectinas HPA, IB₄, PHA-L, SBA e WGA. Coluna da esquerda: microscopia óptica convencional; coluna da direita: microscopia de fluorescência. À esquerda de cada fila está a lectina representada na foto de marcação.

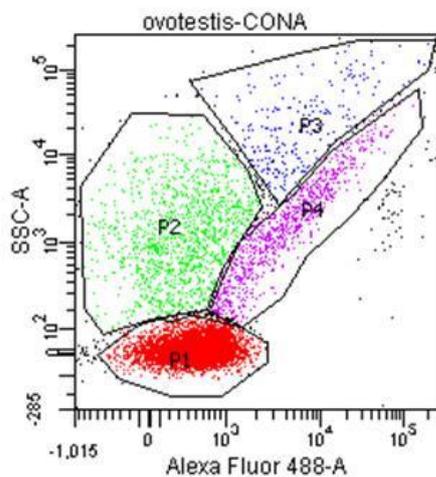
As análises de citometria de fluxo para a cultura de células do ovotesti mostraram que este tecido, de acordo com o padrão de granulosidade, está dividido em duas subpopulações quando não marcadas por nenhum fluorocromo. Com as lectinas testadas mostraram que existem na sua maioria quatro subpopulações para HPA, ConA, PNA, PHA-L, GSII e SBA sendo duas subpopulações negativas e duas positivas para estas marcações e a lectina IB₄ apresentou perfil de quatro subpopulações sendo três negativas e uma positiva. A marcação para a lectina WGA identificou três subpopulações, duas negativas e uma positiva (figura 39).



A

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: ovotestis
 Tube Name: Controle

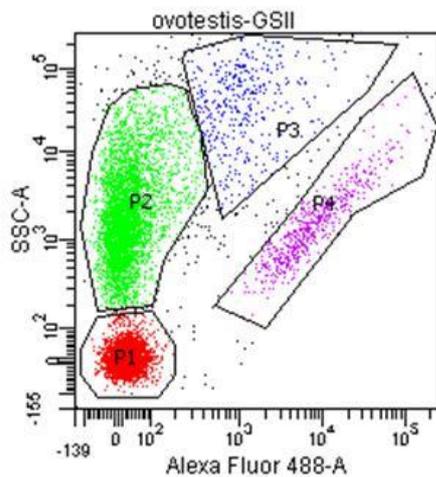
Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	11,828	3
P1	6,285	62.8	-39	1
P2	3,525	35.2	30,735	3



B

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: ovotestis
 Tube Name: CONA

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	2,172	2,581
P1	7,398	74.0	1	569
P2	1,192	11.9	2,091	403
P3	236	2.4	35,050	13,288
P4	856	8.6	2,931	8,238

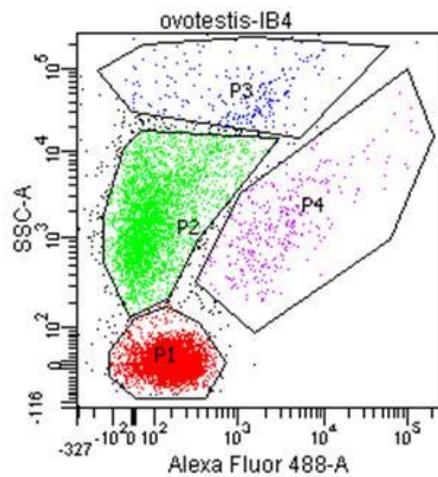


C

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: ovotestis
 Tube Name: GSII

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	5,135	1,108
P1	4,445	44.4	0	24
P2	4,371	43.7	4,116	34
P3	396	4.0	53,446	1,936
P4	574	5.7	2,531	14,848

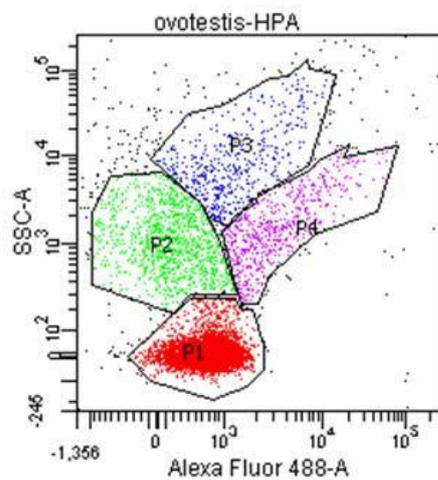
Figura 39-1: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do ovotesti de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)



D

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: ovotestis
 Tube Name: IB4

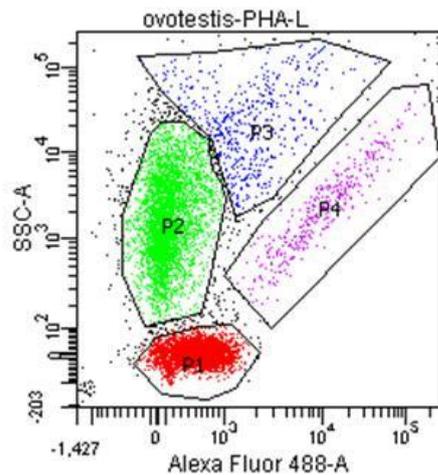
Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor... Mean	Mean
All Events	10,000	####	3,167	509
P1	5,700	57.0	1	197
P2	3,438	34.4	2,869	133
P3	219	2.2	61,082	1,987
P4	329	3.3	2,607	7,903



E

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: ovotestis
 Tube Name: HPA

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor... Mean	Mean
All Events	10,000	####	1,835	1,377
P1	7,509	75.1	1	741
P2	1,121	11.2	1,332	183
P3	461	4.6	13,095	1,875
P4	590	5.9	2,062	5,572

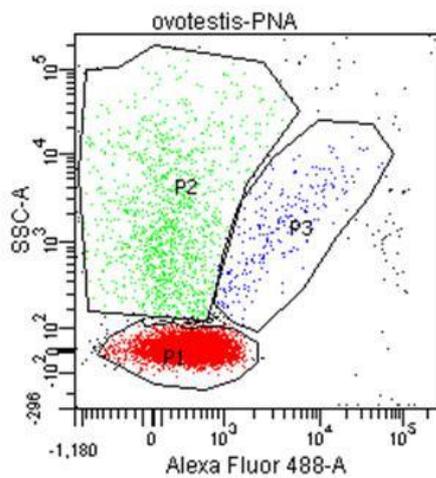


F

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: ovotestis
 Tube Name: PHA-L

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor... Mean	Mean
All Events	10,000	####	4,614	1,695
P1	4,675	46.8	-2	541
P2	3,990	39.9	2,674	141
P3	517	5.2	34,598	2,818
P4	383	3.8	3,999	20,027

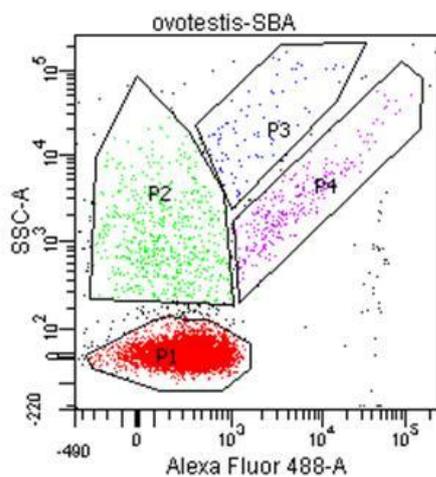
Figura 39-2: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do ovotesti de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)



G

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: ovotestis
 Tube Name: PNA

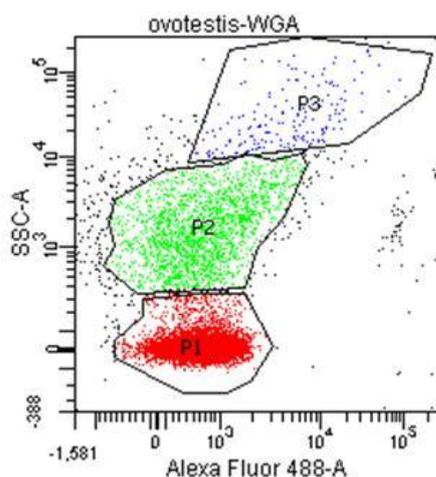
Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	1,483	1,228
P1	8,341	83.4	-4	477
P2	1,184	11.8	6,449	246
P3	241	2.4	2,258	5,972



H

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: ovotestis
 Tube Name: SBA

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	793	932
P1	8,805	88.0	1	387
P2	610	6.1	2,010	207
P3	79	0.8	34,454	2,874
P4	282	2.8	4,689	9,768



I

Experiment Name: Lectinas 002
 Specimen Name: ovotestis
 Tube Name: WGA

Population	#Events	%Parent	SSC-A Alexa Fluor...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	1,791	1,653
P1	7,419	74.2	6	704
P2	1,989	19.9	2,001	874
P3	177	1.8	38,117	9,048

Figura 39-3: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do ovotesti de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

A cultura primária do TRpS foi positiva nas marcações com as lectinas SBA e WGA em MF (figura 40).

