

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
Doutorado em Medicina Tropical



MARÍLIA GABRIELA DOS SANTOS CAVALCANTI

CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS DE *Biomphalaria glabrata* E
Biomphalaria straminea SADIOS E INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni*

Recife
2011

MARÍLIA GABRIELA DOS SANTOS CAVALCANTI

**CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS DE *Biomphalaria glabrata* E
Biomphalaria straminea SADIOS E INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni***

Tese apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadores:

Dr. Fábio André Brayner dos Santos
Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

**Recife
2011**

Cavalcanti, Marília Gabriela dos Santos
Caracterização dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* sadios e infectados por *Schistosoma mansoni* / Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2011.
155 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

1. *Schistosoma mansoni*. 2. *Biomphalaria glabrata*. 3. *Biomphalaria straminea*. 4. Hemócitos. 5. Morfologia. I. Santos, Fábio André Brayner dos. II. Título.

594.3 CDD (20.ed.) UFPE
CS2011-171



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

REITOR:

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiros

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Profa. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Profa. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof^a. Celina Maria Turchi Martelli

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof. Fábio André Brayner dos Santos

Prof^a. Heloisa Ramos Lacerda de Melo

Prof^a. Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Prof^a. Maria do Amparo Andrade

Prof^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Prof^a. Marli Tenório Cordeiro

Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Prof^a. Vera Magalhães da Silveira

Prof^a. Vláudia Maria Assis Costa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPEQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

MARÍLIA GABRIELA DOS SANTOS CAVALCANTI

No dia 27 de maio de 2011, às 13h00, no Auditório do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, os Membros Doutores: a Prof^ª. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (Presidente da Banca - UFPE), a Prof^ª. Dra. Lânia Ferreira da Silva (UPE), a Prof^ª. Dra. Luciana Maria Silva (Fundação Ezequiel Dias), a Prof^ª. Dra. Valéria Wanderley Teixeira (UFRPE) e a Prof^ª. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda MARÍLIA GABRIELA DOS SANTOS CAVALCANTI sobre a sua Tese intitulada “**CARACTERIZAÇÃO DOS HEMÓCITOS DE *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* SADIOS E INFECTADOS POR *Schistosoma mansoni***”, a qual foi orientada pelo Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Prof^ª. Dra. Lânia Ferreira da Silva

Prof^ª. Dra. Luciana Maria Silva

Prof^ª. Dr^ª. Valéria Wanderley Teixeira

Prof^ª. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

APROVADA

Aprovada

Aprovada

Aprovada

Aprovada

Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Prof^ª. Dra. Lânia Ferreira da Silva

Prof^ª. Dra. Luciana Maria Silva

Prof^ª. Dr^ª. Valéria Wanderley Teixeira

Prof^ª. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel

Dedico

Ao meu marido Felipe Santana pelos ensinamentos, amor, amizade, paciência, carinho, respeito e confiança.

Ofereço

Aos meus pais, Francisco e Valdemira e meus irmãos, Cláudia e Helder que muito me ajudaram e me apoiaram nessa longa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me concedeu todas as condições para chegar até aqui, mostrando o melhor caminho, guiando-me na direção certa.

Aos meus pais, Francisco de Assis e Valdemira Cavalcanti, pelo exemplo de coragem, honestidade, simplicidade e persistência em suas metas que me infundiram a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Ao meu amado marido a quem merecidamente divido essa conquista, pois vivenciamos juntos toda a felicidade e momentos difíceis dessa vitória.

Aos meus queridos e amados irmãos, Cláudia e Helder, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando em tudo.

A toda minha família pelos momentos felizes, apoio, companheirismo e cumplicidade.

A minha avó, Celina Florêncio (*in memoriam*) pelo extraordinário exemplo de vida, dignidade, ética, amor e paciência.

Aos meus orientadores e grandes amigos Fábio Brayner e Luiz Carlos, pela amizade sólida e verdadeira, agradeço toda a orientação, confiança, ensinamentos, companheirismo, paciência, estímulo e por todo o aprendizado durante a minha caminhada científica.

À amiga Célia Castro pelo apoio, incentivo e pela confiança. A você sou muito grata!

Aos colegas de laboratório: Gladiston Rocha, Fernando Caldeira, Thiago Rocha, Dyana Veras, Elverson, Ana Paula, Catarina, Tatiana, Gabriel, Roberto, Grazi e Adriana Burgo pela força e amizade.

À Lânia Ferreira agradeço o carinho, amizade e oportunidade de poder começar a iniciação científica no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

Ao grande amigo Rafael Padilha (LIKA) pela amizade, carinho e atenção. Obrigada pela companhia e apoio durante as muitas noites de experimentos, valeu Rafito!

Ao técnico Raimundo Pimentel do CPqAM/ FIOCRUZ pela ajuda no processamento das amostras e obtenção das fotos em microscopia eletrônica.

Ao diretor do LIKA, Dr. José Luiz de Lima Filho, pela infra-estrutura que possibilitou a realização desta pesquisa.

Aos secretários da pós-graduação, Walter Leite e Jupira, pelo apoio e pela constante presença.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da UFPE.

Aos amigos, Robson Nascimento, Barnabé, Magal, Fernando, Diogo e toda equipe do Laboratório de Esquistossomose, Departamento de Parasitologia (CPqAM) pela amizade, paciência, competência e ensinamentos indispensáveis na execução deste trabalho.

À Dra. Constança Clara Gayoso Simões Barbosa pelas contribuições que permitiram o aperfeiçoamento deste trabalho.

À banca examinadora pelas importantes considerações feitas na tese.

Aos queridos amigos: Helena Rocha, Duschinka Guedes, Guilherme Messias e Marcelo Paiva pela ajuda, amizade e apoio.

Aos amigos da biblioteca pela colaboração na obtenção das informações científicas.

Às amigas Viviane, Gircelly, Aline, Soraya, Juliana, Joseane e Cybelle que sempre me apoiaram nos momentos mais difíceis.

A todos os professores e funcionários da UFPB pela atenção e incentivo.

Às amigas: Caliandra Lima, Cristine Hirsch-Monteiro e Vânia Maranhão pela força, incentivo e amizade.

Aos meus companheiros do curso de Medicina Tropical (Mestrandos/Doutorandos), em especial a Bruno Galvão, André Ayres, Kedma Magalhães, Analíria Pimentel, Eduardo Brandão, Luciana Homes e Ana Isabel pelo apoio, carinho e companheirismo.

Por fim, a todos que de alguma forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Não venci todas as vezes que lutei,
mas perdi todas as vezes que deixei de lutar"*

Marcio Kühne

CAVALCANTI, Marília Gabriela dos Santos. Caracterização dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria straminea* sadios e infectados por *Schistosoma mansoni*. 2011. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

RESUMO

O ciclo do *Schistosoma mansoni* depende da existência de hospedeiros intermediários que no Brasil são caramujos do gênero *Biomphalaria*. Em muitas espécies de invertebrados sabe-se que os hemócitos e fatores humorais da hemolinfa são responsáveis pela defesa imunológica contra patógenos, que efetivamente podem impedir ou limitar uma espécie de funcionar como vetor competente. Sabendo-se que o *B. glabrata* demonstra maior suscetibilidade ao *S. mansoni* em relação ao *B. straminea*, o presente estudo teve como objetivo elucidar as bases celulares do sistema de defesa dos caramujos das espécies *B. glabrata* e *B. straminea*. Para a avaliação morfológica dos hemócitos nas condições sadios e infectados pelos miracídios de *S. mansoni*, foi utilizada a microscopia óptica, de interferência diferencial e microscopia eletrônica de transmissão. Na caracterização dos hemócitos através de lectinas (UEA-1, DBA, LCA, BS-I e WGA) conjugadas a FITC, foi utilizado o microscópio confocal a laser. Foi realizado também a avaliação cinética diferencial das células nas condições sadios e infectados pelos miracídios de *S. mansoni*, utilizando hemocitômetro nos tempos de 2h, 15 e 30d. Neste trabalho foi identificado cinco tipos celulares na hemolinfa das duas espécies: células blásticas, granulócitos e hialinócitos do tipo I, II e III. As células blásticas se mostram esféricas com núcleo grande localizado centralmente, em *B. straminea* infectados estas células não apresentaram muitas modificações morfológicas, porém em *B. glabrata* este tipo celular passou a apresentar alterações no formato da célula. Os granulócitos apresentaram-se com vários grânulos eletrodensos. Em *B. glabrata* infectados estas células não se mostraram com alterações morfológicas, porém, em *B. straminea* foi possível identificar liberação de grânulos. O hialinócito do tipo I foi o tipo celular mais encontrado na hemolinfa de ambas as espécies, tais células são polimórficas e apresentam muitas projeções citoplasmáticas. Estas células em caramujos infectados apresentaram-se com maior adesão celular e maior quantidade de grânulos de glicogênio. Nos hialinócitos do tipo I em *B. straminea*, não identificamos adesão celular, e assim como *B. glabrata*, passaram a apresentar mais projeções citoplasmáticas após infecção. Os hialinócitos do tipo II e III são células ovais e geralmente apresentam coloração homogênea. Estes tipos celulares apresentaram poucas alterações morfológicas após a infecção nas duas espécies estudadas. Em relação à marcação com lectinas foi evidenciado um aumento na marcação após a infecção em quase todos os hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea*. Na avaliação da dinâmica hemocitária em *B. glabrata* foram identificadas variações significantes em três dos cinco tipos celulares: células blásticas, granulócito e hialinócito I. Os mesmos resultados foram encontrados em *B. straminea*. Neste trabalho foi realizada a caracterização e padronização dos hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea*, sadios e infectados com miracídios de *S. mansoni*. Desta forma, o presente estudo possibilitou um melhor entendimento sobre o papel dessas células no processo de defesa contra o *S. mansoni* e sugere uma relação da resposta imune celular na suscetibilidade ou não ao Trematóide.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea*, hemócitos, morfologia.

CAVALCANTI, Marília Gabriela dos Santos. Characterization of hemocytes of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea* uninfected and infected to *Schistosoma mansoni*. 2011. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

ABSTRACT

The cycle of *Schistosoma mansoni* depends on the existence of intermediate hosts that in the Brazil are snails of the genus *Biomphalaria*. In many species of invertebrates the knowledge about hemocytes and humoral factors of hemolymph are responsible for immune defense against pathogens, which can effectively prevent or limit a specie of to work as a competent vector. Knowing that the *B. glabrata* demonstrates increased susceptibility to *S. mansoni* in relation to *B. straminea*, this study aimed to elucidate the cellular basis of the defense system of snails of the species *B. glabrata* and *B. straminea*. For the morphological evaluation of hemocytes in uninfected conditions and infected by miracidia of *S. mansoni*, we used optical microscopy, differential interference and transmission electron microscopy. To characterization of hemocytes by lectins (UEA-1, DBA, LCA, WGA and BS-I) conjugated to FITC was used confocal laser microscope. Was also performed to evaluate differential cell kinetics in uninfected conditions and infected by miracidia of *S. mansoni* a hemocytometer in the times of 2 hours, 15 and 30d. This work identified five cell types in the hemolymph of two species: blast cells, granulocytes and hyalinocytes type I, II and III. The blast cells showed spherical with nucleus centrally located, in *B. straminea* infected these cells did not show many morphological changes, but in *B. glabrata* this cell type began to show changes in the format of the cell. The granulocytes showed electrodense granules, in *B. glabrata* infected these cells not showed morphological changes; however, in *B. straminea* were identified granule release. The hyalinocytes type I was the cell type most commonly found in the hemolymph of both species, these cells are polymorphic, and have many cytoplasmic projections. These cells in infected snails presented with increased cell adhesion and an increased amount of glycogen granules. In hyalinocytes type I in *B. straminea*, not was identified cell adhesion, and as *B. glabrata*, began to show more cytoplasmic after infection. The hyalinocytes type II and III are oval cells and usually show homogeneous staining. These cell types showed few morphological changes after infection in the two species. Regarding the marking with lectins was identified an increase in the markup after infection in nearly all hemocytes of *B. glabrata* and *B. straminea*. In assessing the dynamics hemocytes in *B. glabrata* significant variations were identified in three of five cell types: blast cells, granulocytes and hyalinocytes I. The same results were found in *B. straminea*. In this study was performed the characterization and standardization of hemocytes of *B. glabrata* and *B. straminea*, uninfected and infected with miracidia of *S. mansoni*. Thus, this study has enabled a better understanding of the role of these cells in the defense against *S. mansoni* and suggests a relationship between cellular immune response in susceptibility or not to trematode.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea*, hemocytes, morphology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mapa da distribuição da esquistossomose	20
Figura 2 -	Ciclo de vida do <i>Schistosoma spp</i>	21
Figura 3 -	Caramujos transmissores da esquistossomose no Brasil	23
Figura 4 -	Distribuição geográfica de <i>Biomphalaria glabra</i> e <i>B. straminea</i> no Brasil	28
Figura 5 -	Anatomia do <i>Biomphalaria</i>	32
Figura 6 -	Processo de fagocitose de microrganismos	42
Figura 7 -	Início do encapsulamento do esporocisto de <i>S. mansoni</i> em <i>B. glabrata</i>	43
Figura 8 -	Criadouros do moluscário do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães	51
Figura 9 -	Obtenção de miracídios de <i>S. mansoni</i> e infecção de caramujos	52
Figura 10 -	Coleta da hemolinfa de <i>B. straminea</i> utilizando microcapilar de vidro siliconizado	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH	Belo Horizonte
BL	Célula Blástica
BSA	Meio de cultura contendo (batata, sacarose e ágar)
BS-I	<i>Bandeirea simplicifolia</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>
ERO	Mecanismos oxidativos
GR	Granulócito
HY1	Hialinócito do tipo I
HY2	Hialinócito do tipo II
HY3	Hialinócito do tipo III
LCA	<i>Lens culinaris</i>
MCC	Microscopia de Campo Claro
MCID	Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia óptica
PBS	Tampão fosfato salino
UEA	<i>Ulex europaeus</i>
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Esquistossomose	19
2.2 Ciclo do <i>S. mansoni</i>	21
2.3 Vetor	22
2.3.1 Caramujo da espécie <i>B. tenagophila</i>	23
2.3.2 Caramujo da espécie <i>B. glabrata</i>	24
2.3.3 Caramujo da espécie <i>B. straminea</i>	24
2.4 <i>Biologia e Ecologia de Biomphalaria</i>	25
2.5 Distribuição de <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i>	27
2.6 Interação do <i>S. mansoni</i> com o <i>Biomphalaria</i>	28
2.7 Infecção e Desenvolvimento do <i>S. mansoni</i> no Hospedeiro Intermediário	29
2.8 Sistema Circulatório	33
2.9 Mecanismo de Defesa dos Caramujos	33
2.9.1 Hemolinfa	34
2.9.2 Hemócitos	35
2.9.2.1 Origem dos Hemócitos	36
2.9.2.2 Classificação dos Hemócitos	37
2.9.3 Resposta Humoral	38
2.9.4 Resposta Celular	39
2.9.4.1 Sinalização Celular	39
2.9.4.2 Fagocitose	41
2.9.4.3 Encapsulação	43
2.9.4.4 Ferramentas para o estudo morfológico dos hemócitos	44
3 OBJETIVOS	47
3.1 Geral	47
3.2 Específicos	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Desenho do Estudo	49
4.2 Operacionalização da Pesquisa	49
4.2.1 Definição das Variáveis	49
4.2.2 Obtenção dos moluscos	50

4.2.3 Obtenção de miracídios	51
4.2.4 Infecção dos moluscos	52
4.2.5 Formação dos grupos	52
4.2.6 Obtenção da hemolinfa	53
4.2.7 Microscopia	54
4.2.7.1 Preparação de Lâminas- Microscopia de Campo Claro:	54
4.2.7.2 Contagem total e diferencial dos hemócitos - Microscopia de Campo Claro	54
4.2.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	54
4.2.7.4 Microscopia confocal a laser (MCL)	55
4.2.7.5 Marcação com lectinas conjugadas à FITC	55
4.2.8 Análise Estatística	56
4.2.9 Aspectos Éticos	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Artigo 1: Caracterização morfológica dos hemócitos de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) e <i>Biomphalaria straminea</i> (Dunker, 1848): uma nova classificação	59
5.2 Artigo 2: Perfil da resposta celular de <i>Biomphalaria glabrata</i> (Say, 1818) e <i>Biomphalaria straminea</i> (Dunker, 1848) infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	79
6 CONCLUSÕES	114
REFERENCIAS	117
ANEXOS	132
Anexo A: Parecer da Comissão de Ética do CPqAM/FIOCRUZ	133
Anexo B: Confirmação de Submissão do Artigo, Revista: Micron	134
Anexo C: Normas da Revista (Micron)	135
Anexo D: Confirmação de Submissão do Artigo, Revista: Parasitology Research	145
Anexo E: Normas da Revista (Parasitology Research)	146

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Moluscos do gênero *Biomphalaria* apresentam diferenças na susceptibilidade à infecção pelo *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907) e existem vários fatores que podem estar associados a essa variação, entre eles, o estado imunológico dos caramujos (VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001).

Alguns trabalhos têm mostrado variações na suscetibilidade à infecção ao trematódeo. Populações de *B. glabrata* (SAY, 1818) de diferentes localidades brasileiras mostraram índices de infecção que variam de 0 a 100% quando foram desafiados com uma única cepa de *S. mansoni* (Belo Horizonte) (PARAENSE; CORRÊA, 1963). Da mesma forma, as taxas de infectividade variando entre 0 e 91,5% em amostras de *B. tenagophila* (ORBIGNY, 1835) (PARAENSE; CORRÊA, 1978) e de 0,6 a 24% em *B. straminea* (DUNKER, 1848) (SOUZA, 1986).

Os moluscos, assim como outros invertebrados não possuem resposta imune adquirida capaz de realizar seleção clonal e produzir anticorpos, no entanto, o sistema imune desses invertebrados são capazes de remover de forma rápida e eficaz qualquer corpo estranho presente dentro do seu organismo (COUSTAU, 2009)

Os caramujos têm uma resposta inata bem desenvolvida, subdividida em defesa humoral e celular. A defesa imunológica dos moluscos, durante uma infecção é ativado por fatores da hemolinfa e mediadas por células imunes conhecidas por hemócitos. Estas células podem realizar o encapsulamento, fagocitose e liberação de substâncias citotóxicos sendo essenciais na morte e eliminação dos patógenos invasores (BEZERRA et al. 1999; VARGAS-ALBORES; BARRACO, 2001).

As primeiras classificações das células do sistema imune em *Biomphalaria* se basearam na capacidade que esses hemócitos têm em se aderirem a diferentes substratos. Os primeiros dados na literatura sobre estas células reportam a existência de dois tipos celulares, são eles os: granulócitos e hialinócitos (CHENG, 1975; CHENG; AULD 1977). Atualmente, com a evolução de várias ferramentas no estudo das células outros parâmetros têm sido empregados para melhor descrever e classificar os tipos celulares e incluem: granularidade (MARTINS-SOUZA et al 2009), tamanho da célula (MATRICON-GONDRAN; LETOCART 1999; MARTINS-SOUZA et al. 2009),

marcadores bioquímicos e de superfície celular (GRANATH; YOSHINO 1983; MARTINS-SOUZA et al. 2006; YOSHINO E GRANATH 1985) e características ultra-estruturais (JEONG et al 1983; MATRICON-GONDRAN E LETOCART, 1999).

Mesmo com empenho de muitos pesquisadores e instituições de pesquisa de várias partes do mundo na busca de um possível controle, esta parasitose continua em franca expansão. Apesar de haver alguns trabalhos relacionados ao estudo dos hemócitos da espécie de *B. glabrata*, pouquíssima atenção vem sendo dada ao *B. straminea*. Além disso, a caracterização comparativa da hemolinfa das duas espécies tem sido pobremente estudada.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Esquistossomose

A esquistossomose é uma endemia parasitária, causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma* tendo como principais agentes etiológicos as espécies: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* (NEVES et al., 2002).

A humanidade convive com a esquistossomose desde a antiguidade, fato este comprovado por estudos que verificaram a presença de ovos de *Schistosoma* em múmias egípcias de 3.500 a.C (COURA; AMARAL, 2004).

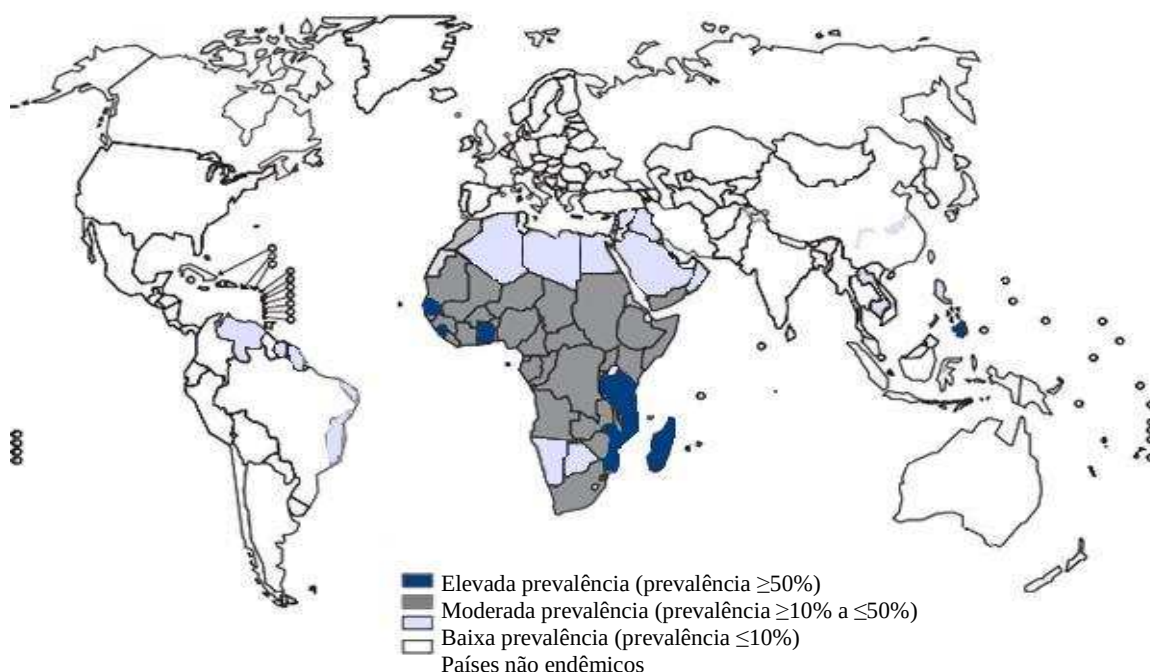
No Brasil, apesar da esquistossomose ter se estabelecido durante o período colonial, através do tráfico de escravos africanos parasitados (MORGAN et al. 2001), seu primeiro relato só foi descrito entre os anos de 1907 e 1908, por Pirajá da Silva, no estado da Bahia, que esclareceu as incertezas taxonômicas quanto ao parasita, surgindo a partir de então, as investigações sobre a distribuição geográfica e dados parasitológicos da doença (ANDRADE, 2002). Todavia, sua importância só foi evidenciada na década de 50, por Pellon e Teixeira (1950), com a realização do grande inquérito coproscópico nacional de prevalência, que teve início na região Nordeste do país e, posteriormente, em áreas supostamente não endêmicas do Sul e Sudeste. Desde então, houve um crescimento exponencial nas pesquisas sobre o *S. mansoni* e a doença por ele provocada (ANDRADE, 2002; KATZ; PEIXOTO, 2000).

A gravidade e o déficit orgânico produzido por esses parasitas fazem da esquistossomose, depois da malária, a mais importante doença tropical nos países em desenvolvimento. Estima-se que a doença atinja 200 milhões de pessoas no mundo (STEINMANN et al. 2006) (Fig. 1).

No Brasil, a esquistossomose apresenta ampla distribuição com áreas endêmicas importantes no Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, além de grande parte da Bahia, Minas Gerais e na zona serrana do Espírito Santo. Estima-se que no país mais de 8 milhões de pessoas estejam infectadas sendo 30 milhões de indivíduos vivendo em áreas endêmicas (KATZ; PEIXOTO, 2000).

O Nordeste brasileiro apresenta uma alta endemicidade, sobretudo nos estados de Pernambuco e Alagoas, onde a esquistossomose destaca-se como a terceira causa de morte entre as doenças classificadas como grandes endemias rurais (SILVA et al., 2002).

Figura 1- Mapa da distribuição da esquistossomose
Fonte: Adaptação de World Health Organization (2011).



O controle da esquistossomose deve ser considerado sob dois aspectos: morbidade e transmissão. O controle da morbidade visa diminuir o aparecimento de casos da forma grave, sendo o diagnóstico e o tratamento suficientes, apesar de que, o sucesso da quimioterapia no tratamento desta parasitose em áreas de alta prevalência não tem sido duradouro, havendo a rápida re-infecção. Um outro fator limitante no controle da doença é o difícil acesso ao fármaco (Praziquantel) em determinadas localidades como no continente Africano (HOTEZ et al., 2010). Em relação à transmissão, apenas o tratamento das populações infectadas não é suficiente sendo necessário também interromper o ciclo evolutivo do parasita (KATZ et al., 1980).

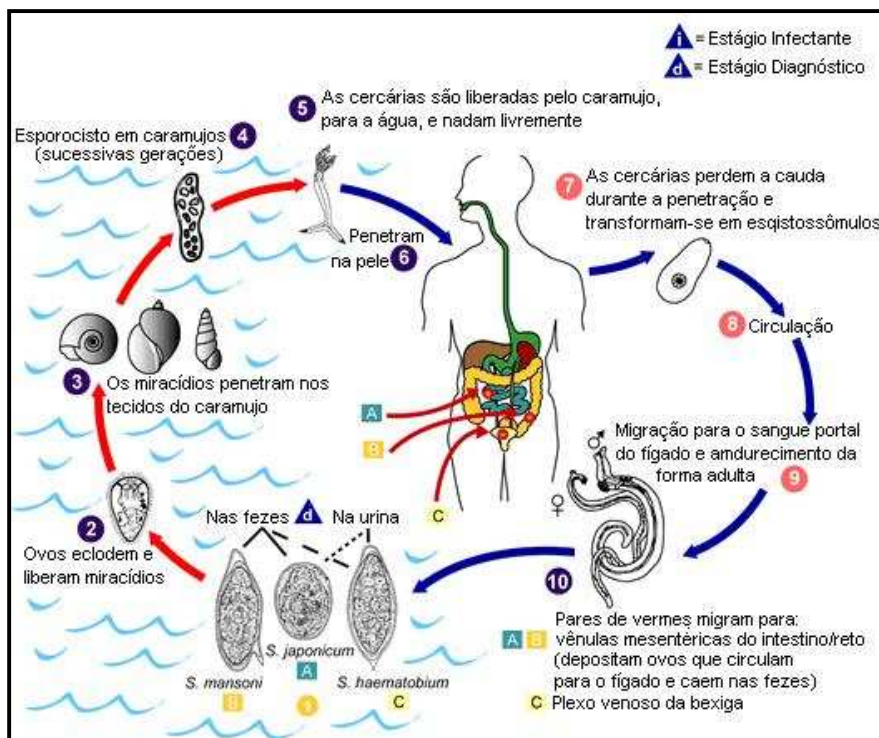
2.2 Ciclo do *S. mansoni*

O ciclo biológico do *S. mansoni* (Fig. 2) é compreendido por uma série de mudanças adaptativas. A transmissão do Trematóide depende da presença do portador humano, eliminando ovos do parasita juntamente com as fezes; da existência de hospedeiro intermediário, do caramujo, e do contato do homem com água contendo cercárias (REY, 2001).

