

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

**Estudo do sistema inato de defesa de *Biomphalaria tenagophila*  
(d'Orbigny, 1835) frente ao *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907**

**por**

**Ana Carolina Alves de Mattos**

**Belo Horizonte**

**Março/ 2011**

**TESE DDIP - CPqRR**

**A.C.A.MATTOS**

**2011**

---

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

**Estudo do sistema inato de defesa de *Biomphalaria tenagophila*  
(d'Orbigny, 1835) frente ao *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907**

**por**

**Ana Carolina Alves de Mattos**

**Tese apresentada com vistas à obtenção do  
título de Doutor(a) em Ciências na área de  
concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias**

**Orientação: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho**

**Belo Horizonte**

**Março/ 2011**

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

M435e Mattos, Ana Carolina Alves de.

2011

Estudo do sistema inato de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (d' Orbigny, 1835) frente ao *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907/ Ana Carolina Alves de Mattos. – Belo Horizonte, 2011.

xix, 84 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 85 - 103

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor(a) 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 mansoni/transmissão 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. *Biomphalaria*/imunologia I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

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

**Estudo do sistema inato de defesa de *Biomphalaria tenagophila*  
(d'Orbigny, 1835) frente ao *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907**

**por**

**Ana Carolina Alves de Mattos**

**Foi avaliada pela banca composta pelos seguintes membros:**

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Junior

Prof. Dr. Fernando Schemelzer Moraes Bezerra

Prof. Dra. Roberta Lima Caldeira

Prof. Dra. Marina de Moraes Mourão

Suplente: Prof. Dra. Silvane Maria Fonseca Murta

**Tese defendida e aprovada em: 18/03/2011**

“É preciso que não se tenha medo de dizer alguma coisa que possa ser considerada erro. Porque tudo que é novo, parece, aos olhos antigos, como uma coisa errada.”

(Mário Schenberg)

"A ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão."

(Jacques Barzun)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Sérgio e Nilza que sempre me incentivaram e se orgulharam de mim. Ao Bruno, meu amor, sempre presente, mesmo que distante.

## **SUPORTE FINANCEIRO**

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais/ Pronex (FAPEMIG/  
PRONEX - nº 12055)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - nº  
484552/2006-6)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Dr. Paulo Marcos, exemplo de pesquisador e pessoa, pela confiança, atenção e paciência. São 8 anos de convivência e todos os seus ensinamentos eu levarei comigo pela vida toda. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Elio Hideo Babá, pela ajuda fundamental e incondicional nestes últimos 2 anos. As conversas e ensinamentos foram essenciais para eu chegar até aqui.

Ao Dr. Naftale Katz, grande responsável pela minha entrada no Laboratório de Esquistossomose. Obrigada pela oportunidade e ajuda sempre.

Ao Dr. Evandro Marques de Menezes Machado pelos ensinamentos. Você é parte importante na elaboração inicial deste trabalho.

À Delza, Dília, Sueleny, Lidiane e Liana, que mais uma vez estiveram comigo durante esta jornada.

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose: Ana Karine, Aristeu, Áureo, Clarice, Cíntia, Daisy, Flávia, Gardênia, Juliano, Lili, Lucila, Lud, Kika, Neusa, Rafa, Tati, Patty, Vanessa, Wander, Watson e D. Vera pelo excelente convívio durante todos esses anos. Cada um de vocês, do seu modo, contribuiu de forma efetiva para o meu crescimento. Obrigada pelas conversas, incentivos, por confortarem minhas lágrimas e sorrirem junto comigo ao longo desta caminhada. Amo vocês!!

À Vandinha, minha mãezinha, minha madrinha, com quem eu compartilho segredos, angústias e alegrias. Obrigada por tudo sempre: as conversas, os conselhos e as orações.

À Jussara, querida secretária e amiga, que se desdobra para nos ajudar, sempre com boa vontade e um sorriso no rosto.

À todos os amigos do Curso de Pós-Graduação do CPqRR/FIOCRUZ.

Aos Coordenadores e funcionários do Programa de Pós-Graduação.

À Equipe do Biotério, Central de Esterilização pela ajuda e colaboração sempre que necessário.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta tese, também pela catalogação e normalização da mesma..

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, na pessoa do Diretor Rodrigo Corrêa, pela estrutura disponibilizada, sempre visando o sucesso de seus colaboradores.

À minha irmã Antonietta e meu cunhado Sérgio, pessoas mais do que especiais, sempre presentes na minha vida nos momentos de alegria e tristeza.

À Família Duarte-Biaggi, da qual agora faço parte, responsável por inúmeros momentos de descontração.

À Deus, por guiar o meu caminho e me confortar nos momentos de ansiedade. Tenho certeza de que Ele está sempre comigo.

*A você que, de alguma forma, esteve ao meu lado, obrigada por fazer parte de mais essa etapa importante da minha vida.*

## Sumário

<b>Lista de Figuras</b> .....	XII
<b>Lista de Fotomicrografias</b> .....	XIII
<b>Lista de Tabelas</b> .....	XIV
<b>Lista de Gráficos</b> .....	XV
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b> .....	XVII
<b>Resumo</b> .....	XVIII
<b>Abstract</b> .....	XIX
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 Esquistossomose.....	20
1.2 Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i> .....	21
1.3 Sistema interno de defesa do molusco .....	23
1.4 Mecanismos de escape do <i>S. mansoni</i> .....	28
1.5 <i>Biomphalaria tenagophila</i> Taim.....	30
1.6 <i>Echinostoma paraensei</i> .....	32
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
3.1 Objetivo Geral.....	36
3.2 Objetivos Específicos .....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
4.1 Caramujos e parasitos .....	37
4.2 Obtenção e transformação “ <i>in vitro</i> ” de miracídios em esporocistos primários de <i>S. mansoni</i> e <i>E. paraensei</i> .....	37
4.3 Obtenção de esporocistos secundários de <i>S. mansoni</i> .....	38
4.4 Coleta de hemolinfa e isolamento de hemócitos .....	38
4.5 Avaliação da atividade da Fenoloxidase (PO) em <i>Biomphalaria tenagophila</i> linhagens Taim e Cabo Frio expostos ao <i>S. mansoni</i> ou <i>E. paraensei</i> .....	39
4.5.1 Ensaio “ <i>In vitro</i> ” .....	40
4.5.2 Ensaio “ <i>Ex vivo</i> ”.....	40
4.6 Avaliação do índice de adesão celular e viabilidade de esporocisto primário e secundário, após exposição ao SID da <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio .....	42

4.7	Verificação, por meio de marcadores fluorescentes, da presença de dano no tegumento de esporocistos primários e secundários de <i>S. mansoni</i> , após o contato com componentes do SID da <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio .....	43
4.8	Imagens fotográficas e análise estatística .....	44
4.9	Avaliação do desenvolvimento de esporocisto secundário após inoculação em <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
5.1	Avaliação da atividade do Sistema Profenoloxidase (proPO) em <i>Biomphalaria tenagophila</i> linhagens Taim e Cabo Frio expostos ao <i>S. mansoni</i> ou <i>E. paraensei</i> ..	46
5.1.1	Atividade de PO x Período pós-alimentação.....	46
5.1.2	Atividade de PO x Fatores inibitórios .....	47
5.1.3	Atividade da PO x <i>S. mansoni</i> .....	48
5.1.3.1	Atividade da PO x Esporocisto primário - Ensaio “ <i>in vitro</i> ” .....	48
5.1.3.2	Atividade de PO x Esporocisto secundário - Ensaio “ <i>in vitro</i> ” .....	50
5.1.3.3	Atividade da PO x Desafio com <i>S. mansoni</i> - Ensaios “ <i>ex vivo</i> ” .....	53
5.1.4	Atividade da PO x <i>E. paraensei</i> .....	57
5.1.4.1	Atividade de PO x Esporocisto primário – Ensaio “ <i>in vitro</i> ” .....	57
5.1.4.2	Atividade da PO x Desafio com <i>E. paraensei</i> – Ensaio “ <i>ex vivo</i> ” .....	58
5.2	Avaliação do índice de adesão celular e viabilidade de esporocisto primário e secundário após exposição ao SID da <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio .....	62
5.2.1	Índice de adesão celular x Esporocisto primário e secundário .....	62
5.2.2	Viabilidade x Esporocisto primário e secundário .....	64
5.3	Verificação, por meio de marcadores fluorescentes, da presença de dano no tegumento de esporocistos primários e secundários de <i>S. mansoni</i> , após o contato com componentes do SID da <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio .....	66
5.4	Avaliação do desenvolvimento de esporocisto secundário após inoculação em <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio.....	72
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>83</b>
8.1	Anexo 1: Artigo Aceito .....	83
8.2	Anexo 2: Outras Produções Bibliográficas .....	84
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>85</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html> ..... 23
- Figura 2. Cascata de ativação do sistema da profenoloxidase. Adaptado de Franssens et al., (2008). PRPs (proteínas reconhecedoras de patógenos), PAP (proteínas ativadoras da fenoloxidase)..... 28
- Figura 3. Ciclo de vida do *Echinostoma*. Adaptado de [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Echinostomiasis\\_il.html](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Echinostomiasis_il.html)..... 34

## Lista de Fotomicrografias

- Fotomicrografia 1. Ação do SID de *B. tenagophila* Taim na membrana de esporocisto primário (A, C, E, G) e secundário (B, D, F, H). A e B: microscopia óptica; C e D: marcado com Hoechst 33258 (microscopia de fluorescência); E e F: marcado com Alexa Fluor 488 (microscopia de fluorescência); G e H: marcação com Lectina de *Glicina max* (microscopia de fluorescência). Barras = 25µm..... 70
- Fotomicrografia 2. Ação do SID de *B. tenagophila* Cabo Frio na membrana de esporocisto primário (A, C, E, G) e secundário (B, D, F, H). A e B: microscopia óptica; C e D: marcado com Hoechst 33258 (microscopia de fluorescência); E e F: marcado com Alexa Fluor 488 (microscopia de fluorescência); G e H: marcação com Lectina de *Glicina max* (microscopia de fluorescência). Barras = 25µm..... 71
- Fotomicrografia 3. Esporocisto primário controle (A, C, E, G) e secundário controle (B, D, F, H). A e B: microscopia óptica; C e D: marcação com a sonda Hoechst 33258 (microscopia de fluorescência); E e F: marcação com Alexa Fluor 488 (microscopia de fluorescência); G e H: marcação com Lectina de *Glicina max* (microscopia de fluorescência). Barras = 25µm..... 72

## Lista de Tabelas

- Tabela 1. Atividade específica da PO de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio submetida a aquecimento por 15 minutos a 56°C ou exposta à feniltioureia (PTU- 10mM), leitura 3 horas após adição de L-DOPA (4mg/ml) ..... 48
- Tabela 2. Média dos valores de índice de adesão celular (IAC) de esporocistos primários e secundários de *S. mansoni* expostos à *B. tenagophila* (Taim e Cabo Frio) e *B. glabrata*. ..... 64
- Tabela 3. Proporção de esporocistos primários e secundários de *S. mansoni* mortos, após exposição do parasito ao sistema interno de defesa (SID) da *B. tenagophila* Taim, Cabo Frio e *B. glabrata*. ..... 65
- Tabela 4. Número absoluto e porcentagem de caramujos vivos e infectados 30 dias após inoculação com esporocisto secundário de *Schistosoma mansoni*. ..... 73

## Lista de Gráficos

- Gráfico 1. Padronização do período de coleta da hemolinfa dos caramujos pós-alimentação, leitura três horas após adição de L-DOPA (média  $\pm$  DP)..... 46
- Gráfico 2. Cinética da atividade específica da fenoloxidase na hemolinfa total de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, expostas ou não ao esporocisto primário de *S. mansoni* (média  $\pm$  DP)..... 49
- Gráfico 3. Cinética da atividade específica da fenoloxidase na hemolinfa total de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, expostas ou não ao esporocisto secundário de *S. mansoni* (média  $\pm$  DP)..... 51
- Gráfico 4. Cinética da atividade específica da fenoloxidase na hemolinfa total de *B. tenagophila* Taim, exposta a esporocisto primário ou secundário de *S. mansoni* (média  $\pm$  DP)..... 52
- Gráfico 5. Cinética da atividade específica da fenoloxidase na hemolinfa total de *B. tenagophila* Cabo Frio, exposta a esporocisto primário ou secundário de *S. mansoni* (média  $\pm$  DP)..... 52
- Gráfico 6. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio 1 hora após desafio pelo *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA ..... 54
- Gráfico 7. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio 24 horas após desafio pelo *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA ..... 55
- Gráfico 8. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo frio 48 horas após desafio pelo *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA ..... 56

Gráfico 9. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio, não desafiadas pelo <i>S. mansoni</i> , ao longo dos experimentos “ex vivo” (média ± DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA .....	57
Gráfico 10. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio, expostas ou não ao esporocisto primário de <i>E. paraensei</i> (média ± DP).....	58
Gráfico 11. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio, 24 horas após desafio pelo <i>E. paraensei</i> (média ± DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA .....	59
Gráfico 12. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio, 48 horas após desafio pelo <i>E. paraensei</i> (média ± DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA .....	61
Gráfico 13. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio, não desafiadas com <i>E. paraensei</i> ao longo dos experimentos “ex vivo” (média ± DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA .....	62
Gráfico 14. Intensidade média de fluorescência/área detectada pela sonda Hoechst 33258 em esporocistos primários e secundários, expostos ao SID das linhagens de <i>B. tenagophila</i> Taim, Cabo Frio e esporocistos controles. ....	67
Gráfico 15. Intensidade média de fluorescência/área detectada pela sonda Alexa Fluor 488 em esporocistos primários e secundários, expostos ao SID das linhagens de <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio e esporocistos controles.....	68
Gráfico 16. Intensidade média de fluorescência/área detectada pela Lectina de <i>Glicina max</i> em esporocisto primário e secundário, exposto ao SID das linhagens de <i>B. tenagophila</i> Taim e Cabo Frio .....	69

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

SID- Sistema Interno de Defesa

HT- Hemolinfa Total

H- fração contendo apenas hemócitos

S- fração contendo apenas fatores solúveis (sem hemócitos)

proPO- Sistema Profenoloxidase

PO- fenoloxidase

ROS- espécies reativas de oxigênio

FREP- fibrinogen-related protein

Taim - Caramujos *Biomphalaria tenagophila* provenientes da Reserva Ecológica do Taim/ RS (linhagem resistente ao *S. mansoni*)

Cabo Frio - Caramujos *Biomphalaria tenagophila* provenientes de Cabo Frio/ RJ (linhagem susceptível ao *S. mansoni*)

IAC - índice de adesão celular

DALY's - Disability-Adjusted Life Years

APO - órgão produtor de amebócitos

ES - produto secretado/ excretado

SBF - soro fetal bovino

RPMI – 1640 - meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

CBSS - Solução Salina Balanceada de Chernin

PTU - feniltiouréia

## Resumo

A fenoloxidase (PO) é uma enzima envolvida no processo de melanização. A melanização é um mecanismo de defesa contra patógenos, muito importante para diversos invertebrados, inclusive, alguns artigos já descreveram a existência dessa enzima em *Biomphalaria glabrata*. Utilizando *B. tenagophila* (linhagem resistente Taim e linhagem susceptível Cabo Frio), tentou-se esclarecer, por meio de experimentos “*in vivo*” e “*in vitro*”, a real importância desse sistema enzimático no processo de resistência da *Biomphalaria* ao *S. mansoni*. Verificou-se que, apesar do sistema fenoloxidase apresentar, em alguns experimentos, uma atividade significativamente maior, principalmente na linhagem Taim, na presença do *S. mansoni*, não foi possível afirmar que esse sistema tem importância no mecanismo de resistência da *B. tenagophila* Taim contra *S. mansoni*, pois a ativação enzimática ocorreu em todas as linhagens testadas. Quando os testes da atividade enzimática foram realizados, utilizando *Echistosoma paraensei* (trematódeo, digenea), que infecta a linhagem Taim, os resultados foram semelhantes. Outro aspecto estudado neste trabalho foi a resposta do sistema interno de defesa (SID - hemócitos, fração solúvel e hemolinfa total) da *B. glabrata* e *B. tenagophila* (Taim e Cabo Frio), frente aos esporocistos secundários, obtidos de caramujos *B. glabrata* infectadas. Já foi descrito na literatura o processo de mascaramento/mimetismo molecular como mecanismo de evasão do parasito. Assim, utilizando os esporocistos secundários, foi possível demonstrar que os esporocistos primários são mais afetados pelo SID da *Biomphalaria* (principalmente Taim) do que os esporocistos secundários. Os esporocistos primários apresentaram maior mortalidade e danos no tegumento do que os esporocistos secundários. No entanto, a inoculação dos esporocistos secundários, provenientes de *B. glabrata*, obteve sucesso apenas na espécie análoga, resultando na eliminação de cercárias, trinta dias após a inoculação. O mesmo não ocorreu nas linhagem de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio. Dessa forma, o mimetismo/mascaramento molecular é um mecanismo possível, porém experimentos utilizando esporocistos secundários provenientes da *B. tenagophila* são necessários para verificar a real importância desse processo como mecanismo de escape do parasito em relação a *B. tenagophila* Taim.

## Abstract

Phenoloxidase (PO) is an enzyme involved in the process of melanization, which is a defense mechanism against pathogens, being very important for different invertebrates. Several articles have described the presence of this enzyme in *Biomphalaria glabrata*. Using *B. tenagophila* (resistant Taim and susceptible Cabo Frio) lineages to *Schistosoma mansoni*, we carried out “*in vivo*” and “*in vitro*” experiments aimed at clarifying the real importance of this enzymatic system in the process of *Biomphalaria* resistance to *S. mansoni*. It was observed in some experiments that the phenoloxydase system presented a significantly higher activity, mainly in Taim lineage in the presence of *S. mansoni*, but it was not possible to confirm whether this system exerts some importance in the resistance mechanism of *B. tenagophila* Taim against *S. mansoni*, since the enzymatic activity has occurred in all the lineages tested. When the enzymatic activity was tested using *Echistosoma paraensi* (Trematode, Digenea), which infects the Taim lineage, the results obtained were very similar. Another aspect investigated in the present work was the response of the internal defense system (IDS – hemocytes, soluble fraction, and total hemolymph) of *B. glabrata* and *B. tenagophila* (Taim and Cabo Frio) in the presence of secondary sporocysts derived from infected *B. glabrata* snails. The process of molecular masking/mimetism as evasion mechanism of the parasite has been described in the literature. Thus, using secondary sporocysts, it was possible to demonstrate that primary sporocysts are more affected by IDS of *Biomphalaria* (mainly of Taim), presenting higher mortality rate and tegumental damages than the secondary ones. Nevertheless, inoculation of secondary sporocysts derived from *B. glabrata* was successful only in the analogue species, showing as a result elimination of cercariae thirty days post-inoculation. The same result did not occur with *B. tenagophila* Taim and Cabo Frio. In this way, the molecular masking/mimetism may be considered a possible mechanism, however, further experiments using secondary sporocysts derived from *B. tenagophila* are needed in order to verify the real importance of this process as the parasite’s scape mechanism in relation to *B. tenagophila* Taim.

# 1 Introdução

## 1.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma das doenças parasitárias de maior prevalência, sendo endêmica em mais de 76 países e territórios distribuídos pela África, Ásia e Américas (Engels et al., 2002). No entanto, a morbidade associada à doença é muito variável, sendo sua prioridade de controle amplamente discutida (Gryseels et al., 2006). É atualmente colocada no grupo de doenças tropicais negligenciadas e estima-se que 207 milhões de pessoas estejam infectadas e 779 milhões expostas ao risco de contrair a doença (Steinmann et al., 2006; WHO, 2011). De acordo com o “rank” da DALY’S (Disability-Adjusted Life Years), que quantifica o número perdido em anos de vida, devido a problemas relacionados com a doença, a esquistossomose é colocada apenas atrás da Malária. A esquistossomose é responsável por 1,7- 4,5 milhões/ DALY’s anualmente (Steinmann et al., 2006). Além disso, aproximadamente 280 mil mortes por ano são atribuídas às esquistossomoses (Van der Werf et al., 2003). Nos últimos 50 anos, houve uma mudança na distribuição geográfica da esquistossomose, no entanto, mesmo com programas de controle bem sucedidos, o número de pessoas infectadas ou sob risco de contrair a doença não foi reduzido (Engels et al., 2002).

Os agentes etiológicos das esquistossomoses são trematódeos digenéticos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Dentre as espécies que parasitam mamíferos, três possuem maior importância médica para o homem. São elas: *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *Schistosoma haematobium* Bilharz, 1852 e *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904, causadores, respectivamente, da esquistossomose mansoni, esquistossomose hematóbica e esquistossomose japônica.

A esquistossomose mansoni é endêmica em 54 países e territórios distribuídos pela América do Sul, Caribe e África (WHO, 2002), enquanto as esquistossomoses hematóbica e japônica estão restritas ao continente africano e asiático, respectivamente.

No Brasil, a esquistossomose é um grave problema de saúde pública, abrangendo 19 estados. Nas regiões sudeste e nordeste, existem focos de transmissão contínua, desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto nas regiões norte e sul existem apenas áreas de média extensão e focos

isolados (Teles, 2005; Coura & Amaral, 2004). Estudo realizado por Passos e Amaral (1998) aponta que 2,5 milhões de pessoas são portadoras da esquistossomose no Brasil, porém outro levantamento, realizado por Katz e Peixoto (2000) indica que mais de 8 milhões de pessoas estão infectadas e outras 30 milhões estão expostas ao risco de infecção. No entanto, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) no Brasil existem aproximadamente 7 milhões de pessoas infectadas e outras 42 milhões vivendo em área de risco.

O controle da esquistossomose baseia-se, principalmente, no emprego da quimioterapia, educação em saúde, engenharia sanitária e combate ao molusco transmissor. Porém, mesmo com a existência de tratamento efetivo, não se tem observado a redução na transmissão da doença (Barbosa, et al 2008). Dessa forma, uma melhor compreensão sobre a interação parasito-hospedeiro invertebrado é de grande valia na busca de novas estratégias para controle biológico do molusco e do processo de transmissão.

A distribuição da esquistossomose no Brasil coincide com a distribuição geográfica das espécies de *Biomphalaria* susceptíveis; no entanto, o nível de susceptibilidade em cada espécie ou linhagem do molusco pode influenciar na prevalência da infecção humana.

## **1.2 Ciclo de vida do *S. mansoni***

*Schistosoma mansoni* possui um ciclo biológico complexo, no qual se observa uma notável interação adaptativa entre o parasito e seus hospedeiros definitivo e intermediário. Os hospedeiros intermediários são moluscos pertencentes à Classe Gastropoda, Família Planorbidae e Gênero *Biomphalaria*. No Brasil, existem onze espécies (uma nova espécie, *Biomphalaria cousini*, recentemente notificada por Teodoro et al., 2010) e uma sub-espécie, pertencentes a esse gênero, mas somente três já foram encontradas eliminando cercárias de *S. mansoni* em condições naturais. São elas: *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (d'Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1848) (Paraense, 1975).

Ovos do *S. mansoni* eliminados nas fezes de indivíduos infectados entram em contato com a água. Na água, sob influência de temperatura e luminosidade, os miracídios eclodem do ovo, nadam e penetram nos moluscos. Após a penetração dos miracídios, ocorre a perda do epitélio ciliar e a degeneração do terebratorium (extremidade anterior do parasito, onde se encontram as terminações das glândulas

adesivas e de penetração). Em seguida, ocorre o desaparecimento da musculatura subepitelial e do sistema nervoso. A larva se torna imóvel e passa a ser chamada de esporocisto primário. Na 2ª semana após a penetração, observa-se, no interior do esporocisto primário, uma série de ramificações tubulares que preenchem todos os espaços intercelulares do tecido conjuntivo; nestas ramificações, as células germinativas estão em intensa multiplicação. A partir do 14º dia, inicia-se, então, a formação dos esporocistos secundários. Ocorre o desenvolvimento de um aglomerado de células germinativas nas paredes do esporocisto primário, a formação de vacúolos mais acentuada na parte central da larva. Os aglomerados se reorganizam e dão origem a septos, sendo cada septo considerado um esporocisto secundário. Nessa fase, as paredes apresentam uma camada cuticular e, abaixo, dupla camada muscular com fibras musculares longitudinais e transversais. Essa musculatura é fundamental para locomoção dos esporocistos. Ocorre, a partir do 18º dia, a migração transtecidual dos esporocistos, até alcançarem a glândula digestiva ou hepatopâncreas. Esses esporocistos secundários sofrem modificações anatômicas, dando início à proliferação das células germinativas e formação das cercárias. A formação completa das cercárias, até a sua emergência, ocorre de 27 a 30 dias após a penetração dos miracídeos (Pan, 1965). Essas cercárias são eliminadas pelo molusco e, ao encontrarem um hospedeiro definitivo, as cercárias penetram através da pele ou mucosa, transformando-se em esquistossômulos, que penetram nos vasos sanguíneos e são levados pela circulação periférica, via coração direito, aos pulmões. Posteriormente, migram para o fígado, via circulação sanguínea, onde ocorre a maturação dos vermes para posterior acasalamento. Logo depois, os vermes migram para as veias mesentéricas inferiores, onde ocorre a postura de ovos. Parte desses ovos ganha a circulação e deposita-se no fígado. Inicia-se, então, uma reação inflamatória ao redor desses ovos, levando à formação de granulomas, o evento patogênico mais grave na esquistossomose. Outros ovos podem depositar-se nas paredes intestinais e em outras partes do organismo, produzindo granulomas, enquanto outros alcançam a luz intestinal, sendo, então, eliminados pelas fezes, reiniciando o ciclo (Figura 1).