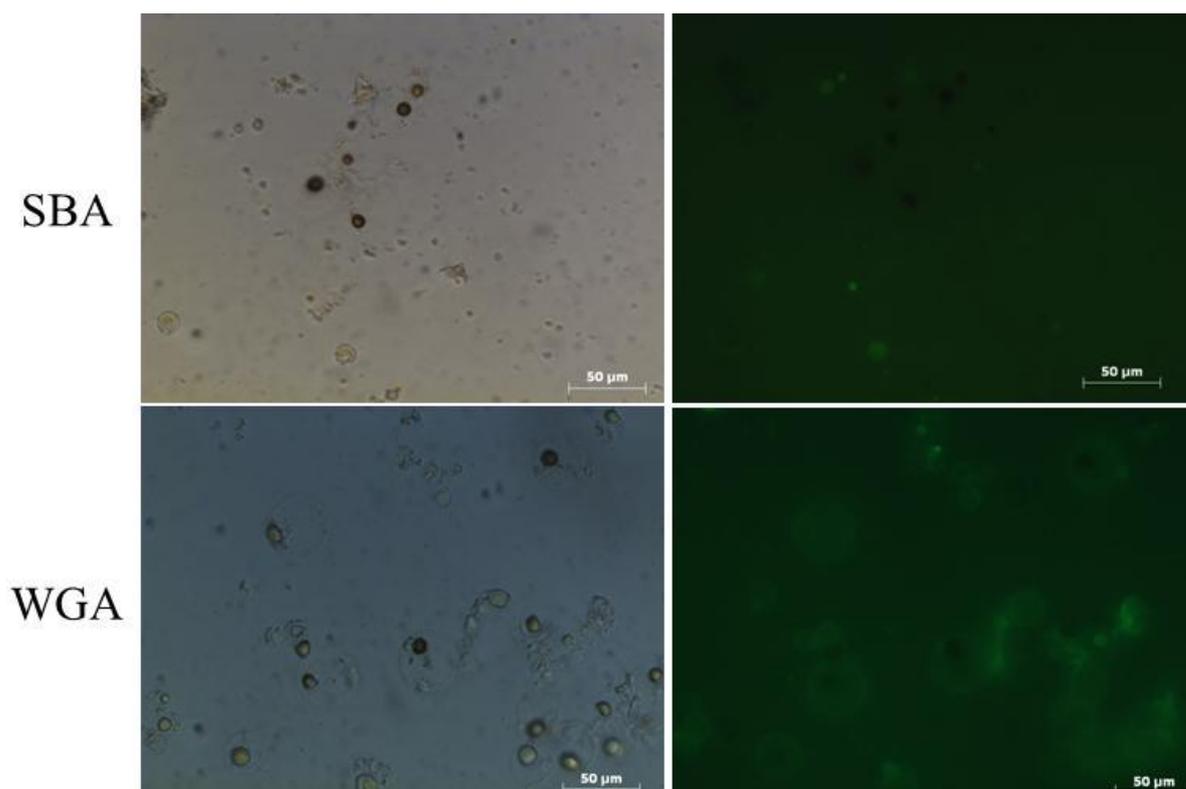
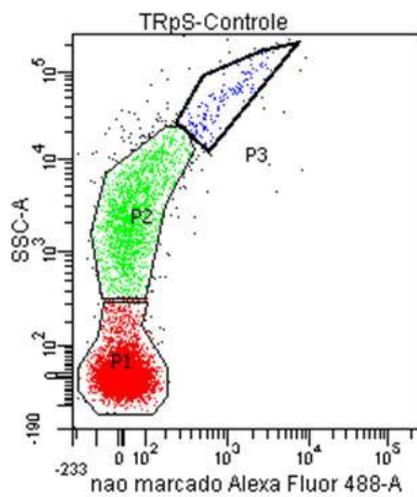


Figura 40: Microscopia de fluorescência para células da cultura primária da porção sacular do tubo renal de *B. tenagophila*.

Células positivas para as lectinas SBA e WGA. Coluna da esquerda: microscopia óptica invertida; coluna da direita; microscopia de fluorescência. À esquerda de cada fila está a lectina representada na foto de marcação.

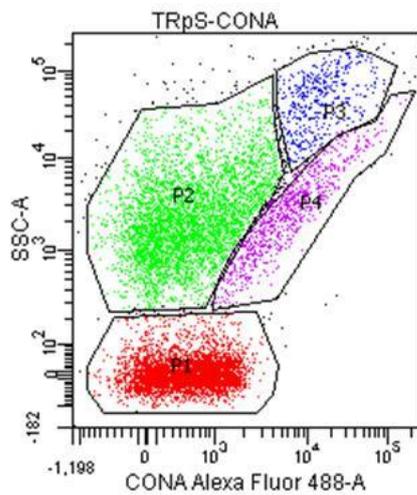
As análises por citometria de fluxo para a cultura de células da porção sacular do tubo renal mostraram que este tecido pode ser dividido em três subpopulações segundo a granulosidade quando não marcadas por nenhuma sonda. Uma das subpopulações, de maior granulosidade, apresentou alguma autofluorescência no espectro de emissão do fluorocromo utilizado. A figura 41 apresenta os resultados após a marcação com as lectinas, onde quatro subpopulações foram identificadas para as lectinas ConA, GSII, PHA-L e SBA (duas negativas e duas positivas) e para a lectina HPA (uma negativa e três positivas). A marcação pela lectina WGA identificou três subpopulações (uma negativa e duas positivas) e a lectina PNA separou em cinco subpopulações (três negativas e duas positivas).



A

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpS
 Tube Name: Controle

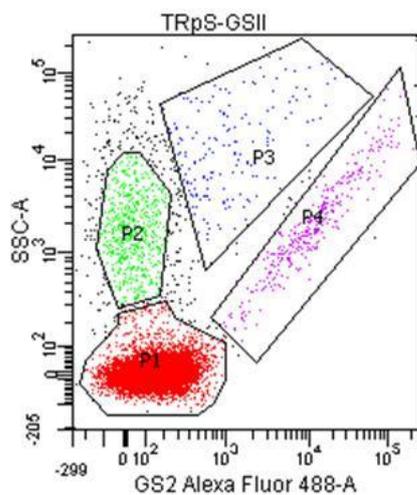
Population	#Events	%Parent	SSC-A nao marca...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	####	2,018	89
P1	8,053	80.5	-6	8
P2	1,650	16.5	3,636	58
P3	133	1.3	55,571	1,169



B

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpS
 Tube Name: CONA

Population	#Events	%Parent	SSC-A CONA Alex...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	####	5,609	2,765
P1	4,120	41.2	-1	579
P2	4,316	43.2	3,790	765
P3	443	4.4	52,918	18,849
P4	870	8.7	3,818	10,510

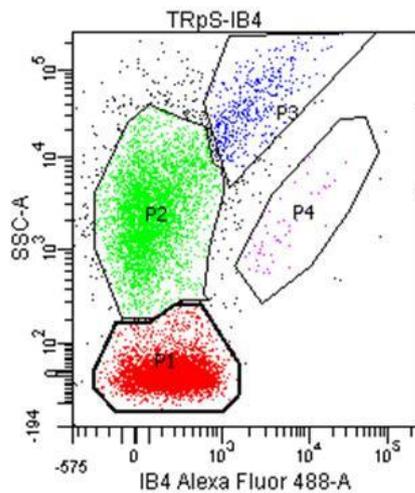


C

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpS
 Tube Name: GSII

Population	#Events	%Parent	SSC-A GS2 Alexa ...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	####	1,327	1,151
P1	8,587	85.9	-1	168
P2	603	6.0	2,392	38
P3	172	1.7	27,200	2,556
P4	333	3.3	4,129	23,676

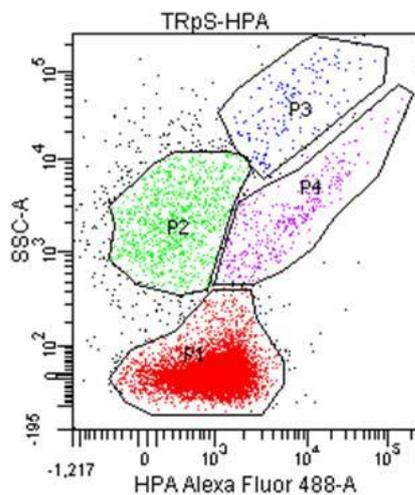
Figura 41-1: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção sacular do tubo renal de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)



D

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpS
 Tube Name: IB4

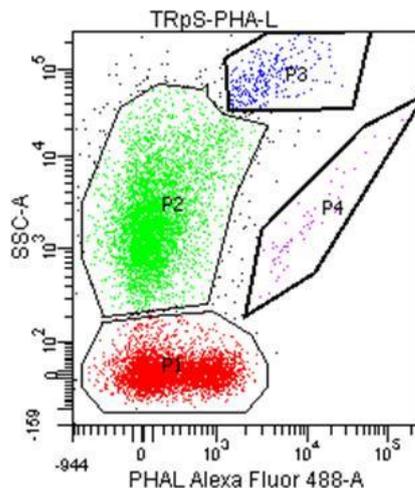
Population	#Events	%Parent	SSC-A IB4 Alexa Fl...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	5,261	512
P1	5,055	50.6	-8	305
P2	4,121	41.2	3,723	134
P3	443	4.4	54,538	3,295
P4	52	0.5	2,325	6,817



E

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpS
 Tube Name: HPA

Population	#Events	%Parent	SSC-A HPA Alexa ...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	1,792	1,695
P1	8,195	82.0	-1	1,169
P2	947	9.5	2,832	398
P3	164	1.6	53,044	9,660
P4	339	3.4	3,432	10,884



F

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpS
 Tube Name: PHA-L

Population	#Events	%Parent	SSC-A PHAL Alexa...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	5,015	545
P1	4,757	47.6	2	369
P2	4,721	47.2	3,965	144
P3	274	2.7	88,551	4,703
P4	60	0.6	2,920	16,744

Figura 41-2: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção sacular do tubo renal de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