Neste ciclo de vida, no hospedeiro intermediário ocorre o ciclo assexuado. Nos seus tecidos o *S. mansoni* multiplica-se originando os esporocistos, dando mais tarde origem à cercária (SCHNEIDER; ZELCK, 2001).

Figura 2 - Ciclo de vida do *Schistosoma spp.*

Fonte: Adaptação de CENTERS FOR DISEASE CONTROL (2010).



A infecção do hospedeiro definitivo ocorre quando o homem entra em contato com a água onde existem caramujos infectados liberando cercárias. Se estas larvas encontrarem o hospedeiro definitivo, penetram pela pele ou pelas mucosas. O parasita

invade os tecidos até encontrar os vasos sanguíneos, seguindo pelas veias, passa pelo coração, atinge os pulmões, retornam para o coração, onde ganham a circulação até chegarem ao fígado. Lá ocorre o amadurecimento das larvas em formas sexuais adultas: macho e fêmea (REY, 2001).

Após o acasalamento, os parasitas migram juntos, contra o fluxo sanguíneo (migração retrógrada), atingindo as veias mesentéricas e do plexo hemorroidário superior. Nessas veias, os parasitas põem os ovos durante anos. Os ovos ao chegarem à luz do intestino são eliminados junto com as fezes e em contato com a água, liberam os miracídios que nadam livres até encontrar o caramujo completando o ciclo (REY, 2001) (Fig. 2).

No ciclo de vida do *Schistosoma*, o hospedeiro intermediário (caramujo) exerce um papel fundamental na manutenção da parasitose, sendo a distribuição da doença diretamente proporcional à prevalência do vetor (SCHNEIDER; ZELCK, 2001).

2.3 Vetor

Evidências moleculares utilizando achados fósseis apóiam a hipótese de que caramujos do gênero *Biomphalaria* originaram-se nas Américas. Estes estudos indicam que o antepassado de *B. glabrata* esteve presente nas Américas no período Plioceno-Pleistoceno (CAMPBELL et al. 2000, DEJONG et al. 2001) e, provavelmente foram transportados por aves migratórias, atravessando o Atlântico e chegando até a África, neste continente, deu origem às espécies africanas (LOKER et al. 2004).

As espécies que se comportam como vetores biológicos pertencem à ordem Pulmonata, subordem Basommatophora, família Planorbidae compreendendo apenas moluscos terrestres ou de água doce, sem opérculo que feche a concha quando o animal se retrai (REY, 2001).

Os planorbídeos habitam desde grandes lagos até pequenos córregos, brejos e poços rasos. Ainda que a presença desses moluscos possa ser frequente em coleções naturais, sua densidade populacional costuma ser maior em criadouros artificiais como: canais, vala de drenagem pluvial, entre outros (REY, 2001).

Apesar de evidências experimentais que demonstram a suscetibilidade de outras espécies de *Biomphalaria*, no Brasil das dez espécies de moluscos do gênero descritas, a transmissão de *S. mansoni* acontece em ambientes hídricos de água doce colonizados por *B. glabrata* (Fig. 3A), *B. tenagophila* (Fig. 3B) e *B. straminea* (Fig. 3C) (BRASIL, 2007; PARAENSE, 2001).

2.3.1 Caramujo da espécie *B. tenagophila*

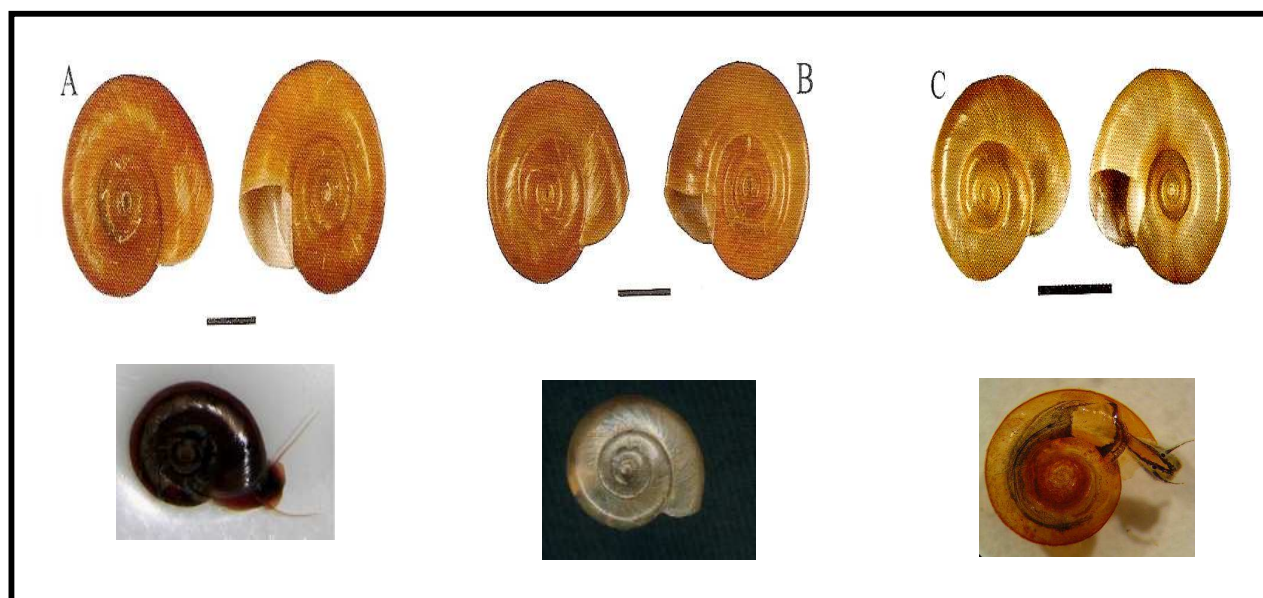
Esta espécie está distribuída de forma quase contínua no litoral do Brasil (a partir do sul do estado da Bahia até o estado do Rio Grande do Sul). Foi notificada em 603 municípios de 10 estados brasileiros, além de no Distrito Federal, mas são nos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e de Santa Catarina onde esses moluscos se encontram em maior distribuição (BRASIL, 2007)

Nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul o *B. tenagophila* avança em direção ao oeste. Além disso, esta espécie pode ser encontrada nas divisas do Brasil com a Argentina (BRASIL 2007)

Figura 3: Caramujos transmissores da esquistossomose no Brasil.

Fonte: BRASIL (2008).

Nota: (A) *B. glabrata*. (B) *B. tenagophila*. (C) *B. straminea*. Escalas= 5mm



2.3.2 Caramujo da espécie *B. glabrata*

Esta espécie é um molusco de água doce considerado o principal hospedeiro intermediário do *S. mansoni* no Brasil. Das espécies transmissoras esta é a mais suscetível infectando-se com todas as linhagens geográficas do *S. mansoni* (CARVALHO et al. 2007; DIAS et al. 1987).

Os caramujos adultos apresentam um diâmetro de concha que varia de: 20mm a 40mm; de 5mm a 8mm de largura e cerca de 6 a 7 giros, as paredes laterais do giros são arredondadas (BRASIL, 2007).

A espécie *B. glabrata* é encontrada, preferencialmente, em poças de água, ocorrendo também em áreas de clima seco. Estes caramujos são capazes de ajustar-se a variações nas condições ambientais e climáticas quando estas se tornam inadequadas a seu desenvolvimento (PIERI; JUBERG, 1981). Os moluscos da espécie *B. glabrata* podem colonizar também habitats sujeitos a secas periódicas, desenvolvendo níveis de resistência à dessecação (BARBOSA; DOBBIN, 1952).

No Brasil, *B. glabrata* é o vetor mais importante de *S. mansoni*, nas várias áreas endêmicas do país, mostrando altas taxas de infecções (DIAS et al. 1987).

2.3.3 Caramujo da espécie *B. straminea*

De todas as espécies transmissoras do *S. mansoni*, o *B. straminea* é a que apresenta a maior distribuição geográfica, sendo encontrado em todo o território brasileiro (Fig. 4B). Preferem coleções de águas rasas de poucas correntezas se adaptam bem a dessecação e habitam corpos de água permanentes e temporários, desenvolvendo-se em uma grande variedade de clima (PARAENSE, 1972).

Estruturalmente, os exemplares adultos apresentam uma concha de 10mm a 16mm de diâmetro, com 3mm a 4mm de largura e cerca de cinco giros (BRASIL, 2007).

O *B. straminea* é indicado como uma espécie em plena expansão geográfica estando presente desde o norte ao sul do país, tornando-se um importante vetor na região Nordeste, apesar de expressar taxas muito baixas de infecção (menos de 1%) (LUCENA, 1963; NEVES et al., 2005).

2.4 Biologia e Ecologia de *Biomphalaria*

Apesar da simplicidade dos sistemas responsáveis pela respiração, digestão, circulação, excreção e reprodução, a realização de atividades vitais pelas espécies do gênero é muito eficiente, o que garante a sobrevivência e proliferação sob diversos panoramas ambientais, condições climáticas ou ecológicas (KAWAZOE, 1977; KAWAZOE et al. 1980).

A excepcional biologia destes vetores é essencial para a superação das adversidades ambientais. Esta característica, certamente garante o estabelecimento e colonização de ecótopos distribuídos por grandes amplitudes geográficas e a manutenção de elevadas densidades populacionais pela maioria das espécies de *Biomphalaria*. Não existem relatos de que a densidade populacional do gênero *Biomphalaria* diminua na presença de ectoparasitos ou de parasitas que possuem fases de desenvolvimento intramolusco, provavelmente, porque a manutenção de funcionamento pleno ou parcial dos sistemas vitais durante as infecções garante a sobrevivência dos moluscos infectados (TELES; CARVALHO 2008).

Se considerarmos o parasitismo uma relação que viabiliza a seleção natural de linhagens mais adaptadas dos hospedeiros intermediários e definitivos, a co-evolução ou evolução concomitante de *Schistosoma* e *Biomphalaria* é um fenômeno que favorece a sucessão de gerações suscetíveis dos caramujos nos focos da esquistossomose e o aprimoramento permanente da interação parasita/hospedeiro (TELES; CARVALHO 2008).

A extensa distribuição dos hospedeiros intermediários de *S. mansoni* no Brasil confere à esquistossomose caráter expansivo, ocorrendo uma maior frequência no número de casos mesmo em áreas indenes. Nas áreas endêmicas, grandes concentrações desses moluscos, aliados a outros fatores de risco, favorecem a existência de localidades com alta prevalência de esquistossomose (KATZ; CARVALHO, 1983).

Apesar dos esforços de pesquisadores e centros de saúde, os estudos que denotam a distribuição vetorial de caramujos são bastante lentos e precários, sendo a real distribuição dos hospedeiros intermediários no Brasil bastante limitada,

principalmente devido a dificuldades de acesso a grandes áreas do país. Outro fator é o pequeno número de pesquisadores envolvidos na epidemiologia vetorial, cuja pesquisa se faz sentir, especialmente, nas áreas de atuação de suas instituições (PARAENSE, 1972; CARVALHO et al. 2008). Apesar disso, a distribuição geográfica dos moluscos do gênero *Biomphalaria* vem sendo lenta, mas progressivamente acrescida de novas localidades (CARVALHO et al. 2007).

No Brasil as áreas consideradas endêmicas para a esquistossomose são heterogêneas quanto ao clima, à topografia e à vegetação, inviabilizando que se faça qualquer generalização sobre a caracterização ecológica dos criadouros dos moluscos hospedeiros intermediários nessas diferentes áreas (PIERI, 1985).

Os hospedeiros intermediários podem colonizar uma grande variedade de ambientes tanto lóticos (desde rios até pequenas valas) quanto lênticos (de lagoas a pequenas poças). Porém, os focos de transmissão da doença geralmente têm características ecológicas parecidas, sendo localizados nos peridomicílios de comunidades urbanas ou rurais desprovidas de saneamento ou água encanada. Mesmo nas áreas sujeitas à secas sazonais, esses criadouros podem albergar populações permanentes de moluscos hospedeiros, alimentados por nascedouros ou água doméstica (SILVA et al., 2006).

Os habitats onde vivem os moluscos mostram-se, em sua maioria, pH entre 6,0-8,0. Em águas com pH ácido, os moluscos são incapazes de promover a deposição de cálcio para a constituição da concha, o que impede a sua colonização (SILVA et al., 2006). As características físico-químicas da maioria das coleções de água encontradas no peridomicílio estão dentro dos limites de tolerância dos planorbídeos.

Comumente, no habitat desses caramujos podemos encontrar uma vegetação típica. Plantas aquáticas interferem diretamente na distribuição dos caramujos. Esses moluscos hospedeiros tendem a se estabelecer, preferencialmente, em locais cujos micro-habitats são ricos em substrato orgânico. Essa matéria orgânica pode servir como fonte para a alimentação, além de que esses sedimentos podem proporcionar um substrato denso e macio sob o qual os moluscos podem se abrigar da luz solar e locomover-se (HARRISON; MCKILLOP, 1980; HARRY et al. 1957; KADER, 2001; UTZINGER; TANNER, 2000).

Um aspecto biológico relevante é a capacidade que os planorbídeos possuem de sobreviver fora da água por longos períodos. Na ausência de água, a primeira resposta dos moluscos é a retração do corpo para o interior da concha. As estratégias de sobrevivência à seca diminuem os efeitos diretos da dessecação; por outro lado, induz o molusco a sobreviver de suas próprias reservas alimentares, com um suprimento limitado de oxigênio e acumulação de excretas potencialmente tóxicas. Assim, a sobrevivência fora da água vai depender de sua capacidade de conservar recursos e eliminar ou neutralizar os produtos tóxicos do metabolismo. As três espécies de moluscos hospedeiros no Brasil possuem em maior (*B. straminea*) ou menor (*B. tenagophila*) grau, a capacidade de resistir à dessecação. O processo de diapausa (estímulos antecipados a degradação sazonal do hábitat) ou anidrobiose (estímulos adversos resultantes da deteriorização do hábitat) aumenta o tempo de vida de caramujos se comparado a aqueles que não se adaptam ao período de seca (PIERI; FAVRE, 2008; WHITE et al. 2007).

Uma outra forma de adaptação, durante o período de seca, seria alterações na sua morfologia na fase juvenil. Essas modificações incluem: o espessamento da concha, a diminuição da área de abertura da concha e a formação de lamelas e epifragmas próximos à abertura. A capacidade desses caramujos de sobreviver à estação seca, repovoar as coleções de água sazonais, inclusive albergando formas larvares de *S. mansoni*, torna seu controle ainda mais difícil (PIERI; FAVRE, 2008; RICHARDS, 1967).

2.5 Distribuição de *B. glabrata* e *B. straminea*

Foi notificada, pelo menos, uma das três espécies vetoras do *S. mansoni* em 24 dos 26 estados brasileiros. Apenas em Rondônia e Amapá, até o momento, não foram verificadas a presença desses planorbídeos (CARVALHO et al., 2008).

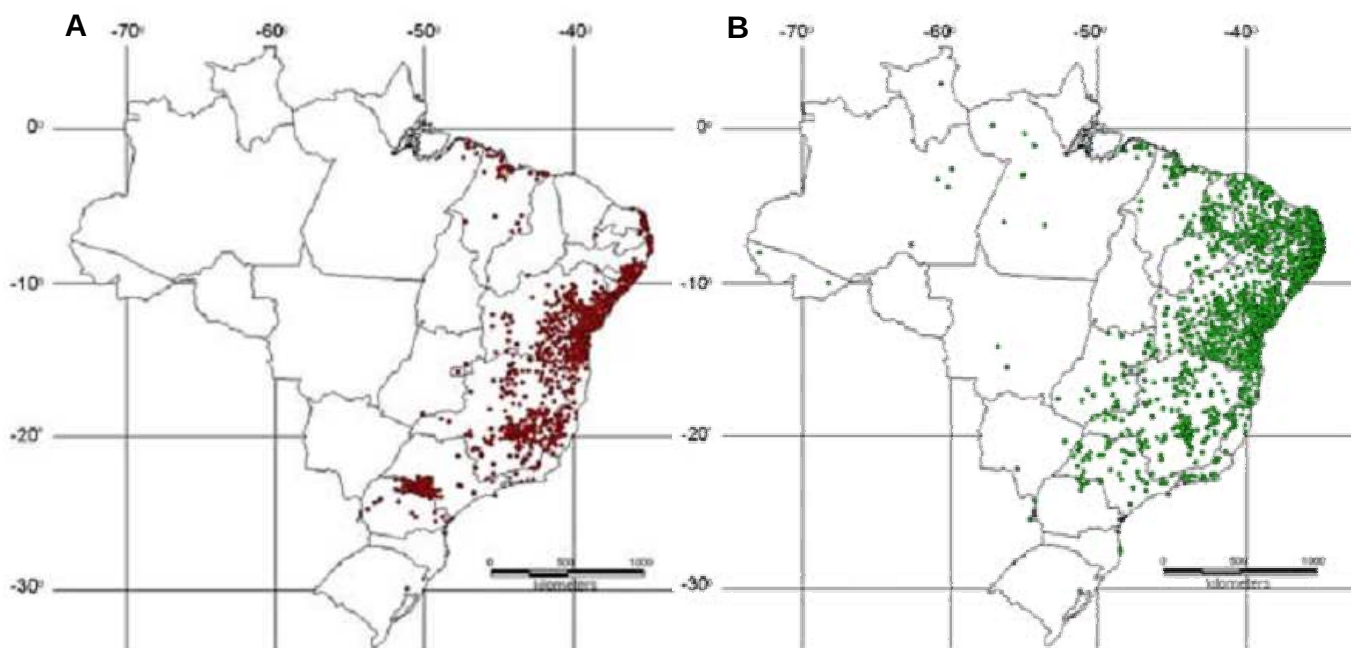
A espécie *B. glabrata* apresenta uma ampla distribuição e ela está quase sempre associada à esquistossomose. Esta espécie já foi notificada em 16 estados brasileiros, além do Distrito Federal. Em Pernambuco, a *B. glabrata* pode ser encontrada em 21 municípios (CARVALHO et al., 2008) (Fig. 4A).

A presença de *B. straminea* foi registrada em 1.327 municípios, distribuídos por 24 estados brasileiros, além do Distrito Federal (Fig. 4B). Os únicos estados onde este vetor ainda não foi encontrado foi no Amapá e Rondônia. Esta espécie é mais prevalente no Nordeste, principalmente nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia. Esses moluscos são habitantes de coleções hídricas permanentes e temporárias, estando mais adaptados ao clima seco do Nordeste. Em Pernambuco, esta espécie apresenta uma maior distribuição do que a *B. glabrata*, sendo encontrado em 130 municípios (CARVALHO et al., 2008).

Figura 4: Distribuição geográfica de *Biomphalaria glabra* e *B. straminea* no Brasil

Fonte: Adaptado de Carvalho e Caldeira (2004).

Nota: Figura A= *B. glabrata* e Figura B= *B. straminea*.



2.6 Interação do *S. mansoni* com o *Biomphalaria*

O *S. mansoni* pertence à subclasse Digenea, Trematódeo com complexo ciclo evolutivo. São nos hospedeiros intermediários, caramujos do gênero *Biomphalaria*, onde ocorre a multiplicação do parasita, resultando de uma sofisticada sintonia entre o metabolismo do hospedeiro e do parasita (NEGRÃO-CORRÊA et al. 2008).

O sucesso do desenvolvimento do *S. mansoni* em seus hospedeiros dependerá da capacidade do parasita em: a) encontrar e penetrar em hospedeiros compatíveis; b) adaptar-se às condições de estresse, com variações de fatores fisiológicos (osmolaridade, pH, concentração de oxigênio e de gás carbônico e concentração de glicose), os quais os diferentes estágios de desenvolvimento do parasita são expostos durante a passagem do hospedeiro definitivo para o meio aquático e daí para o hospedeiro intermediário; c) obter nutrientes adequados para o seu crescimento e reprodução; d) evadir de possíveis mecanismos de destruição do sistema de defesa dos hospedeiros (MONÉ et al. 2010; NEGRÃO-CORRÊA et al. 2008).

Devido à relevância da esquistossomose para a saúde humana e pelo grande número de grupos de pesquisadores que atuam nesta área, muitos progressos foram obtidos no conhecimento da associação entre *S. mansoni* e seu hospedeiro definitivo, entretanto, a interação entre o parasita e seu hospedeiro intermediário ainda apresenta muitos aspectos desconhecidos (NEGRÃO-CORRÊA et al. 2008).

Comparando com a enorme variedade de espécies de hospedeiros vertebrados que pertencem a diversas ordens, fica evidente que a interação de *S. mansoni* com seus hospedeiros invertebrados reflete exigências adaptativas muito mais complexas. Assim, o sucesso evolutivo do *S. mansoni* em seus hospedeiros intermediários dependem dos fatores ambientais, da compatibilidade fisiológica/bioquímica entre parasita/hospedeiro intermediário, dos mecanismos intrínsecos de defesa dos moluscos transmissores e dos mecanismos adaptativos do parasita ao organismo do molusco (MONÉ et al. 2010; NEGRÃO-CORRÊA et al. 2008).

2.7 Infecção e Desenvolvimento do *S. mansoni* no Hospedeiro Intermediário

O miracídio após sair do ovo possui um tempo de vida de cerca de 8 horas; porém, após 5 horas, poucos conseguem penetrar nos tecidos dos moluscos hospedeiros. Logo, existem aspectos químicos e comportamentais que favorecem o encontro da larva com seu hospedeiro-alvo. O mecanismo quimiotático que leva ao encontro do miracídio com seus hospedeiros intermediários ainda é um tema controverso na literatura (NEGRÃO-CORRÊA et al. 2008).

Deve-se considerar que, na maioria dos locais onde ocorre a transmissão, as águas são correntes e isto dificulta o mecanismo de quimiotaxia, pois poderia ocorrer diluição e dispersão das moléculas de atração. O que ocorre é uma estimulação dos movimentos do miracídio pela presença de moléculas do caramujo na água (quimiocinesis) e, dessa forma, há um acúmulo de miracídios nas proximidades do caramujo, formando assim um espaço ativo que sem dúvida, favorece o processo de infecção (BRASIO et al. 1985; CHERNIN, 1974).

Quanto ao comportamento similar que favoreceria o encontro entre parasita e hospedeiro, deve-se destacar a fototaxia positiva presente em ambos. A atração do miracídio a uma fonte luminosa foi bem estabelecida por diversos autores (CHAIA 1956). No entanto, Williams e Coelho (1975) mostraram a ocorrência de fototaxia positiva também em *B. glabrata*, fenômeno este confirmado por outros autores (PIMENTEL-SOUZA et al. 1984). A fototaxia positiva que ocorre entre miracídios e *B. glabrata* vai, sem dúvida, favorecer o encontro dos dois organismos no ambiente aquático. Pimentel-Souza et al. (1976) mostraram que a luminosidade também estimula a exposição da massa cefalopodal do molusco no meio aquático, o que favoreceria o processo de penetração, já que são estas as partes preferidas para a invasão miracidiana (COELHO, 1957).

A temperatura também é um fator importante para a penetração do miracídio no molusco. Maldonato e Acosta-Maltienzo (1947) mostram que a redução de 1°C na temperatura (de 26°C para 25°C) levaria a uma redução na taxa de infecção dos moluscos de 80 para 40%.

O miracídio, ao entrar em contato com o tegumento do molusco, modifica o terebratorium que logo assume a forma de ventosa ocorrendo, quase que simultaneamente a descarga do conteúdo das glândulas de adesão. O miracídio agita-se com movimentos contráteis e rotatórios comandados pela vibração ciliar e pela musculatura sub-epitelial. O epitélio do molusco é ultrapassado e a larva se estabelece no tecido subcutâneo. O local de penetração pode ser representado por qualquer ponto das partes expostas do caramujo, sendo, porém, a massa cefalopodal, principalmente a base das antenas e o pé os pontos preferidos (COELHO, 1957). O processo de penetração dura entre 10 e 15 min e, neste processo, cerca de apenas 30% dos

miracídeos são capazes de penetrar e evoluir em *B. glabrata*, 30% penetram, mas não evoluem; e 40% são incapazes até mesmo de penetrar no molusco (CHERNIN; ANTOLICS, 1975).

Os miracídeos, em contato com os hemócitos, perdem sua camada ciliada externa, mas não há nenhuma evidência de alterações no que diz respeito à arquitetura interna da larva. Esse fato pode ser explicado pelo pouco tempo de atuação dos hemócitos (COELHO, 1995). Tem sido demonstrado que a eficácia do processo de infecção parasitária é baseado em dois fatores. Em primeiro lugar, a capacidade do parasita para sintetizar determinantes antigênicos semelhantes aos do molusco, um processo conhecido como mimetismo molecular e, em segundo lugar, a absorção e incorporação de aglutininas do molusco, processo conhecido como “mascaramento antigênico” (COELHO, 1995).

A larva, após a perda das glândulas de adesão e penetração continua a perder outras estruturas. Desta forma, o passo seguinte seria a perda do epitélio ciliado e a perda do terebratorium. Em seguida, dar-se-ia o desaparecimento da musculatura sub-epitelial e, por último, do sistema nervoso, que pode persistir por mais alguns dias. Com exceção do sistema nervoso, todas as alterações citadas ocorrem num período de 48 horas. Assim sendo, o miracídio transforma-se em um saco com paredes cuticulares, contendo a geração de células germinativas e reprodutivas (REY, 2001).

A infecção por *S. mansoni* nos moluscos leva a uma série de problemas no hospedeiro intermediário. A localização do parasitismo na glândula reprodutiva (ovoteste) (Fig. 5) ocasiona uma inibição da reprodução, a qual não resulta em uma esterilização definitiva, pois aqueles que se autocuram voltam à oviposição (COELHO, 1954).

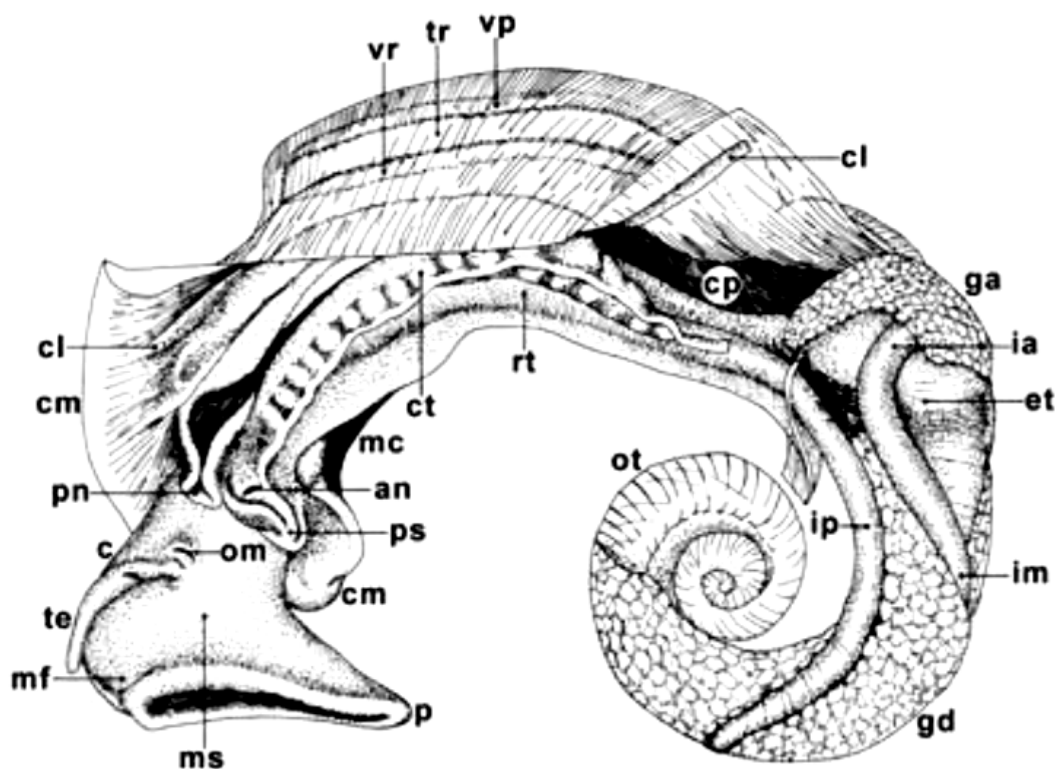
Esta extraordinária capacidade de regeneração é comum para vários tecidos do caramujo. Após a irradiação, tanto os parasitas como as estruturas do ovoteste (Fig. 5) praticamente desaparecem, mas tudo volta ao normal após semanas de suspensão da irradiação (AZEVEDO et al. 2004). A Infecção no período pré-patente leva a uma grande mortalidade de moluscos. Após a emergência cercariana, muitos caramujos morrem também pela perda de hemolinfa no processo de saída das cercárias. Embora já se tenha observado a sobrevivência de caramujos infectados por mais de 150 dias em

condições de laboratório, a média de sobrevivência no laboratório foi de 39 dias (BARBOSA; COELHO et al., 1954). Na natureza, a sobrevivência média de caramujos *B. glabrata* infectados não parece ser longa, apesar de um exemplar ter sobrevivido por um período de quatro meses (BARBOSA, 1963).