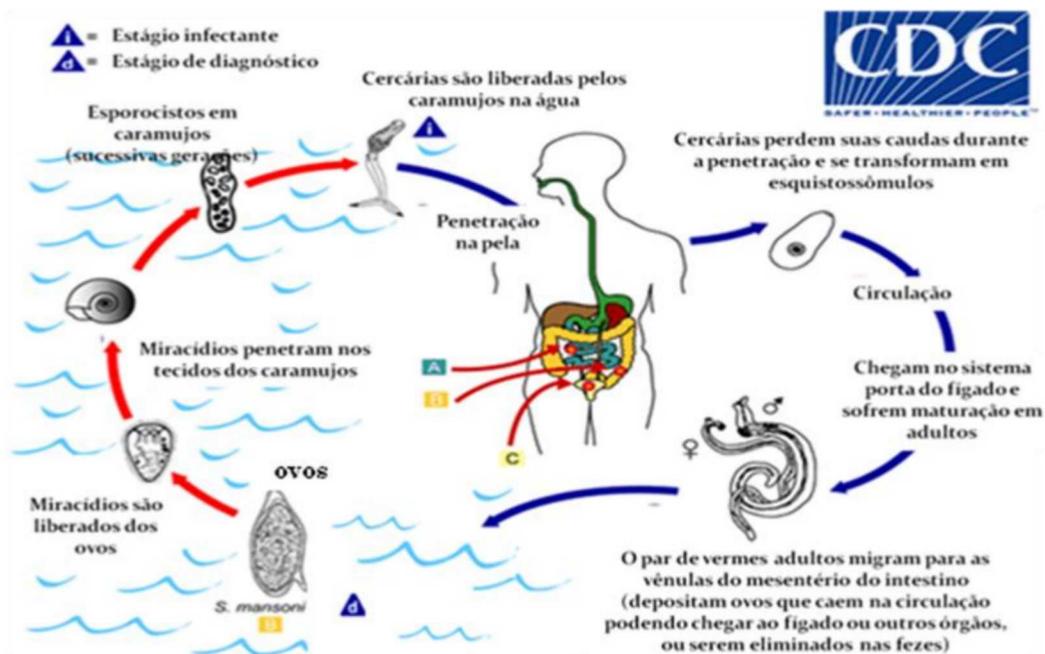


Figura 1. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*. Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

### 1.3 Sistema interno de defesa do molusco

Uma característica marcante na interação *Biomphalaria/Schistosoma mansoni* é o elevado grau de especificidade. Está bem estabelecido na literatura que um número restrito de espécies, ou mesmo linhagens de *Biomphalaria*, são susceptíveis a uma determinada cepa de *S. mansoni* (Basch, 1976). O grau de compatibilidade entre *S. mansoni* e *Biomphalaria* é determinado por fatores genéticos tanto do parasito quanto do hospedeiro intermediário (Basch, 1976). Newton (1953) e Richards (1973) demonstraram, respectivamente, que a susceptibilidade de *B. glabrata* ao *S. mansoni*, bem como o caráter de resistência adquirido pelo molusco na maturidade estão ligados à constituição genética do molusco. Além dos fatores genéticos, o desenvolvimento do *S. mansoni* no molusco também é influenciado por fatores ambientais, por aspectos comportamentais do miracídio e do caramujo (Basch, 1976; Richards, 1973; Richards & Shade, 1987). Analisando populações de *B. glabrata* de diferentes localidades do Brasil, Paraense & Corrêa (1963) relataram uma grande variação no nível de susceptibilidade ao *S. mansoni* nas diferentes linhagens geográficas. Variação no nível de susceptibilidade também é relatada na espécie *B. tenagophila*, sendo encontradas linhagens altamente susceptíveis ao parasito e outras totalmente resistentes à infecção pelo *S. mansoni* (Paraense e Corrêa, 1978).

Fator fundamental, que influencia diretamente no destino da infecção e que é determinado geneticamente, é a atividade do sistema interno de defesa (SID) do molusco. Segundo Van der Knaap & Loker (1990) e Glinski & Jarosz (1997), o SID dos moluscos é composto por elementos celulares, constituído por hemócitos ou amebócitos, e elementos humorais, conhecidos como fatores solúveis presentes na hemolinfa que, juntos, agem na destruição de parasitos. Os hemócitos podem estar livres, circulando na hemolinfa ou fixos nos tecidos. Em *B. glabrata* e *Bulinus sp.*, uma região bem definida, localizada entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto, conhecido como órgão produtor de amebócitos (APO - amebocyte producing organ), foi identificada como o principal local de produção de hemócitos (Lie & Heynman, 1976). Sullivan et al. (2004) e Sullivan & Castro (2005) relataram que a inoculação de antígenos de miracídios ou cercárias de *S. mansoni* induziu um aumento de mitoses em células da região do APO. Entretanto, outros autores (Matricon-Gondran & Letorcart, 1999; Souza & Andrade, 2006) demonstraram que hemócitos de *B. glabrata* podem ter origem multi-cêntrica, sendo observados outros sítios de proliferação de hemócitos nos túbulos renais e na cavidade ventricular do coração. Vários estudos demonstram que os hemócitos são os principais elementos efetores do SID dos moluscos, atuando na fagocitose de partículas e microorganismos e/ou encapsulamento de invasores de maior porte, como é o caso das larvas de helmintos (Van der Knaap & Loker, 1990; Negrão-Corrêa et al., 2007; 2008). Apesar dos diversos estudos sobre os hemócitos da *Biomphalaria*, não há uma concordância em relação ao número e aos subtipos celulares. Utilizando metodologias e parâmetros distintos, autores já descreveram a presença de dois subtipos de hemócitos (Harris, 1975; Yoshino, 1976; Lo Verde et al., 1982; Lie et al., 1987; Barraco et al., 1993; Johnston & Yoshino, 2001); três subtipos celulares (Martins-Souza et al., 2009; e Matricon-Gondran & Letorcart, 1999); e até quatro subtipos (Joky et al., 1983).

Além dos hemócitos circulantes e fixos, componentes solúveis da hemolinfa também são importantes na defesa dos moluscos contra parasitos (Van der Knaap & Loker, 1990). Esses fatores solúveis podem agir diretamente sobre os organismos invasores, por meio de moléculas tóxicas e peptídeos líticos; ou, indiretamente, por meio de mediadores do reconhecimento de patógenos ou ativadores de hemócitos, como lectinas, lizozimas e produtos da ativação do sistema profenoloxidase (Cheng et al., 1977; Glinski & Jarosz, 1997; Adema et al., 1997; Negrão-Corrêa et al., 2007). Sapp e Loker (2000) demonstraram que, em várias das interações entre gastrópodos

e digenéticos, fatores solúveis da hemolinfa desses moluscos são responsáveis por matarem os esporocistos em cerca de 6 horas, no entanto, a natureza desses fatores ainda não está bem estabelecida. Estudos da transferência de componentes solúveis da hemolinfa de *Biomphalaria* resistentes para *Biomphalaria* susceptíveis foram realizados (Granath & Yoshino, 1984; Coelho e Bezerra, 2006; Pereira et al., 2008) e mostraram uma redução da susceptibilidade dos caramujos que receberam os fatores solúveis da hemolinfa.

Os mecanismos pelos quais o SID destrói os parasitos ainda não foram completamente esclarecidos, porém se sabe que os moluscos podem eliminar patógenos por meio de fagocitose, formação de nódulos, encapsulamento e reação de citotoxicidade. De acordo com Glinski & Jarosz (1997), se o invasor for unicelular, será eliminado por fagocitose com participação de lectinas e produtos do sistema profenoxidase. Já invasores em grande número e tamanho serão eliminados por formação de nódulos ou encapsulamento com participação de processos celulares e humorais. O contato do hemócito com o tegumento do parasito pode resultar no encapsulamento dos esporocistos, na lesão do tegumento, podendo resultar na destruição do parasito (Newton, 1952; Bayne et al., 2001). No processo de encapsulamento e destruição dos esporocistos, existe um efeito aditivo entre hemócitos e hemolinfa. Bayne et al. (1984) demonstraram que hemócitos de *B. glabrata* susceptíveis e resistentes foram capazes de encapsular os parasitos, mas somente os hemócitos de caramujos resistentes conseguiram gerar dano significativo na membrana dos esporocistos.

Outro mecanismo envolvido na morte do parasito parece ser a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos hemócitos (Adema et al., 1994; Hahn et al., 2001). Já foi demonstrada a presença de carboidratos (principalmente glicoproteínas) como principais componentes do tegumento de miracídios e esporocistos de *S. mansoni* (Zelck et al., 1990; Uchikawa et al., 1991) e, de acordo com Johnston & Yoshino (1996), essas glicoproteínas podem ser reconhecidas por lectinas presentes na fração solúvel da hemolinfa de *B. glabrata*. Hahn et al. (2000) demonstraram que esses carboidratos presentes na superfície dos esporocistos podem estimular a produção de ROS pelos hemócitos de *B. glabrata*, resultando na morte do parasito. Martins-Souza (2006) confirmou esses resultados e verificou a produção de ROS por hemócitos de *B. tenagophila* resistentes e susceptíveis ao *S. mansoni*, porém não foi possível correlacionar claramente a produção de ROS com resistência/susceptibilidade.

Nos invertebrados, um mecanismo importante na defesa contra microorganismos e parasitos multicelulares é o encapsulamento melanótico ou a melanização (Ratcliffe et al., 1985; Christensen & Forton, 1986; Vass et al., 1993; Chen et al., 1995; Cerenius & Söderhäll, 2004). Esse processo compreende diversos componentes, como: moléculas de reconhecimento, serino-proteases e o zimogênio profenoloxidase (proPO). Quando o patógeno invade o hospedeiro, componentes da superfície desses patógenos (carboidratos, glicoproteínas, lipopolissacárides) serão reconhecidos por moléculas do SID, chamadas de proteínas reconhecedoras de patógenos (PRPs), conseqüentemente, uma cascata de serino-proteases será rapidamente ativada na hemolinfa. Posteriormente, proteínas ativadoras da fenoloxidase (PAP) serão responsáveis pela transformação da forma inativa da enzima (proPO) em forma ativa, chamada de fenoloxidase (PO). A PO utiliza como substrato a L-DOPA culminando com a formação de melanina (Cerenius & Söderhäll, 2004; Franssens et al., 2008) (Figura 2). Segundo Ashida & Yamazaki (1990), a PO é uma enzima multifuncional presente em microorganismos, plantas e uma variedade de animais, como insetos (Ratcliffe & Gagen, 1976; Chen et al., 1995; Nigan et al., 1997; Gomes et al., 1999, 2003; Garcia et al., 2004; Machado et al., 2006; Franssens et al., 2008), crustáceos (Hernandez-Lopez et al., 2003; Liu et al., 2006) e moluscos, como ostras (Hellio et al., 2007; Thomas-Guyon et al., 2009) e mexilhão (Coles & Pipe, 1994; Asokan et al., 1997; Wootton et al., 2003; Hong et al., 2006).

Em trabalho realizado por Newton et al (2004), foi possível relacionar maior atividade da enzima PO com a resistência de ostras à infecção por microorganismos do reino protista. Em mexilhões, Munõz et al (2006) observaram uma maior atividade de PO em moluscos infectados com protozoários, quando comparado com mexilhões não infectados. Porém, essa diferença só foi observada em infecções com carga parasitária baixa; com carga parasitária elevada, houve inibição do sistema proPO. Maior atividade de PO na presença de fungos e bactérias também já foi demonstrada em moluscos, sugerindo importante envolvimento dessa enzima no mecanismo interno de defesa nesses organismos (Smith & Söderhäll, 1991; Asokan et al., 1997; Deaton et al., 1999). Chen et al (1995) verificaram que lectinas são capazes de ativar, indiretamente, o sistema proPO. Em experimentos mais detalhados, verificaram que as lectinas eram capazes de ativar a cascata de serino-proteases, que, por sua vez, ativava o sistema proPO. Em outro trabalho realizado por Franssens et al (2008), observou-se que inibidores da cascata da serino-

proteases foram capazes de inibir a atividade de PO, demonstrando, mais uma vez, a importância desta cascata para a ativação do sistema proPO.

Especificamente em *B. glabrata* já foi descrita a presença da PO em hemócitos lisados (Bahgat et al., 2002) e também seu envolvimento na formação de ovos dessa espécie (Bai et al., 1997a,b). Contudo, no estudo realizado por Bahgat et al. (2002), não foi observada nenhuma diferença significativa na atividade de PO em *B. glabrata* com diferentes níveis de susceptibilidade ao *S. mansoni*. Nesse mesmo trabalho, Bahgat et al. (2002) demonstraram a presença de serino-proteases em hemócitos lisados de *B. glabrata*, porém não foi possível associar a atividade destas enzimas à resistência/susceptibilidade ao parasito. Recentemente, Pereira (2009), após fracionamento da hemolinfa (ausente de células) de *B. tenagophila* Taim, verificou a presença de serino-proteases. Além disso, realizou estudos *in vitro* para avaliar a atividade dessa fração sobre esporocistos de *S. mansoni*, transformados *in vitro*, e observou que a fração contendo essas enzimas foi capaz de causar danos intensos ao tegumento de esporocistos, bem como gerar alta taxa de mortalidade dos parasitos *in vitro*, demonstrando a importância das serino-proteases na defesa da *B. tenagophila* Taim contra *S. mansoni*. Dessa forma, levando-se em conta a influência das serino-proteases na ativação da fenoloxidase, justifica-se a busca por uma melhor compreensão acerca da atividade de proPO na *B. tenagophila* Taim (totalmente resistente ao *S. mansoni*) na presença e ausência do parasito.

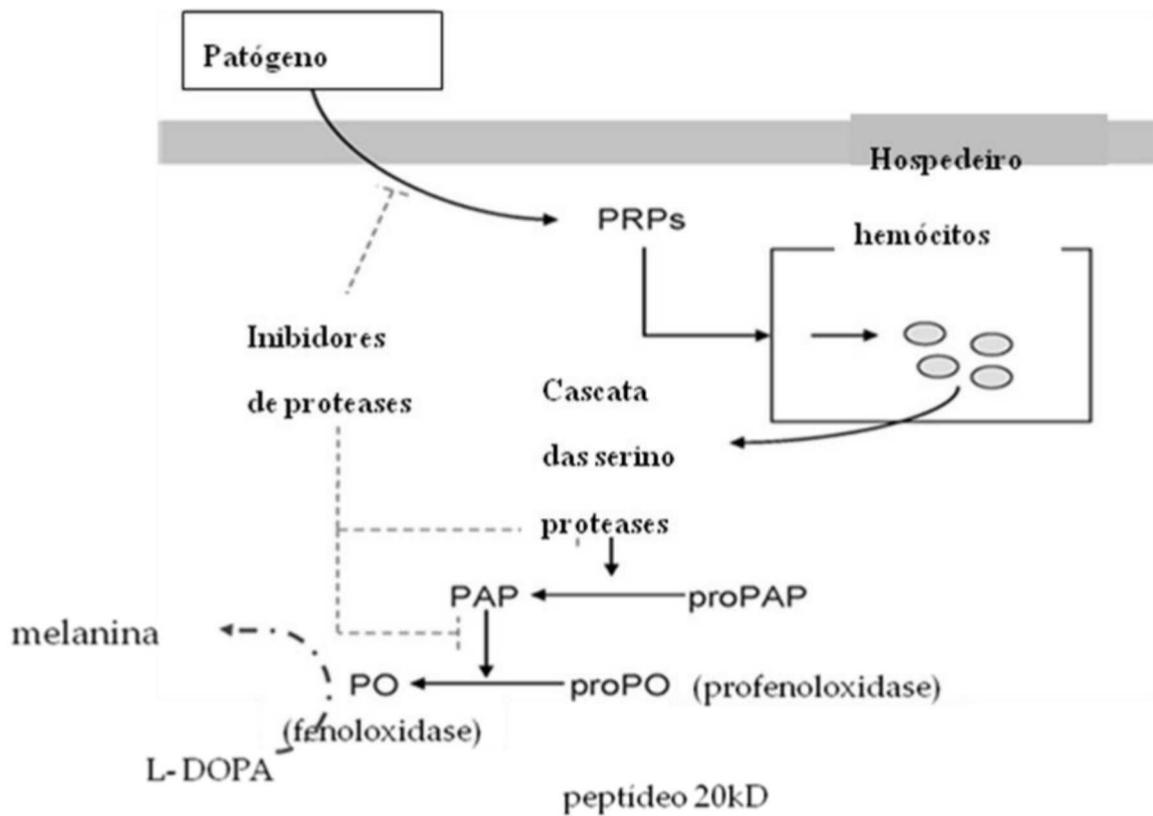


Figura 2. Cascata de ativação do sistema da profenoloxidase. Adaptado de Franssens et al., (2008). PRPs (proteínas reconhecedoras de patógenos), PAP (proteínas ativadoras da fenoloxidase).

#### 1.4 Mecanismos de escape do *S. mansoni*

Diante dos componentes do SID, bem como dos mecanismos efetores das células e fatores solúveis da hemolinfa, torna-se evidente como o processo de compatibilidade/ resistência entre hospedeiros e parasitos é complexo. Porém, da mesma forma que, para ocorrer a manutenção da vida do hospedeiro é necessária a presença do SID (independente de qual seja o hospedeiro), é também fundamental que o parasito tenha mecanismos de escape que garantam sua sobrevivência nesse ambiente.

Os mecanismos de escape do *S. mansoni* ainda são pouco conhecidos, no entanto, Connors & Yoshino (1990) e Yoshino et al (1993) sugeriram que as larvas de *Schistosoma* possuem proteases e enzimas neutralizantes de ROS, que seriam capazes de inibir enzimas lisossomais e ROS geradas pelo caramujo hospedeiro. Porém, diante da existência de sistemas *Biomphalaria/ Schistosoma* compatíveis expressando altos níveis de enzimas circulantes, bem como da existência de parasitos de espécies distintas (um compatível e outro incompatível a determinado

hospedeiro, expressando igual resistência ao dano por ROS), essas sugestões não são adequadas para explicar o padrão de compatibilidade/resistência molusco-digenea (Adema & Loker, 1997). Mourão et al (2009) mostraram que esporocistos de *S. mansoni* são capazes de produzir enzimas neutralizantes de ROS, SOD (superóxido desmutase) e GST (glutathione S-transferase). Além disso, quando essas enzimas são silenciadas utilizando a técnica de RNA interference (RNAi) as larvas tornam-se mais susceptíveis à ação do SID da *Biomphalaria* susceptível. Tem sido relatado, também, que componentes do material excretado/secretado (ES) pelo miracídio no processo de transformação em esporocisto são capazes de reduzir a motilidade dos hemócitos, bem como sua capacidade fagocitária (Lodes & Yoshino, 1990; Connors & Yoshino, 1990). Em trabalho recente, que estabelece um proteoma global dos produtos excretados/secretados (ES) de *S. mansoni* e *Echinostoma caproni*, Guillou et al (2007) verificaram a presença de proteínas inibidoras de ROS, envolvidas na glicólise e na sinalização/carreamento de cálcio. Além disso, realizaram a predição funcional dessas proteínas sobre o SID do molusco, sugerindo: a) envolvimento em atividade antioxidante; b) influência sobre o processo de encapsulamento por hemócitos; e c) favorecimento da invasão e migração do esporocisto pelo tecido do hospedeiro.

Um mecanismo de escape importante, realizado pelo *S. mansoni*, é o processo chamado mascaramento molecular, que é a produção ou adsorção de antígenos do hospedeiro na superfície do tegumento como estratégia de escape do SID de *Biomphalaria* (Basch, 1976). De acordo com Johnston and Yoshino (1996), o tegumento do esporocisto é uma interface importante na comunicação molecular entre parasito e hospedeiro, sendo o principal alvo de ataque do SID do molusco. O processo de mascaramento molecular é capaz de dificultar o processo de reconhecimento do parasito pelos hemócitos. Estudos realizados por Yoshino & Bayne (1983) demonstraram, por meio de imunofluorescência e microscopia imunoelétrica, que esporocistos são capazes de adsorver antígenos do hospedeiro, quando cultivados *in vitro*, na presença de componentes derivados do molusco. Porém os parasitos (miracídios e esporocistos) são capazes de sintetizar naturalmente moléculas semelhantes às do hospedeiro, mesmo quando cultivado na ausência de fatores da *Biomphalaria*. Neste último caso, o fenômeno seria descrito como mimetismo molecular (intrínseco do parasito).

Trabalhos mais recentes apontam para uma semelhança entre *S. mansoni* e *Biomphalaria* no que diz respeito à composição de carboidratos de superfície. Essa

similaridade sugere uma convergência molecular entre parasito e hospedeiro (Peterson et al. 2009; Van Die and Cummings, 2010; Lehr et al. 2010). Além disso, o estudo de Lehr et al.(2010) correlaciona o grau de similaridade na composição dos carboidratos com resistência e susceptibilidade do hospedeiro ao parasito. No entanto, todos esses trabalhos foram realizados utilizando *B. glabrata*, espécie altamente susceptível ao *S. mansoni*. Além disso, os estudos que analisaram a resposta em caramujos parcialmente resistentes utilizaram *B. glabrata* com resistência selecionada em laboratório, após repetidas tentativas de infecção. Assim, seria de grande valia estudar o comportamento do SID de *B. tenagophila* Taim (totalmente resistente à infecção), frente a esporocistos secundários de *S. mansoni* oriundos de *B. glabrata*, logo, já trazendo consigo moléculas vindas desta espécie.

### **1.5 *Biomphalaria tenagophila* Taim**

*Biomphalaria tenagophila* é a segunda espécie em importância na transmissão da esquistossomose no Brasil. A distribuição dessa espécie no país vai desde o sul da Bahia, passando por Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, com pontos isolados na região Sul do país (Carvalho et al., 2008). Apesar de ser a espécie responsável pela manutenção da transmissão da doença em focos em São Paulo, Minas Gerais e Santa Catarina, é encontrada na natureza com baixas taxas de infecção (Paraense, 1986). Conforme já mencionado, existem linhagens de *B. tenagophila* susceptíveis ao *S. mansoni*, bem como linhagens totalmente resistentes à infecção, como é o caso da linhagem *B. tenagophila* Taim, objeto deste estudo.

*Biomphalaria tenagophila* Taim é proveniente da Reserva Ecológica do Taim no Rio Grande do Sul. Essa linhagem foi coletada na década de 70, durante um trabalho de levantamento malacológico realizado na área pelo professor José Rabelo de Freitas. Testes de susceptibilidade realizados em laboratório e publicados por Corrêa et al.(1979) e Santos et al. (1979) revelaram a resistência dessa linhagem ao *S. mansoni*. Desde então, nosso grupo vem trabalhando no modelo *B. tenagophila* Taim – *S. mansoni* na tentativa de esclarecer os fatores envolvidos nessa resistência. Bezerra et al. (2003) submeteu a *B. tenagophila* Taim à radiação (10Krad), na tentativa de imunossuprimir o molusco e posteriormente desafiou os moluscos com *S. mansoni*. Porém, ao final do ensaio, todos os caramujos do Taim permaneceram negativos; além disso, a radiação não foi capaz de alterar a atividade fagocítica dos hemócitos. Outra tentativa de vencer a resistência da linhagem Taim

foi realizada por Martins-Souza et al. (2003). Nesse estudo, após inoculação de sílica e desafio de moluscos *B. tenagophila* susceptíveis e resistentes com miracídeos de *S. mansoni*, foi possível observar uma redução no número de hemócitos circulantes, bem como um aumento de células mortas na hemolinfa de ambas as linhagens. No entanto, a resistência absoluta da linhagem Taim ao *S. mansoni* foi mantida.

De acordo com Paraense (1955), *Biomphalaria*, molusco, hermafrodita, só realiza autofecundação quando está isolada; na presença de outro caramujo, existe a preferência pela reprodução cruzada. Baseados nesse conceito, Rosa et al. (2005) estudaram a herança genética do caráter de resistência à infecção pelo *S. mansoni* em cruzamentos realizados entre *B. tenagophila* Taim e a linhagem geográfica de Joinville (susceptível ao parasito). Nesse estudo, os autores demonstraram que 100% dos descendentes da geração F1 são resistentes ao *S. mansoni*. Já os descendentes da geração F2, 8% foram susceptíveis à infecção, porém produziram significativamente menos cercárias e apresentaram auto-cura quando comparados com a linhagem susceptível. Esses resultados mostraram que o gene que confere resistência ao *B. tenagophila* Taim é dominante e que existem outros genes secundários que interferem na infecção (F2).

A importância dos hemócitos na eliminação do parasito foi demonstrada em trabalho publicado por Barbosa et al. (2006). Nesse estudo, foi realizado o transplante do APO da linhagem Taim (resistente) para uma linhagem susceptível da mesma espécie (linhagem Cabo Frio). Os caramujos susceptíveis nos quais o transplante havia ocorrido com sucesso (confirmado pela presença do marcador do Taim – 350pb – descrito por Rosa et al. 2004) passaram a ser totalmente resistentes ao parasito, não havendo eliminação de cercárias ao final do experimento. Por outro lado, outros trabalhos já demonstraram a participação dos fatores solúveis na destruição do parasito. A transferência passiva de fatores solúveis da hemolinfa (na ausência de hemócitos) de caramujos resistentes para susceptíveis foi responsável pela resistência parcial dos moluscos, sendo verificada uma redução na taxa de infecção (Coelho e Bezerra, 2006) e no número de esporocistos e cercárias eliminadas pelos moluscos receptores (Pereira et al. 2008). Nesse mesmo trabalho, Pereira et al. (2008) demonstraram, por meio de ensaios *in vitro*, que o contato de hemócitos da linhagem susceptível associados aos fatores solúveis da linhagem Taim com esporocistos causa uma taxa de mortalidade significativamente maior do que a gerada pelo SID (hemócitos + fatores solúveis) de moluscos susceptíveis,

demonstrando, mais uma vez, que os fatores solúveis podem agir de forma direta ou indireta na eliminação do parasito.

O estudo das lectinas presentes na superfície dos hemócitos da *B. tenagophila* Taim também tem sido importante para esclarecer os mecanismos envolvidos na resistência. Os hemócitos *B. tenagophila* (linhagens susceptíveis e resistentes) apresentam marcação mais intensa com diferentes lectinas (ConA, PNA, SBA, WGA) do que *B. glabrata*. Após o desafio com *S. mansoni*, porém, ocorre uma redução significativa dessas células marcadas na linhagem Taim, sugerindo o envolvimento desses carboidratos no reconhecimento dos parasitos (Martins-Souza et al., 2009). Interessante foi o resultado obtido por Jannotti-Passos et al. (2008), empregando a abordagem da proteômica. Utilizando esta metodologia, foram identificados “spots” exclusivos para cada uma das linhagens (Cabo Frio-susceptível e Taim-resistente), antes e após o desafio pelo *S. mansoni*. A identificação dessas proteínas pode ser a chave para esclarecer os genes envolvidos na resistência absoluta do Taim ao *S. mansoni*.

Todas essas evidências contribuem para uma melhor compreensão a respeito dos mecanismos utilizados pela *B. tenagophila* Taim na eliminação do *S. mansoni*. Além disso, fornecem consistência à definição de resistência absoluta do Taim frente ao *Schistosoma*, o que fortalece a estratégia de controle da transmissão da esquistossomose por meio da introdução da linhagem Taim e áreas onde a transmissão é mantida por caramujos *B. tenagophila* (Coelho et al., 2004 e 2008).

### **1.6 *Echinostoma paraensei***

Os parasitos do gênero *Echinostoma* (Trematoda, Digenea: Echinostomatidae) possuem uma ampla distribuição geográfica, tendo em vista a grande variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados que ele é capaz de parasitar (Huffman & Fried, 1990). No ciclo de vida do *Echinostoma* vários animais podem servir como hospedeiro definitivo, incluindo pássaros aquáticos, roedores, carnívoros e humanos. Ovos não embrionados saem nas fezes e se desenvolvem na água. Os miracídios levam aproximadamente 10 dias para alcançarem a maturação final, assim eclodem e penetram no primeiro hospedeiro intermediário, um caramujo. Vários são os gêneros de caramujos que podem ser hospedeiros intermediários, dentre eles a *Biomphalaria*. No tecido do caramujo três diferentes estágios se desenvolvem: esporocisto, uma ou duas gerações de rédia e cercária. A cercária

pode se encistar como metacercária neste hospedeiro ou ser liberada pelo caramujo, penetrando em outro hospedeiro e encistando em segundo hospedeiro intermediário. Vários animais podem servir como segundo hospedeiro: outro caramujo, bivalves, peixes, etc. O hospedeiro definitivo se infecta após ingerir o segundo hospedeiro intermediário contendo a metacercária. Essa metacercária se desincista no duodeno e o verme adulto se aloja no intestino delgado (Huffman & Fried, 1990) (Figura 3). No Brasil existem 25 espécies do gênero *Echinostoma*, sendo *E. paraensei* o primeiro isolado de *B. glabrata* naturalmente infectada (Lie & Basch, 1967). O hospedeiro vetebrado *Nectomys squamipes* (rodedor aquático) naturalmente infectado com *E. paraensei* também já foi descrito na literatura, no estado do Rio de Janeiro (Maldonado Jr et al., 2001). Neste mesmo estudo foi demonstrado que o parasito era capaz de manter o ciclo de vida em caramujos *B. glabrata*, *Physa marmorata* e *Lymnaea columella*, espécies simpátricas.