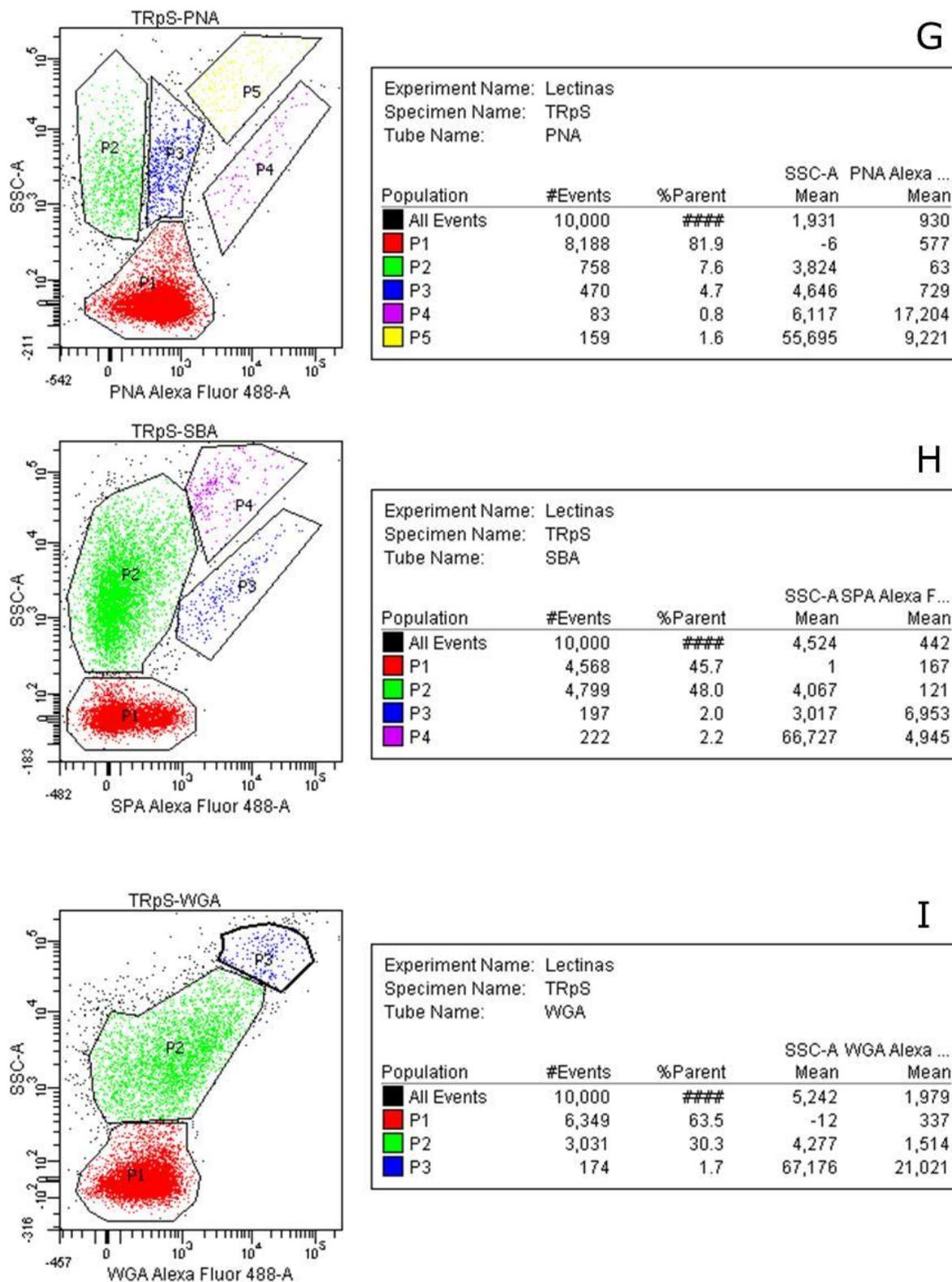


Figura 41-3: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção sacular do tubo renal de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

Por último, a cultura primária do TRpT foi positiva nas marcações para as lectinas ConA, HPA, SBA e WGA em MF (figura 43).

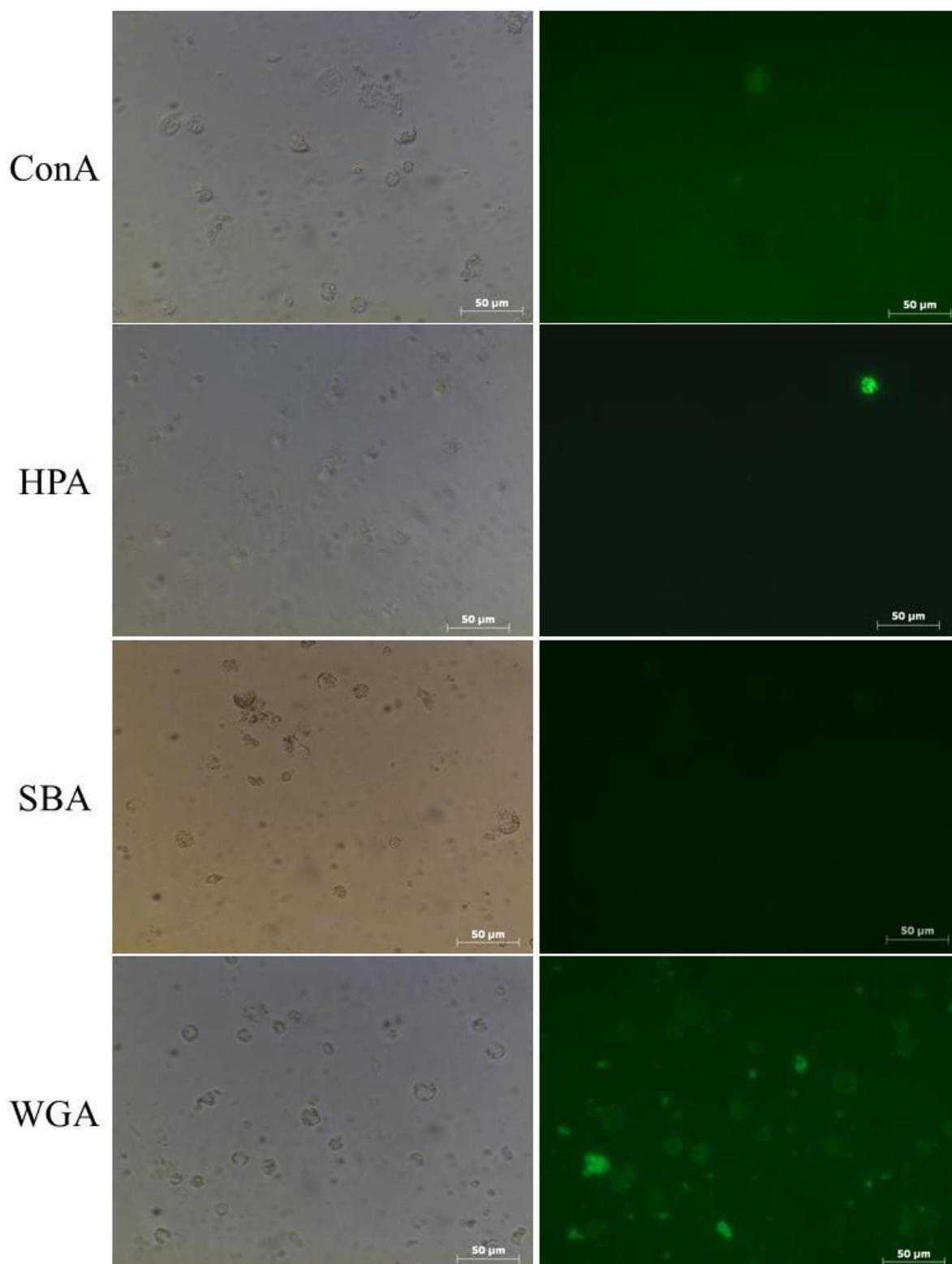
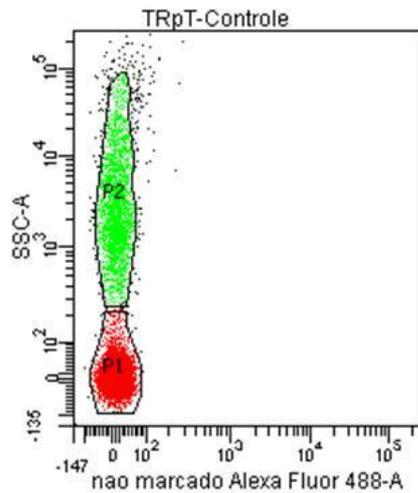


Figura 42: Microscopia de fluorescência para células da cultura primária da porção tubular do tubo renal de *B. tenagophila*.

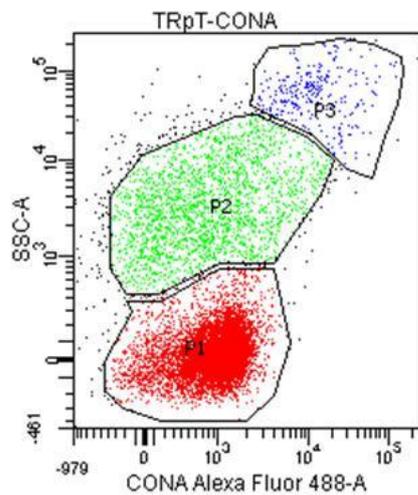
Células positivas para as lectinas ConA, HPA, SBA e WGA. Coluna da esquerda: microscopia óptica invertida; coluna da direita; microscopia de fluorescência. À esquerda de cada fila está a lectina representada na foto de marcação.

Na análise por citometria de fluxo para a cultura primária de células da porção tubular do tubo renal, a cultura, de acordo com o padrão de granulosidade, mostra-se dividida em duas subpopulações quando não marcadas por nenhum conjugado de lectina. Para as lectinas GSII, IB₄, PHA-L e PNA foram identificadas quatro subpopulações, sendo duas negativas e duas positivas para estas marcações. A marcação pelas lectinas ConA e WGA identificou 3 subpopulações positivas enquanto que para a lectina PHA-L, duas subpopulações foram negativas e uma positiva (figura 43).