Figura 5: Anatomia do *Biomphalaria*

Fonte: Paraense (1975).

Nota: Animal retirado da concha com o manto levemente rebatido, para visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula de albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).



A idade dos caramujos também é um aspecto importante no processo de infecção. Caramujos juvenis (3 a 5mm) são mais suscetíveis à infecção (RICHARDS, 1977). Théron et al. (1998) utilizando juvenis (3 a 5 mm), sub-adultos (7 a 9 mm) e

adultos (11 a 13mm) de *B. glabrata* expostos à infecção por miracídios de *S. mansoni* demonstraram a preferência destes em penetrarem em caramujos de tamanho intermediário (sub-adultos). Os autores sugerem vários fatores para justificar esta preferência, e especulam sobre possíveis mecanismos de atração derivados do processo de amadurecimento sexual dos caramujos sub-adultos (hormônios), maior disponibilidade de nutrientes para desenvolvimento dos esporocistos e uma menor mortalidade em relação aos juvenis. Acrescenta-se ainda que o adulto teria menor expectativa de vida e seu sistema inato de defesa seria mais eficiente.

2.8 Sistema Circulatório

Os moluscos apresentam um sistema circulatório aberto em que a hemolinfa deixa os vasos circulatórios e banha os tecidos. Posteriormente, a hemolinfa será drenada pelos vasos e irá retornar ao coração (WOLFE et al. 2007).

2.9 Mecanismo de Defesa dos Caramujos

A interação *Biomphalaria-S. mansoni* depende da compatibilidade fisiológica e bioquímica entre hospedeiro e parasita, onde o sucesso ou o fracasso da infecção será fortemente determinado pela eficácia do sistema interno de defesa do caramujo. A capacidade do sistema de defesa desses hospedeiros intermediários em destruir o parasita é o fator que mais determina a susceptibilidade do *Biomphalaria* à infecção ao *S. mansoni* (SOUZA et al., 1997).

As espécies de moluscos têm apresentado variado grau de susceptibilidade e das três espécies vetoras, *B. glabrata* é considerada a mais suscetível e a *B. straminea* é indicada como a mais resistente, embora apresente diferenças em determinados locais na infecção (LIE, 1982).

Quando em contato com o agente infeccioso, o mecanismo de defesa interno do molusco é imediatamente ativado, estes mecanismos são mediados por células circulantes efetoras (hemócitos) e por fatores solúveis que estão presentes na hemolinfa (lectinas) (BEZERRA et al. 1999). Essas lectinas se ligam a carboidratos específicos e

desempenham um papel importante como a aglutinação de partículas estranhas, auxilia a fagocitose e atua como receptores para células citotóxicas (VAN DER KNAAP; LOKER 1990).

A atividade dos hemócitos em *B. glabrata* é estimulada por diversos fatores, tais como a liberação de produtos secretório/excretório de miracídios de *S. mansoni*. O hospedeiro invertebrado desenvolve várias respostas que inclui: migração de células, liberação de superóxido, encapsulamento e citotoxicidade celular (ADEMA et al. 1994; DIKKEBOOM et al. 1988; LOVERDE, 1998). Todas estas respostas podem ocorrer da mesma forma em caramujos resistentes e suscetíveis. Alguns trabalhos têm demonstrado que a diferença fundamental entre a susceptibilidade ou resistência é a capacidade do parasita em através de algumas substâncias produzidas, interromper ou dificultar a migração dos hemócitos em direção aos miracídios (HAHN et al. 2001; VAN DER KNAAP; LOKER, 1990).

2.9.1 Hemolinfa

O sangue ou hemolinfa dos moluscos é composto por células (os hemócitos) e uma parte líquida (o plasma). O plasma é rico em água, cloreto de sódio e bicarbonato. Neste plasma, encontra-se dissolvido um pigmento vermelho, a eritrocruorina também conhecida como hemoglobina (MUTHUKRISHNAN et al. 2007).

Entre as substâncias integrantes da hemolinfa do *B. glabrata*, a hemoglobina constitui 97% das proteínas totais presentes. Esta hemoglobina, que se apresenta de forma extracelular, parece desempenhar um importante papel no transporte de O₂ (BUGEE; WEBER, 1999).

Em contraste com a atividade coagulante da hemolinfa de vários grupos de invertebrados, a hemolinfa dos moluscos não apresenta uma elevada capacidade de coagulação (IWANAGA, 1993).

2.9.2 Hemócitos

Os moluscos mais resistentes, aqueles que quando infectados eliminam poucas cercárias, exibem nos seus tecidos uma grande reação celular em torno dos esporocistos e cercárias em desenvolvimento. Os hemócitos apresentam ação fundamental nas funções de defesa, tais como fagocitose, encapsulação, liberação de substâncias citotóxicas, transporte de cálcio nas situações de reparo tecidual e na produção de fator coagulante da hemolinfa (ABDUL-SALAM; MICHELSON, 1980; AMEN et al., 1992; BAYNE et al., 1980; CHENG; BUTTLER, 1979; SMINIA; VAN DER KNAAP, 1987; WEGGE, 1951). Estas células de defesa lembram na sua forma e função, os macrófagos dos vertebrados.

Os hemócitos são células que circulam livremente na hemolinfa dos caramujos e outros invertebrados. No molusco estas células são produzidas no Órgão Produtor de Amebócitos localizando-se na região renopericárdica. Os hemócitos podem se apresentar dentro ou fora dos tecidos, visto que o caramujo tem um sistema vascular aberto (JEONG et al. 1983).

Segundo Cheng e Auld (1977) existem duas categorias de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata*: os granulócitos e os hialinócitos, chamados, respectivamente, de “estrelados” e “não estrelados”, devido à sua aparência de célula estrelada, semelhante às células nervosas, ou sem prolongamentos citoplasmáticos observáveis ao microscópio óptico.

Não existem evidências concretas de que ocorram apenas duas ou mais populações de amebócitos circulantes ou que uma delas se transforme na outra. No entanto, sabe-se que os amebócitos denominados granulócitos são os responsáveis pela fagocitose de partículas estranhas. O número destas células bem como a taxa de fagocitose aumentam consideravelmente após a infecção pelo *S. mansoni*. A avaliação da taxa de fagocitose indicou o processo de fagocitose em 43% nos moluscos não submetidos à infecção e de 57 a 75% nos moluscos infectados (SERRANO et al., 2002).

Amen et al. (1992), ao estudarem a modulação da atividade do sistema de defesa de *Lymnaea stagnalis* pelo *Trichobilharzia ocellata*, observaram, nas primeiras horas após a infecção, uma ativação da resposta imune celular e humoral, neste trabalho

discute-se a possibilidade de que as respostas encontradas sejam direcionadas às placas ciliadas perdidas pelos miracídios imediatamente após a penetração no molusco, do que propriamente ao parasita em desenvolvimento no esporocisto mãe.

Reis et al. (1995) observaram uma relação direta entre a resistência da infecção pelo *S. mansoni* e a morte dos esporocistos no interior do *B. tenagophila*, estas observações permitiram sugerir que os hemócitos têm um papel importante no combate à infecção. Guaraldo et al. (1981) confirmaram que o desenvolvimento do esporocisto em moluscos suscetíveis era lento, visto que em moluscos não suscetíveis os esporocistos eram cercados por células de defesa e rapidamente mortos. A reação granulomatosa que ocorre logo após a penetração do parasita, é, de acordo com esses autores, mediada pelos granulócitos que têm uma grande capacidade fagocitária.

2.9.2.1 Origem dos Hemócitos

Os hemócitos podem ser encontrados no interior dos tecidos e circulando na hemolinfa, mas o seu local de origem ainda é controverso. Há duas idéias em curso entre os pesquisadores. Alguns autores admitem que os hemócitos tenham uma origem multicêntrica, a partir de células que compõem o tecido conjuntivo do molusco (SOUZA; ANDRADE, 2006); outros propõe que os hemócitos tenham origem em um órgão especial, localizado na parede da porção sacular do órgão renal, a qual forma parte do saco pericárdico, e que foi denominado APO (uma sigla do inglês "*Amebocyte Producing Organ*") (SALAMAT; SULLIVAN, 2009).

O APO funcionaria como um análogo da medula óssea dos vertebrados. A principal razão para considerar o APO como órgão hematopoiético foi à ocorrência de hiperplasia e mitose nas células do órgão durante a infecção pelo *S. mansoni* além da suspeita da existência de células blásticas entre as células do órgão (SALAMAT; SULLIVAN, 2009; SULLIVAN et al 1984; SULLIVAN et al. 2004).

Alguns trabalhos demonstraram que a resistência às larvas do trematódeo *S. mansoni* digenéticos pode ser transferida passivamente entre caramujos da espécie *B. glabrata* não suscetíveis para os caramujos suscetíveis através da inoculação de plasma (GRANATH; YOSHINO, 1984) e adotivamente, por transplantes do APO (SULLIVAN;

SPENCE, 1994). Esta resistência é específica para a transferência do APO, não ocorrendo com transplantes de tecidos não hematopoiéticos como: manto, coração, cérebro, glândula digestiva e ovoteste (SULLIVAN; SPENCE, 1999). Esses achados corroboram a hipótese do papel do APO como órgão hematopoiético desses moluscos.

2.9.2.2 Classificação dos Hemócitos

Para a classificação morfológica dos hemócitos de invertebrados são considerados vários aspectos como: a) o tamanho, a forma, o número, afinidade tintorial de suas inclusões e coloração do citoplasma; b) diferenças comportamentais, na sua habilidade de divisão, rapidez de degranulação ou vacuolização de suas inclusões, na sua fragilidade, no desenvolvimento de projeções citoplasmáticas e sua adesão a superfícies (JONES, 1979).

Muitos autores têm indicado a existência de subpopulações de hemócitos dependendo da idade do caramujo, conteúdo enzimático, ou determinantes de superfície (GRANATH; YOSHINO, 1983; YOSHINO; GRANATH, 1985).

Cheng (1975) e Yoshino (1976) trabalhando com *B. glabrata* e Barraco et al. (1993) com *B. tenagophila* descreveram dois tipos de hemócitos na hemolinfa desses caramujos, são eles: os hialinócitos e granulócitos. Estas células diferem no tamanho, característica morfotintorial desenvolvimento das suas organelas além de possuírem comportamento diferente (BARRACCO et al. 1993).

Os granulócitos de *B. glabrata* apresentam as mesmas características de *B. tenagophila*. O citoplasma dessa célula apresenta grânulos, ela é a maior célula encontrada na hemolinfa e é também a mais prevalente. Diferente dos hialinócitos, este tipo celular apresenta aderência formando pseudópodes. Os hialinócitos apresentam uma elevada relação núcleo-citoplasma e no seu citoplasma existem muitos ribossomos livres. Este tipo celular não apresenta grânulos e sua prevalência na hemolinfa é menor que a do granulócito (BARRACO et al. 1993; CHENG, 1975; YOSHINO, 1976;).

Apesar dos trabalhos mais antigos discutirem apenas dois tipos celulares, há alguns autores que já sinalizam a possibilidade da existência de outras células, mas não

há nenhuma classificação padronizada sobre as mesmas (BORGES; ANDRADE, 2003; MARTINS-SOUZA et al. 2009; MATRICON-GONDRAN; LETOCART, 1999).

2.9.3 Resposta Humoral

A resposta humoral de *Biomphalaria* ainda não é totalmente compreendida, mas é sabido que os componentes da resposta humoral podem atuar diretamente nas larvas, agindo sobre o reconhecimento do parasita e favorecendo a ativação dos hemócitos (MARTINS-SOUZA et al, 2006).

Os fatores envolvidos na resposta humoral são capazes de causar a lise na célula-alvo além de desempenhar vários papéis na defesa interna do molusco (LEIPPE; RENWRANTZ, 1988). Além disso, alguns componentes da resposta humoral são capazes de modular a atividade dos hemócitos (CONNORS et al., 1995; GRANATH et al., 1994). Apesar de já comprovado a presença da via de fenoxidase em moluscos há poucas evidências de que estes invertebrados utilizem essa forma de defesa contra parasitas (SMITH; SÖDERHÄLL, 1991).

Estudos desenvolvidos por Granath e Yoshino (1984) em *B. glabrata* e de Pereira (2005) em *B. tenagophila* indicaram que o mecanismo de destruição do esporocisto de *S. mansoni* através da resposta imune humoral nessas espécies é tão importante quanto à resposta desenvolvida pelas células.

A presença de substâncias na hemolinfa de *B. glabrata* que promovem a aglutinação de hemócitos em torno dos esporocistos de *S. mansoni* foi relatado por Loker et al. (1984). Posteriormente, Fryer e Bayne (1996) demonstraram que partículas de poliestireno tratadas com fatores solúveis na hemolinfa de cepas resistentes de *B. glabrata* resultaram em um aumento na capacidade fagocítica. Esses dados sugerem que tais fatores humorais participariam no mecanismo de reconhecimento e opsonização das partículas, favorecendo o processo de fagocitose.

Na busca de possíveis mediadores relacionados aos mecanismos de reconhecimento do parasita, foi demonstrado que algumas lectinas tais como: *Conavalia ensiformis* (Cona), *Erythrina corallodendrom* (ECA), *Glycine max* (SBA), *Tetragonolobus purpurea* (TPA) e *Triticum vulgaris* (WGA) foram capazes de se ligar a carboidratos

presentes na superfície do esporocistos de *S. mansoni* (JOHNSTON; YOSHINO, 1996; UCHIKAWA; LOKER, 1991). Esses dados sugeriram que tais lectinas poderiam intermediar o reconhecimento de larvas de trematódeos pelos hemócitos (VAN DER KNAAP; LOKER 1990) e a ligação: lectina-carboidratos, possivelmente, poderia induzir ativação dos hemócitos favorecendo a fagocitose (BAYNE, 1990), além da produção de superóxidos (HAHN, et al. 2000).

Em moluscos, as lectinas são sintetizadas pelo hemócitos e podem ser liberadas na hemolinfa ou serem expressas na superfície das células circulantes, onde estes carboidratos são capazes de agir como receptores (RICHARDS; RENWRANTZ, 1991). Deste modo, outra possibilidade, que tem sido pouco explorado na literatura, é que as diferenças no reconhecimento do parasita poderiam estar relacionadas com a variação na expressão dessas lectinas em diferentes linhagens (MARTINS-SOUZA et al, 2006).

2.9.4 Resposta Celular

Os hemócitos são os principais mediadores do sistema de defesa celular de moluscos. Estas células podem desempenhar várias funções, tais como: fagocitose de partículas (por exemplo, bactérias e protozoários), encapsulamento de parasitas maiores como, por exemplo, larvas de helmintos (VAN DER KNAAP; LOKER 1990), liberação de substâncias citotóxicas que atuam sobre as larvas e que são liberadas pelos hemócitos após o encapsulamento (COUSTAU; YOSHINO, 1998), além de produzirem carboidratos, proteínas e peptídeos que vão atuar na resposta humoral.

2.9.4.1 Sinalização Celular:

Até recentemente acreditava-se que invertebrados desenvolviam uma resposta inata que era limitada no reconhecimento de patógenos. Atualmente, esse conceito mudou e em alguns invertebrados já foram identificados uma extensa diversidade de proteínas que podem reconhecer uma gama de diferentes patógenos. Essa capacidade de discriminar o próprio do não próprio e de reconhecer uma ampla classe de patógenos

contribui para o desenvolvimento de uma apropriada resposta imune (NEGRÃO-CORRÊA et al. 2008).

Essa distinção, possivelmente está relacionada a receptores associados à membrana. Os sinais gerados pelo ligante atravessam a membrana desencadeando uma cascata de reações químicas direcionadas para organelas-alvo resultando na indução de resposta celular adequada (HELDIN; PURTON, 1996).

Diferente dos vertebrados, pouco se sabe sobre o processo de sinalização celular em invertebrados. Essa carência de informações inclui: quais os tipos de moléculas que podem estar envolvidos, quais os percursos e como as funções celulares são reguladas. Em moluscos, os mecanismos de transdução de sinais têm sido obtidos principalmente através de estudos neurobiológicos (TENSEN et al., 1998; TIERNEY, 2001) que começaram a estabelecer a presença de vias sinalizadoras intracelulares, muitos dos quais parecem ter homologia com os de mamíferos.

Em células do sistema imune de vertebrados, a interação do receptor com seu ligante resulta em ativação ou desativação de numerosas funções celulares, por exemplo: adesão celular, motilidade, citotoxicidade, endocitose e indução de morte celular (TORGERSEN et al., 2002).

A transdução de sinais envolve uma diversidade de proteínas celulares e, alguns receptores, presentes em hemócitos de moluscos gastrópodes envolvidos nesse processo de sinalização foram identificados com base na utilização de anticorpos específicos para receptores ou através de ensaios funcionais. Esses receptores podem ser agrupados em várias categorias: lectinas (ou lectin-like receptors), integrinas e fatores de crescimento (hormônio e receptores “citocina-like”) (GREENBERG, 2001; TORGERSEN et al., 2002).

Alguns trabalhos utilizando a *Drosophila melanogaster* identificaram a presença de receptores tipo Toll (TLR), semelhantes aos encontrados em mamíferos. Esses receptores são capazes de reconhecer padrões de moléculas expressas em alguns patógenos. Apesar de reconhecer uma gama de padrões de moléculas, os receptores Toll apresentam uma limitada especificidade quando comparados com os receptores envolvidos na resposta adaptativa (ZAMBO et al., 2005).

Os receptores Toll e a via de sinalização celular representam o mecanismo de defesa mais antigo encontrado em insetos, mamíferos e plantas (AKIRA, 2004). Estudos na mosca da fruta têm demonstrado que a família de receptores Toll é um dos mais cruciais receptores na resposta imune inata. Esses receptores reconhecem componentes específicos de organismos incluindo fungos, protozoários e vírus induzindo a resposta imune inata. O alvo de reconhecimento são padrões moleculares conservados em microrganismos (PAMPs). Existem muitos receptores celulares que quando ativados podem desencadear processos de opsonização, fagocitose, processo inflamatório, apoptose entre outros (VALANNE et al. 2011).

2.9.4.2 Processo de Fagocitose

O processo de fagocitose em invertebrados é considerado uma resposta celular primária de defesa sendo similar ao que ocorre com as células fagocíticas de mamíferos. Este processo de defesa ocorre contra materiais inertes ou organismos como: vírus, bactérias, protozoários, fungos ou helmintos (LAVINE; STRAND, 2002).

Da mesma forma que em vertebrados, os hemócitos de caramujos contém estruturas semelhantes aos lisossomos e são reativos a uma série de marcadores enzimáticos. Estas estruturas se fundem com vesículas endossômicas (formação do fagolisossomo), lá ocorre a degradação do material fagocitado (MITTA et al. 2000; VARGAS-ALBORES; BARRACCO, 2001) (Fig. 6).

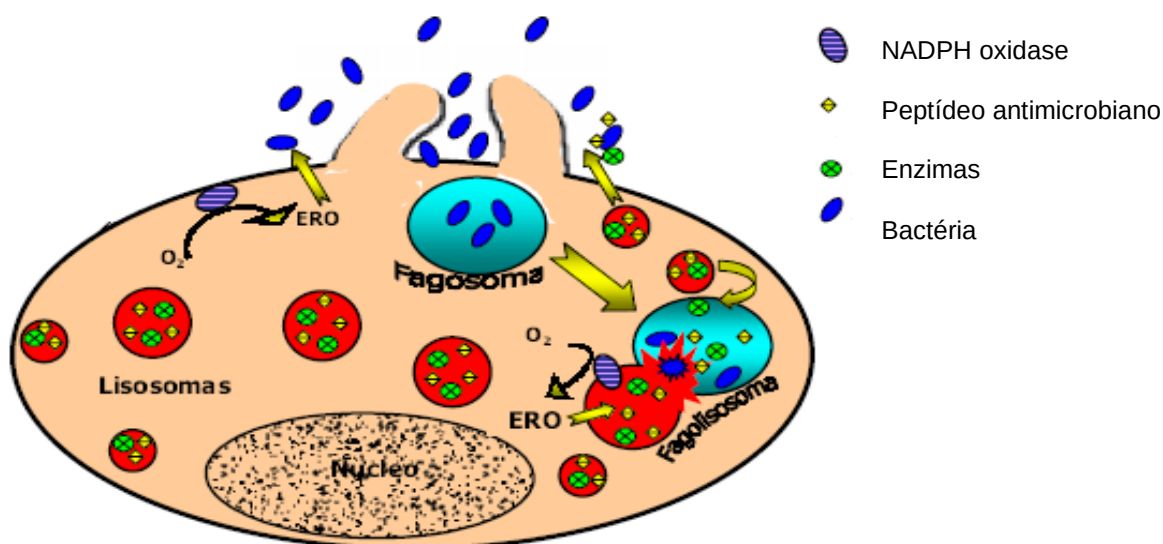
Os fagócitos circulantes são importantes para a captura e destruição de patógenos invasores, remoção de células mortas e limpeza de detritos. Apesar desse mecanismo de defesa ser relativamente muito estudado, em várias espécies de invertebrados, ainda persiste várias dúvidas quanto ao mecanismo envolvido no reconhecimento inicial de partículas pelos fagócitos. Estudos utilizando bactérias, leveduras e eritrócitos como alvos experimentais têm demonstrado a existência de opsoninas em muitos filos (BAYNE, 1990). No entanto, estes fagócitos ainda são capazes de reconhecer partículas estranhas "*in vitro*" na ausência de componentes humorais.

Como os invertebrados não possuem anticorpos nem sistema complemento, a interação: lectina/carboidrato são os mediadores mais prováveis de reconhecimento de células fagocíticas (HANINGTON et al. 2010). Esse sistema de reconhecimento foi observado também em caramujos da espécie *B. glabrata* (MARTINS-SOUZA et al. 2006).

Figura 6: Processo de fagocitose de microrganismos.

Fonte: Adaptação de Mitta et al. (2000).

Nota: Observar os mecanismos antimicrobianos: enzimas lisossomais, peptídeos antimicrobianos e mecanismos oxidativos (ERO).



Durante o estímulo que induz a fagocitose ocorre ativação dos hemócitos através de modificações da superfície da célula. Essas alterações celulares incluem: modificação do citoesqueleto, extensão de pseudópodos e filopódios e frequentemente alterações nas mitocôndrias. Este processo de ativação celular ocorre de forma rápida e depende da intensidade do estímulo (MATRICON-GONDRAN; LETOCART, 1999).

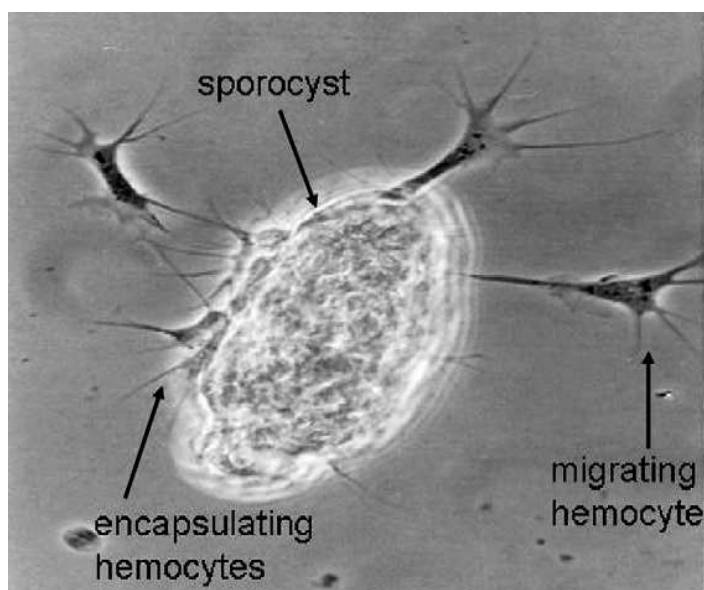
2.9.4.3 Encapsulação

Quando o corpo estranho é muito grande para ser fagocitado por elementos isolados da hemolinfa (ex. larvas de helmintos), ocorre o processo de encapsulação, isto é, a aglomeração de um conjunto de células culminando com a formação de uma cápsula ao redor do agente invasor. Caramujos da espécie *B. glabrata* comumente encapsulam estágios larvais de *S. mansoni* em uma estrutura que morfológicamente lembra um granuloma primitivo (JEONG; HEYNEMAN, 1984; LIE; HEYNEMAN, 1980; PAN, 1965).

Borges e Andrade (2003) indicaram que o granuloma pode ocorrer tanto no isolamento do esporocisto como em cercárias e através da histologia puderam relatar que estas estruturas parasitárias apresentaram vários graus de desintegração e usualmente estavam cercados por fibras e hemócitos cuja frequência está diretamente relacionada à suscetibilidade ou resistência do caramujo.

Fibras com coloração característica de colágeno ou elastina têm sido demonstradas em tecidos normais do caramujo (LEMOS, 1999). No entanto, a presença desses elementos na matriz extracelular durante a lesão granulomatosa em *B. glabrata* infectado com *S. mansoni* tem sido um assunto controverso.

Figura 7. Início do encapsulamento do esporocisto de *B. glabrata*.
Fonte: BOEMHLER et al. (1996).



Um trabalho realizado por Sapp e Loker (2000) utilizando microscópio óptico indicou que os hemócitos, após a migração em direção aos miracídios, desenvolvem finas extensões citoplasmáticas que envolvem os miracídios até seu completo isolamento. Esta etapa corresponde às primeiras fases do encapsulamento. Estágios iniciais desse processo também foram reportados por Boemhler et al. (1996) que trabalhando com *B. glabrata* relataram a migração de células e formação do encapsulamento em esporocistos de *S. mansoni* (Fig. 7).

Borges e Andrade (2003), utilizando a ultra-estrutura, indicaram a presença de dois tipos de célula na hemolinfa de *B. glabrata*: hemócitos pequenos com um núcleo grande e pouco citoplasma e hemócitos com muitas projeções. Porém, no granuloma esses autores indicaram apenas a presença de “spreading cells” que formavam uma rede de prolongamentos citoplasmáticos.