Vários trabalhos já foram publicados descrevendo aspectos da interação de *B. glabrata* e *E. paraensei*. Tunholi et al (2011a) verificaram que *E. paraensei* não altera a capacidade reprodutiva da *B. glabrata* infectada, aspecto diferente do observado durante a infecção do caramujo pelo *S. mansoni*. Neste trabalho apenas a viabilidade dos ovos foi reduzida em relação aos dos caramujos controles. Por outro lado, semelhante à infecção pelo *S. mansoni*, a infecção pelo *E. paraensei* causa uma redução na concentração de proteínas totais da *B. glabrata* e um aumento na atividade de enzimas associadas a danos teciduais, o que explicaria o intenso dano observado no tecido do caramujo durante a penetração do miracídio e subsequente desenvolvimento de esporocisto e redia (Tunholi et al., 2011b). Loker et al (1986) verificaram, por meio de experimentos *in vitro* que a hemolinfa de *B. glabrata* resistente ao *S. mansoni* e desafiados com *E. paraensei* é capaz de matar menos esporocistos do que a hemolinfa proveniente de caramujos controles (não desafiados) ou obtida de *B. glabrata* susceptíveis. Esse dado sugere que o esporocisto do *E. paraensei* libera fatores que interferem na habilidade da *B. glabrata* em matar o *S. mansoni*. No entanto, estudo realizado utilizando *B. tenagophila* Taim, verificou que a infecção prévia da linhagem Taim pelo *E. paraensei* não torna o molusco susceptível ao *S. mansoni* (Garcia et al., 2010). É importante ressaltar que a linhagem Taim é completamente resistente ao *S. mansoni*, mas susceptível ao *Echinostoma paraensei*.

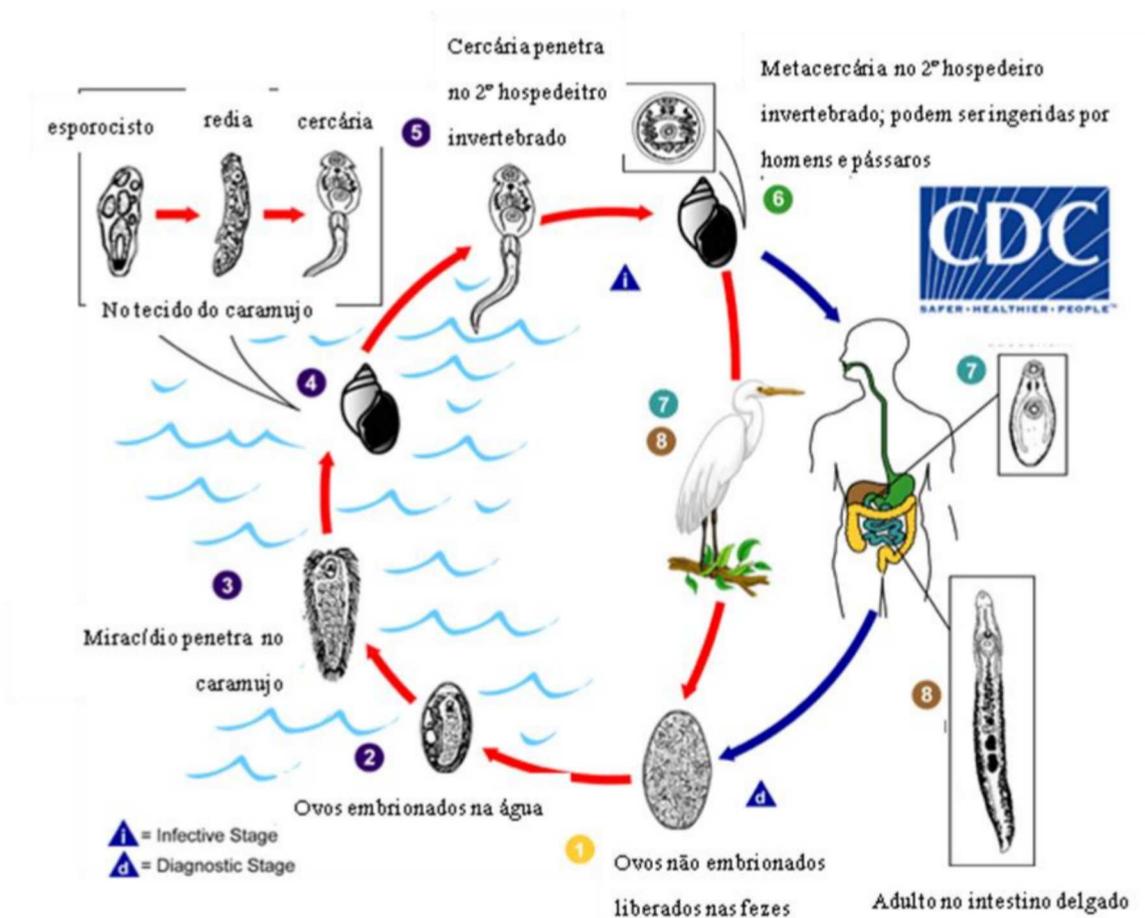


Figura 3. Ciclo de vida do *Echinostoma*. Adaptado de [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Echinostomiasis\\_il.html](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Echinostomiasis_il.html)

## 2 Justificativa

Apesar de haver, na literatura específica, vários trabalhos realizados sobre o Sistema Interno de Defesa (SID) dos invertebrados, ainda permanecem importantes perguntas não elucidadas em relação a este sistema, bem como de sua relação com a susceptibilidade a parasitos causadores de doenças no homem. Sabe-se da existência de uma linhagem de *B. tenagophila*, isolada da Reserva Ecológica do Taim/RS, totalmente resistente ao *S. mansoni*. Inúmeras tentativas de infecção já foram realizadas por nosso grupo, utilizando diversas cepas geográficas do parasito, como também cargas variáveis de miracídios (Santos et al., 1979; Correa et al., 1979; Bezerra et al., 1997; Martins-Souza et al., 2003; Bezerra et al., 2003; Rosa et al., 2004, 2005, 2006; Barbosa et al., 2006; Pereira et al., 2008; Coelho et al., 2008; Mattos et al., 2011). Dessa forma, o conhecimento dos diversos aspectos dessa interação molusco-trematódeo, como, por exemplo, o envolvimento do Sistema Profenoloxidase (proPO) na eliminação do parasito, bem como o mascaramento/mimetismo molecular como estratégia de escape necessitam ser explorados. Esses resultados podem contribuir para o maior entendimento dos mecanismos de defesa utilizados pelos moluscos *Biomphalaria* na eliminação do *S. mansoni*. Além disso, melhor entendimento a respeito do SID da linhagem de *B. tenagophila* Taim, resistentes à infecção pelo *S. mansoni*, pode ser de grande valia para a elaboração de novas estratégias no controle da transmissão da esquistossomose. A utilização da linhagem Taim como alternativa de controle da transmissão da doença tem como suporte várias premissas, tais como: (1) a absoluta resistência dessa linhagem ao *S. mansoni*; (2) o caráter dominante dessa resistência; e (3) a redução da sobrevivência e da postura dos ovos nos caramujos susceptíveis provocada pela infecção pelo parasito, havendo, assim, simultaneamente, uma seleção negativa sobre as linhagens susceptíveis e uma dominância da linhagem resistente do Taim. Assim, os caramujos do Taim introduzidos na área de transmissão teriam maiores chances de sobreviver e, por intercruzamento com a população local, transferir o patrimônio genético da resistência aos descendentes. Dessa forma, este trabalho busca o conhecimento de fatores envolvidos na interação parasito-hospedeiro intermediário na esquistossomose mansoni, que poderiam dar suporte na abordagem do uso de *B. tenagophila* resistente para o controle de transmissão.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo Geral

Investigar mecanismos de defesa utilizados pela *B. tenagophila*, linhagens Taim (resistente) e Cabo Frio (susceptível) frente à exposição ao *S. mansoni*.

### 3.2 Objetivos Específicos

- PO  
 BT Verificar a atividade da enzima fenoloxidase (PO) de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, expostos e não ao *S. mansoni*;
- PO  
 BT Verificar a atividade da enzima fenoloxidase (PO) de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, expostos e não ao *Echinostoma paraensei*;
- PO  
 BT Avaliar o índice de adesão celular de esporocistos primário e secundário de *S. mansoni*, após exposição ao Sistema Interno de Defesa (SID) da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio;
- PO  
 BT Avaliar a viabilidade de esporocistos primário e secundário de *S. mansoni*, após exposição ao SID da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio;
- PO  
 BT Verificar, por meio de marcadores fluorescentes, a presença de dano no tegumento de esporocistos primários e secundários de *S. mansoni*, após o contato com componentes do SID da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio;
- PO  
 BT Avaliar o desenvolvimento de esporocisto secundário após inoculação em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio e *B. glabrata*.

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Caramujos e parasitos

Os caramujos utilizados neste estudo foram: *B. glabrata* linhagem Barreiro de Cima, mantidos rotineiramente pelo Moluscário “Lobato Paraense” do Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ. *Biomphalaria tenagophila* linhagem Taim, totalmente resistente ao *S. mansoni*, originário da Reserva Biológica do Taim (RS), criados em Bananal/SP, sob a supervisão do Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, e *B. tenagophila* da linhagem Cabo Frio, provenientes da criação do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE/ UFMG) e mantidos rotineiramente pelo Moluscário “Lobato Paraense” do Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ. Os caramujos da linhagem Cabo Frio (Cabo Frio/ RJ) são susceptíveis à infecção pelo *S. mansoni* e apresentam taxas de positividade variando entre 30-40 % frente à infecção pela cepa LE e SJ do parasito. Todos os caramujos utilizados neste trabalho possuíam entre 12 e 14 mm de diâmetro. Os parasitos usados foram *S. mansoni*, da cepa LE, ciclo mantido no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ e *Echinostoma paraensei*, ciclo mantido no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatório – IOC/FIOCRUZ.

### 4.2 Obtenção e transformação “*in vitro*” de miracídios em esporocistos primários de *S. mansoni* e *E. paraensei*

Para obtenção de miracídios de *S. mansoni*, fígados de camundongos infectados foram processados conforme descrito por Pellegrino & Katz (1968). Os miracídios foram coletados em tubos Falcon (50ml) e mantidos no gelo para sedimentação. Para obtenção de miracídios de *E. paraensei*, vermes adultos foram dissecados para obtenção dos ovos. Esses ovos foram incubados em B.O.D 26°C por, aproximadamente, 15 dias. Após esse período, os ovos foram expostos à luz artificial para eclosão dos miracídios. Os miracídios de *S. mansoni* e *E. paraensei* foram transformados *in vitro* de acordo com a técnica descrita por Mattos et al (2006). Resumidamente, o cultivo/transformação dos miracídios foi realizado em meio de cultura RPMI – 1640 pH 7,4 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) suplementado com 5%(v/v) de soro bovino fetal inativado (SBF) (Gibco Limited,

Paisley, Scotland) e 20µg/mL de antibiótico gentamicina (Garamox – 80mg/ Hipolabor). Os miracídios foram mantidos em estufa incubadora B.O.D., a 26°C, por 24 horas. Ao final desse procedimento, os esporocistos foram lavados e colocados em Solução Salina Balanceada de Chernin – CBSS [47,7 mM de NaCl; 2,0 mM de KCl; 0,49 mM de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM de MgSO<sub>4</sub> ; 7H<sub>2</sub> O; 3,6 mM de CaCl<sub>2</sub> ; 2 H<sub>2</sub> O; 0,59 mM de NaHCO<sub>3</sub> ; 5,5 mM de glicose e 3 mM de trealose, pH 7.4] ou tampão cacodilato isotônico [10mM de cacodilat de sódio, 10mM de CaCl<sub>2</sub>, 280mM de sacarose, pH 7,4] (dependendo do ensaio) e utilizados em experimentos distintos.

#### 4.3 Obtenção de esporocistos secundários de *S. mansoni*

Os esporocistos secundários foram obtidos conforme descrito por Pereira et al (1984). Para isso, caramujos *B. glabrata* foram infectados com 50 miracídios cada, segundo técnica descrita por Souza et al (1995). Quatorze dias após a infecção, a região cefalopodal do caramujo foi dissecada e o tecido, contendo os esporocistos, foi triturado com auxílio de uma tesoura e pinça. Os fragmentos teciduais foram transferidos para uma tela Kato (malha de nylon de 200µm) e mantidos em contato com CBSS pH 7,4 por 2 horas, em banho Maria a 28°C. Durante esse período, ocorreu a passagem dos esporocistos do tecido para o CBSS pH 7,4, através da tela de Kato. Após passagem pela tela, o material com os esporocitos foi centrifugado 1000 rpm por 2 minutos, lavados; e os esporocistos, contados em microscópio para utilização nos diferentes experimentos.

#### 4.4 Coleta de hemolinfa e isolamento de hemócitos

Antes da coleta da hemolinfa, os caramujos *B. tenagophila* e *B. glabrata* foram submetidos a um procedimento de limpeza (com solução de detergente) e desinfecção (penicilina-estreptomicina -100µg/mL e Anfotericina B – 4mg/ml) “overnight”. A coleta da hemolinfa foi realizada de acordo com o protocolo Bezerra et al (1997) e Martins-Souza et al., 2006). Resumidamente, a concha de cada caramujo foi limpa com álcool 70 % e seca com papel absorvente. Posteriormente utilizando-se uma seringa plástica de 1ml (Injex) com agulha de 21 G, a concha do molusco foi perfurada na região cardíaca até o extravasamento da hemolinfa que foi coletada e transferida para tubos de polipropileno ou de vidro siliconizados e mantidos no gelo. Em alguns ensaios, a hemolinfa foi utilizada de forma fracionada, separando-se os hemócitos da fração solúvel da hemolinfa. Para isso, após a coleta, a hemolinfa total

(HT) foi centrifugada 1000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante (parte solúvel) foi colocado em outro tubo (fração S), enquanto os hemócitos (“pellet”) foram ressuspendidos em CBSS suplementado com 2% de aminoácidos essenciais (Sigma); 5% de SFB; 2% de penicilina-estreptomicina, até o volume inicial (fração H). Antes dos experimentos, os hemócitos foram quantificados em câmara de Neubauer e avaliados quanto à viabilidade, após adição de Azul de Tripán 0,4% (Martins-Souza et al., 2006). Os detalhes para cada experimento serão descritos separadamente em cada item a seguir.

#### **4.5 Avaliação da atividade da Fenoloxidase (PO) em *Biomphalaria tenagophila* linhagens Taim e Cabo Frio expostos ao *S. mansoni* ou *E. paraensei***

Os experimentos realizados em nosso estudo tinham como objetivo: (1) determinar a atividade enzimática da fenoloxidase (PO) em *B. tenagophila* resistente e susceptível ao *S. mansoni*; (2) avaliar a atividade da fenoloxidase em *B. tenagophila* resistente e susceptível exposto ao esporocisto primário e secundário de *S. mansoni*; e (3) determinar o possível envolvimento da PO no mecanismo de defesa da *B. tenagophila* contra *S. mansoni* e *E. paraensei*.

Para alcançarmos os objetivos 1 e 3, foram realizados experimentos “*in vitro*”, nos quais a hemolinfa total e os esporocistos foram obtidos separadamente e colocados em contato apenas no momento da reação; e experimentos “*ex vivo*”, no qual a hemolinfa total foi coletada de moluscos em diferentes períodos de infecção pelo parasito. Já para o objetivo 2 foram realizados apenas ensaios “*in vitro*”.

Inicialmente foi necessário padronizar o período pós-alimentação dos caramujos, ideal para coleta da hemolinfa, para consequente realização do ensaio da atividade da fenoloxidase (PO). A padronização foi necessária, tendo em vista o processo de limpeza realizado nos caramujos antes da coleta da hemolinfa, no qual os caramujos precisam ficar em água e sem alface (utilizada como alimento). Somado a isso, foi observado que, em insetos, o período pós-alimentação influencia a atividade de PO. Para isso, a hemolinfa total de 5 exemplares de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio foi coletada após jejum total de 1, 5 e 10 dias e analisada como “pool”.

#### 4.5.1 Ensaio “*In vitro*”

A hemolinfa total de 10 exemplares de cada linhagem estudada (Taim ou Cabo Frio) foi coletada, separadamente, conforme descrito anteriormente. A hemolinfa total de cada exemplar foi diluída na proporção de 1:10 em tampão cacodilato isotônico pH 7,4. Foram realizados experimentos utilizando esporocistos primários e secundários de *S. mansoni*, a fim de verificar se havia diferença na atividade de PO frente a esses dois estádios do parasito. Além disso, foram realizados experimentos utilizando esporocistos primários de *E. paraensei* (*B. tenagophila* Taim e Cabo Frio são susceptíveis a esse parasito). A cada poço da placa de 96, foram distribuídos: 22,5µl de hemolinfa total, 10 esporocistos primários (*S. mansoni* ou *E. paraensei*) ou secundários (*S. mansoni*) - servindo como ativadores da PO - e volume de tampão cacodilato isotônico suficiente para completar 112,5µl. Nos controles foi acrescentado o mesmo volume de tampão isotônico no lugar dos parasitos. Após o período de 3 horas de incubação com os parasitos, foram acrescentados 37,5µl de L-DOPA (4mg/ml - substrato da fenoloxidase) solubilizada em tampão cacodilato hipotônico (10mM de cacodilato de sódio, 10mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4), completando 150µl o volume total da reação. As amostras foram analisadas em duplicata, em dois experimentos distintos. As leituras da absorbância foram realizadas em leitor de ELISA, laser 490nm, imediatamente após a adição de L-DOPA, 30 minutos, 1, 2 e 3 horas após o acréscimo do substrato. A atividade enzimática foi expressa em  $A_{492} \times 100/\text{mg}$  de proteína (padronização baseada em Garcia et al., 2004; Machado et al., 2006).

#### 4.5.2 Ensaio “*Ex vivo*”

Nos experimentos “*ex vivo*”, 20 caramujos das linhagens (Taim e Cabo Frio) foram desafiados com 10 miracídios de *S. mansoni* ou 10 miracídios de *E. paraensei*. A hemolinfa total de 5 exemplares de cada linhagem foi coletada, como já descrito, nos períodos de 1, 24 e 48 horas após o desafio, bem como a hemolinfa total de 5 exemplares, não desafiados de cada linhagem, para cada período, servindo com controle. Após a coleta, a hemolinfa total foi diluída 1:10 em tampão cacodilato de cálcio hipotônico. A reação foi realizada em placa de 96 poços, sendo distribuído por poço: 22,5µl de hemolinfa total, 90µl de tampão cacodilato isotônico e a adição de 37,5µl de L-DOPA (4mg/ml) solubilizada em tampão cacodilato hipotônico, completando 150µl o volume total da reação. As amostras foram

analisadas em duplicata, em dois experimentos distintos. As leituras da absorbância foram realizadas em leitor de ELISA, laser 490nm, imediatamente após a adição de L-DOPA, 30 minutos, 1, 2 e 3 horas após o acréscimo do substrato. A atividade enzimática foi expressa em  $A_{492} \times 100/\text{mg}$  de proteína (padronização baseada em Garcia et al., 2004; Machado et al., 2006).

Para confirmar que os resultados obtidos eram decorrentes de atividade enzimática da PO, foi realizado experimento utilizando hemolinfa total da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, submetida a aquecimento, bem como utilizando a feniltiourea (PTU) como inibidor da PO. Para isso, a hemolinfa total de 10 exemplares de cada linhagem foi coletada conforme já descrito e diluída 1:10 em tampão cacodilato isotônico (volume final 100 $\mu\text{l}$ ). A hemolinfa foi, então, submetida a aquecimento por 15 minutos a 56°C ou foi acrescentado a cada amostra de hemolinfa total 20 $\mu\text{l}$  de PTU a 10mM por 1 hora. Após esses períodos, 22,5 $\mu\text{l}$  de hemolinfa submetida às condições descritas acima foram distribuídas em placas de 96 poços (em duplicata) e expostas a 10 esporocistos de *S. mansoni*. Hemolinfa não aquecida e não incubada com PTU, expostas e não aos esporocistos, foram utilizadas como controle. Após 3 horas de incubação com os parasitos, a L-DOPA (4mg/ml) foi adicionada e as leituras da absorbância foram realizadas em leitor de ELISA, laser 490nm, imediatamente após a adição de L-DOPA, 30 minutos, 1, 2 e 3 horas após o acréscimo do substrato. A atividade enzimática foi expressa em  $A_{492} \times 100/\text{mg}$  de proteína (padronização baseada em Garcia et al., 2004; Machado et al., 2006). Para o cálculo do percentual de inibição da atividade da PO, utilizou-se como 100% de atividade a média de  $A_{492} \times 100/\text{mg}$  de proteína, encontrada após 3 horas da adição de L-DOPA, nos poços com hemolinfa não submetidas a aquecimento ou sem PTU. A partir da média de  $A_{492} \times 100/\text{mg}$  de proteína, encontrada após 3 horas da adição de L-DOPA, nos poços submetidos às diferentes condições de inibição, verificou-se o percentual de atividade da PO sob aquecimento ou contato com inibidor. Esse percentual de atividade foi subtraído de 100 e encontrado o percentual de inibição, tanto pelo aquecimento, quanto pelo PTU.

Em todos os ensaios a quantificação da proteína presente nas amostras de hemolinfa foi realizada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). Além disso, em todos os experimentos foram realizados controles sem adição do substrato L-DOPA. Os dados dos ensaios foram analisados estatisticamente, utilizando análise de variância ou teste t de Student para dados paramétricos e teste de Kruskal Wallis ou Mann Whitney para dados não paramétricos, todos no programa GraphPad Prism 4.

#### 4.6 Avaliação do índice de adesão celular e viabilidade de esporocisto primário e secundário, após exposição ao SID da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio

O objetivo desses ensaios foi verificar se há diferença no índice de adesão e viabilidade (1) quando são utilizados diferentes tipos de esporocistos (primário ou secundário); (2) quando são utilizados componentes do SID de caramujos resistentes ou susceptíveis ao parasito.

Nesses experimentos, foram utilizados “pool” de hemolinfa de 20 caramujos Taim, Cabo Frio e *B. glabrata*, sendo a hemolinfa coletada, fracionada, conforme já descrito no item 4.4, e utilizada a parte fatores solúveis da hemolinfa (fração S); os hemócitos (fração H) e a hemolinfa total, denominada HT.

Os experimentos foram realizados em placas de cultura de 24 poços. Trinta microlitros da fração S, da fração HT e  $2 \times 10^5$  hemócitos - fração H – de *B. tenagophila* (Taim e Cabo Frio) e *B. glabrata* foram colocadas em contato com 20 esporocistos primários e secundários, separadamente, dependendo do ensaio, e o volume completado para de 300µl com CBSS. Para os experimentos de índice de adesão celular e viabilidade/mortalidade, foram preparados 10 poços para cada linhagem e/ou fração; poços contendo apenas esporocistos foram utilizados como controle. As placas foram mantidas em B.O.D a 26°C. Após 2 horas de incubação, um total de 100 esporocistos para cada linhagem foi analisado em microscópio óptico invertido para verificar o número de hemócitos aderidos à superfície dos esporocistos conforme descrito por Castillo & Yoshino (2002). Nesta avaliação, foi atribuído um valor arbitrário de 1 a 4, valor este chamado de Índice de Adesão Celular (IAC), assim identificado: IAC 1: em que não se observava hemócitos aderidos à superfície do esporocisto; IAC 2: em que havia até 10 hemócitos aderidos; IAC 3: em que se observava entre 11 e 50 hemócitos; e IAC 4: em que havia mais de 50 hemócitos aderidos. A fórmula para calcular o IAC foi a seguinte:

$$\text{IAC} = \frac{\text{Valor total de adesão}}{\text{Número de esporocistos avaliados}}$$

O valor total de adesão foi obtido pelo somatório dos valores de IAC (1-4) de todos os esporocistos avaliados em cada linhagem e fração de hemolinfa. As

análises estatísticas foram utilizadas: teste t de Student (two-tailed) / teste Mann-Whitney (two-tailed) ou Análise de Variância (One-way)/ teste Kruskal-Wallis seguido da comparações múltiplas de Dunn's no software GraphPad Prism 4. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de P foi  $\leq 0,05$ .

A viabilidade dos esporocistos primários e secundários foi avaliada em microscópio óptico invertido, 6 horas após a incubação em B.O.D a 26°C. A proporção de esporocistos mortos foi verificada pela adição de 20µL de Azul de Tripán 0,4%. Os esporocistos corados foram considerados mortos. Para cada linhagem/espécie de *B. tenagophila* (Taim ou Cabo Frio) ou *B. glabrata* e cada fração de hemolinfa foram contados todos os esporocistos de cada poço.

O teste Qui-quadrado e o teste exato de Fisher (quando necessário) foram utilizados para análise dos dados, empregando o software Minitab 14.

#### **4.7 Verificação, por meio de marcadores fluorescentes, da presença de dano no tegumento de esporocistos primários e secundários de *S. mansoni*, após o contato com componentes do SID da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio**

Estes experimentos foram realizados para verificar a presença de dano no tegumento de esporocistos primários e secundários, após exposição aos componentes da hemolinfa fracionados. Foram conduzidos ensaios utilizando: apenas fatores solúveis da hemolinfa (S); apenas hemócitos (H) e hemolinfa total (HT) da linhagem Taim e Cabo Frio.

Trinta microlitros da fração S, HT e  $2 \times 10^5$  de hemócitos (fração H) da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio foram colocados em contato com 20 esporocistos primários ou secundários, separadamente, em placas de 24 poços e o volume completado 300µl/ poço com CBSS. Foram delineados 6 poços para cada componente da hemolinfa, esporocisto primário e secundário, além de poços controles, contendo apenas esporocistos. As placas foram mantidas em B.O.D. a 26°C. Após 3 horas de incubação, o conteúdo de 3 dos 6 poços de cada componente da hemolinfa foi coletado e transferido para tubos falcon de 15ml. Os esporocistos foram, então, marcados com sondas fluorescentes durante 30 minutos, posteriormente lavados três vezes com CBSS e analisados em microscópio de fluorescência (K-Zeiss). Após 5 horas de incubação, o procedimento descrito acima

foi realizado com o restante dos parasitos. Em ambos os períodos de observação, foram utilizados diferentes marcadores fluorescentes, descritos a seguir.

#### **a) Hoechst 33258**

A sonda Hoechst 33258 (bis benzamida) (2,4 hidroxifenil 5, 4 metil, 1 piperazina 2,5 bi H-benzimidazol) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA: 10mg/ml) é um marcador que possui afinidade por DNA, só se tornando fluorescente quando se liga a este. Contém, ainda, um caráter hidrofílico e, devido a isso, não consegue se difundir para o interior das células. Essas características o tornam um indicador de integridade de membrana, uma vez que só se ligará ao DNA da célula quando houver algum tipo de lesão (sonda utilizada por Mattos et al., 2006).