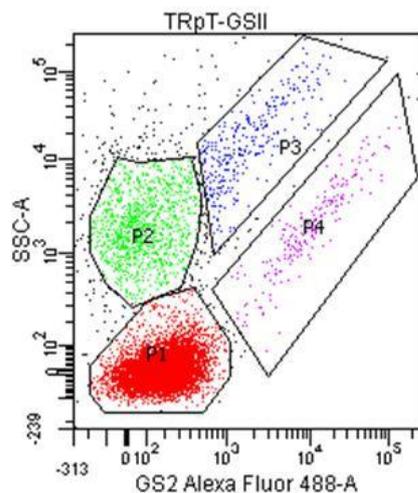
A

Experiment Name: Lectinas		SSC-A nao marca...		
Specimen Name: TRpT		Mean	Mean	
Tube Name: Controle				
Population	#Events	%Parent	Mean	Mean
All Events	10,000	###	2,629	3
P1	7,470	74.7	-0	2
P2	2,270	22.7	5,984	4



B

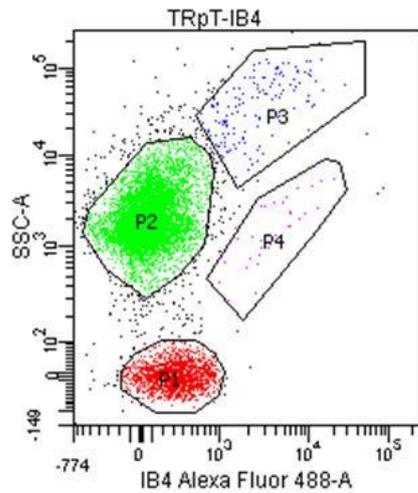
Experiment Name: Lectinas		SSC-A CONA Alex...		
Specimen Name: TRpT		Mean	Mean	
Tube Name: CONA				
Population	#Events	%Parent	Mean	Mean
All Events	10,000	###	3,247	1,811
P1	7,263	72.6	22	1,043
P2	2,170	21.7	4,701	1,635
P3	277	2.8	61,998	19,016



C

Experiment Name: Lectinas		SSC-A GS2 Alexa ...		
Specimen Name: TRpT		Mean	Mean	
Tube Name: GSII				
Population	#Events	%Parent	Mean	Mean
All Events	10,000	###	1,721	761
P1	8,135	81.4	-0	212
P2	1,066	10.7	2,381	93
P3	312	3.1	24,922	3,027
P4	202	2.0	3,255	18,943

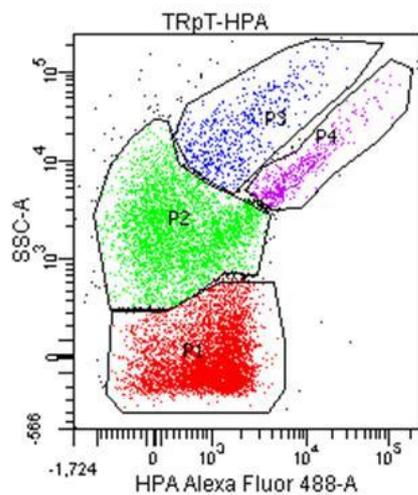
Figura 43-1: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do manto de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)



D

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpT
 Tube Name: IB4

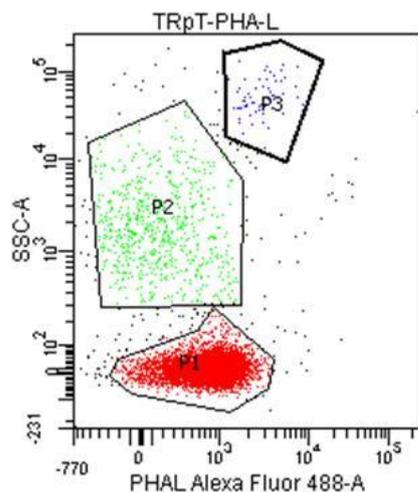
Population	#Events	%Parent	SSC-A IB4 Alexa FI...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	2,769	212
P1	1,610	16.1	-6	334
P2	7,852	78.5	2,194	66
P3	144	1.4	44,279	3,636
P4	35	0.4	1,828	5,083



E

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpT
 Tube Name: HPA

Population	#Events	%Parent	SSC-A HPA Alexa ...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	3,612	1,637
P1	5,120	51.2	-25	1,087
P2	3,590	35.9	2,502	544
P3	576	5.8	28,759	2,819
P4	440	4.4	10,119	12,664

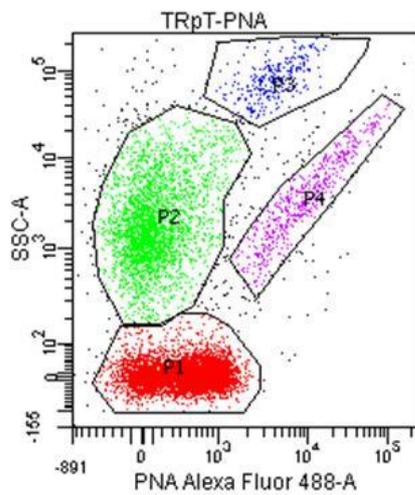


F

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpT
 Tube Name: PHA-L

Population	#Events	%Parent	SSC-A PHAL Alexa...	
			Mean	Mean
All Events	10,000	###	794	914
P1	9,121	91.2	0	887
P2	639	6.4	2,995	219
P3	63	0.6	55,628	2,977

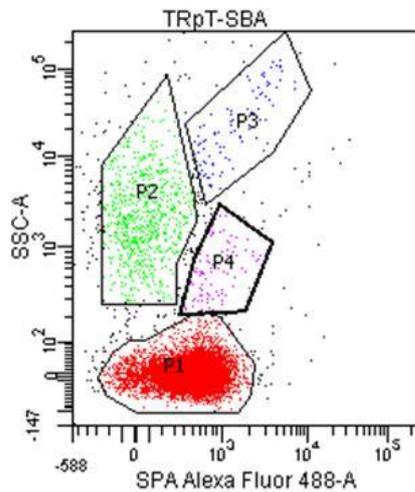
Figura 43-2: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção tubular do tubo renal de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)



G

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpT
 Tube Name: PNA

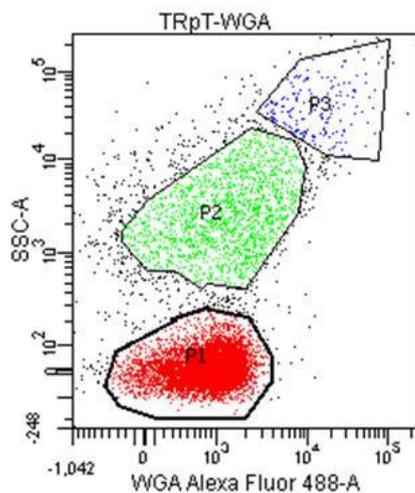
Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	PNA Alexa ... Mean
All Events	10,000	####	4,517	1,517
P1	5,903	59.0	1	527
P2	2,987	29.9	3,163	146
P3	288	2.9	84,331	4,913
P4	518	5.2	5,632	15,819



H

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpT
 Tube Name: SBA

Population	#Events	%Parent	SSC-A SPA Alexa F... Mean	Mean
All Events	10,000	####	919	566
P1	8,862	88.6	1	563
P2	701	7.0	3,455	68
P3	98	1.0	32,714	1,907
P4	101	1.0	699	1,039



I

Experiment Name: Lectinas
 Specimen Name: TRpT
 Tube Name: WGA

Population	#Events	%Parent	SSC-A WGA Alexa ... Mean	Mean
All Events	10,000	####	2,145	1,646
P1	7,568	75.7	-0	975
P2	1,658	16.6	3,569	1,912
P3	184	1.8	45,876	18,725

Figura 43-3: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção tubular do tubo renal de *B. tenagophila*. (legenda no verso anterior)

6 DISCUSSÃO

Culturas primárias de células de moluscos do gênero *Biomphalaria* encontram-se descritas em um número limitado de publicações, utilizando diferentes tecidos como fonte de células. Nesses estudos foram obtidas culturas do ovotesti (BAYNE e cols. 1975; IWANAGA, 2002; BARBOSA e cols. 2006b), da glândula digestiva e hepato-pâncreas (BENEX e GANTIER, 1975), da porção sacular do tubo renal (BENEX e JACOBELLI, 1980), de embriões (HANSEN, 1976) e da região do APO (BARBOSA e cols. 2006b). Destacam-se os trabalhos de Hansen, em 1976, que estabeleceram a linhagem de células denominadas Bge, a partir de tecido embrionário de *B. glabrata*. Atualmente esta linhagem é comercializada e vem sendo empregada em estudos *in vitro* envolvendo a interação parasito-hospedeiro invertebrado. Ao sucesso de cultivo da Bge atribui-se a capacidade de utilizar um meio com osmolaridade compatível à hemolinfa do molusco e à seleção de um tecido com menor carga parasitária e microbiológica. Células de molusco são capazes de suportar grandes variações de pH, temperatura, osmolaridade e desafios imunológicos *in vitro* (BAYNE e cols. 1975; HANSEN, 1976).

Os modelos celulares trabalhados até hoje sempre focaram a interação *B. glabrata-S. mansoni*. Entretanto, na espécie *B. tenagophila*, há a particularidade apresentada pela linhagem Taim, que apresenta resistência absoluta em relação ao *S. mansoni*. Esta característica é o principal motivo pelo qual trabalhamos apenas com essa espécie e linhagem em nossos trabalhos a fim de, no futuro, podermos estabelecer parâmetros de comparação com caramujos de mesma espécie, porém de linhagens sabidamente susceptíveis.

Antes de iniciar o cultivo de células buscamos uma caracterização anatômica do corpo do molusco *B. tenagophila*, identificando os possíveis órgãos e regiões para cultivo. Nesse estudo anatômico, localizamos e identificamos principalmente os órgãos e tecidos que compõem a região reno-pericárdica, local descrito por muitos autores como importante na produção de células de defesa (PAN, 1958; LIE e cols. 1975; SULLIVAN, 1990; SULLIVAN e SPENCE, 1994; BARBOSA e cols. 2006a). Foi possível dissecar separadamente o coração da porção sacular do tubo renal, ou saco renal; entretanto, o órgão hematopoiético, APO, comumente relacionado à região reno-pericárdica, não foi identificado. Muito provavelmente, este órgão não foi encontrado em nossas análises por não estar em hiperplasia, estado de caramujos previamente infectados, uma vez que empregamos caramujos não infectados.

Através do estudo anatômico definimos doze tecidos para cultivo. Dentre esses doze tecidos, não foram obtidas culturas de células somente para dois deles, que eram tecidos compostos por células tipo-musculares como o coração e moela. A não obtenção de nenhum tipo celular em cultura no tecido do coração confronta achados de Bayne e colaboradores, que em 1975 descreveram o cultivo de células, algumas com aspecto ameboide, a partir do coração. Este resultado também diverge dos achados de Souza e Andrade, 2006, que encontraram uma grande quantidade de hemócitos em cortes histológicos do coração.