2.9.4.4 Ferramentas para o estudo morfológico dos hemócitos

Com a aplicação de genômica, biologia celular e molecular e proteômica diferentes visões tem sido dadas no estudo da imunidade de *Biomphalaria* frente ao *Schistosoma* e outras espécies de trematódeos. Tais técnicas permitiram um acúmulo de informações e auxiliam no estudo da complexa associação do parasita com seu hospedeiro (YOSHINO; COUSTAU, 2011).

Os materiais biológicos revelam na sua ultra-estrutura um complexo, variável e dinâmicos processos e seus entendimentos podem ajudar no conhecimento de várias funções celulares. Entre as técnicas utilizadas no estudo da célula a microscopia eletrônica de transmissão destaca-se por permitir o conhecimento da morfologia de diferentes estruturas celulares. Esta ferramenta utiliza elétrons para formação da imagem. Tais elétrons são projetados através de finos tecidos (espécime) para produzir uma imagem dimensional em um écran fluorescente (BOZZOLA; RUSSEL, 1991).

O microscópio eletrônico possibilitou a observação direta de vários aspectos ultra-estruturais das células até então desconhecidos. Como resultado dessas novas observações, a compreensão sobre a organização dos tecidos vegetais e animais foi

enormemente ampliada, e muitas das idéias a respeito da construção e função celulares foram radicalmente alteradas (GALLET, 2003).

Neste trabalho, utilizando diversas ferramentas para o estudo da célula, pretendemos elucidar as bases celulares do sistema de defesa dos dois principais vetores da esquistossomose no Brasil, *B. glabrata* e *B. straminea*, tendo em vista que ambas apresentam resposta imune distinta contra o mesmo patógeno. Este estudo deverá ajudar no esclarecimento da relação parasita-vetor bem como fornecer conhecimentos para o desenvolvimento de novas estratégias para interromper a sobrevivência do *S. mansoni* no molusco.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Identificar e caracterizar os hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* e avaliar as alterações morfológicas das células após a infecção ao *S. mansoni*.

3.2 Objetivos Específicos:

- Identificar os tipos celulares presentes na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea* e descrever morfolologicamente suas características através da microscopia de campo claro, contraste de interferência diferencial e eletrônica de transmissão;
 - Avaliar as alterações morfológicas dos hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* infectados com *S. mansoni*;
 - Diferenciar as populações celulares na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea*, na condição de infectado ou não a miracídeos de *S. mansoni*, utilizando lectinas com diferentes especificidades;
 - Avaliar a cinética populacional de hemócitos presentes na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea* sadios e infectados por miracídeos de *S. mansoni*.
-

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Para o presente estudo foi utilizado o desenho experimental com características de um estudo de intervenção, onde um grupo de caramujos sofreu a intervenção (infecção pelos miracídios de *S. mansoni*) e o outro grupo, não expostos ao miracídio, mas submetidos ao estresse da infecção, serviram para termos de comparação dos resultados.

4.2 Operacionalização da Pesquisa

4.2.1 Definição das Variáveis

Variáveis Independente		
NOME DA VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Infecção dos caramujos <i>B. glabrata</i> e <i>B. straminea</i> pelo <i>S. mansoni</i>	Os caramujos foram considerados infectados após a exposição a 10 miracídios. Para garantir que houve a penetração, foi analisada a água em que os caramujos ficaram durante a exposição. A ausência de miracídios indicou que os mesmos penetraram no molusco e no 30º dia de acompanhamento a liberação de cercárias certificou que a infecção precedeu-se com sucesso.	Infectado ou não infectado
Tempo de Infecção		Os caramujos das duas espécies foram separados em 02 grupos divididos conforme o esquema abaixo:

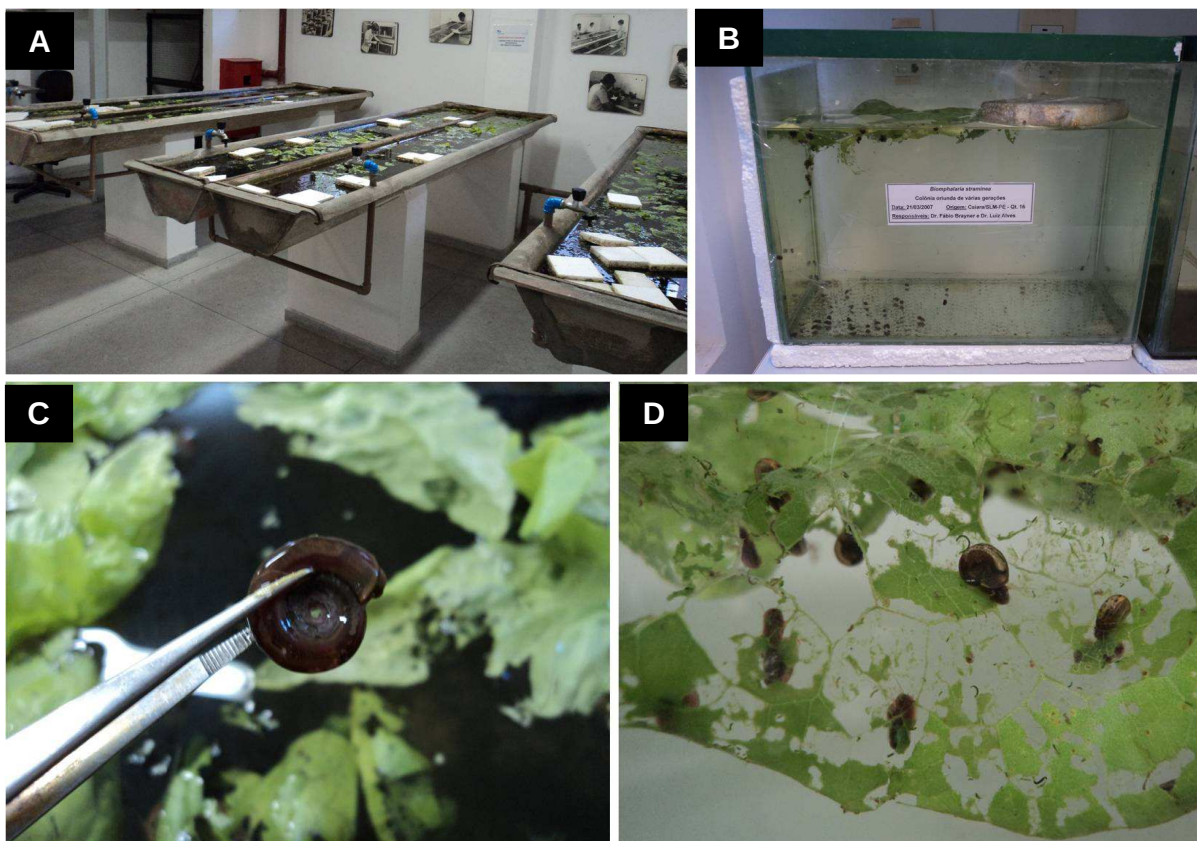
Tempo de Infecção		GRUPO 1 – caramujos não infectados, mas submetidos ao estresse das condições de infecção, porém sem miracídios. Avaliados nos intervalos de 2h, 15d e 30 dias. GRUPO 2 – Caramujos infectados com miracídios de <i>S. mansoni</i> . Avaliados nos intervalos de 2h, 15d e 30 dias.
Variáveis Dependente		
NOME DA VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Morfologia dos hemócitos	Foi considerada alteração morfológica quando foi observado: presença de vacúolos e projeções celulares além de variação no formato da célula e de organelas e aumento ou diminuição de grânulos	Existe ou não diferença morfológica entre os grupos
Cinética hemocitária	Aumenta a população de células Diminui a população celular Não há variação na população de células	Existe alteração ou não da cinética populacional

4.2.2 Obtenção dos moluscos

Os moluscos das espécies *B. glabrata* e *B. straminea* são descendentes de planorbídeos oriundos do município de São Lourenço da Mata/PE (-08° 00' 08"S -35° 01' 06"W). Para o estudo foram escolhidos caramujos subadultos através do diâmetro da concha: *B. glabrata* (9 mm) e *B. straminea* (4mm), entre aqueles existentes nos aquários do moluscário, do Laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ (Fig. 8, A-D)

Figura 8 - Criadouro do moluscário do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

Nota: (A) tanques de criação de *B. glabrata*. (B) Aquário de criação de *B. straminea*. (C) Caramujo *B. glabrata*. (D) caramujos *B. straminea*.



4.2.3 Obtenção de miracídios

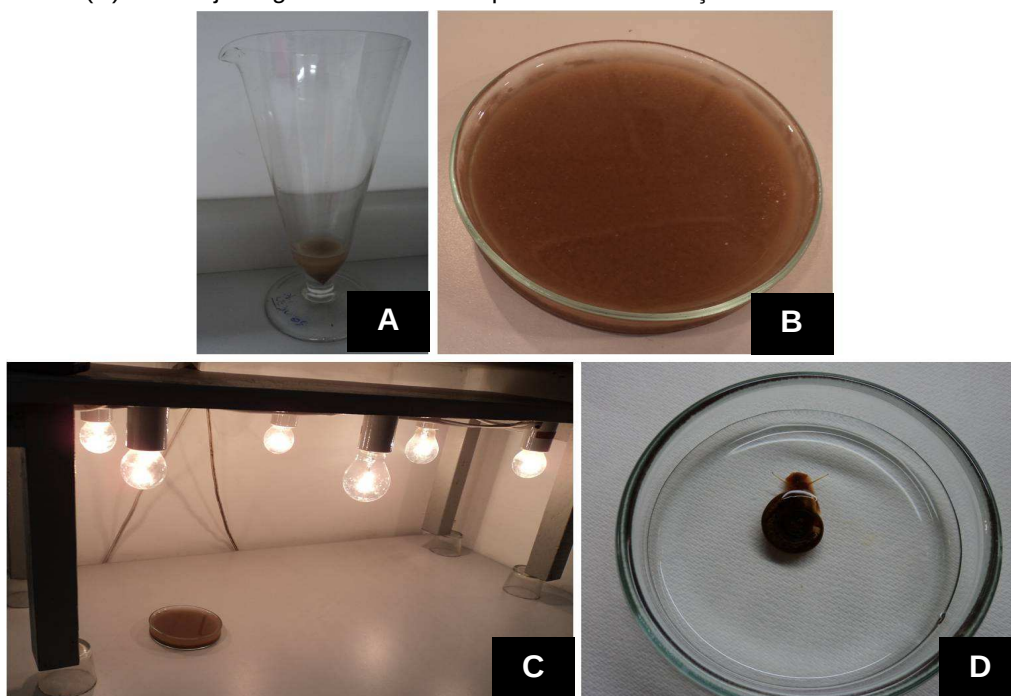
Para não ocorrer ressecamento, as fezes dos camundongos, previamente infectados, com a cepa BH (Belo Horizonte/Brasil) de *S. mansoni* foram coletadas em bandejas, revestidas com papel absorvente úmido. Após a coleta, as fezes foram maceradas em borrel, diluídas em água destilada e filtradas em gaze para um cálice de sedimentação (Fig. 9A) e colocadas em repouso por 24 horas, a temperatura de 8°C, na ausência de luz. No decorrer desse período, após 3 a 4 lavagens, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento, colocado em placas de petri (Fig. 9B), sob luz artificial, para eclosão dos miracídios (Fig. 9C).

4.2.4 Infecção dos moluscos

Cada molusco foi colocado individualmente na presença de 10 miracídios e deixados expostos à luz artificial por um período de aproximadamente duas horas (Fig. 9 C-D).

Figura 9 - Obtenção de miracídios de *S. mansoni* e infecção de caramujos.

Nota: (A) Cálice de sedimentação contendo fezes de caramujos infectados por *S. mansoni*. (B) Placa de Petri contendo concentrado de ovos. (C) Exposição dos ovos à luz para eclosão dos miracídios. (D) caramujo *B. glabrata* durante o processo de infecção.



4.2.5 Formação dos grupos

Para efeito dos estudos realizados neste trabalho, os moluscos de cada espécie foram agrupados conforme o seguinte esquema:

GRUPO 1 - Caramujos não infectados (submetidos ao estresse da infecção sem miracídios e coletados no período de 2h, 15d e 30d).

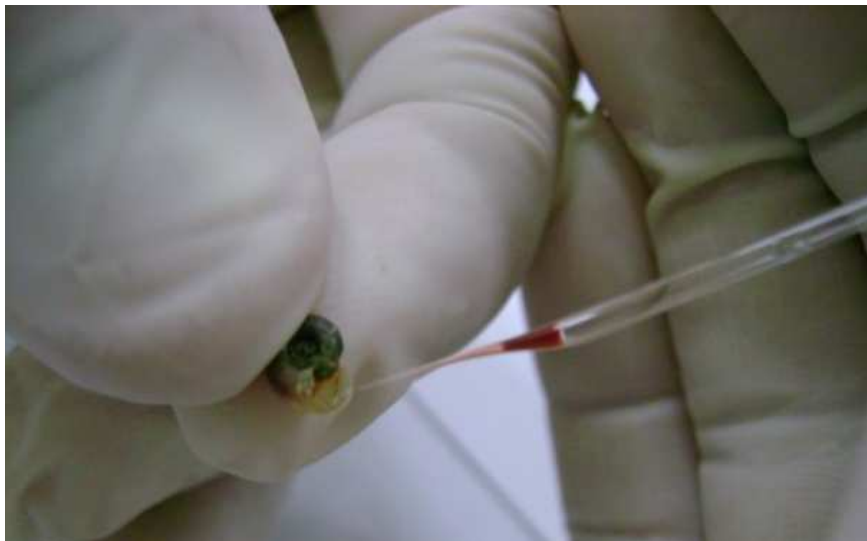
GRUPO 2 - Caramujos infectados (submetidos ao estresse da infecção com miracídios e coletados no período de 2h, 15d e 30d).

4.2.6 Obtenção da hemolinfa

A hemolinfa dos caramujos foi obtida através da punção céfalopodal e coletada com capilar de vidro (Fig. 10). A forma de coleta foi adaptada da técnica de Chernin (1966). Os caramujos, antes de serem puncionados, foram deixados por 30 minutos em água destilada. Após a lavagem, a carapaça foi secada em papel absorvente e a abertura da concha, limpa com algodão, em seguida, foi realizada a punção. O volume de hemolinfa coletada corresponde ao diâmetro da carapaça, apresentando uma variação aproximada de 5 a 7µl em *B. straminea* e 20 a 40µL em *B. glabrata*.

Figura 10 - Coleta da hemolinfa de *B. straminea* utilizando microcapilar de vidro siliconizado.

Fonte: foto gentilmente cedida por Dr. Fábio Brayner.



4.2.7 Microscopia

4.2.7.1 Preparação de Lâminas- Microscopia de Campo Claro:

A hemolinfa das duas espécies foi colhida e colocada individualmente em lâmina (10 poços/cada poço com 5µL de hemolinfa), fixada (metanol a 10%), corada (Giemsa) e caracterizada utilizando como parâmetros a morfologia, tamanho e características tintoriais através da visualização de todos os campos no microscópio óptico de campo claro.

4.2.7.2 Contagem total e diferencial dos hemócitos - Microscopia de Campo Claro:

Um volume total de 10µL de hemolinfa diluída fresca em meio GRACE (1:1) coletados através de um microcapilar de vidro siliconizado. A amostra foi imediatamente colocada em um hemocitômetro estéril e descartável (Neubauer iNCYTO C-Chip DHC-N01, www.incyto.com) (10µl de capacidade). O número de células em quatro quadrados foi contado através de um microscópio de luz (objetiva 40 ×), e o número total de hemócitos por caramujo foi determinado. A contagem dos tipos de células individuais foi realizada simultaneamente, e as proporções em percentagens foram determinadas por caramujos individuais. A contagem dos hemócitos foi confirmada em três experimentos independentes. Para cada experimento, grupos de seis caramujos foram analisados individualmente e o número total de células ou a proporção de cada população de células foram expressos através de média aritmética.

4.2.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):

Esta técnica foi utilizada para o reconhecimento da ultra-estrutura dos hemócitos, definir os tipos de células e comparar os hemócitos das espécies suscetíveis e resistentes, desafiados com miracídios de *S. mansoni*. Um "pool" de hemolinfa, de cada grupo, foi coletado através de perfusão com fixador (2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2). Os hemócitos, presentes na hemolinfa foram

processados como de rotina de acordo com o tipo de experimento. Todo esse procedimento foi realizado a baixa temperatura (4°C). O pool obtido, após a fixação, foi lavado com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2 e pós-fixado com 1% tetróxido de ósmio por 1 hora na ausência de luz. Em seguida lavado, contrastado em bloco com acetato de uranila a 5%. A desidratação foi feita em séries crescentes de acetona para posterior infiltração e emblocamento em resina Epon 812 (Electron Microscopy Sciences). Depois de cortado e contrastado, o material foi analisado no microscópio eletrônico de transmissão 100CXII JEOL.

4.2.7.4 Microscopia confocal a laser (MCL)

Para visualização dos hemócitos vivos, um pool de hemolinfa foi coletada de 5 caramujos, de cada molusco foi obtido cerca de 5µl. A amostra coletada foi diluída em meio GRACE (1:10). A solução de células foi depositada diretamente em placas de cultura de células (MatTEK) e deixada em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, os hemócitos foram examinados utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (Leica microscópio confocal SP2).

A MCL foi utilizada para avaliação morfológica das células (de caramujos sadios e infectados) e para o reconhecimento de possíveis marcadores da superfície dos hemócitos utilizando lectinas conjugadas à FITC:

4.2.7.5 Marcação com lectinas conjugadas à FITC

Os hemócitos foram caracterizados através de cinco lectinas conjugadas à fluoresceína (FITC) com distintas especificidades (Tabela 1). As lectinas utilizadas foram: UEA (*Ulex europaeus*), DBA (*Dolichos biflorus*), LCA (*Lens culinaris*), BS-I (*Bandeirea simplicifolia*) e WGA (*Triticum vulgaris*). A hemolinfa coletada foi diluída em meio GRACE (1:50), a amostra foi colocada em lâminas e deixadas em câmara úmida por aproximadamente 30 a 40 minutos para aderência dos hemócitos. Posteriormente as lâminas foram retiradas da câmara úmida e processadas a temperatura ambiente. Os

hemócitos foram fixados com metanol 70%, 30 µl por poço, durante 15 minutos. Após a fixação, os hemócitos foram lavados em PBS 7.2/BSA 1%/TRITON X-100 0,1% por 30 minutos. As amostras foram incubadas em câmara úmida escura com as lectinas (diluídas em PBS/TRITON X-100 na concentração de 1:100), 20µl por poço durante 1 hora. Posteriormente, os hemócitos foram lavados três vezes em PBS, pH 7.2 e depois foi utilizado ProLong® Gold antifade reagent com DAPI (marcador nuclear, Invitrogen) , para montagem entre lâmina e lamínula e posterior análise no microscópio confocal.

Tabela 1 – Pannel de lectinas conjugadas à FITC com suas siglas e respectivas especificidades.

Lectinas conjugadas à FITC	Sigla	Especificidade
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-1	L-fucose
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin	DBA	N-acetyl-α-D-galactosaminyl
<i>Lens culinaris</i> agglutinin	LCA	α-D-mannosyl e α-D-glucosyl
<i>Bandeirea simplicifolia</i> agglutinin	BS-I	α-D-galactosyl e N-acetyl-α-D-galactosaminyl
Wheat germ agglutinin	WGA	N-acetyl-β-D-glucosaminyl e N-acetyl-β-D-glucosamine oligomers

4.2.8 Análise Estatística

A contagem total e diferencial dos hemócitos foi avaliada e comparada pelo teste t de Student com nível de confiança de $P < 0,05$.

4.2.9 Aspectos Éticos

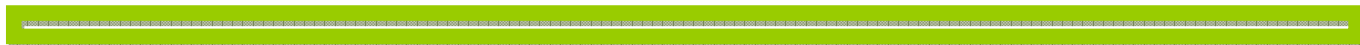
Apesar do trabalho não envolver seres humanos, o mesmo só foi iniciado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Anexo A).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão do presente trabalho encontram-se no formato de artigos.

ARTIGO 1



5.1 ARTIGO 1

Caracterização morfológica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848): uma nova classificação

M. G. S. CAVALCANTI ^{1, 2}, F.C. FILHO ³, A. M. B. MENDONÇA ³, G. R. DUARTE ³,
C.C.G.S. BARBOSA ⁴, C. M. M. B DE CASTRO ^{2, 5}, L. C. ALVES ^{3, 4, 5} and F. A
BRAYNER, ^{2, 4*}

¹ Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade de Federal da Paraíba (UFPB) - PB, Brasil.

² Departamento de Medicina Tropical, Universidade de Federal de Pernambuco Recife - PE, Brasil.

³ Universidade de Pernambuco (UPE), Recife - PE, Brasil

⁴ Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), Recife - PE, Brasil.

⁵ Laboratório de Imunopatologia Profº. Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil.

*Endereço para Correspondência:

Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Departamento de Parasitologia

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE

CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco - Brazil.

E-mail: brayner@cpqam.fiocruz.br

Fone: +55 81 2101-2643

Fax: +55 81 2101-2516

RESUMO

Biomphalaria glabrata e *B. straminea* são reconhecidos como um dos mais importantes hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*. Alguns estudos têm identificado a existência de dois tipos de células na hemolinfa de *B. glabrata* (hialinócitos e granulócitos). Entretanto, existem poucas informações sobre os hemócitos de *B. straminea*. Com o objetivo de descrever as subpopulações celulares presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea* realizamos um estudo detalhado utilizando a microscopia de campo claro, microscopia de contraste de interferência diferencial e microscopia eletrônica de transmissão. Com base nas características morfológicas das células foram identificados os mesmos tipos de hemócitos nas duas espécies de caramujos, são eles: células blásticas, granulócitos, hialinócitos tipo I, hialinócitos tipo II e hialinócitos tipo III. As células blásticas apresentam um formato esférico com núcleo central que ocupa quase toda a célula. Os granulócitos são caracterizados por apresentarem um número variado de grânulos. Hialinócitos do tipo I é o tipo celular mais abundante, e se caracteriza por possuir várias projeções citoplasmáticas. Hialinócitos II e III nunca foram relatados anteriormente. Estes tipos celulares se apresentam em número reduzido e se caracterizam por ter um núcleo grande e excêntrico. Estes resultados permitem concluir que existem cinco tipos de células na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea*. Porém, mais estudos são necessários para identificar o papel desses hemócitos na resposta imune destes caramujos.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea*, hemócitos, morfologia.

INTRODUÇÃO

Biomphalaria glabrata e *B. straminea* são Planorbídeos de água doce e possuem grande importância médica no Brasil por serem hospedeiros intermediários para os estágios larvais do *Schistosoma mansoni* (Paraense, 2001). Esses caramujos podem reagir de diferentes maneiras à exposição de miracídios de *S. mansoni*.

A capacidade do sistema de defesa interno do hospedeiro em destruir o parasita é um dos fatores que podem determinar a suscetibilidade de *Biomphalaria* à infecção por *S. mansoni* (Souza et al. 1995; Yoshino et al. 2001; Martins-Souza et al. 2003, Donaghy et al. 2010). O sistema de defesa interno é composto por componentes solúveis da hemolinfa e células circulantes, denominado hemócitos.

Os hemócitos são células com morfologia e conteúdo enzimático variável, com subpopulações exibindo diferentes capacidades para a adesão e fagocitose (Van der Knaap and Loker, 1990; Matricon-Gondrano and Letocart, 1999). A maioria dos estudos, baseados principalmente em aspectos morfológicos e funcionais, tem relatado que os hemócitos circulantes de *Biomphalaria* são compostos por, pelo menos, duas populações celulares: os hialinócitos e os granulócitos (Lo Verde et al. 1982; Lie et al. 1987; Barracco et al. 1993).

Os hemócitos circulantes desempenham um papel central na imunidade inata. Eles estão envolvidos no reconhecimento de agentes externos, encapsulamento, resposta fagocitária e reações citotóxicas (Matricon-Gondrano and Letocart, 1999; Johnston and Yoshino, 2001). Portanto, a caracterização destas células é fundamental para o entendimento da resposta celular do *Biomphalaria* contra o *S. mansoni*.

Estudos sobre a resposta imune celular de caramujos dependem, em grande parte, da caracterização destas células. Assim, este trabalho se propõe realizar uma avaliação morfológica comparativa dos hemócitos de *B. straminea* e *B. glabrata* além de padronizar a classificação dessas células utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção dos Caramujos

Caramujos das espécies *B. glabrata* e *B. straminea*, provenientes de São Lourenço da Mata, Pernambuco, Brasil (-08°00' 08" S -35°01' 06"W) foram utilizados ao longo deste estudo. Esses caramujos foram criados e mantidos no moluscário do Laboratório de Esquistossomose, Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Recife, Pernambuco, Brasil.

Os caramujos foram mantidos em aquários contendo água desclorada a 26°C e foram alimentados com folhas de alface *ad libitum*. O tamanho dos caramujos utilizados no experimento foi padronizado, tanto em *B. glabrata* (9mm $\pm$ 1mm) como em *B. straminea* (4mm $\pm$ 1mm).

Coleta de Hemolinfa

A hemolinfa foi coletada por meio de uma punção na região cefalopodal utilizando uma micropipeta de vidro siliconizada. Antes da retirada da hemolinfa, a concha dos caramujos foi limpa com álcool a 70% e posteriormente seca em papel absorvente.

Caracterização dos Hemócitos

Microscopia óptica: Cerca de 5µl de hemolinfa de cada caramujo foi coletada diretamente sobre uma lâmina de vidro e deixada secar em temperatura ambiente por um período de 20 a 30 minutos. Em cada lâmina foi realizada a formação de 10 poços o que representa dez diferentes moluscos. Posteriormente, as células foram fixadas em metanol por 10 min. Após a fixação, os hemócitos foram corados com Giemsa (1:9) diluídos em água destilada tamponada por 10-15 minutos e lavados com água destilada tamponada (Brayner et al. 2005). Depois disso, as lâminas foram montadas em Entellan e observadas ao microscópio de campo claro.

Microscopia óptica de células vivas: Para visualização dos hemócitos vivos, um pool de hemolinfa foi coletada de 5 caramujos, de cada molusco foi obtido cerca de 5µl. A amostra coletada foi diluída em meio GRACE (1:10). A solução de células foi depositada diretamente em placas de cultura de células (MatTEK) e deixada em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, os hemócitos foram examinados utilizando microscopia de contraste de interferência diferencial (Leica microscópio confocal SP2).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET): a hemolinfa de pelo menos 50 caramujos foi fixada em uma solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M em pH 7,2. A amostra foi lavada em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e pós-fixada com tetróxido de ósmio (1%) em tampão cacodilato por uma hora. Após a desidratação em uma série crescente de acetona, as amostras foram incluídas e emblocadas em resina Epon. Posteriormente, cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante e depois contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados usando um microscópio eletrônico Jeol JEM 100CX.

Contagem total dos hemócitos

O número de hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* foi determinado a partir de 10µl de amostra fresca em meio GRACE diluída (1:1), por meio de uma câmara de Neubauer. A contagem foi realizada utilizando 10 caramujos.