#### **b) Lectina de *Glicine max* (soybean) (SBA) conjugada a tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC)**

A lectina de *Glicine max* (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA: 1mg/ml) se liga a carboidratos de membrana, mais especificamente a N-acetilgalactosamina (fração glicídica de glicolípídeos e glicoproteínas), composto abundante nas membranas celulares. A lesão da membrana celular pode levar à exposição de N-acetilgalactosamina, a qual irá se ligar à lectina de *Glicine max*, conjugada ao fluoróforo TRITC (tetrametil rodamina isotiocianato). A fluorescência proveniente do TRITC determina o local no qual ocorreu a exposição de N-acetilgalactosamina, localizando uma área lesada (sonda utilizada por Mattos et al., 2006).

#### **c) Alexa-Fluor 488 faloidina**

A Alexa-Fluor 488 faloidina (Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, USA: 1mg/ml) liga-se especificamente à actina (sonda utilizada por Oliveira et al., 2006). A actina é um dos constituintes do citoesqueleto das células do tegumento do *S. mansoni*. A presença de dano causado no parasito pode levar à exposição de actina, a qual irá se ligar à faloidina, que está conjugada com a Alexa flúor 488 (fluoróforo). Assim, áreas de fluorescência verde referem-se a áreas onde houve a exposição de actina.

### **4.8 Imagens fotográficas e análise estatística**

Para as análises, os esporocistos foram colocados em lâminas e observados em microscópio óptico e de fluorescência (K-Zeiss). Os filtros utilizados foram:

vermelho para Lectina de *Glicina max* TRITC (excitação/emissão máxima da TRITC 543/571nm), verde para Alexa-Fluor 488 (excitação/emissão máxima da Alexa-Fluor 499/520 nm) e azul para Hoechst 33258 excitação/emissão máxima da Hoechst 352/455 nm). As imagens foram obtidas utilizando a câmera digital Canon EOS Digital Rebel XT. O software ImageJ 1.43 foi usado para calcular a intensidade média de fluorescência/área para cada imagem obtida em cada experimento, empregando a ferramenta “color histogram”. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Mann Whitney (two-tailed) no programa GraphPad Prism 4. As diferenças foram consideradas significativas se  $P \leq 0,05$ .

#### **4.9 Avaliação do desenvolvimento de esporocisto secundário após inoculação em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio**

A fim de verificar se o esporocisto é capaz de realizar o processo de mascaramento molecular e, conseqüentemente, desencadear um menor reconhecimento do parasito pelo SID da *B. tenagophila* Taim, caramujos *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, bem como *B. glabrata* (controle da inoculação) foram utilizados neste ensaio. Para isso, 30 esporocistos secundários, obtidos conforme descrito no item 4.3 e mantidos em CBSS, foram inoculados conforme descrito por Jourdane & Théron (1980), com modificações. Foram utilizados 65 exemplares de *B. tenagophila* Taim e *B. glabrata* e 35 exemplares de *B. tenagophila* Cabo Frio (divididos em 2 experimentos distintos). Resumidamente, os caramujos foram anestesiados em solução contendo 0,4mg/ml de pentobarbital sódico (Hypnol 3%) por, no mínimo, 6 horas (Martins-Souza et al., 2001). Uma amostra de esporocisto secundário foi corada com Azul de Tripán 0,4% e apenas os parasitos não corados foram contados. Após este período, os esporocistos secundários foram inoculados (volume máximo de 30µL) no pé dos caramujos (região cefalopodal) com auxílio de seringa e agulha 30G. Os caramujos foram examinados 14, 21, 27 e 35 dias após a inoculação. Para isso, os caramujos foram colocados, individualmente, em beckers de 10mL contendo água sem cloro e expostos à luz artificial por uma hora em cada período estabelecido. O conteúdo dos beckers foi examinado em microscópio estereoscópico para detecção de cercárias.

## 5 Resultados

### 5.1 Avaliação da atividade do Sistema Profenoloxidase (proPO) em *Biomphalaria tenagophila* linhagens Taim e Cabo Frio expostos ao *S. mansoni* ou *E. paraensei*

#### 5.1.1 Atividade de PO x Período pós-alimentação

A partir dos ensaios realizados para determinar o período de coleta da hemolinfa foi possível verificar uma atividade de PO significativamente maior quando o ensaio foi realizado com hemolinfa total retirada após 1 dia de jejum, com 3 horas de contato com a L-DOPA (Gráfico 1). Esse resultado já era esperado, visto que, no modelo *Rhodinus prolixus/ Trypanosoma rangeli* (Machado, comunicação pessoal), foi verificado que quanto maior o tempo pós-alimentação dos barbeiros, menor era a atividade de PO. No caso dos barbeiros, o tempo ideal foi de 5 dias após repasto sanguíneo, tendo em vista o tempo gasto para a metabolização do sangue.

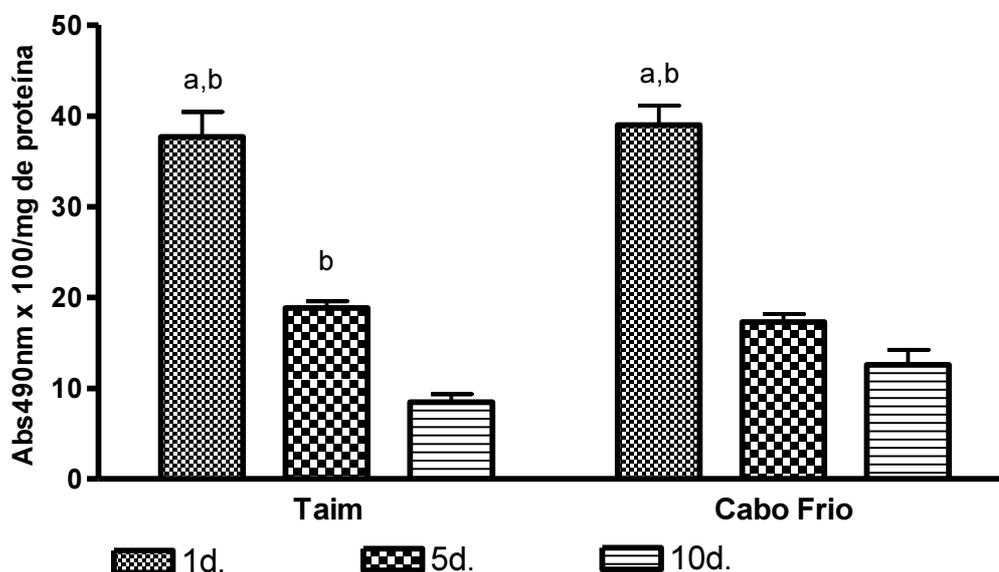


Gráfico 1. Padronização do período de coleta da hemolinfa dos caramujos pós-alimentação, leitura três horas após adição de L-DOPA (média  $\pm$  DP). Taim: *B. tenagophila* Taim; Cabo Frio: *B. tenagophila* Cabo Frio. 1d 3h, 5d 3h e 10d 3h: 1 dia, 5 dias e 10 dias de jejum, respectivamente, no período de 3 horas de análise. As letras a, b mostram as diferenças

estatísticas do resultado de 1d após alimentação em relação a 5d e 10d, respectivamente; a e b:  $P < 0,001$ . Média da atividade da fenoloxidase em Abs490nm x 100/ mg de proteína.

A partir desse resultado, todos os demais ensaios foram realizados com hemolinfa coletada 1 dia após alimentação dos caramujos.

### **5.1.2 Atividade de PO x Fatores inibitórios**

Para confirmar que os resultados obtidos nos ensaios utilizando a L-DOPA como substrato eram mesmo em decorrência da atividade da fenoloxidase, a hemolinfa total dos caramujos, das duas linhagens em estudo, foram submetidas a condições de inibição. O aquecimento da hemolinfa por 15 minutos a 56°C leva à desnaturação de enzimas, o que conseqüentemente reduzirá a atividade da enzima. A utilização de inibidores específicos da PO também foi necessária, já que o aquecimento da hemolinfa leva à desnaturação de proteínas presentes na amostra, enquanto a feniltioureia (PTU) 10mM é específica para as enzimas envolvidas no sistema da profenoloxidase. O aquecimento da hemolinfa e a PTU 10mM foram capazes de inibir a atividade da PO. Na Tabela 1 está descrita a atividade específica da PO, na presença ou ausência de fatores inibitórios, na linhagem Taim e Cabo Frio, na presença ou ausência do esporocisto de *S. mansoni*. O percentual de inibição demonstra a redução da atividade da enzima causada por esses dois fatores inibitórios.

Tabela 1. Atividade específica da PO de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio submetida a aquecimento por 15 minutos a 56°C ou exposta à feniltioureia (PTU- 10mM), leitura 3 horas após adição de L-DOPA (4mg/ml)

Grupos	Hemolinfa Total (Média ± DP)*	Hemolinfa Total aquecida	Hemolinfa Total + PTU
		*Média±DP (% de inibição)	*Média±DP (% de inibição)
<i>B. tenagophila</i> Taim	30,57±2,7	6,72±0,23 (78%)	20,78±1,84 (32%)
<i>B. tenagophila</i> Taim + Parasito	34,95±4,9	9,43±1,45 (73%)	25,86±1,37 (26%)
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio	26,75±3,2	8,02±0,87 (70%)	17,12±2,5 (36%)
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio + Parasito	30,61±5,1	7,04±1,02 (77%)	21,12±2,2 (31%)

\* Atividade Específica da Fenoloxidase - valores expressos em Abs490nm x 100/mg de proteína  
 PTU: Feniltiuréia – inibidor da fenoloxidase

### 5.1.3 Atividade da PO x *S. mansoni*

#### 5.1.3.1 Atividade da PO x Esporocisto primário - Ensaio “*in vitro*”

Para a avaliação da atividade enzimática da PO em *B. tenagophila* Taim (resistente) e Cabo Frio (susceptível), foi realizado, em um primeiro momento, os ensaios “*in vitro*” utilizando esporocistos primários transformados “*in vitro*”. Foram utilizados 10 exemplares de cada linhagem, sendo analisados individualmente. Nesses experimentos, os parasitos foram colocados em contato com a hemolinfa total da *B. tenagophila* no momento do ensaio. Após 3 horas de incubação, foram realizadas as leituras da absorbância nos períodos de 30 minutos, 1, 2 e 3 horas após a adição de L-DOPA.

Os dados visualizados no Gráfico 2 mostram que a PO da linhagem Taim apresentou atividade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) na presença do esporocisto primário de *S. mansoni* do que na ausência do parasito em todos os períodos de leitura. A atividade enzimática, ao final do experimento, foi de 30,57±2,7 na ausência do parasito, enquanto na presença do esporocisto a atividade foi de 34,95±4,9; um aumento de, aproximadamente, 13%. Resultado semelhante foi observado na

linhagem Cabo Frio. Diferença estatisticamente significativa foi observada entre a atividade enzimática na ausência e presença do parasito, em todos os períodos de leitura. Ao final do experimento, uma ativação da PO de, aproximadamente, 13% também foi observada, sendo a atividade enzimática final, na ausência do parasito, de  $26,75 \pm 3,2$  e, na presença do esporocisto,  $30,61 \pm 5,1$ . Sendo assim, ocorreu uma ativação da PO na presença do esporocisto primário de *S. mansoni*, tanto em *B. tenagophila* Taim, quanto na linhagem Cabo Frio. Foi possível observar um aumento gradual da atividade específica da enzima, conforme o tempo de leitura.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a atividade enzimática da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio na presença do parasito. Observa-se, no entanto, uma tendência de maior atividade enzimática na *B. tenagophila* Taim, na ausência do parasito, em relação à linhagem Cabo Frio, com diferença estatisticamente significativa ao final do experimento.

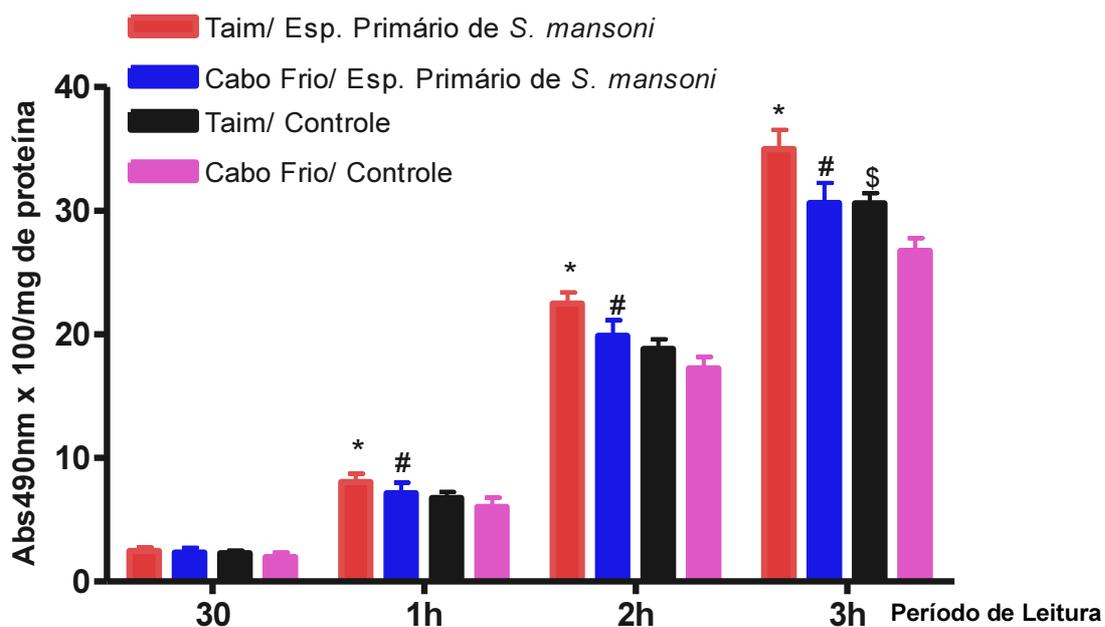


Gráfico 2. Cinética da atividade específica da fenoloxidase na hemolinfa total de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, expostas ou não ao esporocisto primário de *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Taim/Esp. Primário: hemolinfa de *B. tenagophila* Taim, exposta a esporocisto primário de *S. mansoni*; Cabo Frio/Esp. Primário: hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio, exposta a esporocisto primário de *S. mansoni*; Taim/Controle: hemolinfa de *B. tenagophila* Taim, não exposta a esporocisto primário de *S. mansoni*; Cabo Frio/Controle: hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio, não exposta a esporocisto primário de *S. mansoni*. Diferenças estatísticas significativas entre: \*Taim/Esp. Primário e Taim/Controle ( $P < 0,05$ ); #Cabo

Frio/Esp. Primário e Cabo Frio/Controle ( $P < 0,05$ ); <sup>§</sup>Taim/Controle e Cabo Frio/Controle ( $P < 0,05$ ).

### 5.1.3.2 Atividade de PO x Esporocisto secundário - Ensaio “*in vitro*”

Experimentos “*in vitro*”, utilizando esporocistos secundários obtidos de *B. glabrata* infectadas, também foram realizados. Nesses ensaios, foi utilizada hemolinfa total de 10 exemplares de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, que foi colocada em contato com os esporocistos no momento do ensaio, e, após 3 horas de incubação, foi acrescentado L-DOPA como substrato; as leituras foram realizadas até 3 horas após a adição de DOPA.

Não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas quando se comparou a atividade de PO na hemolinfa total de *B. tenagophila* Taim, exposta e não exposta ao esporocisto secundário diferente dos resultados obtidos na presença do esporocisto primário. No entanto, a hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio, exposta ao esporocisto secundário, apresentou uma atividade enzimática significativamente maior, nos períodos de 2 horas ( $14,57 \pm 3,0$ ) e 3 horas ( $21,17 \pm 4,6$ ) de análise, após a adição de L-DOPA, em relação à não exposta ao parasito (2 horas =  $11,63 \pm 2,4$  e 3 horas =  $18,18 \pm 3,5$ ), semelhante ao observado na presença do esporocisto primário (Gráfico 3),

Diferença estatisticamente significativa entre a atividade enzimática em *B. tenagophila* de Taim e Cabo Frio, exposta ao esporocisto secundário foi observada apenas no período de 1 hora de leitura, resultado esse semelhante ao observado no confronto com esporocisto primário. Além disso, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a atividade de PO em *B. tenagophila* de Taim e de Cabo Frio na ausência do esporocisto secundário. Ao final do experimento, a atividade enzimática na linhagem Taim foi de  $30,94 \pm 8,4$ , enquanto na linhagem Cabo Frio apenas  $18,18 \pm 3,5$ ; uma diferença de, aproximadamente, 40% na atividade da enzima. Foi demonstrado que a linhagem Taim possui uma atividade de PO maior do que a de Cabo Frio, independente da presença do parasito, tendência esta já observada anteriormente (Gráfico 3),

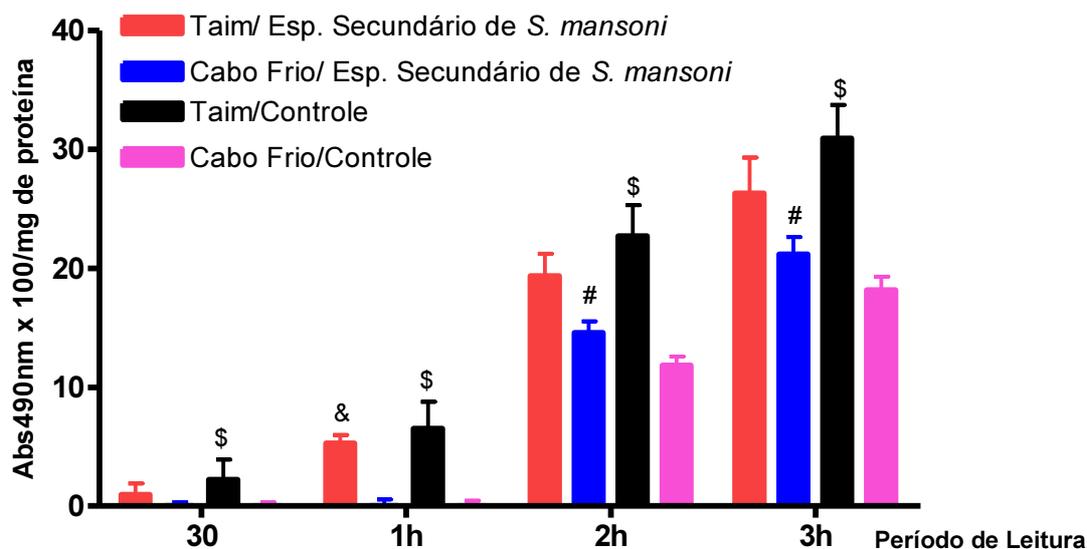


Gráfico 3. Cinética da atividade específica da fenoloxidase na hemolinfa total de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, expostas ou não ao esporocisto secundário de *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Taim/Esp. Secundário: hemolinfa de *B. tenagophila* Taim, exposta a esporocisto secundário de *S. mansoni*; Cabo Frio/ Esp. Secundário: hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio, exposta a esporocisto secundário de *S. mansoni*; Taim/Controle: hemolinfa de *B. tenagophila* Taim, não exposta a esporocisto secundário de *S. mansoni*; Cabo Frio/Controle: hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio, não exposta a esporocisto secundário de *S. mansoni*. Diferenças estatisticamente significativas entre: #Cabo Frio/Esp. Primário e Cabo Frio/Controle ( $P < 0,05$ ); &Taim/Esp. Secundário e Cabo Frio/ Esp. Secundário ( $P < 0,05$ ); \$Taim/Controle e Cabo Frio/Controle ( $P < 0,05$ ).

Uma comparação entre a atividade de PO de caramujos da mesma linhagem, porém expostos a esporocisto primário e secundário foi realizada com o objetivo de verificar se um possível mascaramento/mimetismo molecular realizado pelo parasito seria capaz de reduzir o reconhecimento do parasito e, conseqüentemente, influenciar na atividade de PO. Essa análise demonstrou que na *B. tenagophila* Taim (Gráfico 4) e Cabo Frio (Gráfico 5) houve uma atividade estatisticamente maior quando o hospedeiro foi exposto ao esporocisto primário. Ao final do experimento, a atividade enzimática na linhagem Taim, exposta ao esporocisto primário, foi de  $34,95 \pm 4,9$ ; enquanto exposta a esporocisto secundário, a atividade alcançou  $26,32 \pm 8,9$ ; uma diferença de, aproximadamente, 25%. Na linhagem Cabo Frio, a atividade da PO, ao final do ensaio, alcançou  $30,61 \pm 5,1$  na presença do esporocisto primário; já na presença do esporocisto secundário, a atividade da enzima foi de  $21,17 \pm 4,5$ ; uma diferença de, aproximadamente, 30%.

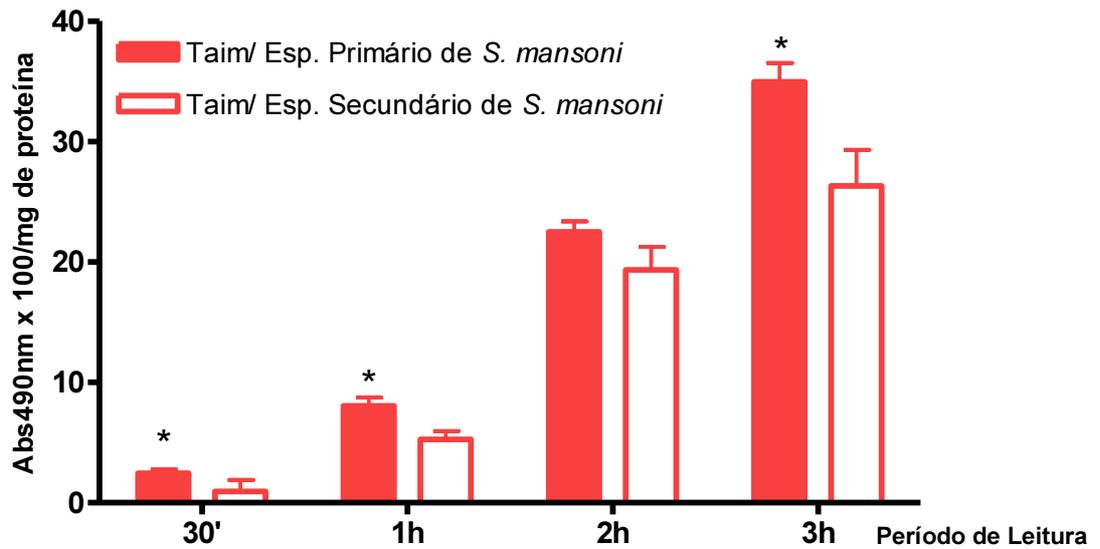


Gráfico 4. Cinética da atividade específica da fenoloxidase na hemolinfa total de *B. tenagophila* Taim, exposta a esporocisto primário ou secundário de *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Taim/Esp. Primário: hemolinfa de *B. tenagophila* Taim, exposta a esporocisto primário de *S. mansoni*; Taim/ Esp. Secundário: hemolinfa de *B. tenagophila* Taim, exposta a esporocisto secundário de *S. mansoni*. \*  $P < 0,05$ .

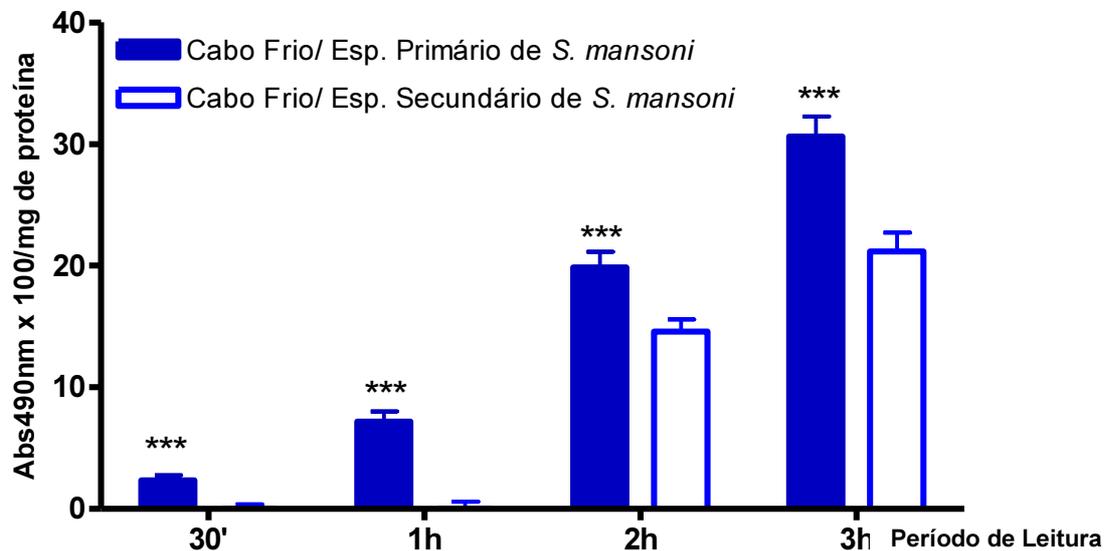


Gráfico 5. Cinética da atividade específica da fenoloxidase na hemolinfa total de *B. tenagophila* Cabo Frio, exposta a esporocisto primário ou secundário de *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Cabo Frio/Esp. Primário: hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio, exposta a esporocisto primário de *S. mansoni*; Cabo Frio/ Esp. Secundário: hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio, exposta a esporocisto secundário de *S. mansoni*. \*\*\*  $P < 0,001$ .

### 5.1.3.3 Atividade da PO x Desafio com *S. mansoni* - Ensaio “ex vivo”

Nos ensaios “ex vivo”, 20 caramujos *B. tenagophila* Taim e 20 Cabo Frio foram desafiados individualmente com 10 miracídios de *S. mansoni*. A hemolinfa de 5 exemplares de cada linhagem foi coletada nos períodos de 1, 24 e 48 horas após o desafio, bem como dos respectivos controles, não desafiados. Imediatamente após a coleta, a hemolinfa foi distribuída em placas de 24 poços e acrescentado o substrato L-DOPA. As leituras foram realizadas 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato.

Uma hora após o desafio, *B. tenagophila* Taim apresentou uma atividade enzimática estatisticamente maior do que seu controle, não desafiado, na primeira hora de análise. Ao final do experimento a linhagem Taim desafiada apresentava média da atividade enzimática de  $25,24 \pm 4,5$  enquanto o controle  $24,32 \pm 8,4$ . Diferença estatisticamente significativa foi observada, quando se comparou a atividade enzimática na *B. tenagophila* Cabo Frio desafiada em relação ao controle não desafiado, na primeira hora de análise. Porém, não houve uma tendência à ativação do sistema enzimático pelo parasito nos demais períodos de leitura. Ao final do experimento a linhagem Cabo Frio desafiada apresentava média da atividade enzimática de  $18,68 \pm 3,9$  enquanto o controle  $19,52 \pm 3,4$  (Gráfico 6).

Na comparação entre *B. tenagophila* Taim e a linhagem Cabo Frio, 1 hora após o desafio, a atividade enzimática se mostrou significativamente maior na linhagem resistente (Taim) (Gráfico 6), sugerindo uma ativação do sistema proPO pelo parasito. Ao final do ensaio, a atividade da PO na linhagem Taim foi de  $25,24 \pm 4,5$ ; enquanto na linhagem Cabo Frio foi de  $18,68 \pm 3,9$ . A diferença de atividade entre as linhagens, ao final do ensaio, foi de, aproximadamente, 26%.