Estas divergências de resultados podem ser atribuídas às diferentes metodologias aplicadas nos estudos. Bayne e colaboradores (1975) utilizaram medidas para garantir a adesão celular e migração de células a partir do explantes de coração, como o cultivo em frascos invertidos e atmosfera controlada, enquanto em nosso estudo empregamos apenas placas tratadas para cultivo celular, sem nenhum tratamento diferenciado para qualquer tecido. A grande quantidade de hemócitos encontrados no trabalho de Souza e Andrade (2006), a partir de cortes histológicos do corpo inteiro do molusco, pode ser uma contaminação proveniente da hemolinfa nas câmaras cardíacas, no momento de sua fixação. Como efetuamos lavagens sucessivas dos tecidos cultivados como medida profilática à contaminação das culturas, essa etapa provavelmente retirou todo o contaminante de hemolinfa dos tecidos.

Em nosso estudo, as células da cultura primária dos tecidos de moluscos apresentaram viabilidade semelhante com os meios Schneider, de maior osmolaridade, e de Hansen, com uma osmolaridade mais próxima a da hemolinfa do molusco. Para os primeiros dias de cultivo não houve diferença entre as viabilidades nos diferentes meios, comprovando que a osmolaridade pode ser importante, mas não foi limitante no cultivo de células de molusco.

Todas as culturas primárias apresentaram grande heterogeneidade, sendo possível identificar mais de um subtipo para cada cultura derivada de um determinado tecido. Algumas semelhanças entre culturas de diferentes tecidos podem ser observadas. Ao compararmos as culturas de tecidos glandulares, como a glândula digestiva e glândula de albume, observamos células com grande quantidade de vesículas, eletrodensas ou eletrolúcidas, encontradas no citoplasma. Essa característica pode ser atribuída à atividade desempenhada pelo tecido.

Do sistema reprodutor do molusco foram cultivadas células de três regiões distintas: glândula de albume, glândulas nidamental e prostática, gônadas e ovotesti. Na glândula de albume foi encontrado um tipo de célula em microscopia óptica, com citoplasma denso na coloração por Giemsa, enquanto que nas análises por MET encontramos três tipos diferentes células, todas com citoplasma eletrodense e ultraestruturalmente diferentes.

As glândulas nidamental e prostática foram cultivadas em conjunto devido à dificuldade de separação das mesmas do tecido fresco. A cultura destas células, observadas ao M.O., apresentou alternância entre formas cubica e circular. Em cultura, as células cubicas se tornavam circulares, e depois de algum tempo de cultivo pareciam sofrer lise. Essa lise pode ser observada em MET, onde células sem a delimitação de suas membranas celulares foram visualizadas, um comportamento típico de células de glândulas holócrinas. Neste tipo de glândula, a célula rompe-se extravasando os grânulos de secreção para o meio.

O último tecido cultivado, a fazer parte do sistema reprodutor do molusco, foi o ovotesti, responsável pela produção das células de reprodução do caramujo. Este tecido é um dos locais para onde os esporocistos filhos de *Schistosoma mansoni*, também chamados de secundários, migram após sua liberação pelo esporocisto mãe, ou primário. Durante o período de infecção do molusco pelo *S. mansoni*, pode ocorrer infertilidade temporária, reversível após a cura, do hospedeiro invertebrado. Infiltrados de hemócitos já foram encontrados nesta região após cortes histológicos de caramujos infectados, sem a constatação do aumento de hemócitos circulantes na hemolinfa (SOUZA e ANDRADE, 2006).

A cultura de células do ovotesti já foi realizada anteriormente por outros autores. Bayne e colaboradores (1975) cultivaram as gônadas em estudo associando à infecção com microsporídio, juntamente com tecido cardíaco. Além da constatação da grande tolerância dessas células a diferentes condições de cultivo e à contaminação por parasitos, os autores relataram alta taxa de migração de células a partir do explante para o entorno do tecido. Um importante estudo de cultura da região do ovotesti foi realizado por Iwanaga em 2002, que observou a migração de células do tipo fibroblásticas e epiteliais. Uma possível explicação para origem dos hemócitos pode estar na diferenciação de células fibroblásticas, espalhadas por todo o corpo do molusco (PAN, 2958). Finalmente, Barbosa e colaboradores, em 2006, cultivaram a região do ovotesti, apenas como controle, em estudo envolvendo a cultura primária da região do APO.

Nossas análises em MEV revelaram que o ovotesti possui pelo menos quatro tipos de células distintas, sendo duas globosas lisas, uma circular com reentrâncias, e um último tipo de célula com forma flagelar, tipo espermatozoide. Através de MET foi possível visualizar uma possível relação entre célula globosa lisa com célula circular rugosa, onde estas atuam como suporte das células globosas, assim como ocorre com as células da zona pelúcida e ovócitos em mamíferos. Apesar da possibilidade de presença de células fibroblásticas no ovotesti, ou mesmo com a possibilidade de acúmulo de hemócitos em indivíduos parasitados, em espécimes não infectados por *S. mansoni* não foram encontradas células que se assemelhem à hemócitos.

Dos tecidos glandulares, a glândula digestiva foi a que apresentou maior diversificação de tipos celulares, com seis tipos diferentes, quase todos repletos de vesículas, de formatos e densidades variados. A glândula digestiva é outro importante órgão durante a infecção do molusco pelo *S. mansoni* sendo um dos alvos de migração dos esporocistos secundários. Nesse tecido também já foi relatada uma grande quantidade de infiltrado de hemócitos em estudo histológico (SOUZA e ANDRADE, 2006). No entanto, nossas análises não revelaram nenhum tipo celular semelhante à hemócitos. Em modelo de cultura celular da glândula digestiva, Benex e Gantier (1975) revelaram não ter encontrado amebócitos nesta região, o que corrobora com o fato de não termos associado nenhum dos tipos celulares encontrados às características dos hemócitos ou células precursoras.

Além da cultura primária de células da glândula digestiva, outras duas culturas foram obtidas a partir de tecidos do sistema digestivo do molusco, papo e piloro, constituintes do estômago. A parte muscular do estômago, a moela, como já discutido, não apresentou células livres do tecido em cultura; entretanto, o papo e o piloro apresentaram células que, em observação ao M.O. pareciam semelhantes entre si. Análises de MET revelaram que os dois tecidos apresentaram células com características distintas, a despeito da proximidade de localização no estômago.

Em microscopia eletrônica, o papo apresentou, como característica, comum às células identificadas nas outras culturas do sistema digestivo, um complexo de vesículas em seu citoplasma, de variados tamanhos e densidades. Por outro lado, o piloro apresentou, além das vesículas, estruturas ciliares em grande quantidade. Foi possível identificar em cortes transversais à estrutura das cadeias de dineína (proteínas motoras) formando a conformação

‘9+2’ que representa nove pares de microtúbulos externos e um par central. Essas estruturas ciliares apenas estiveram presentes em células de mais dois tecidos além do piloro, porção tubular do tubo renal e manto.

A cavidade do manto é um local extremamente propício à formação de hemócitos uma vez que, além da parede da região sacular do tubo renal constituída de células com características mesenquimais, neste tecido encontram-se os espaços sanguíneos, o endotélio vascular e o órgão hematopoiético, APO (PAN, 1958; LIE, 1975). Nesta região do caramujo foram dissecados com sucesso e cultivados, manto e porções sacular e tubular do tubo renal, além do coração, cuja cultura não foi bem sucedida. A cultura de tecidos musculares exige uma metodologia mais elaborada, uma vez que essas células são extremamente complexas, resultado da fusão de mais de uma célula e com forte sistema de adesão celular para resistir a impactos. Outro fator limitante é a existência de uma intrincada organização do citoesqueleto para contração do tecido. Daí, provavelmente vem o fato de não obtermos o cultivo destas células sem uma prévia digestão do tecido.

De todos os tecidos cultivados, as células do manto foram as mais diversificadas dentro da população, sendo possível identificar 10 tipos celulares. A porção tubular do tubo renal apresentou algumas características em comum tanto com a porção sacular do mesmo quanto com o manto. Algumas células dessas culturas apresentaram grande quantidade de mitocôndrias, citoplasma com muitas cisternas e núcleo pouco denso. Estruturas ciliares também foram encontradas, facilmente identificadas pela organização peculiar dos microtúbulos que as formam.

Em microscopia óptica, algumas células, nas culturas do manto e das diferentes porções do tubo renal, apresentaram, em comum, formatos esféricos e pequeno porte. Essas células podem ser fruto de uma contaminação entre as culturas nessa região, uma vez que o tubo renal é uma estrutura anexa ao manto, ou seja, toda cultura de tubo renal pode apresentar material do manto.

Ao compararmos os perfis celulares obtidos em nosso estudo, através da microscopia eletrônica, com os perfis celulares para hemócitos estabelecidos por Cavalcanti e colaboradores em 2011, constatamos que, em nossas culturas, não houve produção nem identificação de hemócitos. Como já descrito anteriormente, os tecidos cultivados foram alvo

de ostensiva lavagem com soluções contendo antibióticos, a fim de minimizar a contaminação da cultura. Assim sendo, não era esperado encontrar tipos celulares semelhantes à hemócitos circulantes nos tecidos. Considerando os tecidos hematopoiéticos como produtores de hemócitos, é possível que, dentre algum dos subtipos apresentados em nosso trabalho, haja células precursoras de hemócitos, em um estágio primitivo, não presente na hemolinfa.

É interessante ressaltar que, nas culturas da porção sacular do tubo renal reconhecida na literatura pelo potencial de produção de hemócitos, foram encontradas células semelhantes às da cultura primária da região do APO, obtidas por Barbosa e colaboradores em 2006b, de grande potencial na produção de hemócitos. Foram obtidas as mesmas populações de células ao longo de toda a porção sacular do tubo renal, dissecada a partir de instruções de Paraense (1972) e Pan (1958). Apesar de outras semelhanças entre as células das porções tubular e sacular do tubo renal, a semelhança com a cultura do APO ficou restrita à porção sacular.

Na busca pela obtenção *in vitro* de células de defesa, Barbosa e colaboradores, em 2006, realizaram o cultivo primário de células da região do órgão hematopoiético, APO. Os autores encontraram três subpopulações celulares, denominando-as de células do tipo I, II e III, presentes na cultura da região. Dentre os tipos celulares encontrados, dois deles apresentaram semelhanças com as descrições para hialinócitos e granulócitos, à época.