Contagem diferencial dos hemócitos

A porcentagem da população total de hemócitos foi calculada a partir da contagem diferencial de subpopulações celulares em dez caramujos. Esta avaliação foi realizada através da contagem dos tipos de hemócitos diferentes através de esfregaços corados pelo Giemsa, utilizando as mesmas amostras que foram utilizadas para a contagem total dos hemócitos (amostra fresca diluída em meio GRACE). Pelo menos 200 células foram contadas em cada caramujo e examinadas em microscopia de campo claro em um aumento de 100x. Tanto a contagem total como a diferencial foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS

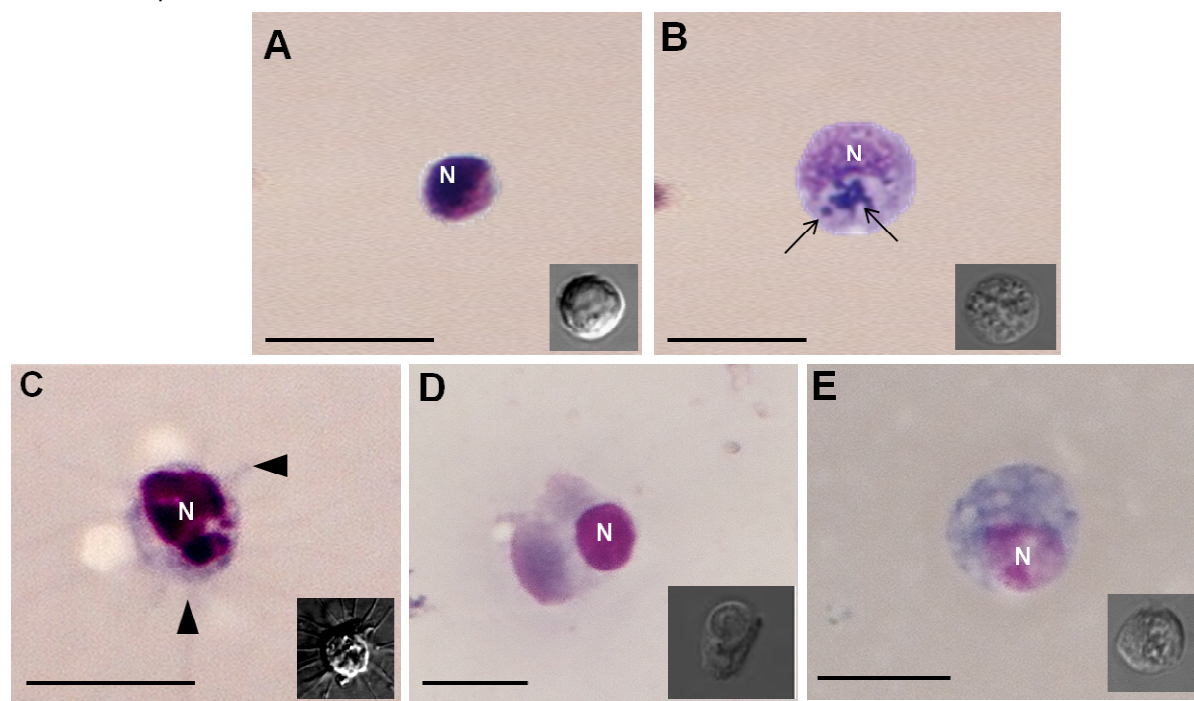
Classificação dos hemócitos e morfologia

A avaliação através da microscopia óptica e eletrônica sugere a existência de cinco tipos celulares presentes na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea*. São eles: células blásticas, granulócitos, hialinócitos do tipo I, hialinócitos do tipo II e hialinócitos do tipo III.

Células Blásticas:

Hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* apresentaram as mesmas características celulares. Estas células exibiram um perfil esférico com um núcleo grande localizado centralmente que quase ocupa toda a célula, o citoplasma se restringe a uma pequena área ao redor do núcleo (Figs. 1A, 2A, 3A e 5A).

Figura 1 (A-E): microscopia de luz e microscopia de contraste de interferência diferencial de hemócitos de *B. glabrata*. (A) Célula blástica: o núcleo grande e central (N) preenche quase toda a célula, de modo que o citoplasma ocupa apenas uma área restrita ao redor do núcleo. (B) Granulócitos: possui um número variável de grânulos (setas). (C) Hialinócitos do tipo I: o formato dessas células variam de fusiformes a esféricas. A membrana plasmática apresentaram projeções citoplasmáticas (filopódios e pseudópodes) (cabeça de seta). (D) Hialinócitos do tipo II e (E) Hialinócitos do tipo III: apresentaram formato oval e geralmente apresentam citoplasma homogêneo. Barras = 10µm.



Em *B. glabrata* nas células blásticas foi identificado: mitocôndrias, grânulos de glicogênio, retículo endoplasmático rugoso, ribossomos livres e filopódios pequenos (Fig. 3A). Em *B. straminea*, além de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, algumas vesículas também puderam ser vistas (Fig.5A).

As células blásticas apresentam características de células jovens ou de células precursoras de outros hemócitos. Este tipo celular representa 45% da população total de hemócitos em *B. glabrata* e 44% em *B. straminea*. O tamanho dessas células varia de 3-5µm em *B. glabrata* e 4-5µm em *B. straminea*.

Granulócitos:

Essas células são polimórficas e medem aproximadamente 7-8µm de diâmetro (*B. glabrata*) e 6-7µm (*B. straminea*). Este tipo de célula representa 4% da população total de hemócitos em *B. glabrata* e 5% em *B. straminea*.

Os granulócitos de ambas as espécies mostraram um formato que variou de esférico a fusiforme e são preenchidos com um número variável de grânulos basófilos (Figs. 1B e 2B).

Utilizando a microscopia eletrônica de transmissão foi possível identificar a presença de vários grânulos eletrodensos distribuídos no citoplasma. Estes grânulos podem se apresentar em diferentes quantidades e podem ser localizados na periferia (Fig. 3B) ou no centro da célula (Fig. 5B).

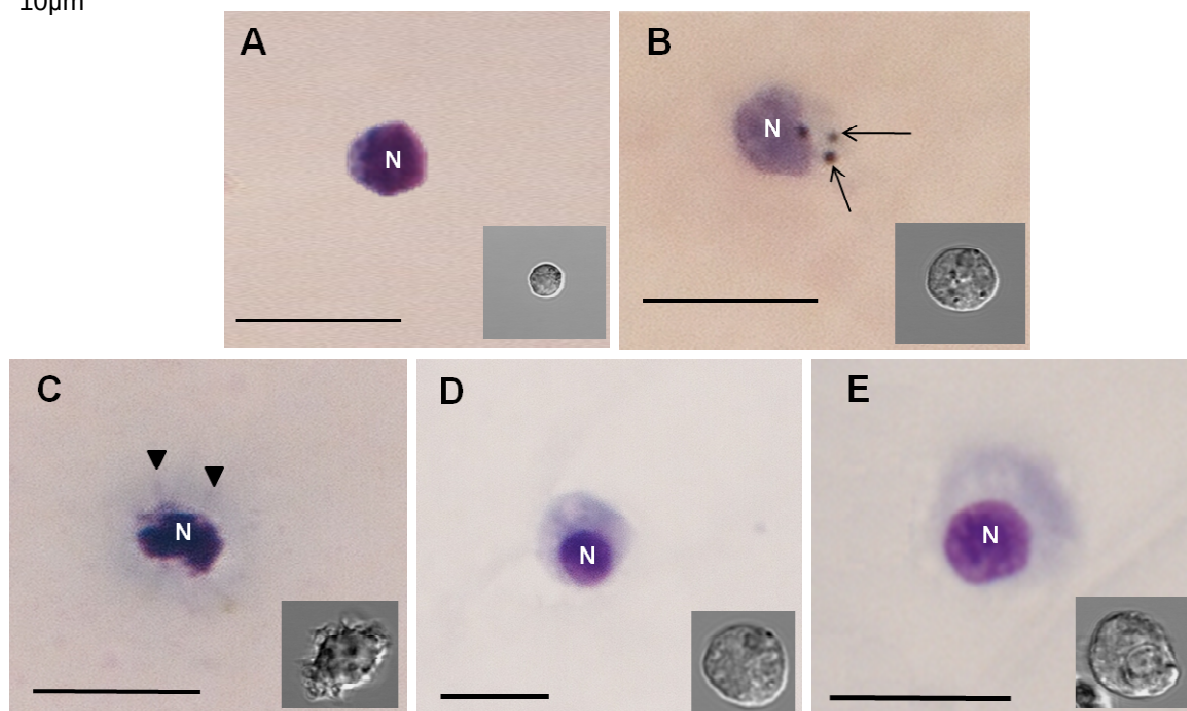
Em ambas as espécies foram encontradas a presença de mitocôndrias e projeções citoplasmáticas. Os granulócitos de *B. glabrata* também apresentaram vacúolos e grânulos de glicogênio (Figs. 3B e 5B).

Nos granulócitos de *B. straminea* identificou-se a presença de nucléolo evidente e grânulos em diferentes estágios de formação. As fotomicrografias mostraram uma série de grânulos que se apresentavam vazios à parcialmente cheios (Fig.5B).

Hialinócitos do tipo I:

Este tipo celular foi a célula mais abundante na hemolinfa, representando 47% da população total de hemócitos na hemolinfa de *B. glabrata* e 45% em *B. straminea*. Seu tamanho variou de 7-12 µm em *B. glabrata* e 5-8 µm em *B. straminea*.

Figura 2: Hemócitos de *B. straminea* visualizados através da microscopia de luz (corados com Giemsa) e de contraste de interferência diferencial. (A) Células blásticas: possui núcleo grande, esférico (N) e apresenta uma posição central. (B) Granulócitos: células polimórficas possuem um formato que varia de arredondados a fusiformes. A principal característica desta célula é a presença de grânulos (setas) em seu citoplasma. (C) Hialinócitos do tipo I: células polimórficas com projeções citoplasmáticas, filopódio (seta). (D) Hialinócitos do tipo II: apresenta citoplasma homogêneo e núcleo excêntrico (N). (E) Hialinócitos do tipo III: apresenta um núcleo (N) geralmente na periferia. Barra = 10µm

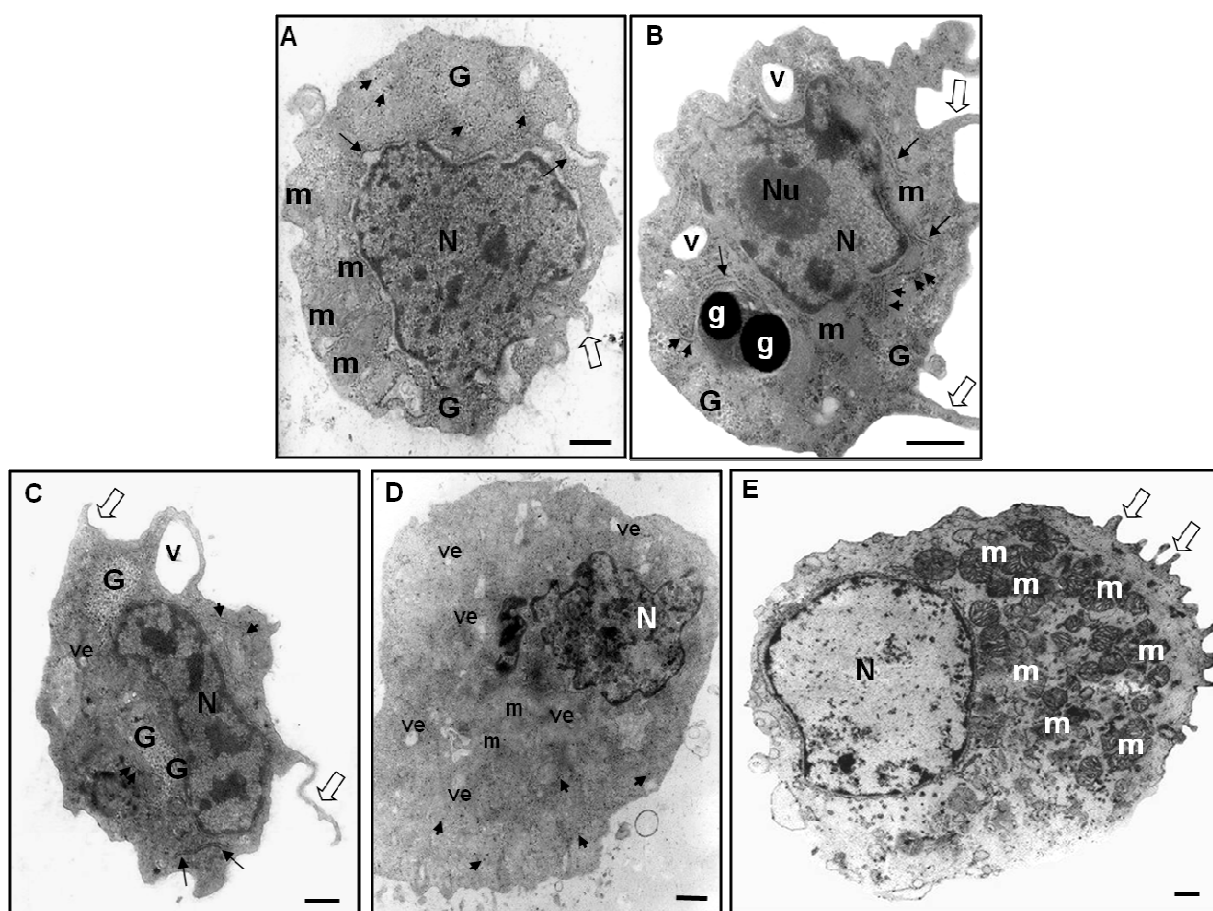


No que diz respeito às características tintoriais, os hialinócitos tipo I foram mais acidófilos em *B. glabrata* (Figura 1C) e mais basófilos em *B. straminea* (Fig.2C).

Hialinócitos do tipo I de ambos os caramujos apresentaram um perfil polimórfico, com o núcleo localizado em uma posição central ou deslocado (Figs. 1C, 2C, 3C, 4A, 4B e 5C). A heterocromatina foi observada aderida ao envelope nuclear em *B. glabrata* (Figs. 3C, 4A e 4B) e em *B. straminea* (Fig. 5C).

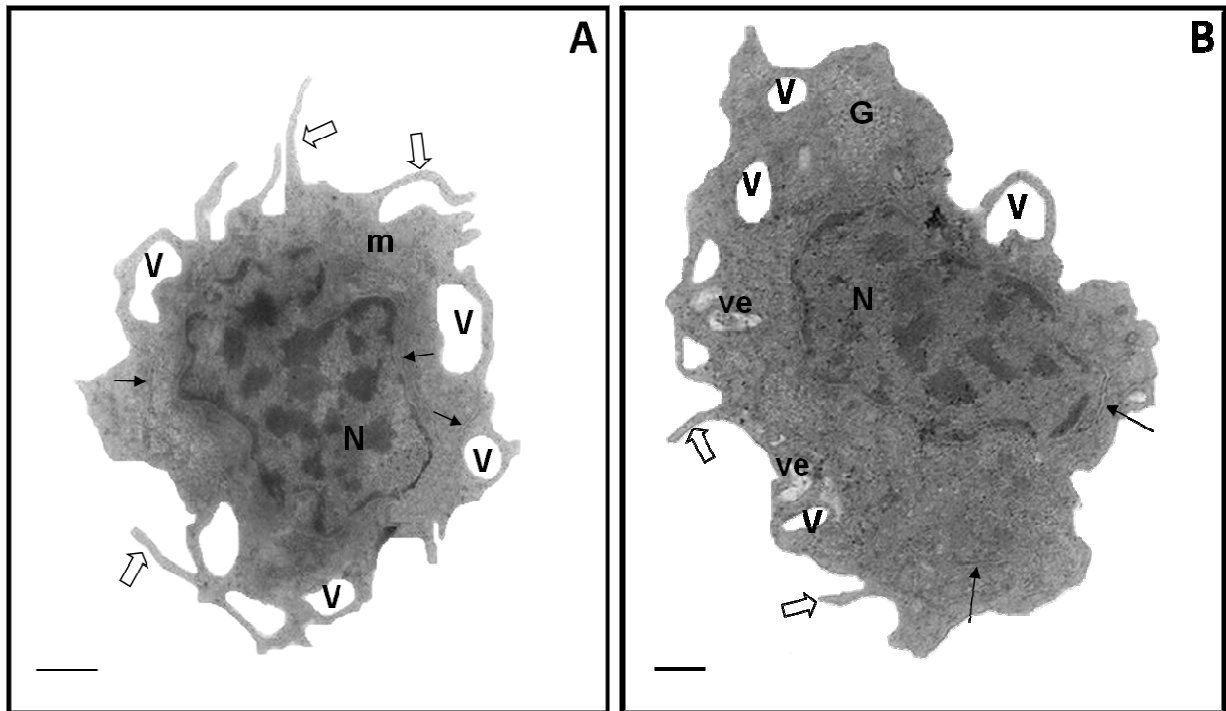
Este tipo de célula foi muito semelhante nas duas espécies de caramujos e frequentemente foram identificados em processo de divisão celular atípica, tanto em *B. glabrata* (Fig. 6A) como em *B. straminea* (Fig. 6B).

Figura 3 (A-E): microscopia eletrônica de transmissão, hemócitos de *B. glabrata*. (A) Células blásticas: possui um núcleo esférico e alta relação núcleo/citoplasma, apresenta no citoplasma ilhas de glicogênio (G), ribossomos livres (cabeça de seta) e mitocôndrias (m). (B) Granulócitos: apresentam perfil de circular a fusiformes, estas células são polimórficas e apresentam grânulos (g) citoplasmáticos. A membrana plasmática é irregular e exibe pseudópodes e filopódios (seta aberta), também podemos observar nesta célula : nucléolo proeminente (Nu), vacúolos (V), mitocôndrias (m), ilhas de glicogênio (G) e retículo endoplasmático rugoso (setas). (C) Hialinócitos do tipo I hialinócitos: possui membrana irregular que apresenta filopódios (seta aberta) e da mesma forma que a célula, o núcleo também é polimórfico (N). No citoplasma observamos: vesículas (ve), vacúolos (V), ilhas de glicogênio (G) e retículo endoplasmático rugoso (seta). (D) Hialinócito do tipo II: caracterizado por possuir um núcleo excêntrico (N), sem nucléolo proeminente, citoplasma com várias vesículas (ve), ribossomos dispersos (cabeça de seta) e presença de mitocôndrias (m). (E) Hialinócitos do tipo III apresenta perfil oval mostrando núcleo grande (N). Observar citoplasma com muitas mitocôndrias eletrodensas (m). Barras = 1µm.



Além de grânulos de glicogênio foi identificado no citoplasma mitocôndria e vacúolos. A membrana plasmática apresentou processos irregulares (filopódios/pseudópodes) (Figs. 1C, 2C, 3C, 4A, 4B e 5C). A cromatina foi finamente distribuída, mas alguns pacotes de heterocromatina estavam presentes.

Figura 4 (A-B): Eletromicrografias de hialinócitos do tipo I (*B. glabrata*). Estas células se encontram em maior frequência na hemolinfa. Os hialinócitos do tipo I são muito polimórficos, variando de fusiformes à oval. A membrana plasmática apresentaram processos irregulares, filopódios e pseudópodes (seta aberta). O núcleo (N), com eucromatina lobada, está localizado em uma posição central ou periférica. Encontrados no citoplasma: vacúolos (V), ilhas de glicogênio (G), retículo (seta) e vesículas (ve). Barras= 1 μ m.



Hialinócitos do tipo II:

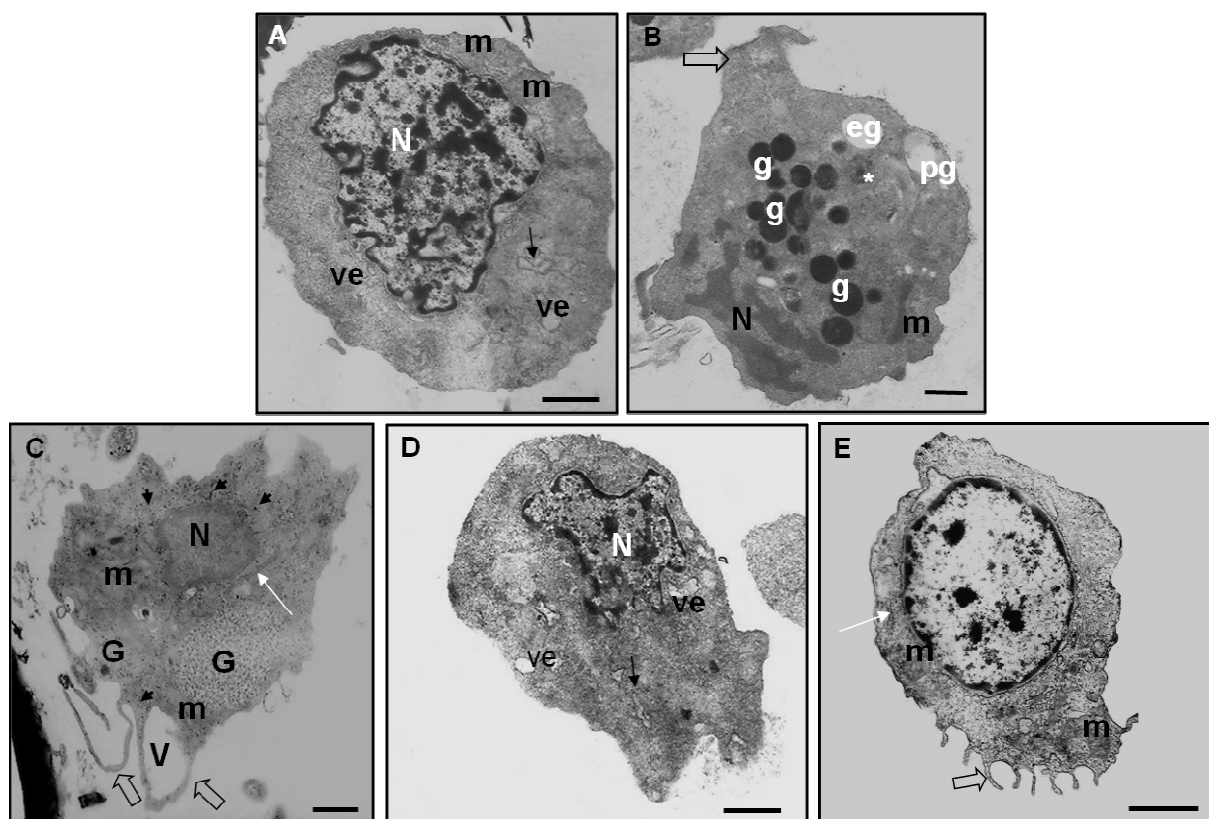
Este tipo de célula representou uma prevalência de 2,5% em *B. glabrata*, com o tamanho variando de 9 a 10 μ m; e 4% em *B. straminea*, variando entre 9-10 μ m de diâmetro. Os hialinócitos do tipo II são células ovais e geralmente apresentam coloração homogênea (Fig. 1D e 2D). Este tipo celular caracteriza-se por apresentar um núcleo excêntrico sem nucléolo proeminente e citoplasma homogêneo, com vesículas e presença de ribossomos livres espalhados por todo o citoplasma (Figs. 3D e 5D).

Hialinócitos do tipo III:

Os hialinócitos do tipo III são encontrados em pequeno número na hemolinfa das duas espécies: 1,5% em *B. glabrata* e 2% em *B. straminea*. Este tipo celular é a maior

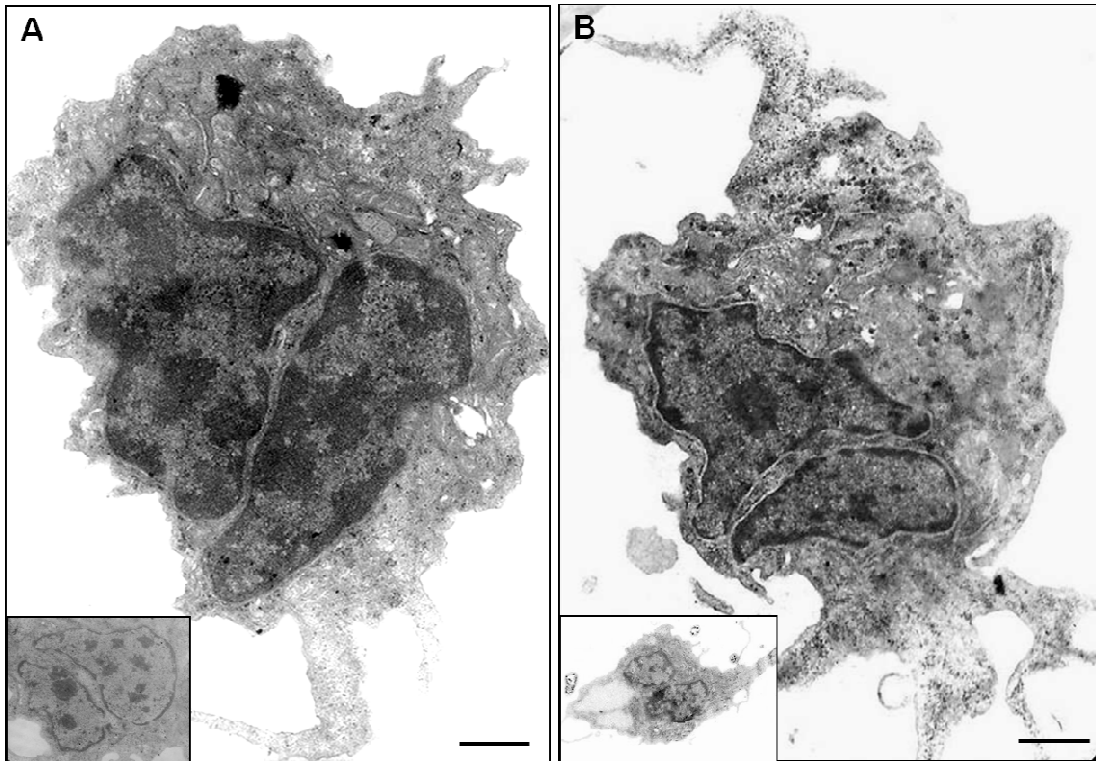
célula encontrada na hemolinfa, possuindo um diâmetro que varia de 10-12 μ m em *B. glabrata* e 9-11 μ m em *B. straminea* (Fig. 1E, 2E, 3E e 5E).

Figura 5 (A-E): microscopia eletrônica de transmissão, hemócitos de *B. straminea*. (A) Célula blástica: observar o núcleo grande e central (N), apresenta citoplasma escasso com vesículas (ve), mitocôndrias (m), retículo (seta) e ribossomos dispersos. (B) Granulócitos: são polimórficos e apresentaram um perfil circular à fusiforme, essas células apresentam grânulos (g) em diferentes estádios de desenvolvimento: grânulos vazios (eg), parcialmente cheios (pg) e podemos ver grânulos quase completamente cheios (asterisco). A membrana plasmática é irregular e apresenta pseudópodes e filopóides (seta aberta). Também demonstramos na micrografia o núcleo (N) e mitocôndria (m). (C) Hialinócitos do tipo I: apresenta filopóides (seta aberta) com núcleo polimórfico (N). Observadas no citoplasma as ilhas de glicogênio (G), retículo endoplasmático rugoso (seta) e mitocôndrias (m). (D) Hialinócitos do tipo II: caracterizado por possuir um núcleo excêntrico (N), sem nucléolo proeminente, citoplasma com vesículas (ve) e retículo endoplasmático rugoso (seta). (E) Hialinócitos do tipo III: apresenta perfil oval mostrando um núcleo grande (N). Observar citoplasma, mitocôndrias (m), retículo endoplasmático rugoso (seta) e projeções citoplasmáticas (seta aberta). Bares = 1 μ m



Estas células são frágeis, pois se romperam com facilidade no processamento para microscopia eletrônica de transmissão. Os hialinócitos tipo III possuem um formato de esférico à oval, e se caracterizam por um núcleo grande e esférico que pode estar disposto de forma central ou excêntrica (Fig. 1E, 2E 3E e 5E).

Figura 6 (A-B): hialinócitos do tipo I de *B. glabrata* (A) e *B. straminea* (B). Note que este tipo de célula tem características muito semelhantes nas duas espécies. Normalmente essas células se encontram em processo de divisão atípica. Barras = 1µm.