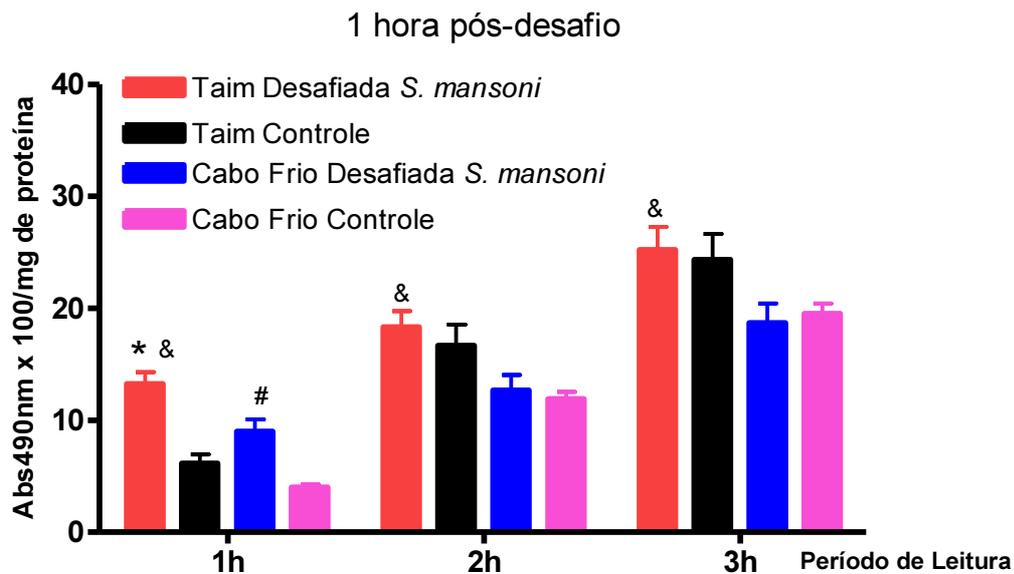


Gráfico 6. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio 1 hora após desafio pelo *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA. Taim Desafiada: *B. tenagophila* Taim desafiada com 10 miracídios *S. mansoni*; Taim Controle: *B. tenagophila* Taim não desafiada; Cabo Frio Desafiada: *B. tenagophila* Cabo Frio desafiada com 10 miracídios *S. mansoni*; Cabo Frio Controle: *B. tenagophila* Cabo Frio não desafiada. Diferenças estatisticamente significativas entre: \* Taim Desafiada e Taim Controle; #Cabo Frio Desafiada e Cabo Frio Controle ( $P < 0,05$ ); &Taim Desafiada e Cabo Frio Desafiada ( $P < 0,05$ ).

Vinte e quatro horas após o desafio, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre *B. tenagophila* Taim desafiada e seu respectivo controle, ao longo de todo o experimento. Ao final do ensaio, a atividade enzimática foi de  $24,80 \pm 4,6$  e  $24,32 \pm 8,4$  na *B. tenagophila* Taim desafiada e controle, respectivamente. Resultado semelhante foi observado na comparação da atividade enzimática na *B. tenagophila* Cabo Frio e seu controle não desafiado. Após o último período de leitura, a atividade enzimática na *B. tenagophila* Cabo Frio desafiada foi de  $19,32 \pm 3,6$  e  $19,52 \pm 3,4$  na linhagem Cabo Frio controle.

No entanto, diferenças estatisticamente significativas foram observadas na comparação entre as linhagens Taim e Cabo Frio desafiadas. A atividade enzimática foi significativamente maior quando a linhagem Taim foi desafiada (Gráfico 7). A atividade da PO na *B. tenagophila* Taim desafiada, ao final do ensaio, foi de  $24,80 \pm 4,6$ , enquanto na de Cabo Frio foi de  $19,32 \pm 3,6$ ; uma diferença de 22%.

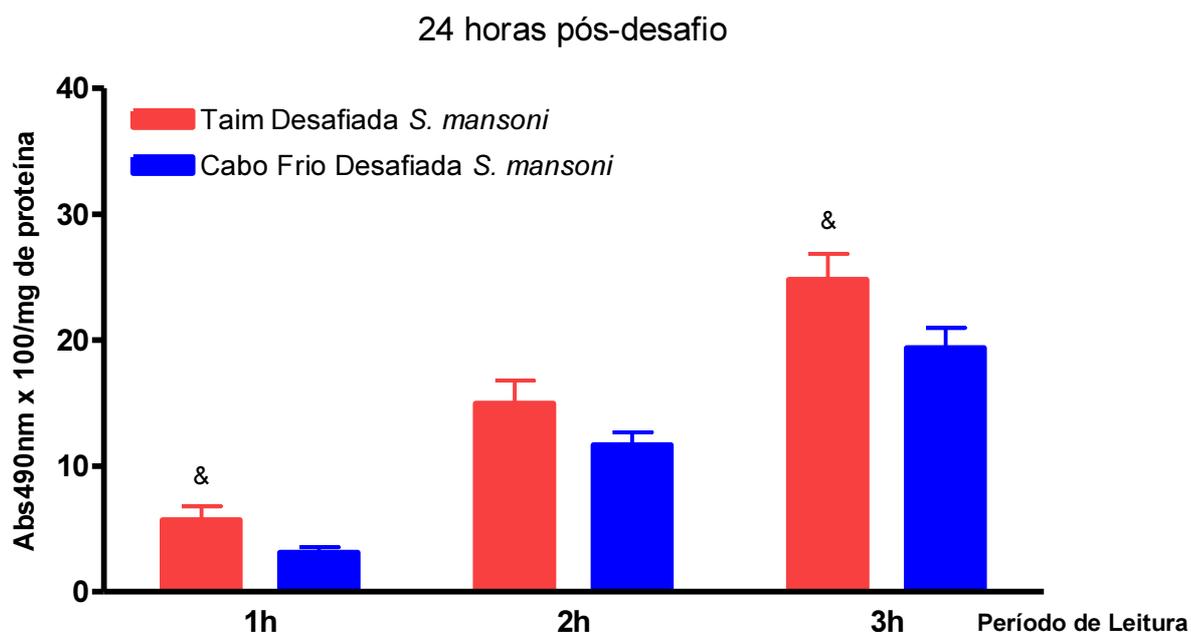


Gráfico 7. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio 24 horas após desafio pelo *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA. Taim Desafiada: *B. tenagophila* Taim desafiada com 10 miracídeos *S. mansoni*. Cabo Frio Desafiada: *B. tenagophila* Cabo Frio desafiada com 10 miracídeos *S. mansoni*. & P < 0,05.

Nos experimentos realizados 48 horas após o desafio, observaram-se diferenças estatisticamente significativas, quando se comparou *B. tenagophila* Taim desafiada e seu respectivo controle. A atividade da enzima foi significativamente maior quando o caramujo foi desafiado com *S. mansoni*, ao longo de todas as leituras. Ao final do ensaio, a atividade da PO foi de  $36,16 \pm 6,6$  na *B. tenagophila* Taim desafiada e  $24,32 \pm 8,4$  nos controles, uma atividade 32% maior na presença do parasito. Esse resultado foi diferente na *B. tenagophila* Cabo Frio. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a atividade enzimática no caramujo desafiado e seu controle não desafiado. Ao final das leituras, a atividade enzimática foi de  $22,73 \pm 3,8$  para caramujo desafiado contra  $19,52 \pm 3,4$  para caramujos controles. Além disso, foi observada diferença estatisticamente significativa entre *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio desafiadas. A atividade enzimática foi significativamente maior na linhagem Taim, sugerindo, mais uma vez, o possível envolvimento dessa enzima como mecanismo de defesa contra o *S. mansoni*. Ao final do ensaio, a diferença entre as médias da atividade da PO foi de, aproximadamente, 37%, uma vez que a média da atividade da PO foi  $36,16 \pm 6,6$  na

*B. tenagophila* Taim desafiada e de  $22,73 \pm 3,8$  na *B. tenagophila* Cabo Frio (Gráfico 8).

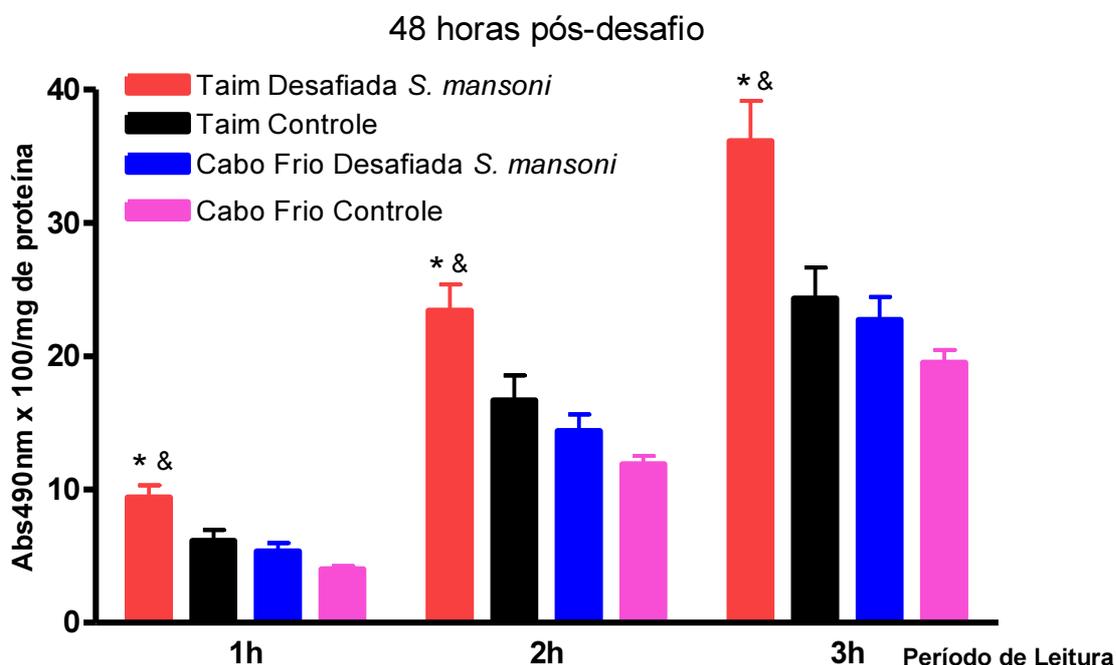


Gráfico 8. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo frio 48 horas após desafio pelo *S. mansoni* (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA. Taim Desafiada: *B. tenagophila* Taim desafiada com 10 miracídios *S. mansoni*; Taim Controle: *B. tenagophila* Taim não desafiada; Cabo Frio Desafiada: *B. tenagophila* Cabo Frio desafiada com 10 miracídios *S. mansoni*; Cabo Frio Controle: *B. tenagophila* Cabo Frio não desafiada. Diferenças estatisticamente significativas entre: \* Taim Desafiada e Taim Controle; & Taim Desafiada e Cabo Frio Desafiada ( $P < 0,05$ ).

Os caramujos controles não desafiados, tanto da linhagem Taim quanto da linhagem Cabo Frio, apresentaram atividade enzimática estatisticamente semelhante ao longo dos períodos pós-desafio (1, 24 e 48 horas). Dessa forma, foi calculada a média, levando em consideração os 15 exemplares utilizados como controle ao longo dos experimentos “*ex vivo*” para cada uma das linhagens. Quando comparamos a média da atividade enzimática dos moluscos controles do Taim com a média linhagem Cabo Frio, foi possível verificar que a atividade enzimática na linhagem Taim foi significativamente maior do que na linhagem Cabo Frio (Gráfico 9). Ao final do ensaio, a média da atividade da PO foi  $24,32 \pm 8,4$  na linhagem Taim e de  $19,52 \pm 3,4$  na linhagem Cabo Frio, uma diferença de 20%.

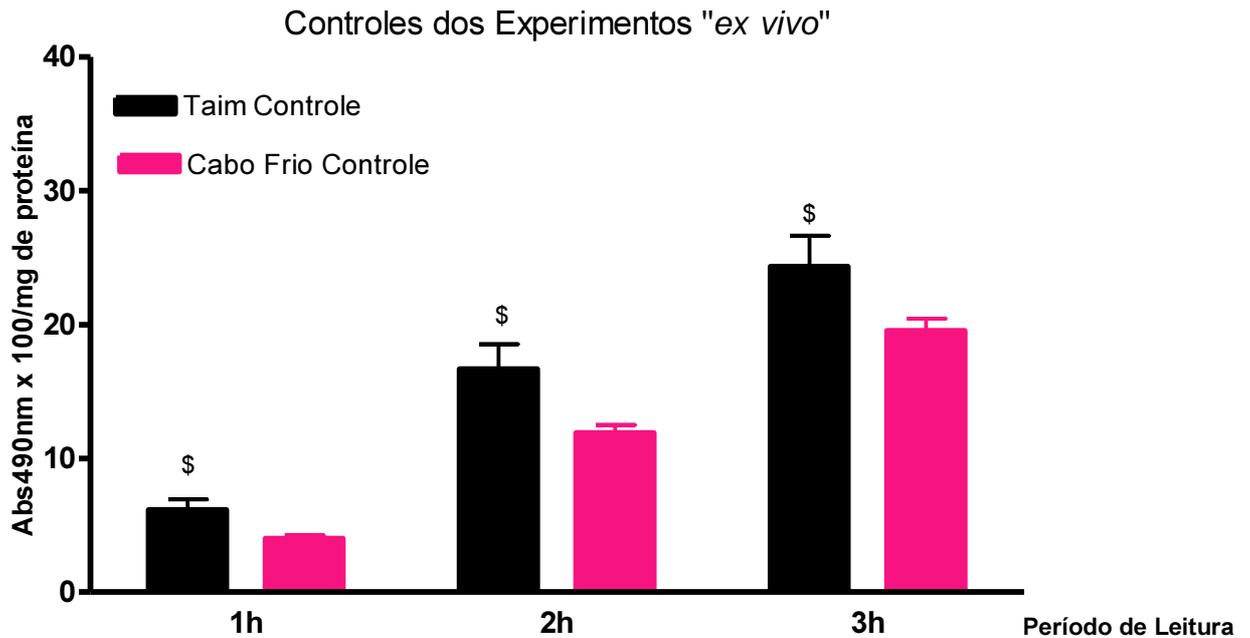


Gráfico 9. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, não desafiadas pelo *S. mansoni*, ao longo dos experimentos "ex vivo" (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA. Taim Controle: *B. tenagophila* Taim não desafiada. Cabo Frio Controle: *B. tenagophila* Cabo Frio não desafiada.  $^{\$}$   $P < 0,05$ .

#### 5.1.4 Atividade da PO x *E. paraensei*

A atividade enzimática foi avaliada frente ao parasito trematódeo, digenético, *E. paraensei*, com o objetivo de verificar o comportamento dessa enzima na presença desse parasito. *E. paraensei* utiliza *Biomphalaria* como hospedeiro intermediário e, além disso, *B. tenagophila* Taim é susceptível ao *E. paraensei*.

##### 5.1.4.1 Atividade de PO x Esporocisto primário – Ensaio "in vitro"

Os ensaios "in vitro" utilizando esporocistos primários de *E. paraensei* revelaram resultados semelhantes aos observados com *S. mansoni*. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre a atividade enzimática na linhagem Taim exposta ao parasito e o seu respectivo controle. Ao final do ensaio, a média da atividade de PO foi de  $28,90 \pm 6,4$  e  $21,96 \pm 5,7$  na linhagem Taim, exposta ao parasito e controle, respectivamente, uma diferença na atividade enzimática de, aproximadamente, 24%. Resultado semelhante foi observado, quando analisamos os dados da linhagem Cabo Frio. A atividade enzimática se mostrou significativamente maior quando os moluscos foram expostos ao parasito. A atividade da PO nos caramujos expostos ao parasito alcançou a média de

28,01±4,9; no seu respectivo controle, a média foi de 22,93±3,2; uma diferença de, aproximadamente, 18%. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na comparação da atividade enzimática na linhagem Taim, exposta ao parasito, em relação à linhagem Cabo Frio, submetida às mesmas condições. Na comparação das linhagens Taim e Cabo Frio controles, não houve diferença entre elas, independente da presença do parasito (Gráfico 10).

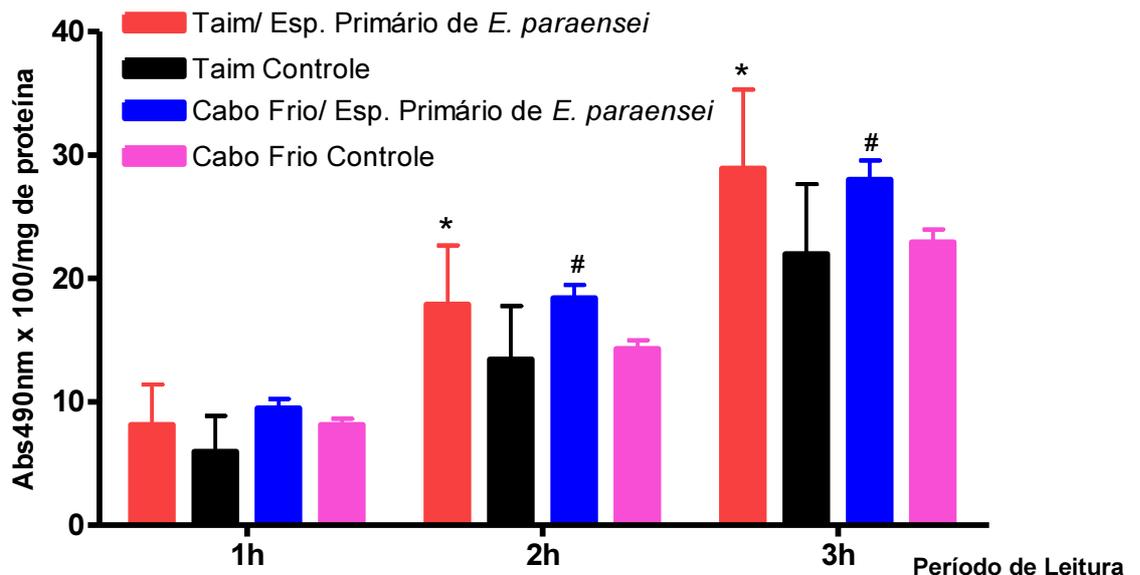


Gráfico 10. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, expostas ou não ao esporocisto primário de *E. paraensei* (média ± DP). Taim/Esp. Primário de *E. paraensei*: hemolinfa de *B. tenagophila* Taim, exposta a esporocisto primário de *E. paraensei*. Taim/Controle: hemolinfa de *B. tenagophila* Taim, não exposta a esporocisto primário de *E. paraensei*; Cabo Frio/Esp. Primário de *E. paraensei*: hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio, exposta a esporocisto primário de *E. paraensei*. Cabo Frio/Controle: hemolinfa de *B. tenagophila* Cabo Frio, não exposta a esporocisto primário de *E. paraensei*. Diferenças estatísticas significativas entre: \*Taim/Esp. Primário e Taim/Controle ( $P < 0,05$ ); #Cabo Frio/Esp. Primário e Cabo Frio/Controle ( $P < 0,05$ ).

#### 5.1.4.2 Atividade da PO x Desafio com *E. paraensei* – Ensaio “*ex vivo*”

O ensaio da atividade da PO, 1 hora após o desafio com *E. paraensei*, em moluscos da linhagem Taim e Cabo Frio, desafiadas ou não com o parasito, não revelou nenhuma diferença estatisticamente significativa. Não houve ativação da PO na presença do parasito, nem na linhagem Taim e Cabo Frio. Além disso, não houve diferença entre as linhagens na presença do esporocisto. Ao final do ensaio a média

da atividade da PO na linhagem do Taim desafiada foi de  $25,46 \pm 6,8$  e na linhagem Cabo Frio desafiada  $25,77 \pm 3,8$  (gráfico não mostrado).

Vinte e quatro horas após o desafio, a *B. tenagophila* Taim apresentou atividade enzimática significativamente maior do que o controle, apenas ao final do ensaio (Taim Desafiada:  $31,71 \pm 4,3$ ; Taim controle:  $21,86 \pm 3,2$ ), uma diferença de 31%. Já na *B. tenagophila* Cabo Frio, o molusco desafiado com o parasito apresentou atividade enzimática significativamente menor, na primeira hora de leitura (Cabo Frio Desafiada:  $5,90 \pm 1,6$ ; Cabo Frio controle:  $11,05 \pm 3,5$ ). No entanto, ao final do experimento, a atividade da PO foi superior à do controle, com diferença estatisticamente significativa (Cabo Frio Desafiada:  $30,16 \pm 11,4$ ; Cabo Frio controle:  $18,14 \pm 3,9$ ) uma diferença de aproximadamente 40%. Além disso, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens desafiadas. *Biomphalaria tenagophila* Taim apresentou atividade enzimática significativamente superior à linhagem Cabo Frio, na primeira e segunda leitura. Ao final do ensaio, a atividade da PO se mostrou semelhante (Gráfico 11).

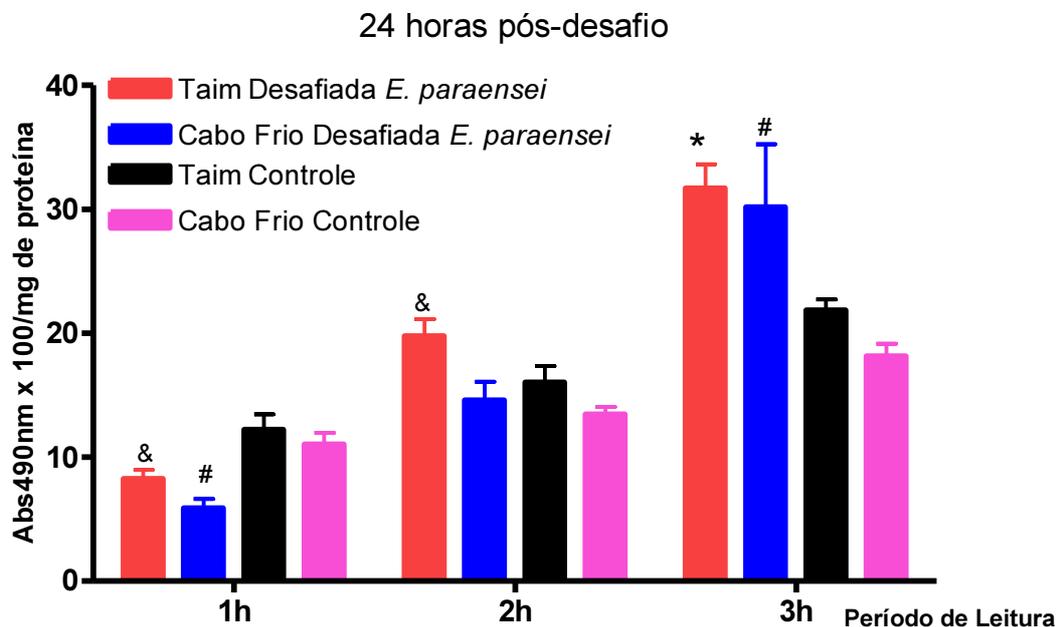


Gráfico 11. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, 24 horas após desafio pelo *E. paraensei* (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA. Taim Desafiada: *B. tenagophila* Taim desafiada com 10 miracídios *E. paraensei*; Cabo Frio Desafiada: *B. tenagophila* Cabo Frio desafiada com 10 miracídios *E. paraensei*; Taim Controle: *B. tenagophila* Taim não desafiada; Cabo Frio

Controle: *B. tenagophila* Cabo Frio não desafiada. Diferenças estatisticamente significativas entre: \* Taim Desafiada e Taim Controle; # Cabo Frio desafiada e Cabo Frio Controle; &Taim Desafiada e Cabo Frio Desafiada ( $P < 0,05$ ).

No ensaio realizado 48 horas após o desafio, a linhagem *B. tenagophila* Taim apresentou atividade enzimática significativamente maior do que o respectivo controle, sugerindo uma ativação da PO na presença do *E. paraensei* (Gráfico 12). A média da atividade da PO, ao final das análises, na *B. tenagophila* Taim desafiada e seu controle, foi de  $38,24 \pm 8,4$  e  $21,86 \pm 3,14$ , respectivamente. A diferença de atividade foi de, aproximadamente, 43%. Já os resultados da atividade da PO na *B. tenagophila* Cabo Frio, 48 horas após o desafio, mostraram diferenças estatisticamente significativas entre o molusco desafiado com o parasito e seu respectivo controle. Em um primeiro momento, o caramujo controle apresentou atividade enzimática significativamente maior que o caramujo desafiado. No entanto, ao final do experimento, a ativação da PO foi significativamente maior no molusco desafiado (média da atividade da PO  $23,26 \pm 5,3$ ) do que no controle (média da atividade da PO  $18,14 \pm 3,9$ ), uma diferença de 22%. Diferenças estatisticamente significativas também foram observadas entre as linhagens desafiadas. *B. tenagophila* Taim apresentou, ao longo de todo o ensaio, atividade enzimática significativamente maior do que a linhagem Cabo Frio. Ao final das análises, a média da atividade da PO foi, aproximadamente, 40% maior na *B. tenagophila* Taim desafiada com o parasito, sendo a média da atividade da PO  $38,84 \pm 8,2$  na *B. tenagophila* Taim desafiada, e  $23,26 \pm 5,3$  na *B. tenagophila* Cabo Frio desafiada (Gráfico 12).

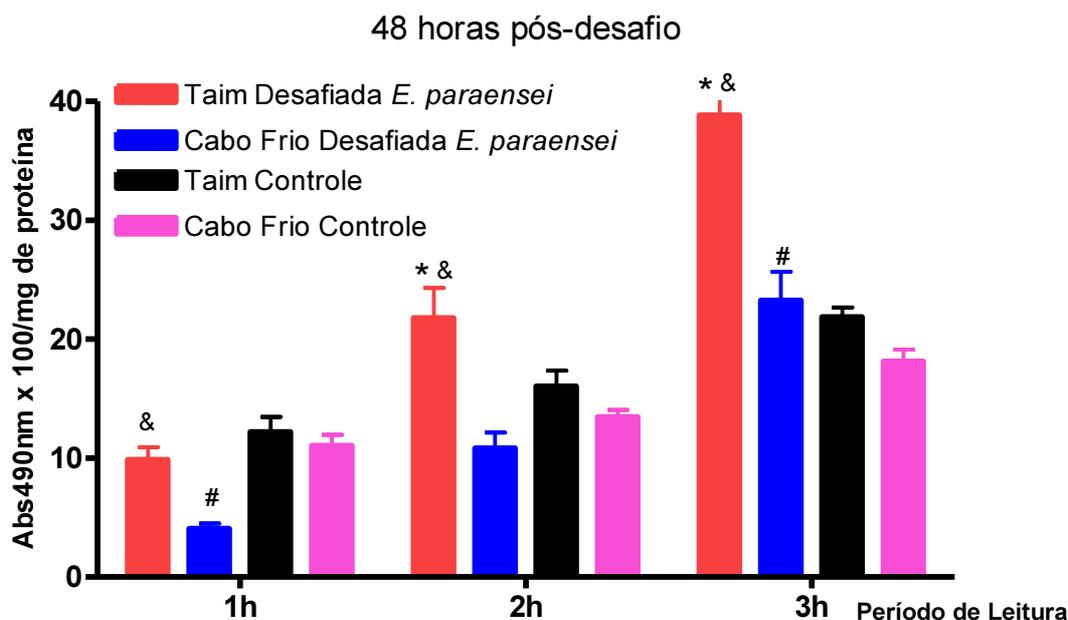


Gráfico 12. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, 48 horas após desafio pelo *E. paraensei* (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA. Taim Desafiada: *B. tenagophila* Taim desafiada com 10 miracídeos *E. paraensei*. Cabo Frio Desafiada: *B. tenagophila* Cabo Frio desafiada com 10 miracídeos *E. paraensei*; Taim Controle: *B. tenagophila* Taim não desafiada; Cabo Frio Controle: *B. tenagophila* Cabo Frio não desafiada. Diferenças estatisticamente significativas entre: \* Taim Desafiada e Taim Controle; # Cabo Frio desafiada e Cabo Frio Controle; & Taim Desafiada e Cabo Frio Desafiada ( $P < 0,05$ ).