Alguma relação dessa cultura com a produção de hemócitos foi revelada em outros trabalhos (SULLIVAN E SPENCE, 1994; SULLIVAN E SPENCE, 1999; BARBOSA e cols. 2006), quando os autores conseguiram, com sucesso, transferir a resistência ao *S. mansoni* entre caramujos da mesma espécie, de diferente grau de susceptibilidade, através de transplantes da região do APO. Em sua tese de Doutorado, Barbosa expõem resultados de estudos da interação das células dessa região com esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*. Adicionados à cultura, os esporocistos foram imobilizados e destruídos pelas células da cultura primária, quando esta foi proveniente de um caramujo resistente à infecção. Culturas oriundas de caramujos susceptíveis mostraram-se ineficazes de matar esporocistos *in vitro* (BARBOSA, 2007).

Os dados até então apresentados, tanto nos modelos de transplantes quanto nas interações *in vitro*, entre células do APO e esporocistos, corroboram com a hipótese do APO como um dos locais de formação de hemócitos. No entanto, a dissecação do órgão

hematopoiético se apresenta, para alguns autores, como grande desafio metodológico, devido ao seu reduzido tamanho, fragilidade e aspecto histológico, sendo provável que durante o processo de dissecação, parte de outros tecidos, na região, possam acompanhar o explante do tecido (AZEVEDO e cols. 2006; BORGES e cols. 2006; SOUZA e ANDRADE, 2006).

Existe a possibilidade de, por não termos identificado o APO durante os experimentos de dissecação, nossa cultura estar contaminada por células do APO. Entretanto, o APO já foi descrito como um tecido de massa pequena, frágil e restrito à região final do saco renal e coração, enquanto o tubo renal, mesmo se considerando apenas sua porção sacular, é um tecido extenso, de fácil reconhecimento. As células comuns entre as culturas primárias da região sacular e APO, originam-se de toda extensão do tubo renal sacular, evadindo os prováveis limites do órgão hematopoiético. Estudos posteriores, envolvendo caramujos infectados, onde o APO estará em estado de hiperplasia, poderão desvendar a localização do real do órgão hematopoiético e definir até onde pode ocorrer contaminação de células entre estas duas estruturas tão próximas.

Associando informações de literatura que apontavam a região sacular do tubo renal como promissor local de produção de hemócitos e com os dados obtidos, sendo a cultura deste órgão muito semelhante à cultura da região do APO (BARBOSA e cols. 2006b), escolhemos as culturas das porções tubular e sacular do tubo renal, do manto (cujas células provavelmente podem contaminar as culturas do tubo renal) e do ovotestí. O último, por ser um tecido anatomicamente distante dos demais, serviu como controle para a caracterização do perfil de açúcares de superfície.

Nossa análise preliminar, por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo, buscou-se identificar, a partir de oito diferentes lectinas, subpopulações dentro das quatro culturas. Através do perfil de citometria de fluxo das culturas marcadas com diferentes lectinas conjugadas com Alexa Fluor® 488, verificamos que a maioria das culturas subdividiu-se em quatro subpopulações considerando células marcadas ou não marcadas e com baixa ou alta granulosidade. Uma das exceções ocorreu para a lectina PNA, pois as células da cultura do tecido TRpS quando marcadas por esta lectina mostrou perfil de citometria contendo cinco subpopulações sendo que para o ovotestí apareceram três subpopulações e manteve a média nos outros tecidos. As marcações das culturas com a lectina WGA mostraram-se diferentes das demais por apresentarem, na maioria dos tecidos

estudados, uma capacidade de distinguir apenas três populações, e o fato de que a maioria das células foi positiva para esta lectina.

A associação de lectinas com a imunidade inata de invertebrados, incluindo moluscos, já foi abordada em alguns trabalhos, principalmente com as lectinas ConA, PNA, SBA e WGA, com possível participação, ainda não completamente entendida, na ativação de células e padrão de resistência da *Biomphalaria* ao *S. mansoni* (BOSWELL e BAYNE, 1986; ZELCK e BECKER, 1990; JOHNSTON e YOSHINO, 1996; MARTINS-SOUZA e cols. 2006).

Em 2006, Martins-Souza e cols. demonstraram que hemócitos de caramujos *B. tenagophila* eram mais marcados pela lectina WGA do que hemócitos de caramujos *B. glabrata*. Nossos dados mostram que a lectina WGA se ligou muito bem a quase todas as populações de células trabalhadas, mostrando a presença de resíduos de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilneuramínico na superfície celular das mesmas. Análises estatísticas mais profundas devem ser realizadas para confirmação de nossos dados, mas, a princípio, a lectina WGA não se apresenta como um bom marcador para células de defesa. A partir do momento em que células com diferentes funções e origens possam apresentar esses mesmos resíduos, torna-se improvável identificar subpopulação específica utilizando apenas WGA. Esporocistos de *S. mansoni* (primários e secundários) também já foram marcados com esta mesma lectina (ZELCK e BECKER, 1990), fato que nos permite descartar, em uma análise preliminar, a participação desta nos mecanismos de defesa do molusco na interação *S. mansoni*.

O sistema de defesa dos caramujos atua reconhecendo estruturas próprias de não próprias (VAN DER KNAAP e LOKER, 1990). Um perfil semelhante, entre as células do molusco e os esporocistos do parasito, favoreceriam apenas o invasor, que conseguiria evadir à resposta do hospedeiro com mais facilidade. No caso da presença de resíduos de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilneuramínico, tanto em tecido do molusco quanto no tecido do esporocisto, parece claramente uma ilustração da tentativa de mascaramento do parasita com características do hospedeiro. Entretanto, os espécimes avaliados em nossos estudos são representantes de uma linhagem que apresenta resistência absoluta ao *S. mansoni*. Assim sendo, os esporocistos de *S. mansoni*, ao se revestirem com esses resíduos reconhecidos pela lectina WGA, não favorecem em nada o processo de infecção de *B. tenagophila*, que ainda

assim consegue reconhecer e eliminar o parasita. Conforme destacado anteriormente, nossos estudos são preliminares sendo necessários trabalhos mais aprofundados que possam confirmar a não participação de WGA nos processos de interação *S. mansoni*-*Biomphalaria*.

Hemócitos obtidos da linhagem resistente de *B. tenagophila*, Taim, apresentaram maior índice de marcação com a lectina PNA, capaz de reconhecer os resíduos de β -galactose, do que hemócitos da linhagem susceptível, de mesma espécie, e da espécie *B. glabrata* (MARTINS-SOUZA, 2006). Observando nossos dados de citometria com células de cultura, identificamos células mais marcadas com essa lectina nas culturas do tubo renal, porções tubular e sacular, do que nas demais culturas, manto e ovotesti. A semelhança da cultura do TRpS com a cultura da região do APO, e uma possível ligação da mesma com a produção de hemócitos podem sugerir uma possível relação da lectina PNA com células do sistema de defesa dos molusco. No entanto, a afirmação de tal relação ainda depende de análises mais profundas envolvendo as lectinas e a confirmação da relação da cultura da região sacular do tubo renal com a produção de hemócitos.

7 CONCLUSÕES

Este foi o primeiro relato de obtenção simultânea de múltiplas culturas de células a partir de vários tecidos de *B. tenagophila*. Ao delimitarmos regiões anatômicas, mapeamos todo o corpo do caramujo na tentativa de identificação futura das células precursoras dos hemócitos ou de outro tipo celular que esteja relacionado ao mecanismo de resistência deste caramujo a infecção por *S. mansoni*.

A partir deste trabalho buscamos a caracterização das células em cultura primária, em seus instantes iniciais de cultivo. Desta forma pudemos identificar as células de cultura momentos após sua saída do tecido, uma fase a qual estas ainda não passaram por tantas alterações morfológicas quanto as células de cultivo mais prolongado.

Este trabalho abre novas fronteiras para estudos da relação parasito-hospedeiro e melhor conhecimento da biologia celular de invertebrados.

8 PERSPECTIVAS

Para aprimorar nossos estudos de identificação de subpopulações em cultura através do perfil de lectinas e açúcares, pretendemos continuar nossos trabalhos através da marcação múltipla com sondas com diferentes fluorocromos, em uma mesma população. No atual trabalho, todas lectinas estavam conjugadas a Alexa Fluor® 488, o que nos impediu de marcar a mesma população com mais de uma lectina. Com a marcação múltipla, poderemos agrupar as células de acordo com os perfis de ligação às diferentes lectinas. Com uma análise mais completa, poderemos, talvez, sugerir se um determinado grupo de células em cultura pode ter relação na produção de hemócitos, se conseguirmos identificar um padrão para células de defesas a partir da marcação com as lectinas.

Após a obtenção de tal perfil, será feita análise de quais populações de células são viáveis para um cultivo prolongado. Visa-se ao final do processo a obtenção de linhagens celulares imortalizadas, obtidas a partir de algum tecido de molusco adulto, e que possam ser empregadas em estudos das interações entre parasito e hospedeiro invertebrado.

Está prevista também a submissão das células em cultura a desafios imunológicos proporcionados pela interação dessas células com esporocistos do *S. mansoni*, obtendo-se um perfil da resposta das células da cultura ao desafio.

ANEXO – Legendas de figuras que aparecem ao verso da página anterior.**Figura 8: Imagens dos explantes *in natura* obtidos após dissecação do caramujo *B. tenagophila*.**

A. Vista interna do manto, em destaque os explantes J (região do ureter do tubo renal), TRpT (Tubo renal porção Tubular), TRpS (Tubo renal porção Sacular), Sac (região final da porção sacular do tubo renal), Mt (Manto), CL (Colar do Manto) e Co (coração) coberto por membrana escura; **B.** Região media do corpo do caramujo, em destaque GA (glândula de albume) e GD (glândula digestiva); **C.** Porção final do corpo, demonstrando GD e Ov (Ovotesti); **D/E.** Porção final do tubo renal recortado para cima (Sac), coração composto por átrio e ventrículo (Co), após remoção de membrana escura que obstruía a visão do órgão; **F.** Zoom de 32x na região de Sac e Co; **G/H.** Remoção da GA expõe Sto (estômago); **I.** Estômago composto por Pp (papo), Mo (moela) e Pi (Piloro). Escala em centímetros (quando não especificada).