A cromatina foi organizadamente distribuída em pacotes aderidos ao envelope nuclear. Esta característica foi observada em ambas as espécies (Fig. 3E e 5E). Em *B. glabrata*, a análise ultra-estrutural revelou citoplasma homogêneo com pequenas mitocôndrias eletrodensas. Em *B. straminea* foi possível identificar no citoplasma a presença de complexo de Golgi e mitocôndrias em menor quantidade do que em *B. glabrata*. As projeções citoplasmáticas foram vistas neste tipo de célula em ambas as espécies de caramujos (Figuras 3E e 5E).

DISCUSSÃO

O presente estudo associou diferentes ferramentas para a avaliação morfológica como a microscopia óptica e eletrônica de transmissão para investigar hemócitos circulantes em *B. glabrata* e *B. straminea*. Com a finalidade de caracterizar hemócitos circulantes foram avaliadas características ultra-estruturais dos hemócitos por meio de análise de imagens e medições.

Alguns autores têm caracterizado os hemócitos do gênero *Biomphalaria* concentrando-se em características morfológicas e bioquímicas destas células (Bezerra et al. 1997; Johnston and Yoshino, 2001).

A maioria dos estudos tem se concentrado em *B. glabrata* (Cheng and Auld, 1977; Matricon-Gondran and Letocart, 1999) e *B. tenagophila* (Barracco et al. 1993; Oliveira et al. 2010), e poucos trabalhos na literatura tem como foco hemócitos da espécie *B. straminea*. A carência de trabalhos com esta espécie está relacionada ao pequeno tamanho destes caramujos além das dificuldades em manter esta espécie em laboratório.

Grande parte dos trabalhos têm diferenciado dois tipos de células circulantes na hemolinfa de *Biomphalaria* sp. Tais células foram nomeadas de hialinócitos (células de menor tamanho sem a presença de grânulos) e granulócitos (células de maior tamanho com presença de grânulos) (Harris, 1975; Lo Verde et al. 1982; Lie et al. 1987; Barracco et al. 1993).

Alguns estudos já começaram a sinalizar a existência de outros subgrupos ou tipos de células na hemolinfa de *Biomphalaria*. Martins-Souza et al. (2009) demonstraram que em uma cepa de *B. glabrata* (BG-BH, altamente suscetível ao *S. mansoni*) e em duas cepas de *B. tenagophila* (BT-CF, moderadamente suscetíveis e BT-Taim, resistente de *S. mansoni*) ocorrem a existência de três subgrupos de hemócitos circulantes, que têm sido referidos como hemócitos pequenos, médios e grandes. A mesma classificação foi utilizada por Matricon-Gondran e Letocart (1999) em um estudo prévio com *B. glabrata*.

Neste trabalho foi descrito pela primeira vez cinco tipos de células na hemolinfa de *B. glabrata* e em *B. straminea*, são elas: células blásticas, granulócitos, hialinócitos

tipo I, hialinócitos tipo II e hialinócitos tipo III. A diferença no número de células encontradas neste estudo pode estar relacionada à metodologia utilizada durante a coleta da hemolinfa, pois para evitar a adesão celular em superfícies, foi utilizado material siliconizado.

Além de células blásticas, outros três tipos celulares não possuem grânulos citoplasmáticos e, portanto, foram classificados como hialinócitos. Uma vez que estes hemócitos apresentaram diferenças morfológica bem evidentes, estas células foram subdividida em hialinócitos do tipo I, II e III.

As células blásticas foram encontradas em alguns estudos envolvendo outros invertebrados. As características destas células são as mesmas descritas por alguns autores como Brayner et al. (2005) trabalhando com o díptera *Culex quinquefasciatus* descreveram que os prohemócitos (células semelhantes as blásticas) exibiram perfil esférico com núcleo grande e central que ocupa quase toda a célula. Travers et al. (2008) descreveram as mesmas características ao trabalharem com *Haliotis tuberculata*. A célula blástica corresponde ao menor tipo celular encontrado na hemolinfa das duas espécies de caramujos. Este tipo de célula também foi encontrado na hemolinfa de *B. tenagophila* (Barracco et al.1993), *B. glabrata* (Matricon-Godrano and Letocart, 1999) e em moluscos bivalves *Haliotis tuberculata* (Travers et al. 2008).

O granulócito é um tipo celular que já foi descrito na hemolinfa de *B. glabrata* (Cheng and Auld, 1977) e *B. tenagophila* (Barracco et al. 1993). Este tipo de célula também tem sido referenciado em outros gastrópodes como *Turbo cornutus* (Donaghy et al 2010) e em *Lymnaea stagnalis* (Russo and Lagadic, 2004).

Foi identificado que estas células apresentaram um perfil polimórfico variando de circular a fusiforme. Os granulócitos também possuem projeções citoplasmáticas, alguns trabalhos têm inferido que os granulócitos apresentam maior número de projeções citoplasmáticas do que os hialinócitos (células com similaridade ao hialinócito do tipo I deste estudo) (Cheng and Auld, 1977; Barracco et al, 1993). No entanto, no nosso estudo pode ser demonstrado, a partir da microscopia ótica e eletrônica de transmissão, que o maior número de projeções citoplasmáticas foi identificado em hialinócitos do tipo I.

Cheng e Auld (1977) relataram que em *B. glabrata*, granulócitos compreendem 93,32% da população total de hemócitos na hemolinfa desses caramujos e hialinócitos compõe 6,68%. Estes resultados diferem dos encontrados neste trabalho, pois o tipo celular mais frequente foi o hialinócitos do tipo I (47%), seguido por células blásticas (45%), granulócitos (4%), hialinócitos do tipo II (2,5%) e hialinócitos do tipo III (1,5%). Proporções semelhantes foram encontradas em *B. straminea*: hialinócitos do tipo I (45%), seguido por células blásticas (44%), granulócitos (5%), hialinócitos do tipo II (4%) e hialinócitos do tipo III (2%).

No presente estudo foi observado que o hialinócito tipo I foi o segundo menor tipo celular encontrado na hemolinfa e o tipo de célula mais prevalente em *B. glabrata* e *B. straminea*. Cheng e Auld (1977) foram os primeiros a relatarem esse tipo de célula na hemolinfa de *B. glabrata*. Barracco et al. (1993) trabalhando com *B. tenagophila* também indicou o pequeno tamanho desta célula. Martins-Souza et al. (2009) conduzindo uma análise detalhada da hemolinfa de *B. glabrata* através de citometria de fluxo demonstrou que houve uma elevada frequência em hemócitos de pequeno tamanho em *B. glabrata*. Apesar dos autores não identificarem quem são os hemócitos pequenos, supõe-se que se tratam dos hialinócitos do tipo I e de células blásticas.

Cheng e Auld (1977) e Barracco et al (1993) observaram que hialinócitos de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, respectivamente, possuem uma pequena aderência além de emitirem poucas projeções citoplasmáticas. Por outro lado, os autores também descreveram que os granulócitos possuíam uma maior aderência a superfícies de vidro. Diferente dos dados encontrados por esses estudos, apesar dos dois tipos de célula possuem a capacidade de se aderir às superfícies, os hialinócitos possuem uma maior aderência por emitirem uma maior quantidade de projeções citoplasmáticas, este dado foi visualizado em todas as microscopias trabalhadas neste estudo. Foi identificado também que esta capacidade de emitir projeções citoplasmáticas foi maior em *B. glabrata* do que em *B. straminea*.

Barracco et al. (1993) trabalhando com *B. tenagophila* utilizando microscopia eletrônica de transmissão sugeriu que os hialinócitos são células imaturas. Neste estudo foi identificado que as células blásticas possuem características de células jovens, mas

os hialinócitos do tipo I é que possuem uma grande capacidade de se dividir, pois comumente foi encontrado estas células em divisão.

Os hialinócitos do tipo II e do tipo III são os novos tipos celulares encontrados na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea*. Estas células foram identificadas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de transmissão e não haviam sido descritas anteriormente em caramujos. Os hialinócitos do tipo II e do tipo III foram encontrados em pequenas proporções na hemolinfa representando 2,5% (hialinócitos tipo II) e 1,5% (hialinócitos tipo III) de todos os hemócitos de *B. glabrata* e 4% (hialinócitos tipo II) e 2% (hialinócitos tipo III) em *B. straminea*. Este pequeno número na quantidade dessas células na hemolinfa de ambos os caramujos podem explicar a ausência de dados na literatura sobre estes tipos celulares.

Em estudos destinados a elucidar os mecanismos que possam influenciar na suscetibilidade ou não de moluscos a organismos invasores, é essencial que seja dada atenção à compreensão dos hemócitos e de como estas células podem atuar na resposta imune.

Estes resultados sugerem a existência de cinco tipos de hemócitos circulantes em *B. glabrata* e *B. straminea*. A morfologia dos tipos celulares encontrados é bem semelhante nas duas espécies trabalhadas, porém existe a necessidade de uma avaliação funcional para que as funções destas células possam ser definidas. Estes resultados servem para gerar conhecimento para estudos futuros sobre os hemócitos e sua participação na resposta imunológica frente à infecção pelo *S. mansoni*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e Laboratório de Imunopatologia Professor Keizo Asami.

SUPORTE FINANCEIRO

Esta pesquisa teve apoio financeiro do Conselho Nacional Científico e Tecnológico, CNPq.

REFERÊNCIAS

Barracco, M.A., Steil, A.A., Gargioni, R., 1993. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 88, 73-83.

Bezerra, F.S., Nogueira-Machado, J.A., Chaves, M.M., Martins, R.L., Coelho, P.M., 1997. Quantification of the population and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 39, 197-201.

Brayner, F.A., Araujo, H.R.C., Cavalcanti, M.G.S., Alves, L.C., Peixoto, C.A., 2005. Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). Micron. 36, 359–367.

Cheng, T.C., Auld, K.R., 1977. Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. J Invertebr Pathol. 30, 119-22.

Donaghy, L., Hong, H.K., Lambert, C., Park, H.S., Shim, W.J., Choi, K.S., 2010. First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. Fish Shellfish Immunol. 28, 87-97.

Harris, K.R., 1975. The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*. Annals of the New York. Academy of Sciences. 266, 446–464

Johnston, L.A., Yoshino, T.P., 2001. Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. J Parasitol. 87, 786-93.

Lie, K.J., Jeong, K.H., Heyneman, D., 1987. Molluscan host reactions to helminthic infection. In Protozoa, Arthropods and Invertebrates (ed. Soulsby, E. J. L.), CRC-Press INC, Boca Raton, Florida, pp. 211–270.

Lo Verde, P.T., Gherson, J., Richards, C.S., 1982. Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*, fine structure. Dev Comp Immunol. 31, 999

Martins-Souza, R.L., Pereira, C.A., Coelho, P.M., Martins-Filho, A.O., Negrão-Corrêa, D., 2009. Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. Parasitology. 136, 67-76.

Martins-Souza, R.L., Pereira, C.A., Coelho, P.M., Negrão-Corrêa, D., 2003. 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. 91, 500-7.

Matricon-Gondran, M., Letocart, M., 1999. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. J Invertebr Pathol. 74, 224-34.

Oliveira, A.L., Levada, P.M., Zanotti-Magalhaes, E.M., Magalhães, L.A., Ribeiro-Paes, J.T., 2010. Differences in the number of hemocytes in the snail host *Biomphalaria tenagophila*, resistant and susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. Genet Mol Res. 21, 2436-45.

Paraense, W.L., 2001. The schistosome vectors in the Americas. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96, 7- 16. Review.

Russo, J., Lagadic, L., 2004. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). Environ Pollut. 127, 303-11. 15

Souza, C.P., Jannotti-Passos, L.K., Freitas, J.R., 1995. Degree of host-parasite compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 90, 5-10.

Travers, M.A., Silva, P.M., Goïc, L.N., Marie, D., Donval, A., Huchette, S., Koken, M., Paillard, C., 2008. Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. Fish Shellfish Immunol. 24, 400-11.

Van der Knaap, W.P., Loker, E.S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitol Today. 6, 175-82.

Yoshino, T.P., Boyle, J.P., Humphries, J.E., 2001. Receptor-ligand interactions and cellular signalling at the host-parasite interface. Parasitology. 123, 143-57.

ARTIGO 2

5.2 ARTIGO 2

Perfil da resposta celular de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) infectados pelo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)

Cavalcanti, M. G. S.^{1, 2, 3}; Mendonça, A. M. B.³; Docena, Cássia⁴; Padilha, R. J. R.⁵; Barbosa, C. C. G. S.³; De Castro, C. M. M. B.^{2, 5}; Alves, L. C.^{3, 5}; Brayner, F. A.^{2, 3, 5}

¹ Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade de Federal da Paraíba (UFPB) - PB, Brasil.

² Departamento de Medicina Tropical, Universidade de Federal de Pernambuco Recife - PE, Brasil.

³ Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), Recife - PE, Brasil.

⁴ Núcleo de Tecnologia Integrada (NIT), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), Recife - PE, Brasil.

⁵ Laboratório de Imunopatologia Profº. Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil.

Endereço para correspondência:

Dr. Fábio André Brayner

Departamento de Parasitologia

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE

CEP 50670-420, Recife, Pernambuco - Brazil.

e-mail: brayner@cpqam.fiocruz.br

Fone: +55 81 2101-2643

Fax: +55 81 2101-2516

RESUMO

O estudo dos hemócitos de *Biomphalaria* é de grande importância para a compreensão dos mecanismos de defesa contra o *Schistosoma mansoni*, bem como contribui para um melhor entendimento sobre os processos que podem interferir na suscetibilidade ou não à infecção pelo parasita. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações morfológicas, a dinâmica hemocitária e a presença de resíduos de carboidratos em hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* infectados pelo *S. mansoni*. Para o presente estudo foram utilizados caramujos infectados com 10 miracídios. A hemolinfa dos mesmos foi adquirida por punção cefalopodal. Para a avaliação morfológica as células coletadas foram analisadas utilizando o microscópio de campo claro, contraste de interferência diferencial e eletrônico de transmissão. A análise de resíduos de carboidratos foi realizada utilizando cinco lectinas (UEA, DBA, LCA, BS-I e WGA). A avaliação cinética das células foi realizada através de hemocitômetro. Na hemolinfa das duas espécies trabalhadas, identificamos cinco tipos celulares: células blásticas, granulócitos, hialinócito do tipo I, hialinócitos do tipo II e hialinócitos do tipo III. Desses tipos celulares observamos diferenças morfológicas relacionados à infecção em células blásticas (*B. glabrata*), granulócitos (*B. straminea*) e hialinócitos do tipo I (*B. glabrata* e *B. straminea*). Estas modificações resumem-se a alteração no formato da célula, aumento na quantidade de projeções citoplasmáticas, tendência à formação de agregados celulares, liberação de grânulos e aumento na reserva de glicogênio. Em relação à marcação com lectinas, nos hemócitos de ambas as espécies, foram observadas uma maior marcação nos resíduos de carboidratos após a infecção. Na avaliação cinética identificamos variações nos mesmos tipos celulares em *B. glabrata* e *B. straminea*. As células que apresentaram sua cinética alterada após a infecção foram: células blásticas, granulócitos e hialinócitos do tipo I. Neste trabalho identificamos alterações morfológicas e cinéticas nos mesmos tipos celulares das duas espécies de caramujos o que indica que tais células podem estar relacionadas no processo de defesa e provavelmente podem interferir numa maior ou menor suscetibilidade dos caramujos à infecção pelo *S. mansoni*.

Palavras-chave: *Biomphalaria glabrata*. *Biomphalaria straminea*. Contagem de Células. Morfologia. Lectinas. *Schistosoma mansoni*.

INTRODUÇÃO

Apesar da disponibilidade de evidências experimentais que demonstram a suscetibilidade de muitas espécies de *Biomphalaria*, no Brasil a transmissão pelo *Schistosoma mansoni* ocorre em ambientes colonizados por caramujos da espécie *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (Carvalho et al. 2007).

O *B. glabrata* e *B. straminea* apresentam diferentes níveis de susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*. Das espécies de vetores no Brasil, *B. glabrata* é mais suscetível à infecção por diferentes cepas geográfica de *S. mansoni* (Dias et al. 1987). *B. straminea* é indicado como uma espécie em expansão do norte ao sul do Brasil, tornando-se um importante vetor biológico no Nordeste, embora muitos expressam baixas taxas de infecção em diferentes cepas (Machado-Silva et al 1995, 2000; Fernandez and Thiengo 2002).

O sucesso evolutivo do *S. mansoni* no caramujo depende de fatores como: condições ambientais, compatibilidade bioquímica e fisiológica entre parasita e hospedeiro intermediário, mecanismos de adaptação do parasita ao corpo do caramujo e a defesa imunológica desenvolvida pelo hospedeiro (Van Der Knaap and Loker 1990; Hahn et al, 2001a, 2001b; Negrão-Corrêa et al 2008).

Quando em contato com o agente infeccioso, o mecanismo de defesa interno do molusco é ativado imediatamente. Participam deste processo de defesa a resposta humoral (fatores solúveis) e células circulantes (hemócitos) que estão presentes na hemolinfa (Vargas-Albores and Barracco 2001).

Sabendo-se que *B. glabrata* e *B. straminea* possuem respostas imunológicas distintas contra o mesmo patógeno e que a resposta celular é um importante mediador de defesa, o presente estudo descreve a comparação morfológica, dinâmica hemocitária e especificidade a lectinas em hemócitos das espécies *B. glabrata* e *B. straminea* após a infecção pelo *S. mansoni*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Criação e Manutenção de Caramujos

Caramujos das espécies *B. straminea* e *B. glabrata* (provenientes de São Lorenzo da Mata, Pernambuco, Brasil) (-08° 00' 08" S -35° 01' 06" W) foram utilizados ao longo deste estudo. Esses caramujos foram criados e mantidos no moluscário do Laboratório de Esquistossomose, Departamento de Parasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, Pernambuco, Brasil.

Os caramujos foram mantidos em aquários contendo água desclorada a 26 °C e foram alimentados com folhas de alface *ad libitum*. O tamanho dos caramujos utilizados no experimento foi padronizado, tanto em *B. glabrata* (9mm ± 1mm) como em *B. straminea* (4mm ± 1mm).

Infecção de Caramujos

Cada molusco foi colocado individualmente na presença de 10 miracídios (cepa Belo Horizonte, Brasil) e ficaram expostos à luz artificial por um período de aproximadamente duas horas.

Organização dos Grupos

Para fins comparativos, caramujos de cada espécie foram distribuídos em dois grupos: grupo 1 - caramujos não infectados (submetidos ao estresse da infecção sem miracídios) e grupo 2- caramujos infectados (submetidos ao estresse da infecção com miracídios). Todos os grupos foram acompanhados durante 2 horas, 15 e 30 dias. Esses períodos representam a penetração de miracídios, desenvolvimento de esporocistos e liberação de cercarias, respectivamente.

Coleta de Hemolinfa

A hemolinfa foi coletada por meio de uma punção na região cefalopodal utilizando uma micropipeta de vidro siliconizada, após a concha dos caramujos terem sido limpas com álcool a 70% e, posteriormente, colocada para secar em papel absorvente.

Caracterização dos Hemócitos

Microscopia de campo claro (MCC): A hemolinfa de cada caramujo foi coletada diretamente sobre uma lâmina de vidro e deixada secar em temperatura ambiente por um período de 20 a 30 minutos. Cada poço contém 5µl de hemolinfa e em cada lâmina foi utilizada a hemolinfa de 10 caramujos diferentes. Posteriormente, as células foram fixadas em metanol por 10 min. Após a fixação, os hemócitos foram corados com Giemsa (1:9) diluídos em água destilada tamponada por 10-15 minutos e lavados com água destilada tamponada montados com Entellan e observadas ao microscópio de campo claro (Brayner et al. 2005).

Microscopia de Contraste de Interferência Diferencial (MCID): Para visualização dos hemócitos vivos foi feito um pool utilizando a hemolinfa de 5 caramujos (5µl por caramujo). O pool coletado foi diluído em meio GRACE (1:10). A solução de células foi depositada diretamente em placas de cultura de células (MatTEK) e deixada em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois disso, os hemócitos foram examinados utilizando MCID (Leica microscópio confocal SP2).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): a hemolinfa total de pelo menos 50 caramujos foi fixada em uma solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M em pH 7,2. A amostra foi lavada em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e pós-fixada com tetróxido de ósmio (1%) em tampão cacodilato por uma hora. Em seguida, foi realizada a desidratação em uma série crescente de acetona. As amostras foram incluídas e emblocadas em resina Epon. Posteriormente, cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante e depois contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo para serem observados e fotografados em um microscópio eletrônico Jeol JEM 100CX.

Marcação com Lectinas

Os hemócitos foram caracterizados através de cinco lectinas conjugadas à fluoresceína (FITC). As lectinas utilizadas foram: UEA (*Ulex europaeus*), com especificidade para L-fucose; DBA (*Dolichos biflorus*), com especificidade para resíduos de N-acetyl- α -D-galactosaminy; LCA (*Lens culinaris*), específico para α -D-mannosyl e

α -D-glucosyl; BS-I (*Bandeirea simplicifolia*), específico para α -D-galactosyl e N-acetyl- α -D-galactosaminyl e WGA (*Triticum vulgaris*) com especificidade para N-acetyl- β -D-glucosaminyl e N-acetyl- β -D-glucosamine oligomers. A hemolinfa coletada foi diluída em meio GRACE (1:50). A amostra foi colocada em lâminas e deixadas em câmara úmida por aproximadamente 30 minutos para aderência dos hemócitos. Posteriormente, as lâminas foram retiradas da câmara úmida e processadas a temperatura ambiente. Os hemócitos foram fixados com metanol a 70% durante 15 minutos. Após a fixação, os hemócitos foram lavados em PBS 7.2/BSA 1%/TRITON X-100 0,1% por 30 minutos. As amostras foram incubadas em câmara úmida escura com as lectinas (diluídas em PBS/TRITON X-100 na concentração de 1:100) durante 1 hora. Posteriormente, os hemócitos foram lavados 3 vezes em PBS, pH 7.2 e depois foi utilizado ProLong® Gold antifade reagente com DAPI (marcador nuclear, Invitrogen), para montagem entre lâmina e lamínula e posterior análise no microscópio confocal a laser.

Contagem Total e Diferencial dos Hemócitos

Um volume total de 10 microlitros de hemolinfa diluída fresca em meio GRACE (1:1) coletados através de um microcapilar de vidro siliconizado. A amostra foi imediatamente colocada em um hemocitômetro estéril e descartável (Neubauer, iNCYTO C-Chip DHC-N01, www.incyto.com com 10 μ l de capacidade). O número de células em quatro quadrados foi contado através de um microscópio de luz (objetiva 40X), e o número total de hemócitos por caramujo foi determinado. A contagem dos tipos de células individuais foi realizada simultaneamente, e as proporções em percentagens foram determinadas por caramujos individuais. A contagem dos hemócitos foi confirmada em três experimentos independentes. Para cada experimento, grupos de seis caramujos foram analisados individualmente e o número total de células ou a proporção de cada população de células foram expressos através de média aritmética.

Análise Estatística

A contagem total e diferencial dos hemócitos foi avaliada e comparada pelo teste t de Student. Com nível de confiança de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Tipos de hemócitos e morfologia

Em ambas as espécies de caramujos (*B. glabrata* e *B. straminea*) foi identificado cinco tipos celulares na hemolinfa: células blásticas (BL), granulócitos (GR), hialinócito do tipo I (HY1), hialinócito do tipo II (HY2) e hialinócito do tipo III (HY3) (Fig. 1, 2, 3 e 4). As alterações morfológicas observadas em alguns hemócitos, que provavelmente estão relacionadas à infecção, foram visualizadas tanto na MCC, MCID e MET.

Figura 1 (A-E): Microscopia de luz e de contraste de interferência diferencial dos hemócitos de *B. glabrata* infectados com miracídios de *S. mansoni*. (A) Células blásticas: foi o menor tipo celular encontrado na hemolinfa. Observar o núcleo grande (N) e citoplasma escasso, esta célula após a infecção passou a ficar mais alongadas e com mais projeções citoplasmáticas (cabeça de seta). (B) Granulócitos: esta célula é caracterizada pela presença de grânulos (seta). O núcleo (N) encontra-se deslocado. Os granulócitos apresentaram poucas alterações morfológicas. (C) Hialinócitos do tipo I: células com vacúolos (*) e bastante filopódios (cabeça de seta), o núcleo encontra-se excêntrico (N). (D) Hialinócitos tipo II: visualizar a presença de filopódios (cabeça de seta). (E) Hialinócitos tipo III: visualizar filopódios (cabeça de seta) com núcleo grande (N) e, da mesma forma que o HY2, excêntrico. Barras=10µm.

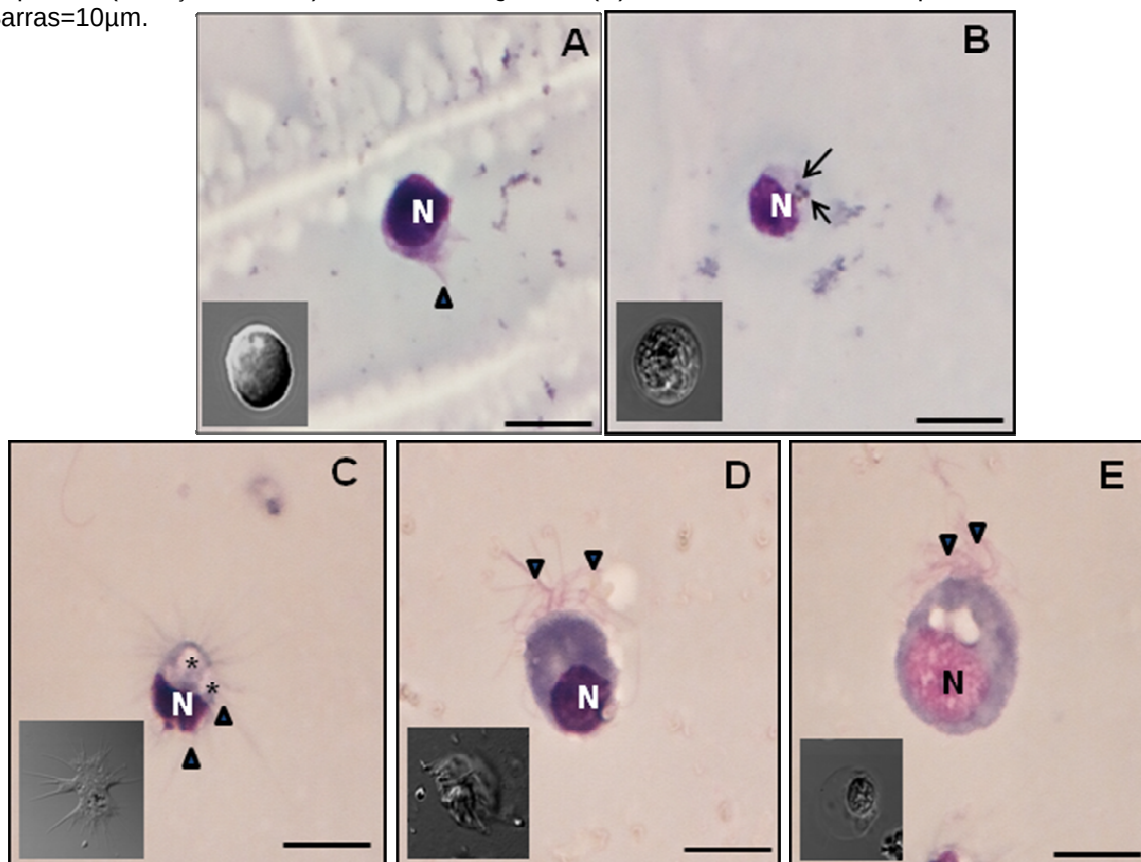


Figura 2 (A-E): Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão: hemócitos de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni*. (A) Células blásticas: presença de retículo endoplasmático (seta) e projeção citoplasmática (seta aberta). Observar que esse tipo celular encontra-se mais alongado. (B) Granulócito: presença de grânulos formados (g) e vazios (eg), ilhas de glicogênio (G), retículo endoplasmático (seta) e filopódios (seta aberta). (C) Hialinócito tipo I: notar a presença de muitas projeções citoplasmáticas (seta aberta) e formação de vacúolos pinocíticos (v). Ficou evidente, neste tipo celular, a presença de ilhas de glicogênio (G) mais abundantes do que os granulócitos. (D) Hialinócito tipo II: poucas alterações identificadas. O núcleo é deslocado com citoplasma homogêneo, observa-se também poucas vesículas (v). (E) Hialinócito tipo III: assim como o HY2, apresenta núcleo excêntrico (N). Esta célula apresentou muitas mitocôndrias (m) no citoplasma. Barras= 1µm.