Os caramujos controles não desafiados, tanto da linhagem Taim quanto da linhagem Cabo Frio, apresentaram atividade enzimática estatisticamente semelhante ao longo dos ensaios (1, 24 e 48 horas após o desafio). Dessa forma, foi calculada a média da atividade da PO, levando em consideração os 15 exemplares utilizados como controle ao longo dos experimentos “*ex vivo*” para cada uma das linhagens. Quando comparamos a média da atividade da PO dos moluscos controles do Taim com a média linhagem Cabo Frio, foi possível verificar que a atividade da PO na linhagem Taim foi significativamente maior do que a da linhagem Cabo Frio (Gráfico 13). Ao final do ensaio, a média da atividade da PO foi  $21,86 \pm 3,2$  na linhagem Taim e de  $18,14 \pm 3,9$  na linhagem Cabo Frio, uma diferença de 17%.

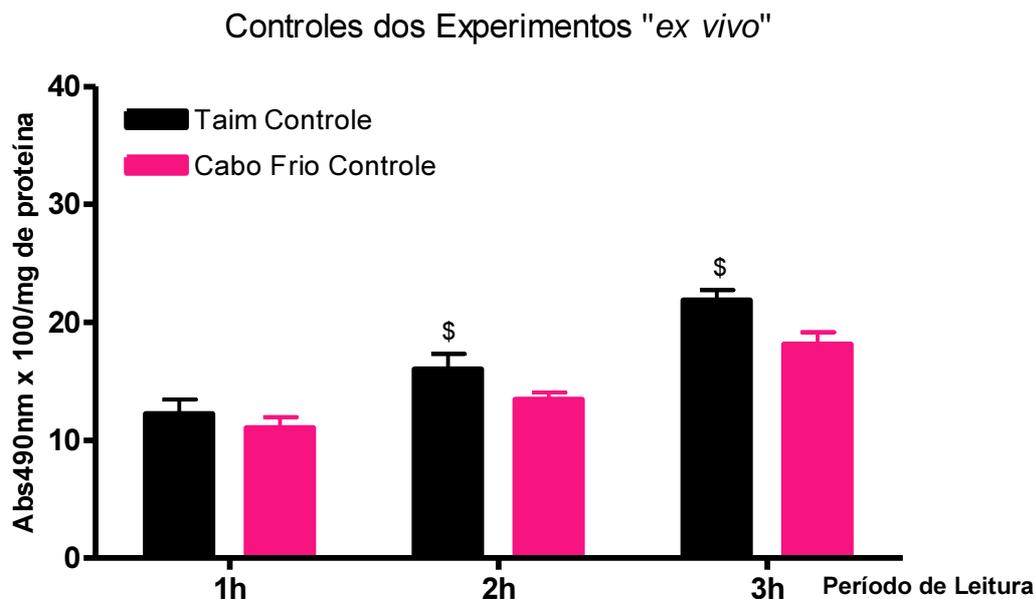


Gráfico 13. Cinética da atividade específica da fenoloxidase em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, não desafiadas com *E. paraensei* ao longo dos experimentos "ex vivo" (média  $\pm$  DP). Leituras 1, 2 e 3 horas após a adição do substrato L-DOPA. Taim Controle: *B. tenagophila* Taim não desafiada; Cabo Frio Controle: *B. tenagophila* Cabo Frio não desafiada. <sup>\$</sup> P<0,05.

## 5.2 Avaliação do índice de adesão celular e viabilidade de esporocisto primário e secundário após exposição ao SID da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio

Os ensaios de índice de adesão celular (IAC) e a viabilidade foram realizados utilizando as diferentes frações da hemolinfa (fração H: apenas hemócitos, HT: hemolinfa total e fração S: apenas fatores solúveis – utilizada apenas nos ensaios de viabilidade), bem como esporocistos primários e secundários. Os índices de adesão celular foram definidos conforme descrito no item 4.6, duas horas após incubação do parasito com o SID, enquanto a viabilidade foi avaliada 6 horas após a incubação. Serão apresentados os resultados dos testes do IAC, para esporocisto primário e secundário, e, posteriormente, o ensaio de viabilidade.

### 5.2.1 Índice de adesão celular x Esporocisto primário e secundário

Os valores do IAC observados neste experimento estão mostrados na Tabela 2. Os hemócitos de todas as linhagens/espécies foram capazes de aderir à superfície de esporocistos primários e secundários. Nos ensaios utilizando esporocistos primários, o IAC dos parasitos expostos à fração HT de *B. tenagophila*

Taim (média IAC – HT:  $2.13 \pm 0.25$ ) e Cabo Frio (média IAC – HT:  $2.32 \pm 0.3$ ) foi significativamente maior ( $p < 0,03$ ) do que a observada nos esporocistos expostos à mesma fração da *B. glabrata* (média IAC – HT:  $1.89 \pm 0.31$ ). No entanto, apenas os esporocistos primários expostos à fração H da *B. tenagophila* Taim (média IAC – H:  $2.02 \pm 0.22$ ) apresentaram IAC significativamente maior ( $p < 0,03$ ) do que os expostos à mesma fração da *B. glabrata* (média IAC – H:  $1.87 \pm 0.35$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens Taim e Cabo Frio, independente da fração a que o esporocisto primário foi exposto.

Os resultados do IAC utilizando esporocistos secundários mostram que a adesão dos hemócitos da *B. tenagophila* Taim (média IAC – HT:  $2.03 \pm 0.31$ / H:  $2.27 \pm 0.30$ ) e Cabo Frio (média IAC – HT:  $2.03 \pm 0.23$ / H:  $1.99 \pm 0.12$ ) foi significativamente maior ( $p < 0,03$ ) do que o IAC dos esporocistos secundários expostos às mesmas frações da *B. glabrata* (média IAC – HT:  $1.73 \pm 0.41$ / H:  $1.41 \pm 0.2$ ). Além disso, o IAC dos esporocistos secundários expostos à fração H da *B. tenagophila* Taim (média IAC:  $2.27 \pm 0.30$ ) foi significativamente ( $p < 0,03$ ) maior do que o IAC dos esporocistos secundários expostos à mesma fração da *B. tenagophila* Cabo Frio (média IAC – H:  $1.99 \pm 0.12$ ). Ainda foi observado um número significativamente maior ( $p < 0,02$ ) de hemócitos aderidos à superfície de esporocistos primários do que de secundários, quando os parasitos foram expostos à fração hemolinfa total de *B. tenagophila* Cabo Frio (média IAC – HT:  $2.32 \pm 0.3$ ) e fração de hemócitos da *B. glabrata* (média IAC – H:  $1.87 \pm 0.35$ ). Não houve, no entanto, diferença estatisticamente significativa entre o IAC de esporocistos primários e secundários expostos ao SID da *B. tenagophila* Taim e nem entre as diferentes frações utilizadas nos experimentos.

Tabela 2. Média dos valores de índice de adesão celular (IAC) de esporocistos primários e secundários de *S. mansoni* expostos à *B. tenagophila* (Taim e Cabo Frio) e *B. glabrata*.

Grupo de Carmujos		Esporocisto Primário	Esporocisto Secundário
		IAC±DP	IAC±DP
<i>B. tenagophila</i> Taim	TH	2,13±0,25 <sup>b</sup>	2,03±0,31 <sup>b</sup>
	H	2,02±0,22 <sup>b</sup>	2,27±0,30 <sup>a,b</sup>
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio	TH	2,32±0,3 <sup>b,*</sup>	2,03±0,23 <sup>b</sup>
	H	1,98±0,31	1,99±0,12 <sup>b</sup>
<i>B. glabrata</i>	TH	1,89±0,31	1,73±0,41
	H	1,87±0,35*	1,41±0,2

Legenda: hemolinfa total (HT); fração de hemócitos (H). <sup>a</sup> diferença estatisticamente significativa entre o IAC de esporocisto primário ou secundário, exposto ao SID do Taim (HT e H) e IAC de esporocisto primário ou secundário, exposto ao SID de Cabo Frio (HT e H) (p<0,03). <sup>b</sup> diferença estatisticamente significativa entre o IAC de esporocisto primário ou secundário, exposto ao SID Taim e Cabo Frio (HT e H) e IAC de esporocisto primário ou secundário, exposto ao SID de *B. glabrata* (HT e H) p<0,03. \* diferença estatisticamente significativa entre o IAC de esporocistos primários e secundários, expostos ao SID da mesma espécie ou linhagem (p<0,02).

### 5.2.2 Viabilidade x Esporocisto primário e secundário

Os resultados dos experimentos de viabilidade estão descritos na Tabela 3. Todas as frações da hemolinfa da *B. tenagophila* Taim produziram significativamente (p<0,03) uma maior mortalidade de esporocistos primários (HT= 47,5; H= 58; S= 56%), comparada à causada pelo *B. tenagophila* Cabo Frio (HT= 23; H= 32, S= 24,5%), *B. glabrata* (HT= 5; H= 18, S= 6%) e esporocistos controles (20%). Além disso, a proporção de esporocistos primários mortos expostos à *B. tenagophila* Cabo Frio foi significativamente maior (p<0,03) do que a observada em *B. glabrata*, quando os parasitos foram expostos às frações HT e S. No entanto, a mortalidade causada pela *B. tenagophila* Cabo Frio foi estatisticamente semelhante à mortalidade verificada no grupo controle.

Nos ensaios utilizando os esporocistos secundários, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,03$ ) entre a proporção de esporocistos secundários mortos, expostos à *B. tenagophila* Taim (HT= 7; H= 8,5; S= 6,5%) em relação à de esporocistos expostos à *B. glabrata* (HT= 3; H= 3; S= 2%). Não foram observadas diferenças significativas entre as linhagens Taim, Cabo Frio e esporocistos controles.

Por outro lado, diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre a proporção de esporocistos primários e secundários mortos. A proporção de esporocistos secundários mortos foi significativamente menor ( $p < 0,01$ ) do que a de esporocistos primários, quando os parasitos foram expostos às diferentes frações da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio. Esse mesmo resultado não foi observado quando os parasitos foram expostos às frações de *B. glabrata*.

Tabela 3. Proporção de esporocistos primários e secundários de *S. mansoni* mortos, após exposição do parasito ao sistema interno de defesa (SID) da *B. tenagophila* Taim, Cabo Frio e *B. glabrata*.

Grupos de caramujos		Esporocistos primários mortos (%)	Esporocistos secundários mortos (%)
<i>B. tenagophila</i> Taim	HT	47,5 <sup>a,b,c,*</sup>	7 <sup>b</sup>
	H	58 <sup>a,b,c,*</sup>	8,5 <sup>b</sup>
	S	56 <sup>a,b,c,*</sup>	6,5 <sup>b</sup>
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio	HT	23 <sup>b,*</sup>	9 <sup>c</sup>
	H	32 <sup>*</sup>	5
	S	24,5 <sup>b,*</sup>	5,5
<i>B. glabrata</i>	HT	5 <sup>c</sup>	3
	H	18 <sup>*</sup>	3
	S	6 <sup>c</sup>	2
Controle	-	20	6

Legenda: hemolinfa total (HT), fração de hemócitos (H), fração de fatores solúveis (S).  
<sup>a</sup>diferença estatisticamente significativa entre a proporção de esporocistos primários ou

secundários mortos, expostos à linhagem Taim, e a proporção de esporocistos primários ou secundários mortos, expostos à linhagem Cabo Frio  $p<0,03$ ; <sup>b</sup> diferença estatisticamente significativa entre a proporção de esporocistos primários ou secundários mortos, expostos à linhagem Taim e Cabo Frio e a proporção de esporocistos primários ou secundários mortos, expostos à *B. glabrata*  $p<0,03$ ; <sup>c</sup> diferença estatisticamente significativa entre a proporção de esporocistos primários ou secundários mortos, expostos à linhagem Taim, Cabo Frio e *B. glabrata* e a proporção de esporocistos primários ou secundários do grupo controle  $p<0,03$ . \*diferença estatisticamente significativa entre a proporção de esporocistos primários e secundários, expostos ao SID da mesma espécie ou linhagem  $p<0,01$ .

### **5.3 Verificação, por meio de marcadores fluorescentes, da presença de dano no tegumento de esporocistos primários e secundários de *S. mansoni*, após o contato com componentes do SID da *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio**

Esporocistos primários ou secundários foram expostos às diferentes frações do SID de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio (HT: hemolinfa total; H: apenas hemócitos; ou S: apenas fatores solúveis), além de um grupo controle mantido na ausência do SID. Após 3 e 5 horas de incubação, os esporocistos foram marcados com sondas fluorescentes. Não foi possível observar diferença no perfil de marcação dos esporocistos quando estes foram examinados 3 ou 5 horas após incubação, independente da fração utilizada. No entanto, foi possível verificar diferença no padrão de marcação quando se comparou esporocistos primários e secundários incubados com SID de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, bem como quando comparamos a marcação gerada pelo SID de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio. Os hemócitos da *Biomphalaria* foram capazes de gerar danos ao tegumento dos esporocistos primários; dano esse visível por meio da marcação com a sonda Hoechst 33258 (marcador de integridade da membrana). Porém, não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significativas, em relação à marcação pela sonda Hoechst 33258, quando comparamos esporocistos primários expostos à linhagem Taim (intensidade média de fluorescência/área:  $3,79\pm0,18$ ), Cabo Frio (intensidade média de fluorescência/área:  $2,80\pm1,6$ ) e esporocistos controles (intensidade média de fluorescência/área:  $3,1\pm1,9$ ). Nos ensaios utilizando os esporocistos secundários, não houve diferenças estatisticamente significativas quando os parasitos foram expostos às diferentes linhagens (intensidade média de fluorescência/área - Taim:  $2,18\pm2,48$ ; Cabo Frio:  $0,35\pm0,09$ ; esporocisto controle:

1,59±1,9). Diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,03$ ) foi encontrada quando comparamos a intensidade média de fluorescência/área dos esporocistos primários expostos à linhagem Cabo Frio em relação à observada nos esporocistos secundários (Gráfico 14).

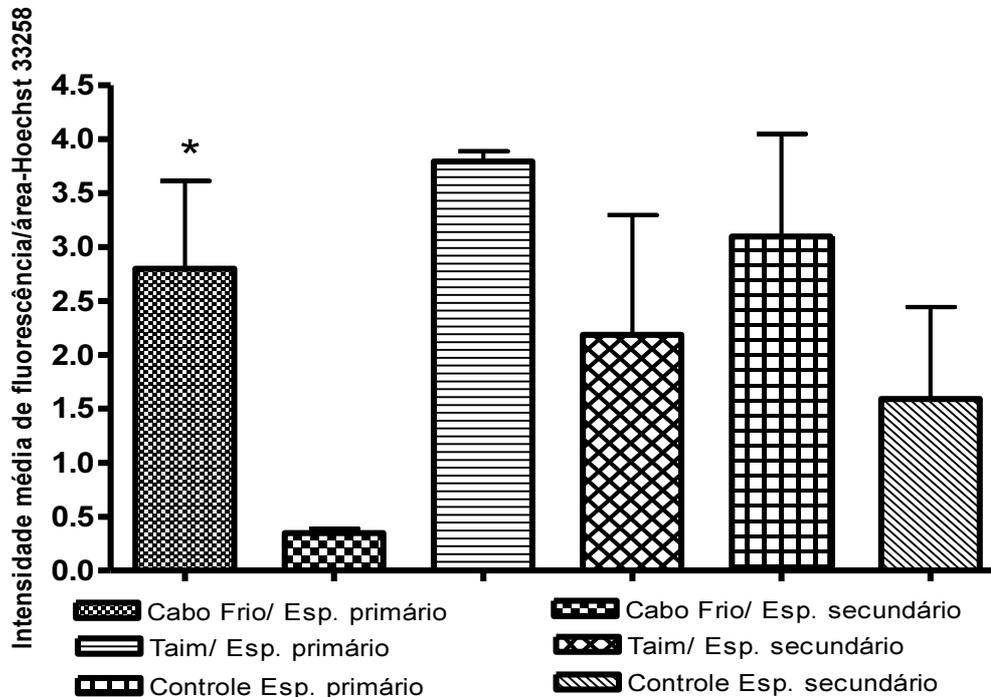


Gráfico 14. Intensidade média de fluorescência/área detectada pela sonda Hoechst 33258 em esporocistos primários e secundários, expostos ao SID das linhagens de *B. tenagophila* Taim, Cabo Frio e esporocistos controles. \* diferença entre esporocisto primário e secundário, exposto ao SID Cabo Frio ( $p < 0,03$ ).

A sonda Alexa-Fluor 488 foi mais eficiente em detectar a extensão dos danos causados pelo SID dos moluscos, nos experimentos realizados. A marcação pela sonda Alexa-Fluor 488 foi significativamente maior ( $p < 0,04$ ) nos esporocistos primários expostos à linhagem Taim (intensidade média de fluorescência/área:  $2,5 \pm 0,8$ ) do que nos expostos ao SID Cabo Frio (intensidade média de fluorescência/área:  $1,1 \pm 0,84$ ) e nos esporocistos controles (intensidade média de fluorescência/área:  $1,1 \pm 0,9$ ), sugerindo, assim, a presença de danos mais intensos nos esporocistos primários expostos à linhagem Taim. Já intensidade média de fluorescência/área nos esporocistos primários expostos à linhagem Cabo Frio foi semelhante à do controle. Utilizando os esporocistos secundários e sonda Alexa-Fluor 488, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas

quando os parasitos foram expostos às diferentes linhagens (intensidade média de fluorescência/área - Taim:  $0,38 \pm 0,22$ ; Cabo Frio:  $0,22 \pm 0,06$ ; esporocisto controle:  $0,46 \pm 0,54$ ). Além disso, os esporocistos primários apresentaram média de fluorescência/área significativamente maior ( $p < 0,04$ ) do que os esporocistos secundários, quando expostos à linhagem Taim (Gráfico 15).

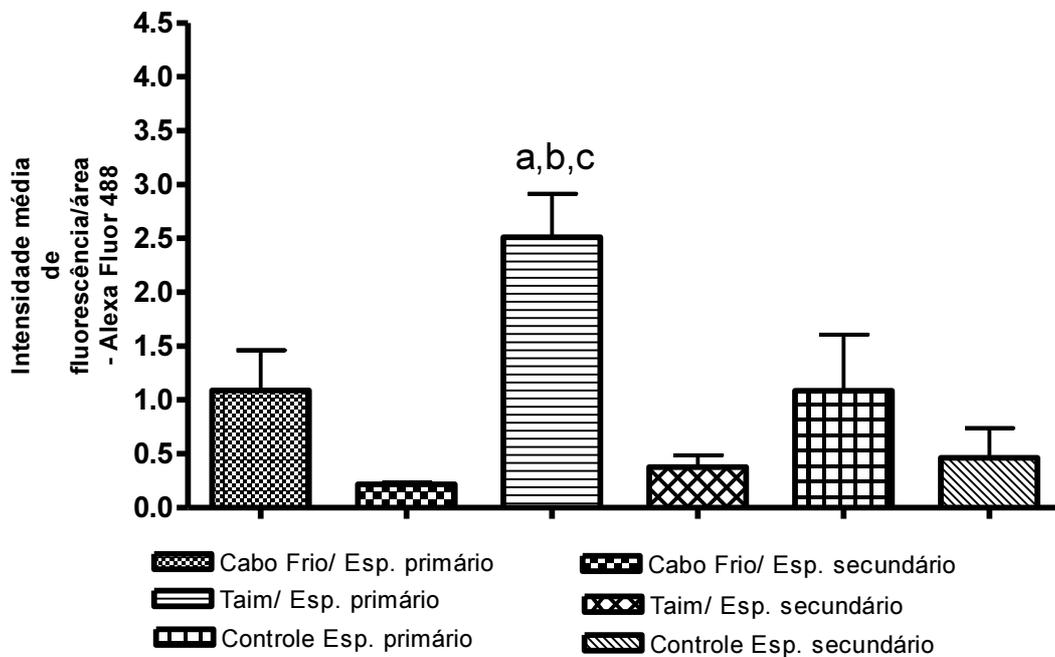


Gráfico 15. Intensidade média de fluorescência/área detectada pela sonda Alexa Fluor 488 em esporocistos primários e secundários, expostos ao SID das linhagens de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio e esporocistos controles. <sup>a</sup> diferença entre esporocistos primários, expostos à *B. tenagophila* Cabo Frio e esporocistos primários, expostos à *B. tenagophila* Taim ( $p < 0,04$ ); <sup>b</sup> diferença entre esporocisto primário e secundário, expostos à *B. tenagophila* Taim ( $p < 0,03$ ); <sup>c</sup> diferença entre esporocisto primário, exposto ao Taim, e esporocisto controle ( $p < 0,04$ ).

Resultado semelhante foi observado na marcação com a sonda Lectina de *Glicina max* (Gráfico 16). Os esporocistos primários expostos à linhagem Taim (intensidade média de fluorescência/área:  $2,76 \pm 0,8$ ) apresentaram uma marcação significativamente maior ( $p < 0,03$ ) do que os expostos à linhagem Cabo Frio (intensidade média de fluorescência/área:  $0,47 \pm 0,43$ ) e esporocistos controles (intensidade média de fluorescência/área:  $0,7 \pm 0,6$ ). Já a intensidade média de fluorescência/área dos esporocistos primários expostos à linhagem Cabo Frio foi semelhante à observada no controle. Nos ensaios com esporocistos secundários, a

intensidade média de fluorescência/área foi semelhante, independente da condição a que o parasito foi exposto (intensidade média de fluorescência/área - Taim:  $0,13 \pm 0,08$ ; Cabo Frio:  $0,18 \pm 0,04$ ; esporocisto controle:  $0,45 \pm 0,36$ ). No entanto, a média de fluorescência/área nos esporocistos primários foi significativamente maior ( $p < 0,03$ ) do que nos esporocistos secundários expostos à linhagem Taim.

Todos os padrões de marcação estão apresentados na Fotomicrografia 1, Fotomicrografia 2 e Fotomicrografia 3.

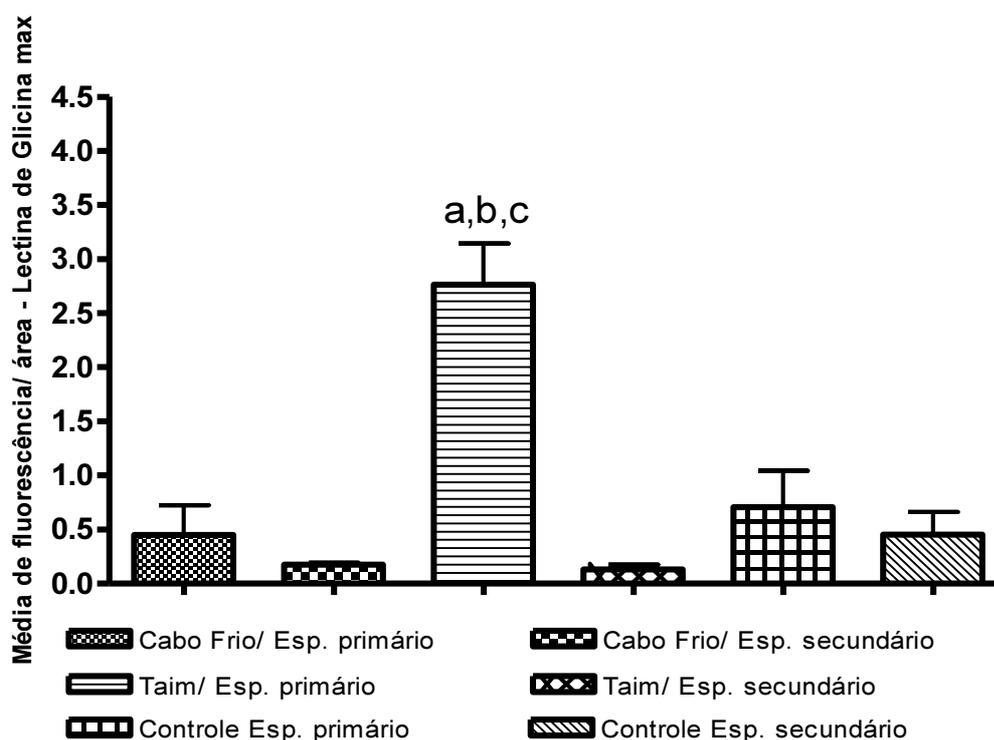
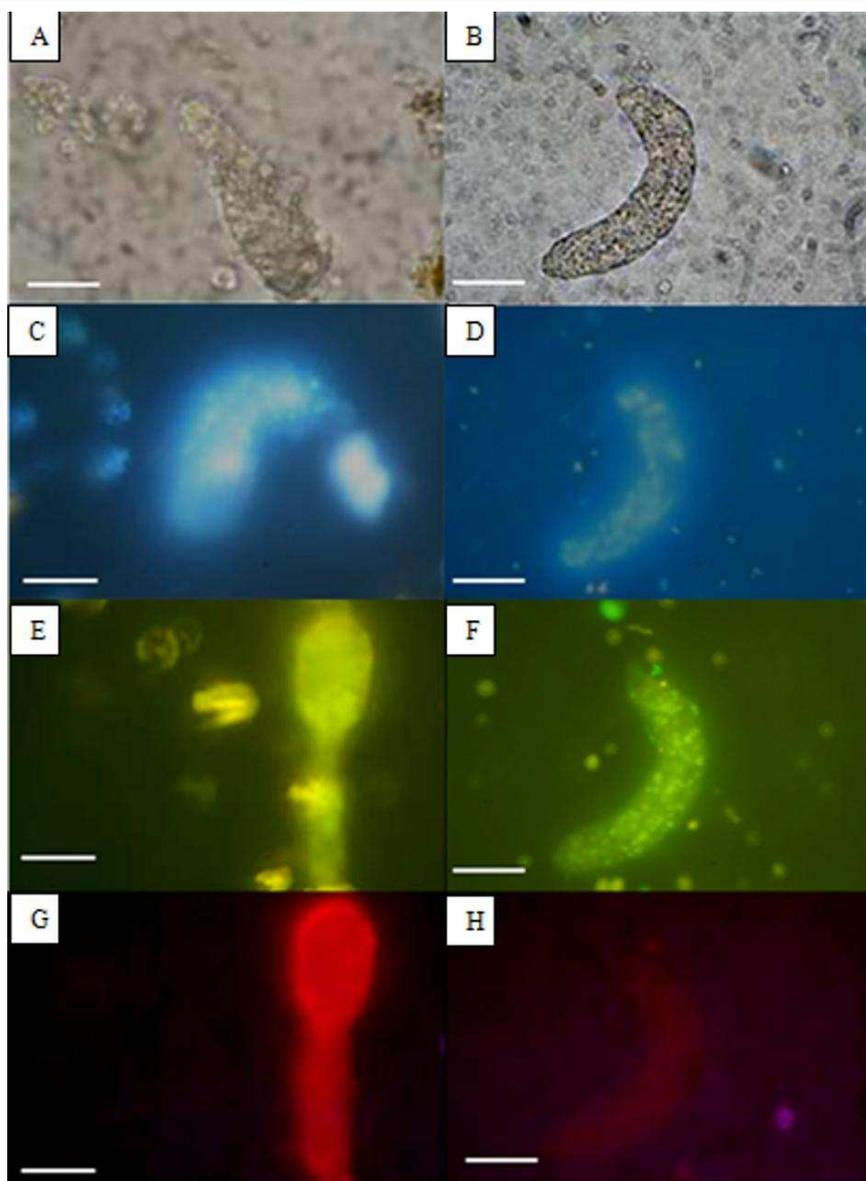
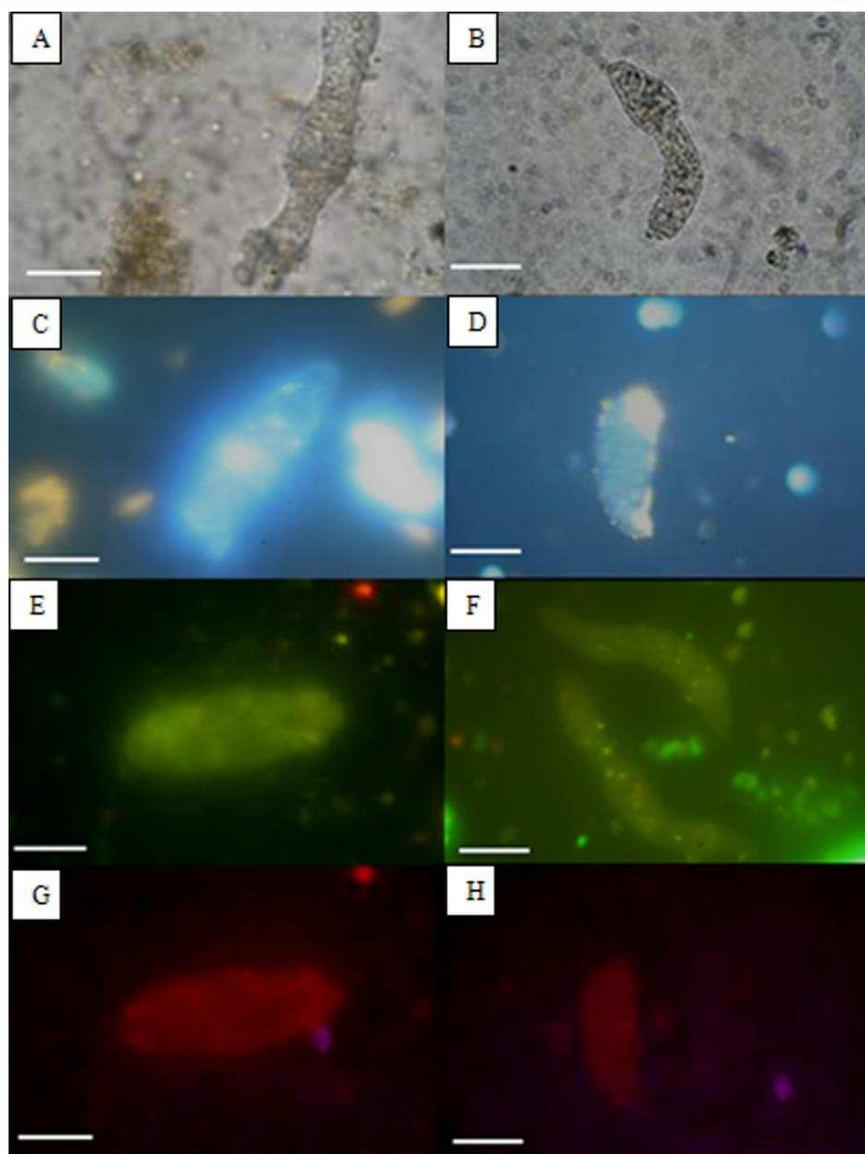