Figura 15: Ultraestrutura de células de cultura da glândula digestiva de *B. tenagophila*.

A. Célula apresentando vesículas secretoras (vsD) eletro-densas, eletro-lúcidas (vsL) e rugosas (vsR) canalículos (ch) no citoplasma celular. **B.** Célula com citoplasma eletro-denso e rugoso repleto de canalículos (ch) e ausência de vesículas. **C.** Núcleo (n) grande e sem forma definida, citoplasma com muitas vesículas (vsD) e sem canalículos. **D.** Núcleo (n) celular sem forma definida e grandes vesículas secretoras rugosas (vsR). **E.** Célula apresentando núcleo de formato irregular, muitas vesículas de secreção (vsD e vsL) no citoplasma e a presença de um complexo vesicular (*) de formato singular. Ao longo do citoplasma, esta mesma estrutura apareceu alongada sem formar vesículas (setas). **F.** Detalhe de estrutura vesicular singular. **G.** Célula com vários grânulos (gr) no citoplasma, núcleo (n) central sem formato definido, vesículas (vsL). **H.** Exclusão de grânulos pela célula. **I.** Estrutura anexada à célula sem comunicação com citoplasma. Barras medem 1 µm.

Figura 28: Ultraestrutura de células de cultura do piloro de *B. tenagophila*.

A. Célula com citoplasma de densidade moderada, presença de vacúolos (va) e algumas mitocôndrias (mt) e estruturas ciliares em torno da célula. **B.** Célula de citoplasma pouco eletrodenso, com mitocôndrias e vesículas, muitas cisternas, além de cílios em torno da célula. **C.** Célula com citoplasma eletrodenso, muitas vesículas e sem cílios no corte. **D.** Célula com complexo (*) possivelmente fagocitário. **E.** Núcleo (n) de baixa eletrodensidade, citoplasma com vesículas e presença de cílios do lado externo da célula. **F.** Célula com muitas vesículas, citoplasma eletrodenso com muitas cisternas e presença de cílios externos à célula. **G.** Célula com núcleo e citoplasma de baixa eletrodensidade, rico em organelas e cisternas, presença de cílios internamente e externamente à célula. **H.** Destaque dos cílios na parte externa da célula e sua origem interna (ci). **I.** Destaque para a estrutura ciliar formado por microtúbulo no formato 9+2 (9 pares externos e um par interno). **J.** Cílios. Barras medem 1 µm.

Figura 35: Ultraestrutura de células de cultura do TRpT de *B. tenagophila*.

Imagens mostrando cada um dos sete tipos celulares encontrados nas análises em MET da cultura do TRpT (**A – G**). Detalhes de estruturas celulares (**H – K**). Possível visualizar

estruturas de cílios em cortes transversais, nas imagens (C/J/K), expondo estrutura no formato “9 + 2” das cadeias de dineína. Corte longitudinal da estrutura da raiz dos cílios, na porção intracelular (E). Núcleos (n), vesículas secretoras eletrodensas (vsD), vesículas rugosas (vsR), mitocôndrias (mt), cisternas e cílios (ci). Barras medem 1 µm.

Figura 37-1: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do manto de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

A. Controle da cultura do manto sem sonda fluorescente, apresentando três populações separadas pela granulosidade, com fluorescência negativa no espectro de emissão da sonda Alexa Fluor 488. **B.** Cultura do manto marcada com ConA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **C.** Cultura do manto marcada com GSII, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, uma positiva e três negativas, após marcação.

Figura 37-2: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do manto de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

D. Cultura do manto marcada com IB₄, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **E.** Cultura do manto marcada com HPA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **F.** Cultura do manto marcada com PHA-L, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação.

Figura 37-3: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do manto de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

G. Cultura do manto marcada com PNA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **H.** Cultura do manto marcada com SBA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, uma positiva e três negativas, após marcação. **I.** Cultura do manto marcada com WGA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, todas positivas após marcação.

Figura 39-1: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do ovotesti de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

A. Controle da cultura do ovotesti sem sonda fluorescente, apresentando duas populações separadas pela granulosidade, com fluorescência negativa no espectro de emissão da sonda Alexa Fluor 488. **B.** Cultura do ovotesti marcada com ConA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **C.** Cultura do ovotesti marcada com GSII, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação.

Figura 39-2: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do ovotesti de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

D. Cultura do ovotesti marcada com IB₄, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, uma positiva e três negativas, após marcação. **E.** Cultura do ovotesti marcada com HPA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **F.** Cultura do ovotesti marcada com PHA-L, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação.

Figura 39-3: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária do ovotesti de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

G. Cultura do ovotesti marcada com PNA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, 2 positivas e 2 negativas, após marcação. **H.** Cultura do ovotesti marcada com SBA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, 3 positivas e 1 negativa, após marcação. **I.** Cultura do ovotesti marcada com WGA, apresentando perfil de três subpopulações distintas, uma positiva e duas negativas, após marcação.

Figura 41-1: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção sacular do tubo renal de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

A. Controle da cultura do manto sem sonda fluorescente, apresentando três populações separadas pela granulosidade, estabelecendo os padrões negativos para o teste. **B.** Cultura do TRpS marcada com ConA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **C.** Cultura do TRpS marcada com GSII, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação.

Figura 41-2: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção sacular do tubo renal de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

D. Cultura do TRpS marcada com IB₄, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, 3 positivas e 1 negativa, após marcação. **E.** Cultura do TRpS marcada com HPA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, três positivas e uma negativa, após marcação. **F.** Cultura do TRpS marcada com PHA-L, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação.

Figura 41-3: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção sacular do tubo renal de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

G. Cultura do TRpS marcada com PNA, apresentando perfil de cinco subpopulações distintas, duas positivas e três negativas, após marcação. **H.** Cultura do TRpS marcada com SBA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **I.** Cultura do TRpS marcada com WGA, apresentando perfil de três subpopulações distintas, duas positivas e uma negativa, após marcação.

Figura 43-1: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção tubular do tubo renal de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

A. Controle da cultura do TRpT sem sonda fluorescente, apresentando duas populações separadas pela granulosidade, com fluorescência negativa no espectro de emissão da sonda Alexa Fluor 488. **B.** Cultura do TRpT marcada com ConA, apresentando perfil de três subpopulações distintas, todas positivas após marcação. **C.** Cultura do TRpT marcada com GSII, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação.

Figura 43-2: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção tubular do tubo renal de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

D. Cultura do TRpT marcada com IB₄, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **E.** Cultura do TRpT marcada com HPA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **F.** Cultura do TRpT marcada com PHA-L, apresentando perfil de três subpopulações distintas, sendo uma positiva e duas negativas para a marcação.

Figura 43-3: Gráficos das análises de subpopulações marcadas com lectinas para cultura primária da porção tubular do tubo renal de *B. tenagophila*.

Coluna 1 – Population: populações identificadas e agrupadas; Coluna 2 – Events: número de eventos/células contadas no experimento; Coluna 3 – Porcentagem; Coluna 4 – SSC-A Mean: média de granulosidade; Coluna 5 – Alexa Fluor Mean: média de fluorescência.

G. Cultura do TRpT marcada com PNA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativas, após marcação. **H.** Cultura do TRpT marcada com SBA, apresentando perfil de quatro subpopulações distintas, duas positivas e duas negativa, para a marcação. **I.** Cultura do TRpT marcada com WGA, apresentando perfil de três subpopulações distintas todas positivas.

10 REFERÊNCIAS

Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES. **A family of fibrinogen-related protein that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection.**

Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94 (16): 8691-8696

Azevedo CM, Borges CMC, Andrade ZA. **Changes induced in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) following trials for artificial stimulation of its internal defense system.**

Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(1): 199-203.

Barbosa L, Caldeira RL, Carvalho OL, Vidigal TH, Jannotti-Passos LK, Coelho PMZ. **Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*.**

Parasite Immunol 2006a; 28(5): 209-212.

Barbosa L, Silva LM, Coelho PMZ, Santos SR, Fortes-Dias CL. **Primary culture of the region of the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*.**

Mem Inst Oswaldo Cruz 2006b; 101(6): 639-643.

Barbosa L. **Cultivo primário do órgão hematopoiético de moluscos do gênero *Biomphalaria*: caracterização morfológica e funcional das células (tese de doutorado).**

Belo Horizonte (MG): UFMG; 2007.

Barracco MA, Steil AA, Gargioni R. **Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*.**

Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 88(1): 73-83.

Bayne CJ, Owczarzak A, Noonan WE. **In vitro cultivation of cells and a microsporidian parasite of *Biomphalaria glabrata* (pulmonata: basommatophora).**

Ann N Y Acad Sci 1975; 266: 513-527.

Bayne CJ, Buckley PM, Dewan PC. **Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro.**

J Parasitol 1980a; 66(3): 413-419.

Bayne CJ, Buckley PM, Dewan PC. **Schistosoma mansoni: cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*.** *Exp Parasitol* 1980b; 50(3): 409-416.

Bayne CJ. **Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment.** *Mol Biochem Parasitol* 2009; 165(1): 8-18.

Benex J, Gantier JC. **[Cell culture of snails. Their use in the study of immunologic host-parasite relationships in schistosomiasis].** *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1975; 68(5): 474-482. [Artigo em Francês].

Benex J, Jacobelli G. **[Cellular immunity in mollusk hosts of schistosomes. Primary results regarding *Biomphalaria glabrata*].** *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1980; 73(2): 206-213. [Artigo em Francês].

Bezerra FS, Nogueira-Machado JA, Chaves MM, Martins RL, Coelho PMZ. **Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1997; 39(4): 197-201.

Boehmler AM, Fryer SE, Bayne CJ. **Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by *Biomphalaria glabrata* hemolymph in vitro: alteration of hemocyte behavior after poly-L-lysine treatment of plastic, and the kinetics of killing by different host strains.** *J Parasitol* 1996; 82(2): 332-335.

Borges CMC, Azevedo CM, Andrade ZA. **A contribution to the pathobiology of *Biomphalaria glabrata* hemocytes.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 193-198.