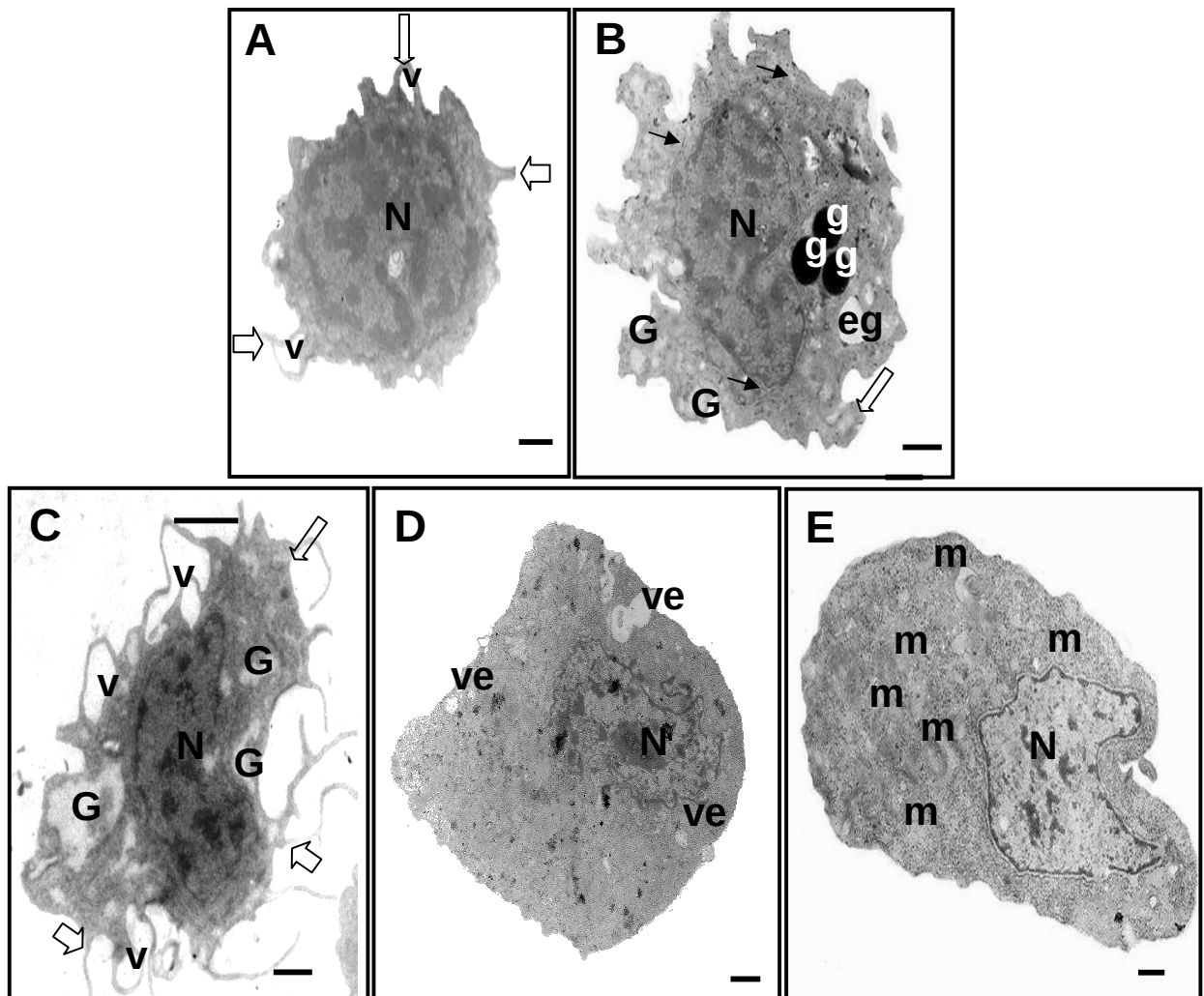


Figura 3 (A-E): Microscopia óptica e de Contraste de interferência diferencial dos hemócitos de *B. straminea* após a infecção por *S. mansoni*. (A) Células blásticas: identificar uma elevada relação núcleo/citoplasma. (B) Granulócito: liberação de grânulos após 1 hora de infecção pelo *S. mansoni*. (C) Hialinócito tipo I: células pequenas que se caracterizam pela presença de projeções citoplasmáticas. (D) Hialinócito tipo II são células basófila com núcleo excêntrico (N), observar a presença de projeções e formação de vacúolos (asterisco). (E) Hialinócito tipo III da mesma forma que HY2 apresentou poucas modificações morfológicas, este tipo celular apresenta um núcleo grande e excêntrico (N). Barras= 10µm.

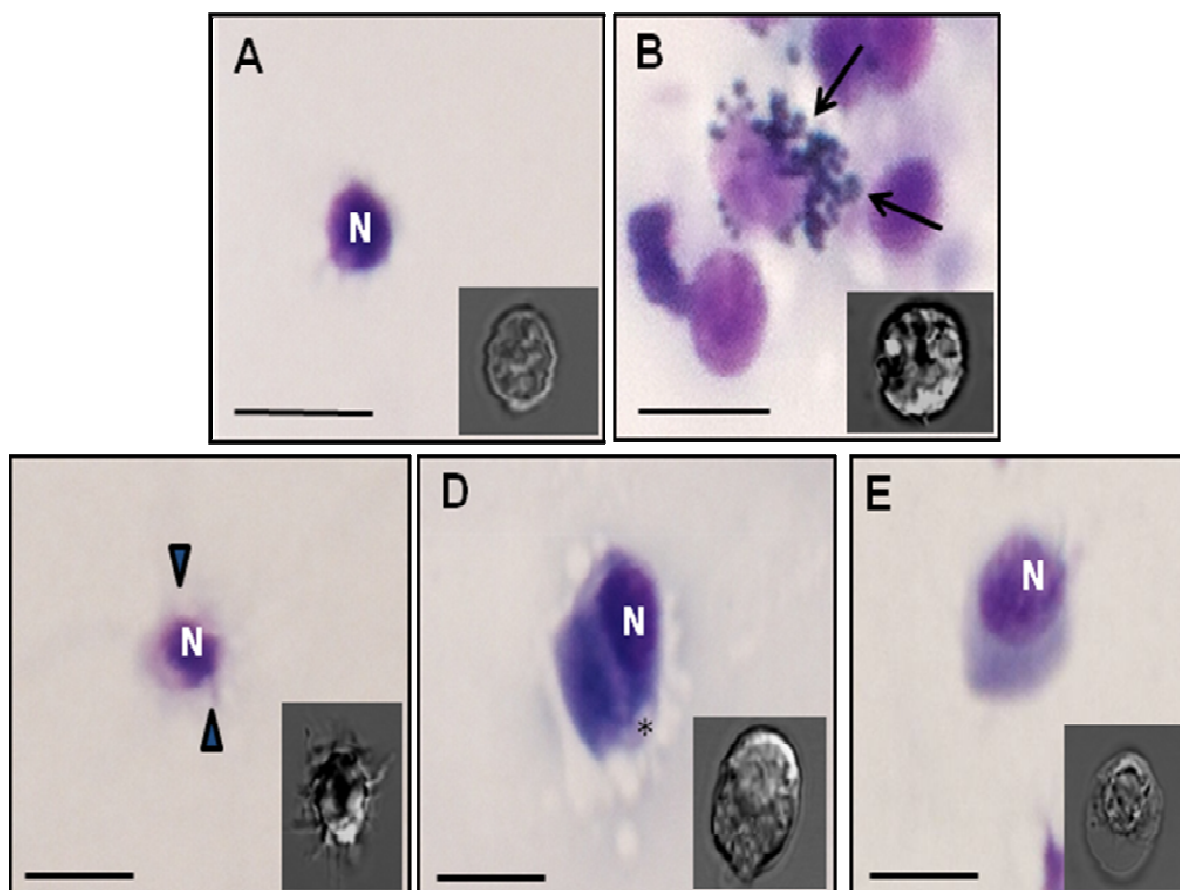
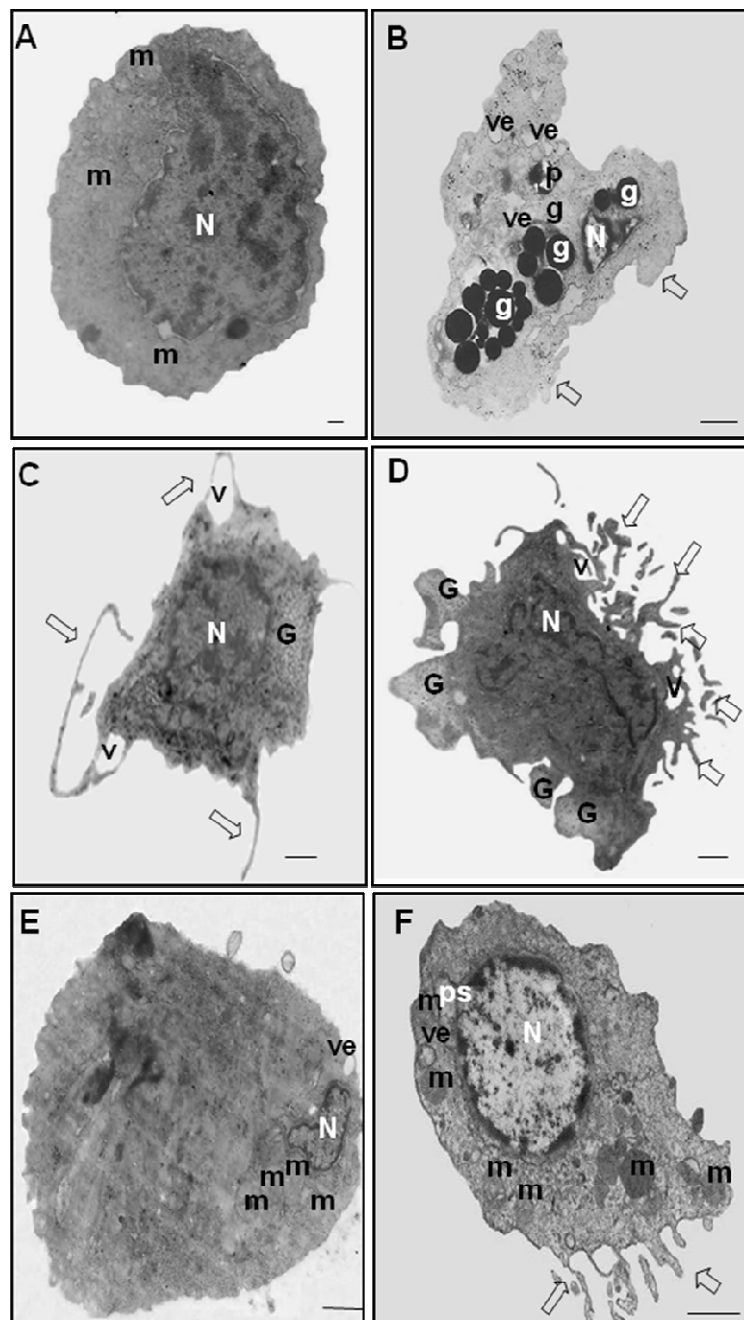


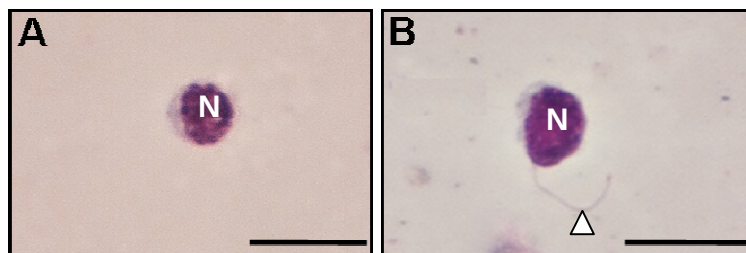
Figura 4 (A-F): Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão: hemócitos de *B. straminea*. (A) Células blásticas de caramujos infectados: não apresentou alterações visíveis, possui núcleo grande (N) e citoplasma escasso com presença de mitocôndrias (m). (B) Granulócito: presença de grânulos formados (g) e parcialmente formados (pg), vesícula (ve) e filopódios (seta aberta) os granulócitos de *B. straminea* apresentaram um número superior de grânulos em relação ao *B. glabrata*, mas morfologicamente não exibiram diferenças morfológicas na ultra-estrutura. (C) Hialinócito do tipo I de caramujos sadios: presença de projeções citoplasmáticas (seta aberta), porém em menor quantidade do que em caramujos infectados (D), encontramos também ilhas de glicogênio (G) e vacúolos (V). (D) Hialinócito tipo II de caramujos infectados: o núcleo é deslocado com citoplasma homogêneo, observa-se também poucas vesículas (v) e algumas mitocôndrias (m). (E) Hialinócito tipo III: apresenta núcleo excêntrico (N) com espaço perinuclear (ps). Observar também a presença de mitocôndrias eletrodensas (m), vesícula (ve) e núcleo grande (N), tanto o HYII quanto o HYIII apresentou poucas diferenças morfológicas em relação aos caramujos não infectados. Bars= 1µm.



Células Blásticas:

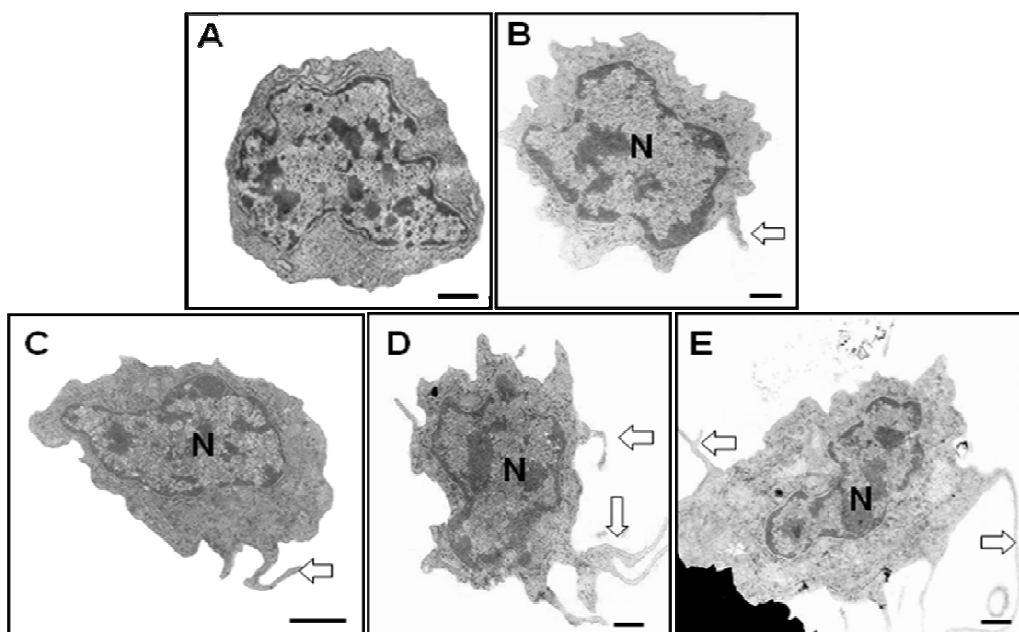
As células blásticas em *B. glabrata* (passaram a apresentar alterações no formato da célula ficando mais alongadas e com projeções (Fig 5 e 6 B-D).

Figura 5 (A-B): Comparação da célula blástica de *B. glabrata* sadios (A) e infectados (B) pelo *S. mansoni* visualizados através da microscopia de luz. Observar alteração na morfologia da célula e presença de projeções (cabeça de seta). Barras=10µm.



Suspeita-se que estas alterações sejam compatíveis com o processo de diferenciação celular, ou seja, a célula blástica passou a apresentar características morfológicas semelhantes ao HY1 (Fig. 6 E). Porém, tal afirmação só poderia ser confirmada se houvesse um acompanhamento dessas células em cultura, o que não foi realizado no presente trabalho. Em *B. straminea* estas células estimuladas com o *S. mansoni* não apresentaram alterações morfológicas consideráveis (Fig. 4 A).

Figura 6 (A-E): Possível diferenciação de células blásticas em *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* através da MET. (A) Células blásticas de caramujos sadios sem projeções visíveis. (B-D) Observar diferenças morfológicas nas células em caramujos infectados, visualizar as alterações morfológicas que levam as células blásticas a ficarem semelhantes ao HY1 (E) Barras=1µm.

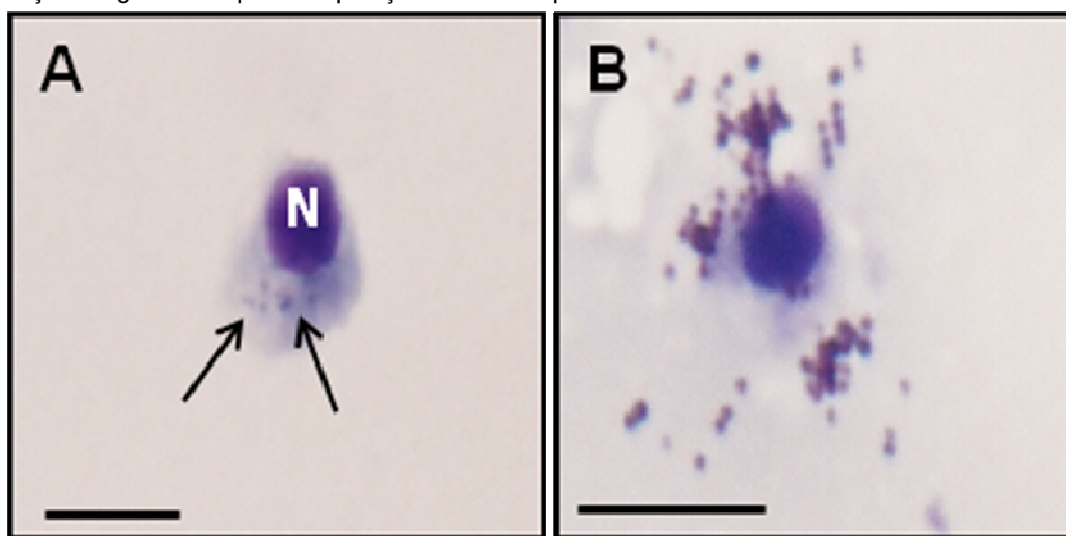


Granulócitos:

Os granulócitos de *B. glabrata* (Figs. 1 B e 2 B) se mostraram menos modificados morfologicamente do que os GRs de *B. straminea* (Figs. 3B e 4B). Em *B. straminea* apesar do número de grânulos não variarem em relação aos caramujos não desafiados tais grânulos possuíam diferentes tamanhos e se apresentavam concentrados em determinadas regiões do citoplasma.

Através da microscopia óptica foi possível caracterizar uma maior degranulação em *B. straminea* à infecção na primeira hora após a exposição aos miracídios (Fig. 7 e 8), tal resposta não foi identificada em *B. glabrata*.

Figura 7 (A-B): Comparação das alterações celulares dos granulócitos na microscopia de luz de *B. straminea* sadios e infectados pelo *S. mansoni*. (A) Granulócitos: de caramujos sadios, identificar grânulos no interior do citoplasma. (B) Granulócitos após a infecção pelo *S. mansoni*, visualizar externalização de grânulos após a exposição Barras=10µm.

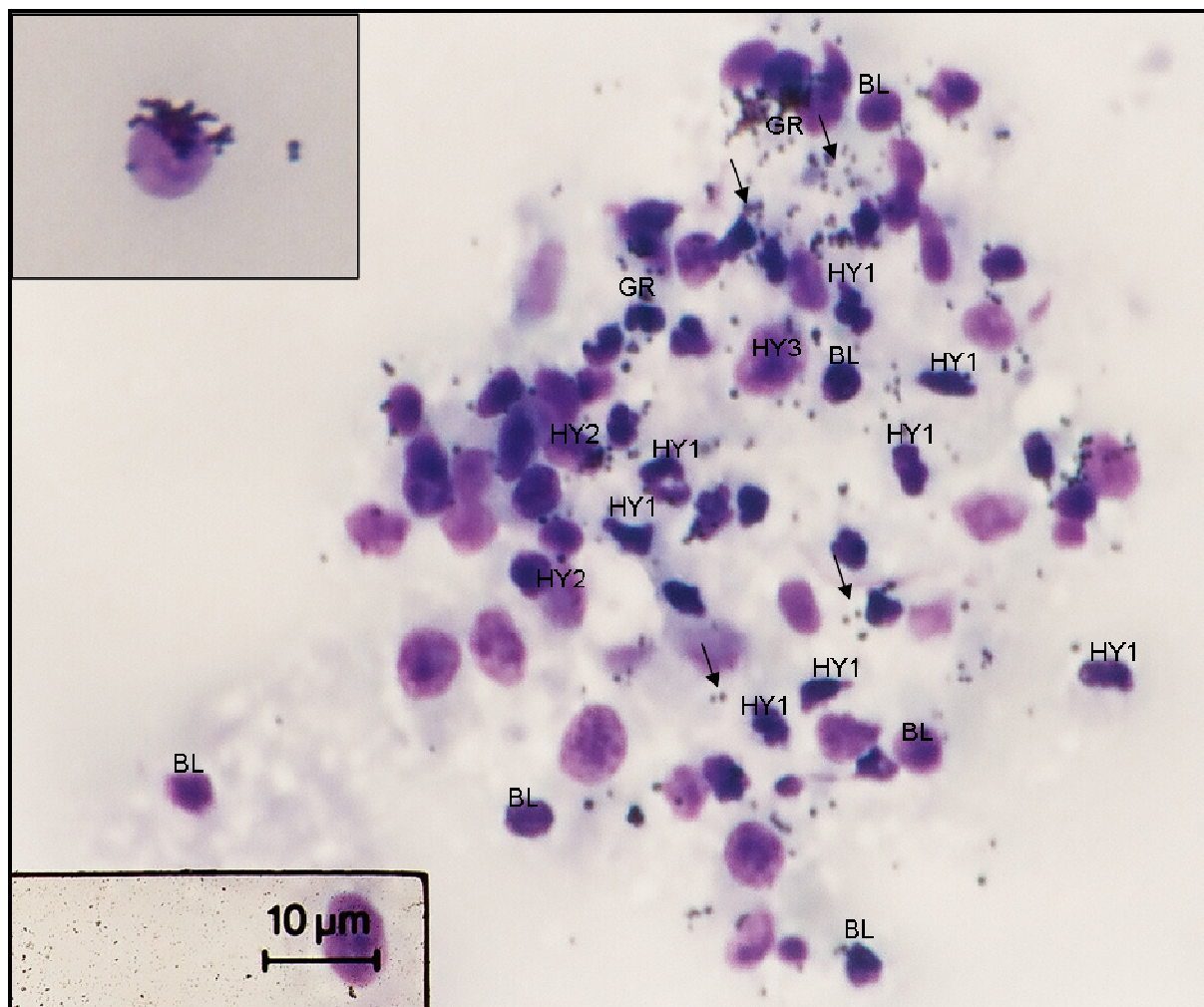


Em *B. glabrata* os granulócitos possuíam grânulos eletrodensos e em diferentes estágios de maturação. Os grânulos já formados se localizavam geralmente bem próximos. Foi identificado também: retículo endoplasmático rugoso, grânulos de glicogênio e ribossomos livres (Fig. 2 B).

Os granulócitos de *B. straminea* apresentaram também uma maior quantidade de retículo endoplasmático rugoso e de ribossomos livres. Foi observado também a

presença de mitocôndrias, complexo de Golgi e grânulos em processo de formação (Fig. 4 B).

Figura 8: Microscopia ótica dos hemócitos de *B. straminea* infectados com *S. mansoni*. Células blásticas (BL). Granulócitos (GR), Hialinócitos do tipo I (HY1), Hialinócitos do tipo II (HY2), Hialinócitos do tipo III (HY3), visualizar grânulos (setas) liberados pela degranulação dos granulócitos. Barra= 10µm

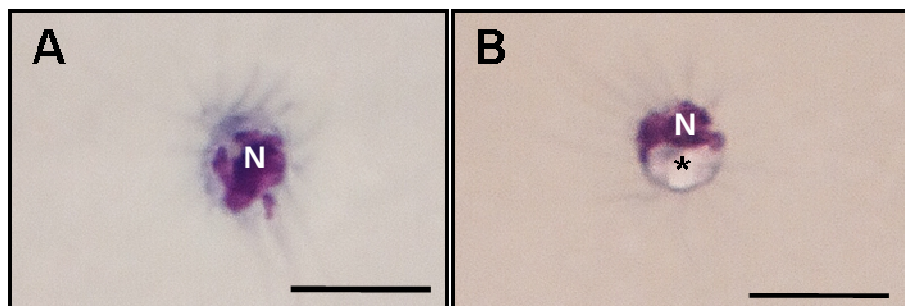


Hialinócitos do tipo I:

Os hialinócitos do tipo I foram as células mais alteradas morfologicamente. A emissão de projeções citoplasmáticas (pseudópodes e filopódios) é uma característica comum tanto em *B. glabrata* (Figs. 9 e 10) como em *B. straminea* (Figs. 4 C e 4 D), porém, após a infecção, observamos uma acentuação nestas características. Por conta

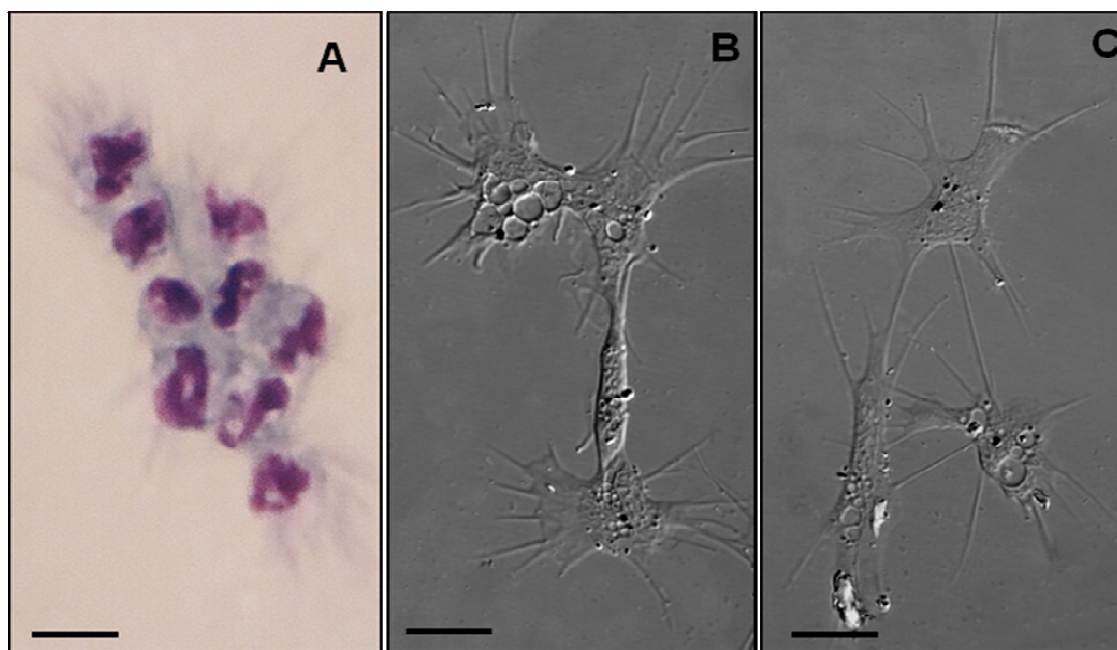
do aumento nas projeções observamos também uma maior variação no tamanho dessas células nas duas espécies de caramujos.