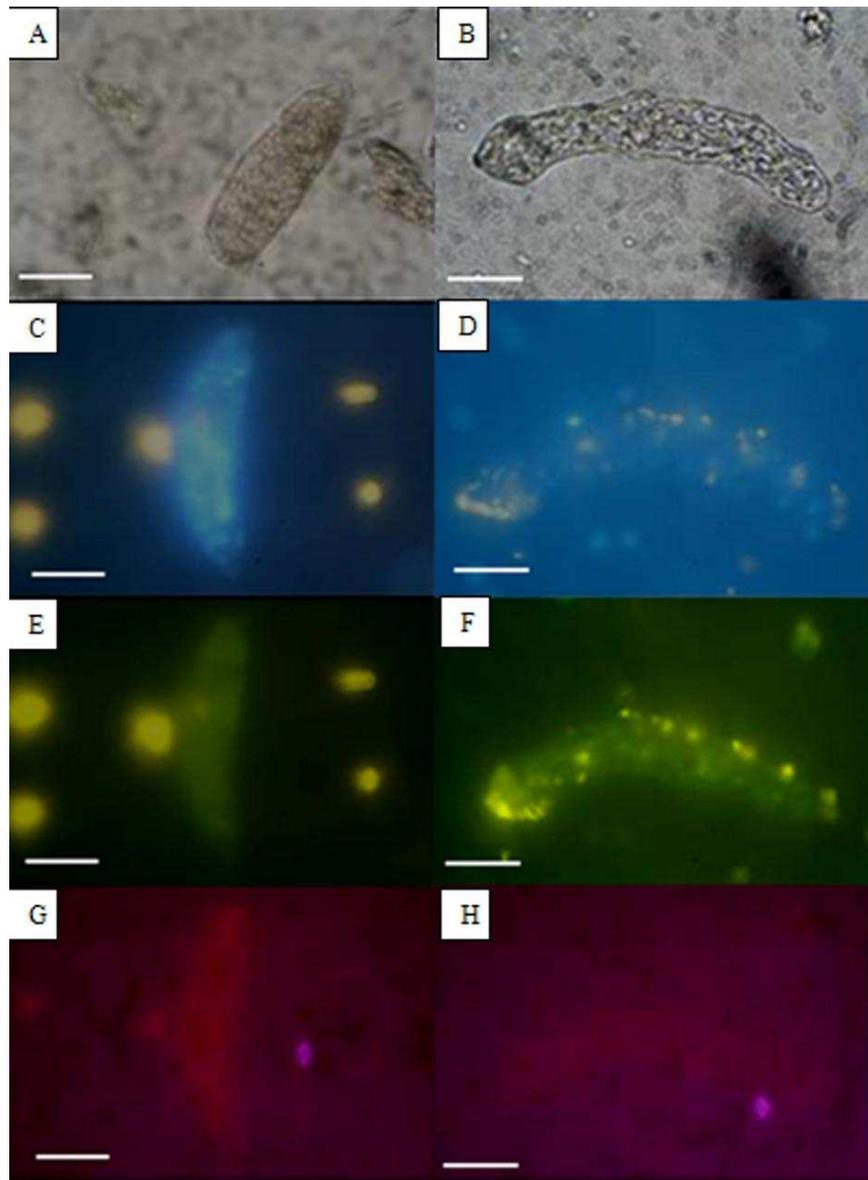
Gráfico 16. Intensidade média de fluorescência/área detectada pela Lectina de *Glicina max* em esporocisto primário e secundário, exposto ao SID das linhagens de *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio. <sup>a</sup> diferença estatisticamente significativa entre esporocisto primário exposto à *B. tenagophila* Cabo Frio ( $p < 0,03$ ); <sup>b</sup> diferença estatisticamente significativa entre esporocisto primário e secundário, exposto à *B. tenagophila* Taim ( $p < 0,03$ ); <sup>c</sup> diferença estatisticamente significativa entre esporocisto primário, exposto à *B. tenagophila* Taim, e esporocisto primário controle ( $p < 0,03$ ).



Fotomicrografia 1. Ação do SID de *B. tenagophila* Taim na membrana de esporocisto primário (A, C, E, G) e secundário (B, D, F, H). A e B: microscopia óptica; C e D: marcado com Hoechst 33258 (microscopia de fluorescência); E e F: marcado com Alexa Fluor 488 (microscopia de fluorescência); G e H: marcação com Lectina de *Glicina max* (microscopia de fluorescência). Barras = 25µm.



Fotomicrografia 2. Ação do SID de *B. tenagophila* Cabo Frio na membrana de esporocisto primário (A, C, E, G) e secundário (B, D, F, H). A e B: microscopia óptica; C e D: marcado com Hoechst 33258 (microscopia de fluorescência); E e F: marcado com Alexa Fluor 488 (microscopia de fluorescência); G e H: marcação com Lectina de *Glicina max* (microscopia de fluorescência). Barras = 25 $\mu$ m.



Fotomicrografia 3. Esporocisto primário controle (A, C, E, G) e secundário controle (B, D, F, H). A e B: microscopia óptica; C e D: marcação com a sonda Hoechst 33258 (microscopia de fluorescência); E e F: marcação com Alexa Fluor 488 (microscopia de fluorescência); G e H: marcação com Lectina de *Glicina max* (microscopia de fluorescência). Barras = 25µm.

#### 5.4 Avaliação do desenvolvimento de esporocisto secundário após inoculação em *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio

Neste ensaio, esporocistos secundários obtidos de *B. glabrata* infectadas foram inoculados em caramujos *B. tenagophila* Taim e Cabo Frio, bem como *B. glabrata* como controle da inoculação. Os caramujos foram examinados até 30 dias após a inoculação. Ao final deste ensaio, dos 65 caramujos *B. tenagophila* Taim, 7 estavam vivos (11%), porém nenhum caramujo estava eliminando cercárias. Em

relação ao *B. tenagophila Cabo Frio*, observou-se uma maior sobrevivência: dos 35 inoculados, 11 (31%) sobreviveram, porém todos estavam negativos. Já os caramujos *B. glabrata*, dos 65 caramujos inoculados, 21 (32%) sobreviveram, e desses sobreviventes, 11 (52%) estavam infectados (eliminando cercárias) (Tabela 4).

Tabela 4. Número absoluto e porcentagem de caramujos vivos e infectados 30 dias após inoculação com esporocisto secundário de *Schistosoma mansoni*.

Espécies/Linhagens	Caramujos Inoculados	Caramujos Vivos	Caramujos Infectados
<i>B. tenagophila</i> Taim	65	7 (11%)	0
<i>B. tenagophila</i> Cabo Frio	35	11 (31%)	0
<i>B. glabrata</i>	65	21 (32%)	11 (52%)

## 6 Discussão

Os mecanismos ligados à resistência de espécies/linhagens de *Biomphalaria* contra infecção por *S. mansoni* têm sido estudados por diversos grupos de pesquisa e têm, quase em sua totalidade, utilizado o modelo *B. glabrata*/ *S. mansoni*. Nesses estudos, as linhagens denominadas “resistentes”, selecionadas em laboratório, têm somente uma resistência parcial, um pouco mais acentuada do que a vista na linhagem original (objeto da pressão seletiva) (Lewis et al., 2001; Bahgat et al., 2002; Lockyer et al., 2004, 2007; Walker & Rollinson, 2008). Assim, esses experimentos já apresentam, no seu início, uma fragilidade quanto às diferenças estatisticamente significativas entre o isolado mais resistente selecionado e a linhagem original mais susceptível.

Um aspecto relevante é o número significativamente menor de publicações sobre a interação *B. tenagophila*/ *S. mansoni* em relação ao modelo *B. glabrata*/ *S. mansoni*. Os trabalhos com *B. tenagophila* foram quase todos conduzidos por pesquisadores brasileiros, visto que essa espécie é a segunda em importância na transmissão da esquistossomose no Brasil, mantendo a doença em áreas de média e grande extensão (Vale do Paraíba/ SP, por exemplo) e em focos isolados (São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina).

Nosso grupo, nos últimos anos, apresentou considerável contribuição no estudo da interação *B. tenagophila*/ *S. mansoni*, com a descoberta de uma linhagem geográfica resistente à infecção pelo *S. mansoni* (*B. tenagophila* Taim), comprovada por centenas de tentativas de infecções em condições de laboratório, utilizando diferentes cepas de parasitos e carga miracidiana variada (Santos et al., 1979; Correa et al., 1979; Bezerra et al., 1997; Martins-Souza et al., 2003; Bezerra et al., 2003; Rosa et al., 2004, 2005, 2006; Barbosa et al., 2006; Pereira et al., 2008; Coelho et al., 2008; Mattos et al., 2011). Também foram utilizados artifícios (radiação gama – 10Krad, inoculação de sílica, infecção simultânea com outros helmintos – *Angiostrongylus vasorum* e *E. paraensei*) para tentar quebrar a resistência natural da linhagem Taim (Bezerra et al., 2003; Martins-Souza et al., 2003; Pereira, 2005; Garcia et al., 2010).

Além dessa linhagem de *B. tenagophila* totalmente resistente ao *S. mansoni*, utilizamos, neste estudo, a linhagem Cabo Frio, mantida em condições de laboratório e susceptível à infecção pelo *S. mansoni*. As linhagens/espécies susceptíveis e a linhagem Taim, relacionadas no limite da susceptibilidade/resistência, nos permitem

delinear experimentos comparativos que têm mostrado novos e interessantes aspectos da resistência da *Biomphalaria* frente ao *S. mansoni*. É importante ressaltar que todos os resultados obtidos pelo grupo servem como base para a estratégia de controle da transmissão da esquistossomose, baseada na introdução da *B. tenagophila* Taim em áreas nas quais a transmissão ocorre por caramujos da espécie *B. tenagophila*.

Esta tese teve como objetivo esclarecer o papel da fenoloxidase (PO - enzima envolvida no processo de melanização) na resistência da *B. tenagophila* Taim, bem como avaliar uma possível estratégia de escape do *S. mansoni* em relação ao SID do molusco.

O processo de melanização é um importante mecanismo de defesa, utilizado por vários invertebrados contra microorganismos e parasitos (Ratcliffe et al., 1985; Christensen & Forton, 1986; Vass et al., 1993; Chen et al., 1995; Cerenius & Söderhäll, 2004). A enzima PO participa ativamente na síntese de melanina, utilizando como substrato a L-DOPA. Estudo realizado por Garcia et al. (2004) demonstrou maior atividade da PO em barbeiros *Rhodnius prolixus* infectados com *Trypanosoma cruzi*. Além disso, a inibição do sistema fenoloxidase gerou maior taxa de mortalidade entre os barbeiros, bem como maior taxa de infecção. A atividade da fenoloxidase em hemócitos de *B. glabrata* foi descrita pela primeira vez por Baghat et al (2002). Bai et al. (1996, 1997) já haviam descrito a atividade da PO na glândula de albúmen e na massa de ovos desse mesmo molusco. Pereira (2009) identificou serino-proteases na fração acelar da hemolinfa de *B. tenagophila* Taim e demonstrou que essas enzimas têm ação direta sobre esporocistos de *S. mansoni*, causando lesão do tegumento. É importante lembrar que as serino-proteases participam diretamente no processo de ativação do sistema proPO. Todos esses achados tentam esclarecer a importância da PO na resistência contra *S. mansoni*.

No presente trabalho, utilizando hemolinfa total, nós descrevemos, pela primeira vez, a avaliação da atividade da PO na presença do *S. mansoni*. Os trabalhos de Baghat et al. (2002) e Bai et al. (1996, 1997) não avaliaram a atividade da PO na presença do *S. mansoni*. A partir dos resultados dos experimentos realizados *in vitro*, foi possível verificar que a atividade da PO aumenta na presença do parasito, tanto na linhagem Taim quanto na linhagem Cabo Frio. No entanto, nos ensaios *in vivo*, o mesmo não ocorre 1 e 24 horas após o desafio, tanto na linhagem Taim quanto do Cabo Frio. Apenas 48 horas após o desafio observou-se uma atividade significativamente maior na linhagem Taim desafiada com *S. mansoni*.

Essa diferença de resultados nos ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*” pode ser intrínseca dos próprios ensaios, afinal, no ensaio “*in vitro*”, há um contato direto e mais rápido entre hemolinfa e esporocistos. Já no ensaio “*ex vivo*”, o tempo de penetração do miracídio, bem como o contato com as células podem retardar a ativação do sistema. Uma maior atividade da PO, apenas 48 horas após o desafio, sugere uma ativação tardia do sistema da fenoloxidase pelo parasito. Conforme já foi descrito, *B. tenagophila* Taim é capaz de eliminar o parasito rapidamente. Negrão-Corrêa et al. (2007) mostraram, por meio de análise histopatológica, que, 5 dias após o desafio da linhagem Taim com 20 miracídios, é possível observar uma intensa reação celular no local da infecção, sem a presença de esporocistos no caramujo, confirmando, assim, a presença de uma rápida e efetiva resposta celular frente ao parasito. Assim, uma hipótese é que o sistema da fenoloxidase só seria ativado tardiamente, momento em que o esporocisto já teria sido destruído por outros mecanismos do sistema interno de defesa, sem participar ativamente durante o processo inicial da infecção. Ainda nos ensaios “*ex vivo*”, foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre a atividade da PO do Taim e Cabo Frio na ausência do parasito, o que sugere uma maior atividade da PO intrínseca da linhagem resistente, independente da presença do *S. mansoni*. Baghat et al. (2002) não verificou correlação entre susceptibilidade/resistência de *B. glabrata* com atividade da PO, pois linhagens com diferente nível de susceptibilidade ao parasito apresentaram atividade da PO semelhantes. Assim, nossos resultados confirmam a hipótese de que a PO tem participação no mecanismo de defesa da *Biomphalaria*, porém, não é fator primordial para a eliminação do parasito.

Visando esclarecer ainda mais o papel da PO na infecção com outros parasitos, utilizamos também *E. paraensei*. Além disso, sabe-se que *B. tenagophila* Taim é resistente ao *S. mansoni* (como já mencionado), mas é susceptível ao *E. paraensei* (Santos, 2009; Garcia et al., 2010). Esse fato nos motivou a estudar resposta da PO, do Taim e Cabo Frio, frente a esse parasito. Os resultados obtidos utilizando o *E. paraensei* foram muito semelhantes aos observados na presença do *S. mansoni*. Nos ensaios “*in vitro*”, observou-se uma ativação da PO, tanto no Taim quanto no Cabo Frio, sugerindo um envolvimento dessa enzima na resposta frente ao parasito. Porém, nos experimentos “*ex vivo*”, só houve ativação da PO, no Taim e Cabo Frio, 48 horas após o desafio. Diferenças significativas entre as linhagens, na presença do *E. paraensei*, foram observadas 24 e 48 horas após o desafio. No entanto, como houve diferença entre as linhagens, mesmo na ausência do parasito,

evidencia-se mais uma vez que essa atividade mais exacerbada da PO no Taim pode ser intrínseca do caramujo. Alguns trabalhos sugerem que *Echinostoma* utiliza como mecanismo de evasão a supressão do sistema de defesa da *Biomphalaria* (Lie et al., 1977a,b, 1982; Guillou et al., 2007). No entanto, outros trabalhos já demonstraram que *B. glabrata* parcialmente resistentes ao *S. mansoni* e susceptíveis ao *E. paraensei* apresentam maior expressão de moléculas (principalmente FREPs – fibrinogen-related proteins) envolvidas na eliminação do parasito, após desafio com *E. paraensei* (Hertel et al., 2005; Zhang et al., 2008). Dessa forma, o fato de a atividade da PO, tanto da linhagem Taim quanto Cabo Frio, ser mais elevada na presença do *S. mansoni* e do *E. paraensei* sugere claramente a presença da PO como mecanismo de defesa. No entanto, tudo indica tratar-se de um mecanismo secundário, sem uma função evidente e direta frente aos trematódeos e não relacionado diretamente com a resistência. Os trabalhos em moluscos publicados, que avaliam importância da PO na eliminação de patógenos, descrevem claramente o papel fundamental dessa enzima na eliminação de parasitos, bem como associa a maior atividade da PO à resistência à infecção (Newton et al., 2004; Munõz et al., 2006; Hong et al., 2006). Porém, nesses trabalhos, a atividade da PO foi avaliada frente a bactérias e protozoários que são organismos unicelulares, menos complexos e muito menores do que o esporocisto de *S. mansoni* e de *E. paraensei*. Adema et al. (2010) avaliaram a expressão de diferentes moléculas em *B. glabrata* após contato com parasitos trematódeos (*S. mansoni* e *E. paraensei*), bem como bactérias e metazoários. Esse estudo revelou que o caramujo responde, de maneira diferente, frente aos diferentes patógenos. Sendo assim, o sistema da proPO pode até ser ativado na presença de outros parasitos, mas devido à complexidade e dimensão dos dois trematódeos, digenea, é capaz de encapsulá-los e eliminá-los, mas não utilizando o mecanismo de melanização.

A eficiência do sistema de defesa da *Biomphalaria* na destruição dos esporocistos de *S. mansoni* vem sendo amplamente estudada (como já mencionado), no entanto, devem ser levadas em consideração as evidências que indicam que o parasito possui estratégias de defesa que permitem a sua evasão e consequente sucesso da infecção. As estratégias utilizadas pelo *S. mansoni* não estão ainda completamente esclarecidas, porém, baseado na similaridade antigênica entre os componentes do parasito e tecidos do hospedeiro, alguns autores têm descrito a habilidade do *S. mansoni* em realizar mascaramento/mimetismo molecular

(Basch, 1976; Yoshino & Bayne, 1986; Damian, 1997; Salzet et al., 2000). Nos ensaios utilizando esporocistos secundários para avaliar a atividade da PO, foi possível observar pouca ou nenhuma ativação da enzima na presença desse estágio do parasito (quando comparado com o controle não exposto ao esporocisto secundário). Além disso, comparando a atividade da PO frente a esporocistos primários e secundários, demonstrou-se que a ativação da PO foi significativamente maior na presença do esporocisto primário. Esses resultados somados às evidências descritas na literatura nos levaram à hipótese de que esporocistos secundários, obtidos de caramujos infectados, poderiam ser menos reconhecidos pelo sistema interno de defesa da *B. tenagophila* Taim. Inicialmente, os ensaios de índice de adesão celular (IAC) demonstraram que os esporocistos primários e secundários, expostos às frações da hemolinfa da *B. tenagophila* Taim (incubação por 2 horas), apresentavam IAC significativamente maior do que os expostos à *B. glabrata*. Essa diferença não foi observada em relação à linhagem Cabo Frio. Sabe-se que a espécie *B. tenagophila* é naturalmente menos susceptível ao *S. mansoni* do que *B. glabrata* (Paraense e Corrêa, 1978; Souza et al., 1986, 1997; Caldeira et al., 2009). Além disso, Martins-Souza (2006) não observou diferença no IAC de Taim e Cabo Frio após 2 horas de incubação. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o IAC de esporocistos primários e secundários expostos à linhagem Taim. Talvez o tempo curto de incubação possa ter mascarado esse resultado.

Nos experimentos de viabilidade, realizados após 6 horas de incubação dos esporocistos com a hemolinfa da *Biomphalaria*, a linhagem Taim matou significativamente mais esporocistos do que as demais linhagens e espécies. Esse resultado já era esperado, tendo em vista a resistência absoluta do Taim. Além disso, foi possível observar que a proporção de esporocistos primários mortos foi significativamente maior do que a de esporocistos secundários, quando estes foram expostos às linhagens de *B. tenagophila*. Esse dado sugere menor eficiência do sistema de defesa em matar os esporocistos secundários, provenientes de caramujos infectados. Nesse ensaio de viabilidade, a proporção de esporocistos mortos foi elevada nos poços controles (apenas esporocistos), maior inclusive do que a observada nos esporocistos incubados com a hemolinfa de *B. glabrata*. A partir desse resultado, pode-se sugerir que *B. glabrata* (altamente susceptível) possua moléculas que favoreçam a sobrevivência e consequente desenvolvimento do esporocisto. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas

entre as diferentes frações da hemolinfa avaliadas (HT: hemolinfa total; H: fração de apenas hemócitos; S: fração de fatores solúveis). De acordo com a literatura, os hemócitos são os principais efetores do sistema de defesa dos moluscos (Adema & Loker, 1997). Barbosa et al. (2006) demonstraram que o transplante do APO da *B. tenagophila* Taim (resistente) para *B. tenagophila* Cabo Frio (susceptível) torna os caramujos susceptíveis resistentes ao *S. mansoni*, quando o transplante é bem sucedido. A fração solúvel da hemolinfa possui papel importante na eliminação do parasito. Coelho e Bezzera (2006) e Pereira et al. (2008) verificaram que a transferência passiva da fração solúvel da hemolinfa de caramujo resistente para caramujo susceptível torna esses caramujos resistentes à infecção pelo parasito. Além disso, Pereira (2009) verificou que a fração solúvel da hemolinfa mata esporocistos primários *in vitro*, independente da presença dos hemócitos. Em nossos experimentos, não foi possível observar um aumento da mortalidade de esporocistos quando os parasitos foram expostos à hemolinfa total. Acredita-se que o volume de hemolinfa utilizado (10% do volume total) não tenha sido suficiente para potencializar a resposta dos hemócitos. Martins-Souza (2006) não observou diferença entre a atividade dos hemócitos e hemócitos + fatores solúveis sobre os esporocistos, após 6 horas de incubação, utilizando 10% do volume de fatores solúveis. Pereira et al. (2008) observaram aumento de atividade, porém utilizando 20% do volume de fatores solúveis.

Os experimentos de avaliação da presença de dano no tegumento de esporocisto primário e secundário, após contato com o SID da *Biomphalaria*, demonstraram claramente que *B. tenagophila* Taim foi capaz de causar maior dano no tegumento de ambos os esporocistos. Os esporocistos primários expostos à *B. tenagophila* Taim apresentaram maior marcação com a sonda Alexa-Fluor 488 (específica para filamentos de actina) e Lectina de *Glicina max* do que aqueles expostos à *B. tenagophila* Cabo Frio e esporocistos controles. Além disso, os esporocistos primários expostos à *B. tenagophila* Taim apresentaram maior marcação pela Alexa-Fluor 488 e Lectina de *Glicina max* do que esporocistos secundários. A sonda Hoechst 33258 (específica para DNA) é utilizada como um marcador de integridade de membrana. Assim, é uma sonda muito sensível na marcação de danos no tegumento, até mesmo pequenos danos podem ser detectados pela Hoechst 33258 (Oliveira *et al.* 2006; Mattos *et al.* 2006). Uma sensibilidade similar não é observada durante o uso da sonda Lectina de *Glicina max* (Mattos *et al.* 2006) em esporocistos e Alexa-Fluor 488 (Oliveira *et al.* 2006) em

vermes adultos. Baseando-se nesses resultados da literatura, somente os esporocistos com danos intensos apresentam marcação da membrana com Alexa-Flúor 488 e Lectina de *Glicina max*. Os resultados obtidos utilizando a sonda Lectina de *Glicina max* mostraram que o contato dos esporocistos com SID, principalmente Taim, levou a uma maior exposição de glicoproteínas contendo N-acetilgalactosamina. Essa alteração no tegumento, pela exposição de componentes glucídicos, pode levar a uma maior interação dos hemócitos com os esporocistos, tendo em vista a presença de lectinas na superfície dos hemócitos. Além disso, a sonda Alexa-probe 488 foi capaz de marcar filamentos de actina abaixo da superfície (camada mais profunda).