Boswell CA, Bayne CJ. **Lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity in an invertebrate model: Con A does not act as a bridge.** *Immunology* 1986; 57: 261-264.

BRASIL. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2ª edição, 2008, 177 p.

Caldeira RL, Jannotti-Passos LK, Carvalho OS. **Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: A review of the identification of species and the detection of infected snails**. *Acta Trop* 2009; 111:1-6.

Carvalho OS, Janotti-Passos LK, Mendonça CLGF, Cardoso PCM, Caldeira RL. **Moluscos Brasileiros de Importância Médica**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ. 2008, 86 p.

Cavalcanti MGS, Filho FC, Mendonça AMB, Duarte GR, Barbosa CCGS, Castro CMMB, Alves LC, Brayner FA. **Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea***. *Micron* 2011; 43(2-3):285-291.

Coelho PMZ. **Resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria***. In: Barbosa FS. *Tópicos em Malacologia Médica*. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz 1995; 208-217.

Coelho PMZ, Andrade ZA, Borges C, Ribeiro F, Barbosa L. **Evolução do *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário**. In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. (Org.). *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ 2008a; 147-160.

Coelho PMZ, Rosa FM, Maciel E, Negrão-Corrêa D, Carvalho OS, Caldeira RL, Janotti-Passos, LK, Moreira LA, Oliveira GC, Teles HMS. **Transmission control of schistosomiasis mansoni by introduction of a resistant strain of *Biomphalaria tenagophila* in areas where transmission is maintained by this species**. *Acta Trop* 2008b; 108: 245-248.

Dikkeboom R, van der Knaap WP, van den Bovenkamp W, Tijnagel JM, Bayne CJ. **The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species**. *Dev Comp Immunol* 1988; 12(3): 509-520.

Drummond SC, Silva LC, Amaral RS, Sousa-Pereira SR, Antunes CM, Lambertucci JR. **Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 37-44.

Fernandez MA. **Compatibilidade entre *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 e *Biomphalaria* Preston, 1910.** *Tópicos em Malacologia – Ecos do XVIII EBRAM.* 2007; 259-266.

Fryer SE, Bayne CJ. **Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components.** *Dev Comp Immunol* 1996; 20(1): 23-37.

Granath WO JR, Yoshino TP. ***Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*.** *Exp Parasitol* 1984; 58(2): 188-193.

Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. **Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation.** *Dev Comp Immunol* 2000; 24(6-7): 531-541.

Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. **Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species.** *J Parasitol* 2001a; 87(2): 292-299.

Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. **Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*.** *J Parasitol* 2001b; 87(4): 778-785.

Hanington PC, Lun CM, Adema CM, Loker ES. **Time series analysis of the transcriptional responses of *Biomphalaria glabrata* throughout the course of intramolluscan development of *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*.** *Int J Parasitol* 2010; 40(7): 819-831.

- Hansen E. **A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): Establishment and characteristics.** In: K. Maramorosch (ed.). *Invertebrate tissue culture: Research applications*. New York: New York Academic Press 1976; 75–99.
- Harris KR. **The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*.** *Ann N Y Acad Sci* 1975; 266: 446-464.
- Hertel LA, Adema CM, Loker ES. **Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*.** *Dev Comp Immunol* 2005; 29(4): 295-303.
- Iwanaga Y. ***In vitro* Cultivation of Cells from Ovotestis Tissue of Pigmented *Biomphalaria glabrata*.** *Zoolog Sci* 2002; 19(3): 271-274.
- Jeong KH, Lie KJ, Heyneman D. **The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*.** *Dev Comp Immunol* 1983; 7(2): 217-228.
- Johnston LA, Yoshino TP. **Analysis of lectin and snail plasma binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*.** *Parasitology* 1996; 112: 469-479.
- Johnston LA, Yoshino TP. **Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors.** *J Parasitol* 2001; 87(4): 786-793.
- Léonard PM, Adema CM, Zhang SM, Loker ES. **Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*.** *Gene* 2001; 269(1-2): 155-165.
- Lie KJ, Heyneman D, Yau P. **The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*: fine structure.** *J Parasitol* 1975; 61: 574-576.
- Lockyer AE, Spinks J, Kane RA, Hoffmann KF, Fitzpatrick JM, Rollinson D, Noble LR, Jones CS. ***Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies**

resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni*. *BMC Genomics* 2008; 9(634): 17.

Loker ES, Bayne CJ. *In vitro* encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31: 999-1005.

Loverde PT, Gherson J, Richards CS. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: fine structure. *Dev Comp Immunol* 1982; 6(3): 441-449.

Martins-Souza RL, Pereira CA, Coelho PM, Negrão-Corrêa D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. *Parasitol Res* 2003; 91(6): 500-507.

Martins-Souza RL, Pereira CA, Martins-Filho OA, Coelho PMZ, Corrêa A 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 Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 37-44.

Martins-Souza RL, Pereira CA, Coelho PMZ, Martins-Filho OA, Negrão-Corrêa D. Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology* 2009; 136(1): 67-76.

Matricon-Gondran M, Letocart M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. *J Invertebr Pathol* 1999; 74(3): 224-254.

Organização Mundial Da Saúde (OMS). **Schistosomiasis**. In: Fact sheet. Fevereiro 2012, Nº115. Acesso em: 07/02/2012. Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.

Pan CT. The general histology and topographic micranatomy of *Australorbis glabratus*. *Bulletin of The Museum of Comparative Zoology* 1958; 119: 235-299.

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

Pan CT. **Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*.** *Am J Trop Med Hyg* 1965; 14(6): 931-976.

Paraense WL, Correa LR. **Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1963a; 5: 15-22.

Paraense WL, Correa LR. **Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1963b; 5: 22-29.

Paraense WL. **Fauna planorbídica do Brasil.** In: C. S. Lacaz; R. G. Baruzzi; W. Siqueira. (Org.). *Introdução à Geografia Médica do Brasil*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo; 1972: 213-239.

Paraense WL. **Histórico do Gênero *Biomphalaria*: Morfologia e Sistemática Morfológica.** In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. (Org.). *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008, p. 287-308.

Raghavan N, Miller AN, Gardner M, Fitzgerald PC, Kerlavage AR, Johnston DA, Lewis FA, Knight M. **Comparative gene analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes pre- and post-exposure to miracidia of *Schistosoma mansoni*.** *Mol Biochem Parasitol* 2003; 123(2): 181-191.

Rosa FM, Caldeira RL, Carvalho OS, Godard ALB, Coelho PMZ. **Dominant Character of the Molecular Marker of a *Biomphalaria tenagophila* Strain (Mollusca: Planorbidae) Resistant to *Schistosoma mansoni*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(1): 85-87.

Rosa FM, Godard ALB, Azevedo V, Coelho PMZ. ***Biomphalaria tenagophila*: Dominant character of the resistance to *Schistosoma mansoni* in descendants of crossbreedings between resistant (Taim, RS) and susceptible (Joinville, SC) strains.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(1): 19-23.

- Salamat Z, Sullivan JT. **In vitro mitotic responses of the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* to extracts of *Schistosoma mansoni*.** *J Parasitol* 2008; 94(5): 1170-1173.
- Salamat Z, Sullivan JT. **Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca).** *Dev Comp Immunol* 2009; 33(6): 725-727.
- Silva TM, Souza SS, Almeida TF, Andrade ZA. **Ki-67 is expressed in multiplying forms of *Schistosoma mansoni*, but not in snail host tissues.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102(5): 651-653.
- Sminia T. **Haematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography.** *Cell Tissue Res* 1974; 150(4): 443-454.
- Sminia T. **Blood cell types and blood cell formation I gastropod molluscs.** *Dev Comp Immunol* 1983; 7: 665-668.
- Souza SS, Andrade ZA. **On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 213-218.
- Sullivan JT. **Long-term survival of heterotopic allografts of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata).** *Trans Am Microsc Soc* 1990; 109: 52-60.
- Sullivan JT, Spence JV. **Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte-producing organ.** *J Parasitol* 1994; 80(3): 449-453.
- Sullivan JT, Spence JV. **Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*.** *J Parasitol* 1999; 85(6): 1065-1071.

Sullivan JT, Pikios SS, Alonzo AQ. **Mitotic responses to extracts of miracidia and cercáriae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*.** *J Parasitol* 2004; 90(1): 92-96.

Sullivan JT, Castro L. **Mitotic arrest and toxicity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) exposed to colchicine.** *J Invertebr Pathol* 2005; 90(1): 32-38.

Sullivan JT. **Mitotic responses to injected extracts of larval and adult *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*: effects of dose and colchicine treatment.** *J Parasitol* 2007; 93(1): 213-215.

Théron A, Coustau C. **Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*?** *J Helminthol* 2005; 79(3): 187-191.

van der Knaap WP, Loker ES. **Immune mechanisms in trematode-snail interactions.** *Parasitol Today* 1990; 6(6): 175-182.

Vasquez RE, Sullivan JT. **Effect of miracidial dose on adoptively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*.** *J Parasitol* 2001a; 87(2): 460-462.

Vasquez RE, Sullivan JT. **Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*.** *Dev Comp Immunol* 2001b; 25(7): 561-564.

Vidigal THDA, Caldeira RL, Simpson AJG, Carvalho OS. **Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(1): 57-66.

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

Zhang SM, Léonard PM, Adema CM, Loker ES. **Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged**

IgSF domains and a fibrinogen domain. *Immunogenetics* 2001; 53(8): 684-694. Errata em: *Immunogenetics* 2002; 53(10-11): 992.

Zhang SM, Loker ES. **The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. Fibrinogen-related proteins.** *Dev Comp Immunol* 2003; 27(3): 175-187.

Zhang SM, Loker ES. **Representation of an immune responsive gene family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*.** *Gene* 2004; 344: 255-266.

Zhang SM, Zeng Y, Loker ES. **Expression profiling and binding properties of fibrinogen-related proteins (FREPs), plasma proteins from the schistosome snail host *Biomphalaria glabrata*.** *Innate Immun* 2008a; 14(3): 175-189.

Zhang SM, Nian H, Zeng Y, Dejong RJ. **Fibrinogen-bearing protein genes in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of two novel genes and expression studies during ontogenesis and trematode infection.** *Dev Comp Immunol* 2008b; 32(10): 1119-1130.