Considerando todos os resultados que apontavam para menor reconhecimento dos esporocistos secundários pelo sistema de defesa da *B. tenagophila* Taim, realizamos a inoculação de esporocistos secundários obtidos de *B. glabrata* infectadas nos moluscos *B. tenagophila* e *B. glabrata*, na tentativa de infectar, principalmente, *B. tenagophila* Taim. Porém, ao final do ensaio (30 dias após a inoculação), apenas caramujos *B. glabrata* estavam eliminando cercárias, ou seja, *B. tenagophila* (Taim e Cabo Frio) não se infectaram. Podemos especular que o esporocisto secundário tenha adquirido moléculas da *B. glabrata* e que *B. tenagophila* tenha reconhecido essas moléculas como “não próprias” e destruído o parasito ou que *B. tenagophila*, por ser uma linhagem menos susceptível à infecção, foi capaz de eliminar os esporocistos secundários nessas condições especiais. Para verificar se o reconhecimento de moléculas da *B. glabrata*, na superfície do esporocisto secundário, pela *B. tenagophila* poderia interferir no curso da infecção, várias tentativas de se obter esporocistos secundários provenientes de *B. tenagophila* foram realizadas, no entanto, sem sucesso. É importante ressaltar que essa técnica de inoculação só havia sido realizada, até o momento, em *B. glabrata* (infecção homóloga) (Kapp et al., 2003). Além disso, podemos descartar uma possível inviabilidade dos esporocistos secundários inoculados, uma vez que os esporocistos foram submetidos à coloração em azul de tripan (para avaliar a viabilidade), sendo utilizado, para isso, agulha e seringa idênticas às usadas na inoculação e apenas os esporocistos não corados foram contados. O que também confirma essa viabilidade é o fato de os esporocistos terem se desenvolvido normalmente nas *B. glabrata*.

Os resultados obtidos nesta tese ajudam a esclarecer o envolvimento da PO no mecanismo de defesa da *Biomphalaria* frente a trematódeos, digenea e abrem

perspectivas para o estudo do mascaramento/mimetismo molecular como mecanismo de escape do *S. mansoni* em relação à *B. tenagophila* Taim.

## 7 Conclusões

☐☐ A fenoloxidase apresenta uma ativação na presença do *S. mansoni* e *E. paraensei*, porém não parece exercer papel importante na defesa da *B. tenagophila* frente a esses parasitos;

☐☐ A fenoloxidase apresenta maior atividade específica na *B. tenagophila* Taim, independente da presença do parasito;

☐☐ O sistema interno de defesa da *B. tenagophila* Taim é capaz de gerar mais danos aos esporocistos do que a linhagem Cabo Frio;

☐☐ Os esporocistos secundários são menos afetados pelo sistema de defesa da *B. tenagophila* do que esporocistos primários, apresentando menor IAC, maior viabilidade e menores danos no tegumento;

☐☐ É possível obter *B. glabrata* eliminando cercárias a partir da inoculação de esporocistos secundários provenientes da mesma espécie;

☐☐ Os esporocistos secundários (provenientes da *B. glabrata*) e inoculados na *B. tenagophila* não conseguiram infectar as linhagens objeto de estudo (*B. tenagophila* Taim e Cabo Frio).

## 8 Anexos

### 8.1 Anexo 1: Artigo Aceito

*Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 106(4): 000-000, June 2011 1

#### **Interaction between primary and secondary sporocysts of *Schistosoma mansoni* and the internal defence system of *Biomphalaria* resistant and susceptible to the parasite**

Ana Carolina Alves de Mattos<sup>1</sup>, Raquel Lopes Martins-Souza<sup>2</sup>,  
John Robert Kusel<sup>3</sup>, Paulo Marcos Zech Coelho<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Esquistossomose, Instituto de Pesquisa René Rachou-Fiocruz, Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil

<sup>3</sup>Division of Infection and Immunity, University of Glasgow, Scotland, UK

## 8.2 Anexo 2: Outras Produções Bibliográficas

1. Couto FFB, Coelho PMZ Araujo N, Kusel JR, Katz N, Jannotti-Passos LK, Mattos ACA. A method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, março, 2011.
2. Thornhill JA, Kusel JR, Oliveira FA, Ribeiro F, LIMA SF, Coelho PMZ, McVeigh P, Mattos ACA. Uptake of macromolecules by cercariae during skin penetration and transformation to schistosomula (*Schistosoma mansoni*). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 105, p. 387-390, 2010.
3. Couto FFB, Coelho PMZ Araujo N, Kusel JR, Katz N, Mattos ACA. Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel. Parasitology (London. Print), p. 1-7, 2010.
4. Jurberg AD, Gonçalves T, Costa TA, Mattos ACA, Pascarelli BM, Manso PPA, Ribeiro-Alves M, Pelajo-Machado M, Peralta JM, Coelho PMZ, Lenzi HL. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. Development, Genes and Evolution, v. 219, p. 219-234, 2009.
5. Araújo N, Mattos ACA, Sarvel AK, Coelho PMZ, Katz N. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental *Schistosomiasis mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, p. 450-454, 2008.
6. Araujo N, Mattos ACA, Coelho PMZ, Katz N. Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental *Schistosomiasis mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, p. 781-785, 2008.
7. Araújo S, Mattos ACA, Teixeira HF, Coelho PMZ, Nelson DL, Oliveira MC. Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. International Journal of Pharmaceutics, v. 337, p. 307-315, 2007.
8. Mattos ACA, Pereira GC, Jannotti-Passos LK, Kusel JR, Coelho PMZ. Evaluation of the Effect of Oxamniquine, Praziquantel and a Combination of Both Drugs on the Intramolluscan Phase of *Schistosoma mansoni*. Acta Tropica, v. 102, p. 84-91, 2007.

## 9 Referências Bibliográficas

Adema CM, van Deutekom-Mulder EC, van der Knaap WP, Sminia T. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. *Parasitol* 1994; 109(4): 479-85.

Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(16): 8691-96.

Adema CM & Loker ES. Specificity and immunobiology of larval digenean-snail associations. In: Fried B. & Graczyk TK. *Advances in trematode biology*. Florida: CRC Press; 1997. p.229-64.

Adema CM, Hanington PC, Lun CM, Rosenberg GH, Aragon AD, Stout BA, et al. Differential transcriptomic responses of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca) to bacteria and metazoan parasites, *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* (Digenea, Platyhelminthes). *Mol Immunol* 2010; 47(4): 849-60.

Ashida M, Yamasaki HI. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. In: Ohnishi E & Ishizaki H. *Molting and metamorphosis*. Berlin: Springer; 1990. p. 239-65.

Asokan R, Arumugam M, Mullainadhan P. Activation of prophenoloxidase in the plasma and haemocytes of the marine mussel *Perna viridis* Linnaeus. *Dev Comp Immunol* 1997; 21(1): 1-12.

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

Barbosa L, Caldeira RL, Carvalho OS, Vidigal THDA, Jannotti-Passos LK, Coelho PMZ. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. *Parasite Immunol* 2006; 28(5): 209-12.

Barbosa CS, Frave TC, Amaral RS, Piere OS. Epidemiologia e controle da esquistossomose mansoni: In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HF. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. p. 965-1008.

Bahgat M, Doenhoff M, Kirschfink M, Ruppel A. Serine protease and phenoloxidase activities in hemocytes of *Biomphalaria glabrata* snails with varying susceptibility to infection with the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 2002; 88(6): 489-94.

Bai G, Brown JF, Watson CO, Yoshino TP. Isolation and characterization of from egg masses of the Gastropoda mollusk, *Biomphalaria glabrata*. *Comp Biochem Physiol* 1997a; 118(2): 463-69.

Bai G, Johnston LA, Watson CO, Yoshino TP. Phenoloxidase activity in the reproductive system of *Biomphalaria glabrata*: role in egg production and effect of schistosome infection. *J Parasitol* 1997b; 83(5): 852-58.

Basch PF. Intermediate host specificity in *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 1976; 39(1): 150-69.

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* 1980; 50(3): 409-16.

Bayne CJ, Loker ES, Yui MA, Stephens JA. Immune-recognition of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts may require specific receptors on *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Parasite Immunol* 1984; 6: 519-28.

Bayne CJ, Hahn UK, Bender RC. Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitol* 2001; 123: S159-67.

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

Bezerra FSM, Nogueira-Machado JA, Chaves MM, Correa RF, Coelho PMZ. Effect of gamma radiation on the activity of hemocytes and the course of *Schistosoma mansoni* in resistant *Biomphalaria glabrata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 73-5.

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, Amaral RS, Dutra LV, Scholte RGC, Guerra MAM – Distribuição Espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi H. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. p. 485-516.

Castillo MG, Yoshino TP. Carbohydrate inhibition of *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell adhesion to primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol* 2002; 125(6): 513-25.

Cerenius L, Soderhall K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev* 2004; 198: 116-26.

Chen C, Durrant HJ, Newton RP, Ratcliffe NA. A study of novel lectins and their involvement in the activation of the prophenoloxidase system in *Blaberus discoidalis*. *Biochem J* 1995; 310(Pt1): 23-31.

Cheng TC, Chorney MJ, Yoshino TP. Lysozymelike activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challenged with bacteria. *J Invertebr Pathol* 1977; 29(2): 170-74.

Christensen BM, Forton KF. Hemocyte-mediated melanization of microfilariae in *Aedes aegypti*. *J Parasitol* 1986; 72(2): 220-25.

Coelho PM, Carvalho OS, Andrade ZA, Martins-Sousa RL, Rosa FM, Barbosa L, et al. *Biomphalaria tenagophila*/ *Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(5) Suppl 1: 109-11.

Coelho JR, Bezerra FS. Compatibility of *Biomphalaria tenagophila* with *Schistosoma mansoni*: a study of homologous plasma transference. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 111-12.

Coelho PMZ, Rosa F, Maciel E, Negrão-Corrêa D, Carvalho OS, Caldeira R, et al. 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* 2008; 108: 245-48.

Coles JA, Pipe RK. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Fish Shellfish Immunol* 1994; 4: 337-52.

Connors VA, Yoshino TP. In vitro effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 1990; 76(6): 895-902.

Corrêa MCR, Coelho PMZ, Freitas JR. Susceptibilidade de linhagens de *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria glabrata* a duas cepas de *Schistosoma mansoni* – (LE/ BH – MG e SJ/ São José dos Campos – SP). Rev Inst Med Trop São Paulo 1979; 21: 72-6.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99(5) Suppl 1: 13-9.

Damian RT. Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. Parasitol 1997; 115: S169-75.

Deaton LE, Jordan PJ, Dankert JR. Phenoloxidase activity in the haemolymph of bivalve mollusk. J Fish Res 1999; 18: 223-26.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. Acta Trop 2002; 82: 139-46.

Franssens V, Simonet G, Breugelmans B, Van Soest S, Van Hoef V, Vanden Broeck J. The role of hemocytes, serine protease inhibitors and pathogen-associated patterns in prophenoloxidase activation in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Peptides 2008; 29(2): 235-41.

Garcia JS, Maldonado Junior A, Bidau CJ, Corrêa Ldos R, Lanfredi RM, Coelho PM. The effect of early infection with *Echinostoma paraensei* on the interaction of *Schistosoma mansoni* with *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(4): 499-503.

Garcia ES, Machado EM, Azambuja P. Effects of eicosanoid biosynthesis inhibitors on the prophenoloxidase-activating system and microaggregation reactions in the

hemolymph of *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*. J Insect Physiol 2004; 50(2-3): 157-65.

Glinski Z, Jarosz J. Molluscan immune defenses. Arch Immunol Ther Exp 1997; 45(2-3): 149-55.

Gomes SA, Feder D, Thomas NE, Garcia ES, Azambuja P. *Rhodnius prolixus* infected with *Trypanosoma rangeli*: *In vivo* and *in vitro* experiments. J Invertebr Pathol 1999; 73(3): 289-93.

Gomes SA, Feder D, Garcia ES, Azambuja P. Suppression of the prophenoloxidase system in *Rhodnius prolixus* orally infected with *Trypanosoma rangeli*. J Insect Physiol 2003; 49(9): 829-37.

Granath WO JR, Yoshino TP. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol 1984; 58: 188-93.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. Lancet 2006; 368(9541): 1106-18.

Guillou F, Roger E, Moné Y, Rognon A, Grunau C, Théron A, et al. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. Mol Biochem Parasitol 2007; 155(1): 45-56.

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): 531-41.

Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 2001; 87: 778-85.

Harris KR. The Fine Structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. Ann NY Acad Sci 1975; 266: 446-64

Hellio C, Bado-Nilles A, Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H. Demonstration of a true phenoloxidase activity and activation of a ProPO cascade in Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) *in vitro*. Fish Shellfish Immunol 2007; 22(4): 433-40.

Hernández-López J, Gollas-Galván T, Gómez-Jiménez S, Portillo-Clark G, Vargas-Albores F. In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxidase is located in plasma not in haemocytes. Fish Shellfish Immunol 2003; 14(2): 105-14.

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.

Hong XT, Xiang LX, Shao JZ. The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. Fish Shellfish Immunol 2006; 21(4): 357-64.

Huffman JE, Fried B. *Echinostoma* and echinostomiasis. Adv Parasitol 1990; 29: 215-69.

Jannotti-Passos LK, Andrade HM, Caldeira RL, Romanha AJ, Murta SM, Chapeaurouge DA, et al. Proteome analysis of the cardiac and pericardial tissue of *Biomphalaria tenagophila* populations susceptible and resistant to *Schistosoma mansoni* infection. Acta Trop 2008; 105(3): 229-34.

Johnston LA, Yoshino TP. Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. Parasitol 1996; 112(5): 469-79.

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): 786-93.

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

Jourdane J, Theron A. *Schistosoma mansoni*: cloning by microsurgical transplantation of sporocysts. *Exp Parasitol* 1980; 50(3): 349-57.

Kapp K, Coustau C, Wippersteg V, Jourdan J, Kunz W, Grevelding CG. Transplantation of in vitro-generated *Schistosoma mansoni* mother sporocysts into *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol Res* 2003; 91(6): 482-85.

Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33(3): 303-08.

Lehr T, Frank S, Natsuka S, Geyer H, Beuerlein K, Doenhoff MJ, et al. N-Glycosylation patterns of hemolymph glycoproteins from *Biomphalaria glabrata* strains expressing different susceptibility to *Schistosoma mansoni* infection. *Exp Parasitol* 2010; 126(4): 592-602.

Lie KJ, Heynman D. Studies on resistance in snails. 6. Escape of *Echinostoma lindoense* sporocysts from encapsulation in the snail heart and subsequent loss of the host's ability to resist infection by the same parasite. *J Parasitol* 1976; 62(2): 298-302.

Lie KJ, Heyneman D. Studies on resistance in snails: interference by nonirradiated echinostome larvae with natural resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *J Invertebr Pathol* 1977a; 29(2): 118-25.

Lie KJ, Heyneman D, Richards CS. *Schistosoma mansoni*: temporary reduction of natural resistance in *Biomphalaria glabrata* induced by irradiated miracidia of *Echinostoma paraensei*. *Exp Parasitol* 1977b; 43(1): 54-62

Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D. Further characterization of acquired resistance in *Biomphalaria glabrata*. *J Parasitol* 1982; 68(4): 529-31.

Lie KJ, Jeong KH, Heyneman D. Molluscan host reactions to helminthic infection. In: Soulsby E JL. *Protozoa, Arthropods and Invertebrates*. Florida: CRC-Prees; 1987. p. 211-70.

Lie KJ, Basch PF. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematoda: Echinostomatidae). *J Parasitol* 1967; 53(6): 1192-99.

Liu G, Yang L, Fan T, Cong R, Tang Z, Sun W, et al. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. *Fish and Shellfish Immunol* 2006; 20: 47-57.

Lewis FA, Patterson CN, Knight M, Richards CS. The relationship between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*: genetic and molecular approaches. *Parasitol* 2001; 123: S169-79.

Lo Verde PT, Gherson J, Richards CS. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: fine structure. *Dev Comp Immunol* 1982; 6(3): 441-9.

Lodes MJ, Yoshino TP. The effect of Schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocytes motility. *J Invertebrate Pathol* 1990; 56(1): 75-85.

Lockyer AE, Noble LR, Rollinson D, Jones CS. *Schistosoma mansoni*: resistant specific infection-induced gene expression in *Biomphalaria glabrata* identified by fluorescent-based differential display. *Exp Parasitol* 2004; 107(1-2): 97-104.

Lockyer AE, Spinks J, Noble LR, Rollinson D, Jones CS. Identification of genes involved in interactions between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* by suppression subtractive hybridization. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 151(1): 18-27.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.

Machado EM, Azambuja P, Garcia ES. WEB 2086, a platelet-activating factor antagonist, inhibits prophenoloxidase-activating system and hemocyte microaggregation reactions induced by *Trypanosoma rangeli* infection in *Rhodnius prolixus* hemolymph. *J Insect Physiol* 2006; 52(7): 685-92.

Maldonado A Jr, Vieira GO, Garcia JS, Rey L, Lanfredi RM. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitol Res* 2001; 87(10): 853-59.

Matricon-Gondran M, Letorcart M. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata* – I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. *J Invertebr Pathol* 1999; 74: 224-34.

Martins-Souza RL, Negrão-Corrêa D, Bezerra F, Coelho P. Anesthesia of *Biomphalaria* spp. (Mollusca, Gastropoda): sodium pentobarbital is the drug of choice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(3): 391-92.

Martins-Souza RL, Pereira CA, Coelho PMZ, 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: 500-7.

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Coelho PMZ, Corrêa JR A, 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 Suppl. I: 185-92.

Martins-Souza RL. Caracterização fenotípica e funcional de hemócitos circulantes de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*, linhagens resistentes e susceptíveis, durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni* [Tese]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.

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

Mattos ACA, Kusel JR, Pimenta PFP, Coelho PMZ. Activity of praziquantel on in vitro transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101 Suppl. I: 283-87.

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

Mourão MM, Dinguirard N, Franco GR, Yoshino TP. Phenotypic screen of early-developing larvae of the blood fluke, *Schistosoma mansoni*, using RNA interference. PLoS Negl Trop Dis 2009; 3(8): e502.

Munõz P, Meseguer J, Esteban A M. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. Fish Shellfish Immunol 2006; 20: 12-19.

Negrão-Corrêa D, Pereira CAJ, Rosa FM, Martins-Souza RL, Andrade ZA, Coelho PMZ. Molluscan response to parasite: *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* interaction. *Invert Survival J* 2007; 4: 101-11.

Negrão-Corrêa D, Andrade ZA, Borges C, Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Coelho PMZ - Interação *Biomphalaria* e *Schistosoma mansoni*: papel do sistema interno de defesa do molusco na susceptibilidade ao parasito. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi H. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2008. p. 485-516.

Newton K, Peters R, Raftos D. Phenoloxidase and QX disease resistance in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*). *Dev Comp Immunol* 2004; 28(6): 565-69.

Newton WL. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 1952; 38(4 Pt 1): 362-66.

Newton WL. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. *Exp. Parasitol* 1953; 2: 242-57.

Nigam Y, Maudlin I, Welburn S, Ratcliffe NA. Detection of phenoloxidase activity in the hemolymph of tsetse flies, refractory and susceptible to infection with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *J Invertebr Pathol* 1997; 69(3): 79-281.

Oliveira FA, Kusel JR, Ribeiro F, Coelho PMZ. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. *Parasitol* 2006; 132(3): 321-30.

Pan CT. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am J Trop Med Hyg* 1965; 14(6): 931-76.

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

Paraense WL. Estado atual da sistemática dos Planorbídeos brasileiros. Arq Mus Nac 1975; 55: 105-28.

Paraense WL, Corrêa LR. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 1978; 64(5): 822-26.

Paraense WL. Distribuição dos caramujos no Brasil. In: FA Reis, I Faria, N Katz. Modernos Conhecimentos sobre Esquistossomose Mansônica, Anais da Academia Mineira de Medicina; 1986 Suppl 1983/84, Belo Horizonte; p.117-28.

Passos AD, Amaral Rdos S. Schistosomiasis mansoni: the epidemiological and control aspects. Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31 Suppl 2: 61-74.

Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni*. Adv Parasitol 1968; 6: 233-91.

Pereira, CAJ. Influência de fatores solúveis da hemolinfa de co-infecções com *Angiostrongylus vasorum* na susceptibilidade de *Biomphalaria tenagophila* à infecção por *Schistosoma mansoni* [Dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2005.

Pereira CA, Martins-Souza RL, Corrêa A Jr, Coelho PM, Negrão-Corrêa D. Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts. Parasite Immunol 2008; 30(11-12): 610-19.

Pereira CAJ. Caracterização da atividade de moléculas solúveis da hemolinfa de *Biomphalaria tenagophila* Taim envolvidos na morte dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* cultivados *in vitro* [Tese]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.

Pereira LH, Valadares TE, da Cunha ML, Correa MC. Recovery of young daughter sporocysts from snails infected with *Schistosoma mansoni*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1984; 78(4): 563.

Peterson NA, Hokke CH, Deelder AM, Yoshino TP. Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*: differential expression during the miracidium-to-sporocyst transformation. Int J Parasitol 2009; 39(12): 1331-44.

Ratcliffe NA, Gagen SJ. Cellular defense reactions of the insects hemocytes *in vivo*: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. J Invertebr Pathol 1976; 28: 373-82.

Ratcliffe NA, Rowley AF, Fitzgerald SW, Rhodes CP. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. Int Rev Cytol 1985; 97: 183-350.

Richards CS, Shade PC. The genetic variation of compatibility in *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. J Parasitol 1987; 73(6): 1146-51.

Richards CS. Bulbous head growths of *Biomphalaria glabrata*: genetic studies. J Invertebr Pathol 1973; 22(2): 278-82.

Rosa FM, Caldeira RL, Carvalho OS, 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): 85-7.

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.

Rosa FM, Godard ALB, Negrão-Correa DA, Rodrigues HA, Carvalho OS, Caldeira RL, et al. *Biomphalaria tenagophila*: Dynamics of populations of susceptible and resistant strains to *Schistosoma mansoni* with or without the parasite's pressure. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 247-51.

Salzet M, Capron A, Stefano GB. Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome-and leech-host interactions. Parasitol Today 2000; 16(12): 536-40.

Sapp KK, Loker ES. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: *in vitro* interactions between hemocytes and digenean larvae. J Parasitol 2000; 86(5): 1020-29.

Santos MBL, Freitas JR, Correia, MCR. Suscetibilidade ao *Schistosoma mansoni* de híbridos de *Biomphalaria tenagophila* to Taim, RS, Cabo Frio, RJ e Belo Horizonte, MG. Rev Inst Med Trop São Paulo 1979; 21: 281-86.

Santos MM. Estudo da relação parasite-hospedeiro da infecção por *Echinostoma paraensei* (Platyhelminthes: Echinostomatidae) em isolados de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca: Planorbidae): uma abordagem biológica e histopatológica [Dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Instituto Oswaldo Cruz; 2009.

Smith VJ, Soderhall K. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. Dev Comp Immunol 1991; 15(4): 251-61.

Souza CP. Mollusca of the genus *Biomphalaria* from Minas Gerais, in relation to host-parasite adaptation and importance in the epidemiology of schistosomiasis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1986; 28: 287-92.

Souza CP, Cunha R C, Andrade ZA. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1995; 37(3): 201-6.

Souza CP, Borges CC, Santana AG, Andrade ZA. Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92: 517-22

Souza S dos S, Andrade ZA. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101 Suppl 1: 213-18.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect Dis 2006; 6(7): 411-25.

Sullivan JT, Pikios SS, Alonzo AQ. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 2004; 90(1): 92-6.

Sullivan JT, Castro L. Mitotic arrest and toxicity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) exposed to colchicine. J Invertebr Pathol 2005; 90(1): 32-8.

Teles HM. Geographic distribution of *Schistosoma mansoni* transmitter snail species in State of São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38(5): 426-32.

Teodoro TM, Janotti-Passos LK, Carvalho O dos S, Caldeira RL. Occurrence of *Biomphalaria cousini* (Mollusca: Gastropoda) in Brazil and its susceptibility to *Schistosoma mansoni* (Platyhelminths: Trematoda). *Mol Phylogenet Evol* 2010; 57(1): 144-51.

Thomas-Guyon H, Gagnaire B, Bado-Nilles A, Bouilly K, Lapègue S, Renault T. Detection of phenoloxidase activity in early stages of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Dev Comp Immunol* 2009; 33(5): 653-59.

Tunholi VM, Lustrino D, Tunholi-Alves VM, de Mello-Silva CC, Maldonado A Jr, Rodrigues Mde L, et al. Changes in the reproductive biology of *Biomphalaria glabrata* infected with different doses of *Echinostoma paraensei* miracidia. *J Invertebr Pathol* 2011a; 106(2):192-5.

Tunholi VM, Lustrino D, Tunholi-Alves VM, Mello-Silva CC, Maldonado A Jr, Pinheiro J, Rodrigues MD. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitol Res*. In Press 2011b.

Uchikawa R, Loker ES. Lectin-binding properties of the surfaces of *in vitro*-transformed *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* sporocysts. *J Parasitol* 1991; 77(5): 742-48.

van Der Knaap WPW, Loker ES. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitol Today* 1990; 6: 175-82.

van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 2003; 86(2-3): 125-39.

van Die I, Cummings RD. Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? *Glycobiology* 2010; 20(1): 2-12.

Vass E, Nappi AJ, Carton Y. Alterations in the activities of tyrosinase, N-acetyltransferase, and tyrosine aminotransferase in immune reactive larvae of *Drosophila melanogaster*. *Dev Comp Immunol* 1993; 17(2): 109-18.

Zelck U, Becker W. Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* tissue. *J Invertebr Pathol* 1990; 55(1): 93-9.

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* 2008; 14(3): 175-89.

Walker AJ, Rollinson D. Specific tyrosine phosphorylation induced in *Schistosoma mansoni* miracidia by haemolymph from schistosome susceptible, but not resistant, *Biomphalaria glabrata*. *Parasitol* 2008; 135(3): 337-45.

World Health Organization – WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2002; 912 (i-vi): 1-57.

World Health Organization – WHO. Schistosomiasis: number of people treated in 2009. *Weekly epidemiological record (WER)* [serial online] 2011 Feb; 86(9): [7 screens]. Available from URL: <http://www.who.int/wer/2011/wer8609.pdf>

World Health Organization. Schistosomiasis: Countries X Indicators: This table shows countries in rows and indicators in columns for a particular year. Geneva: WHO, 2010. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/sch/db/index.html?](http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/index.html?)

[units=minimal&region=all&country=bra&countries=bra&year=2009](#). Acesso em: 26 fev. 2011.

Wootton EC, Dyrinda EA, Ratcliffe NA. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*). *Fish Shellfish Immunol.* 2003; 15(3): 195-210.

Yoshino TP. The ultratructure of circulating hemolymph cells of the marine snail *Cerithidea californica* (Gastropoda: Prosobranchiata). *J Morphol* 1976; 150: 148.

Yoshino TP, Bayne CJ. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 1983; 5(3): 317-28.

Yoshino TP, Lodes MJ, Rege AA, Chappell CL. Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 1993; 79(1): 23-31.