Figura 9 (A-B): Hialinócitos do tipo I de *B. glabrata* sadios (A) e infectados (B) com *S. mansoni* visualizados através da microscopia óptica. Observar a presença de material translúcente (*) e deslocamento do núcleo na célula infectada (N). Barras=10µm



Em *B. glabrata* os hialinócitos do tipo I agregavam-se através de suas projeções formando aglomerados celulares (Fig. 10). Tais achados não foram encontrados em *B. straminea* que, apesar de apresentarem muitos filopódios e pseudópodes estes, numericamente e em tamanho, eram bem inferiores aos de *B. glabrata*.

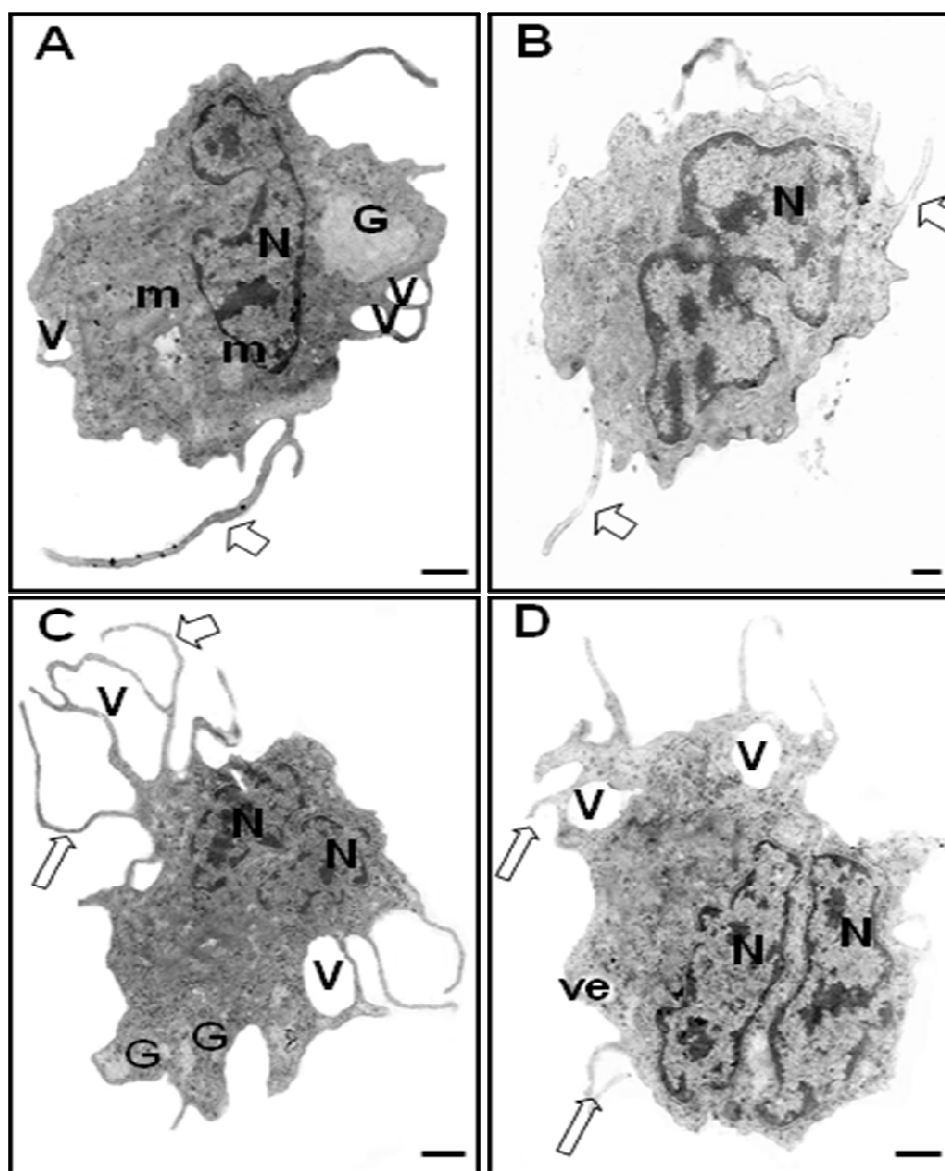
Figura 10 (A-B): Hialinócitos do tipo I de *Biomphalaria glabrata* infectados com *S. mansoni* visualizados através da microscopia óptica (A) e corados com Giemsa e através da microscopia de interferência diferencial (B-C). Observar a adesão celular através de filopódios. Barras=10µm



Após a infecção com o *S. mansoni*, os hialinócitos tipo do I em ambas as espécies de caramujo apresentaram uma maior quantidade de vacúolos, e em algumas células podemos observar regiões com vacúolos múltiplos (Fig. 11).

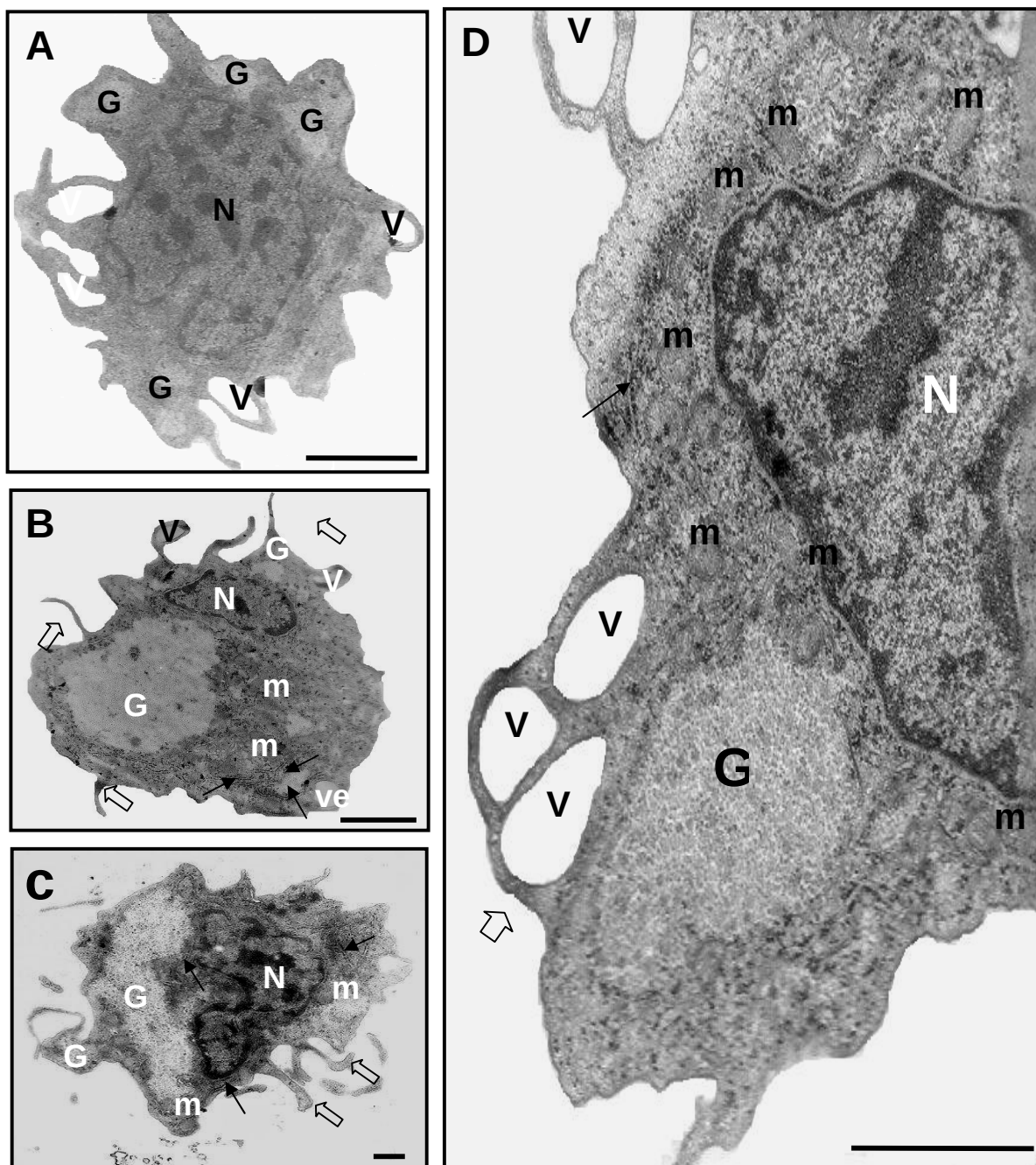
Tanto em *B. glabrata* como em *B. straminea* os hialinócitos do tipo I frequentemente apresentavam-se em processo de divisão celular (Fig. 11).

Figura 11 (A-D): Divisão nuclear de HY1 de *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* (microscopia eletrônica de transmissão). Observar as características morfológicas desse tipo celular após a infecção por *S. mansoni*: presença de ilhas de glicogênio (G), vacúolos (v), vesículas (ve) e bastante pseudópodes (seta aberta). Em todas as micrografias observa-se as etapas da divisão nuclear que culminará na divisão da célula. Barras=1µm.



Foi identificado também um aumento na quantidade de grânulos de glicogênio no citoplasma das duas espécies (Fig. 12 A-D). Em algumas células foi possível observar que a reserva de glicogênio ocupa grande parte da celular (Fig. 12 B-C).

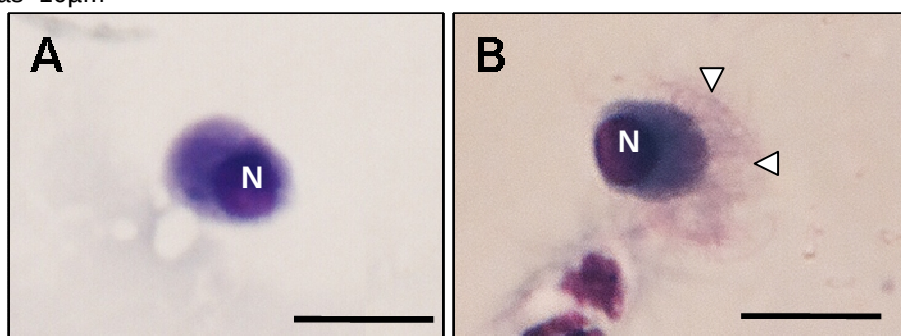
Figura 12 (A-D): Micrografias de hialinócito do tipo I de *B. glabrata* SADIO e INFECTADO com miracídeos de *S. mansoni* (microscopia eletrônica de transmissão). (A) Observar pequenas reservas de glicogênio (G) em HYI de caramujos não expostos e grandes quantidades em caramujos desafiados (B-D), observa-se também vacúolos (ve), vesículas (V), mitocôndrias (m) e muitas projeções citoplasmáticas (seta aberta). Barras=1µm.



Hialinócitos do tipo II

Neste tipo celular não foram encontradas muitas alterações após a infecção com miracídios de *S. mansoni* (Fig. 13). Na MCC e MCID, tanto em *B. glabrata* (Fig. 1 D e 13 B), como em *B. straminea* (Fig. 3 D) observamos projeções citoplasmáticas localizadas. Na ultra-estrutura não foi possível observar estas projeções em *B. glabrata* e *B. straminea* (Figs. 2 D e 4 E, respectivamente).

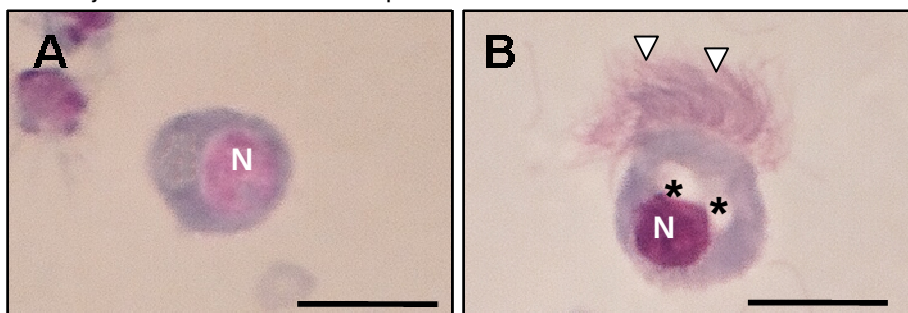
Figura 13 (A-B): Hialinócitos do tipo II de *Biomphalaria glabrata* sadios (A) e infectados (B) com *S. mansoni* visualizados através da microscopia óptica. Visualizar a presença de projeções (cabecinhas de seta). Barras=10µm



Hialinócitos do tipo III

Neste terceiro tipo de hialinócito foi identificado que as maiores alterações morfológicas foram evidenciadas em *B. glabrata* utilizando a MCC, pois esta célula apresentou um aumento no diâmetro celular e uma maior quantidade de projeções citoplasmáticas quando comparado ao controle (Fig. 14). Na MET os hialinócitos tipo III mostraram-se semelhantes ao grupo não infectado, cuja principal característica é a presença de várias mitocôndrias (Fig. 2 E).

Figura 14 (A-B): Microscopia óptica de hialinócitos do tipo III de *B. glabrata* sadios (A) e infectados (B) com *S. mansoni*. Observar material translúcente (*) e projeções citoplasmáticas (cabecinhas de seta) nas células de caramujos infectados. Barras=10µm



Em *B. straminea* não foi evidenciada alteração relacionada à infecção, porém, da mesma forma que em *B. glabrata*, foram identificados muitas mitocôndrias (Fig. 4F).

Marcação com Lectinas-FITC

O perfil de marcação de lectinas conjugadas a FITC pode ser visualizado na tabela 1 e figuras 15 e 16. Em relação à marcação com lectinas observamos que o HY1 foi o único tipo celular que possuiu resíduos de carboidratos detectados por todas as lectinas trabalhadas e este dado foi observado tanto em *B. glabrata* como em *B. straminea* (Tabela 1).

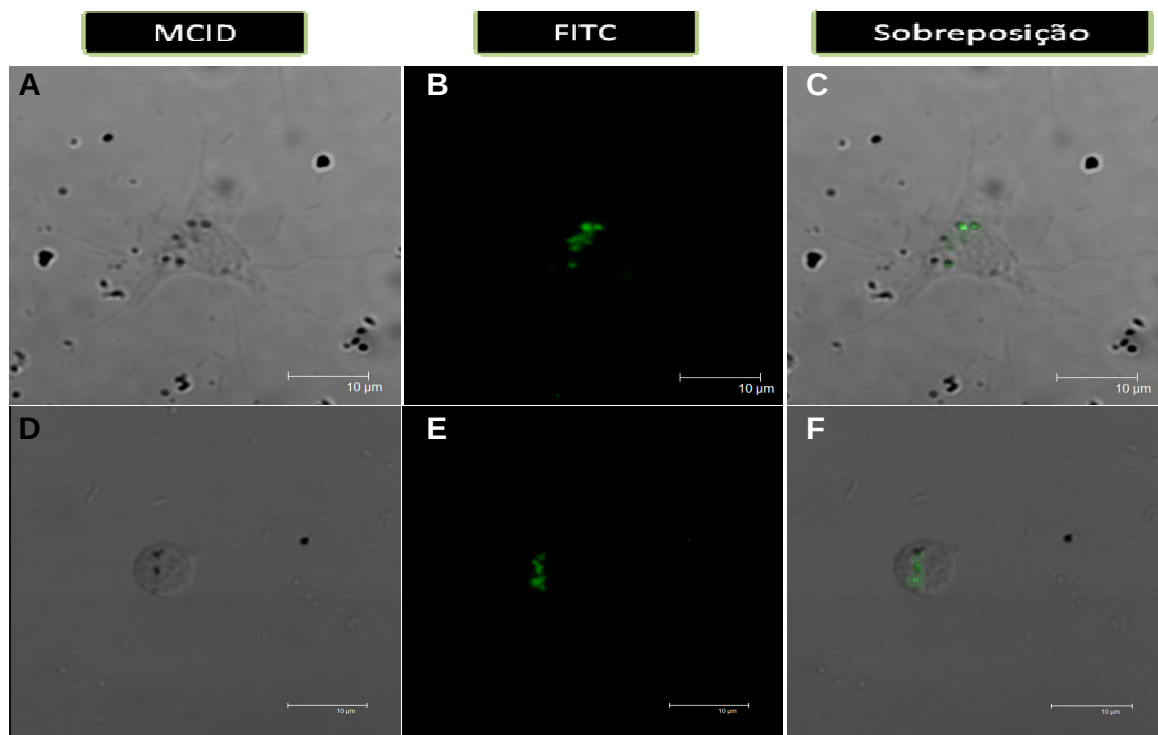
Tabela 1: Intensidade de marcação com lectinas-FITC em hemócitos de caramujos *B. glabrata* e *B. straminea* sadios e infectados por *S. mansoni*.

Nota: (-): ausência de marcação, (+): marcação fraca, (++) marcação moderada, (+++) marcação forte

LECTINAS	<i>B. glabrata</i> SADIO					<i>B. glabrata</i> INFECTADO					<i>B. straminea</i> SADIO					<i>B. straminea</i> INFECTADO				
	BI	Gr	Hy1	Hy2	Hy3	BI	Gr	Hy1	Hy2	Hy3	BI	Gr	Hy1	Hy2	Hy3	BI	Gr	Hy1	Hy2	Hy3
UEA	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	-	++	++	-	+	++	+	+++	-	++
DBA	+	+	++	+	+	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+++	+	+++	+	+++	+++	+
LCA	-	-	+	-	-	+++	+	+++	++	-	+	-	++	-	-	+++	++	+++	-	-
BS-I	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++	+	+
WGA	+++	++	++	++	-	+++	++	++	++	-	-	++	++	+	-	+++	++	++	+	-

Foi evidenciado também um aumento na marcação após a infecção na maioria dos tipos celulares de *B. glabrata* e *B. straminea*, ou seja, após a exposição aos miracídios de *S. mansoni* as células passaram a expressar mais resíduos de carboidratos específicos para as lectinas trabalhadas. Com exceção dos granulócitos marcados moderadamente pela lectina UEA em *B. straminea* sadios e, posteriormente, marcados fracamente após a infecção. Pode-se observar que as lectinas UEA, DBA e BS-I em *B. glabrata* (sadios e infectados) e DBA, BS-I em *B. straminea* marcaram todos os tipos de hemócitos (Tabela 1).

Figura 15 (A-F): Hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* sadios visualizados através do Microscópio Confocal: **(A-C)**: observar marcação fraca nos HY1 de *B. glabrata* sadios após a marcação com BS-I-FITC. **(D-F)**: identificar marcação fraca em GR de *B. straminea* sadios com DBA-FITC. Barras=10µm.

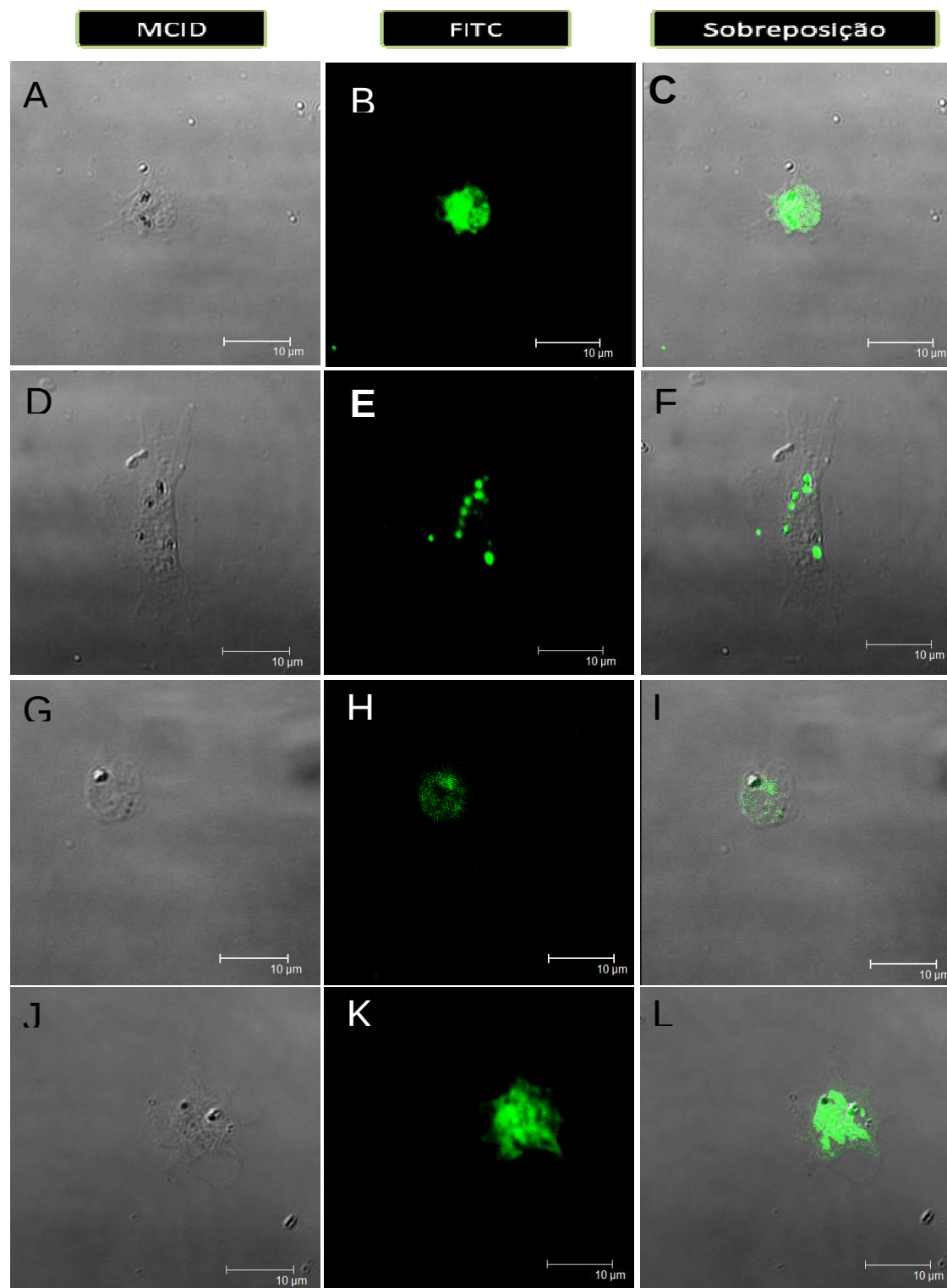


Na figura 15 (A-F) podemos identificar o perfil de marcação dos hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* não expostos ao *S. mansoni*. Observar que tanto o hialinócito do tipo I marcado com BS-I-FITC de *B. glabrata* como o granulócito de *B. straminea* (marcados com DBA-FITC) se apresentam fracamente marcados e a distribuição dessa marcação mostrou-se bem localizada.

Na figura 16 (A-L) observamos o perfil de marcação em hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* expostos ao *S. mansoni*. Na figura 16 (A-C) observamos uma forte marcação com DBA-FITC em granulócitos e na figura 16 (D-F) uma marcação fraca em hialinócitos do tipo I marcados com BS-I-FITC em *B. glabrata* infectados.

Na figura 16 (G-L) identificamos os hemócitos de *B. straminea* infectados, marcados de forma fraca (Hialinócitos do tipo II) com BS-I-FITC (G-I) e hialinócito do tipo I marcado fortemente com DBA-FICT (J-L).

Figura 16 (A-L): Intensidade de marcação dos hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea* infectados com *S. mansoni* e visualizados através do Microscópio Confocal. (A-C) observar uma forte marcação de DBA-FITC em granulócitos de *B. glabrata*. (D-F) identificar uma marcação fraca com a lectina BS-I-FITC em hialinócito do tipo I em *B. glabrata* infectado. (G-I) fraca marcação de HY2 marcados com BS-I-FITC em *B. straminea* infectados. (J-L) Hialinócitos do tipo I marcados fortemente com DBA-FITC em *B. straminea* infectados. Barras=10µm.



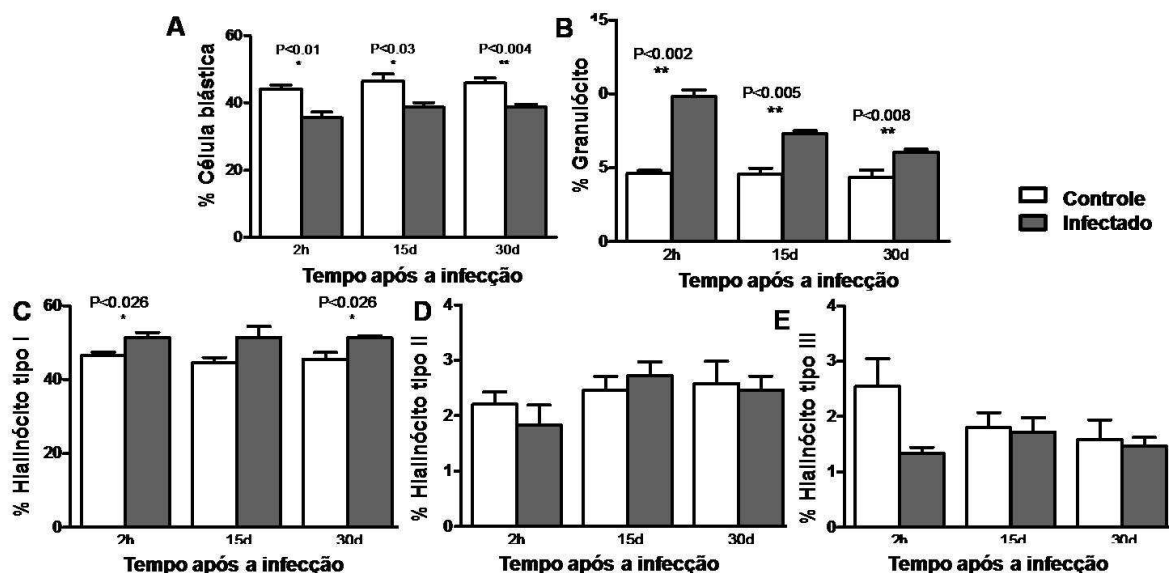
Dinâmica hemocitária

Na avaliação da dinâmica hemocitária identificamos variações estatisticamente significantes em três dos cinco tipos celulares: células blásticas, granulócitos e hialinócitos do tipo I (Figs. 17 e 18).

Em ambas as espécies de caramujos infectados com miracídios de *S. mansoni* houve uma redução significativa em relação ao controle. Tal redução foi mais acentuada em *B. straminea*.

A dinâmica dos granulócitos se comportou de forma diferente nas duas espécies. Apesar deste tipo celular apresentar um aumento em relação ao controle, observamos que em *B. glabrata* infectados o número de granulócitos foi diminuindo nos tempos avaliados enquanto o de *B. straminea* houve um aumento no último período de avaliação (Figs. 17B e 18B).

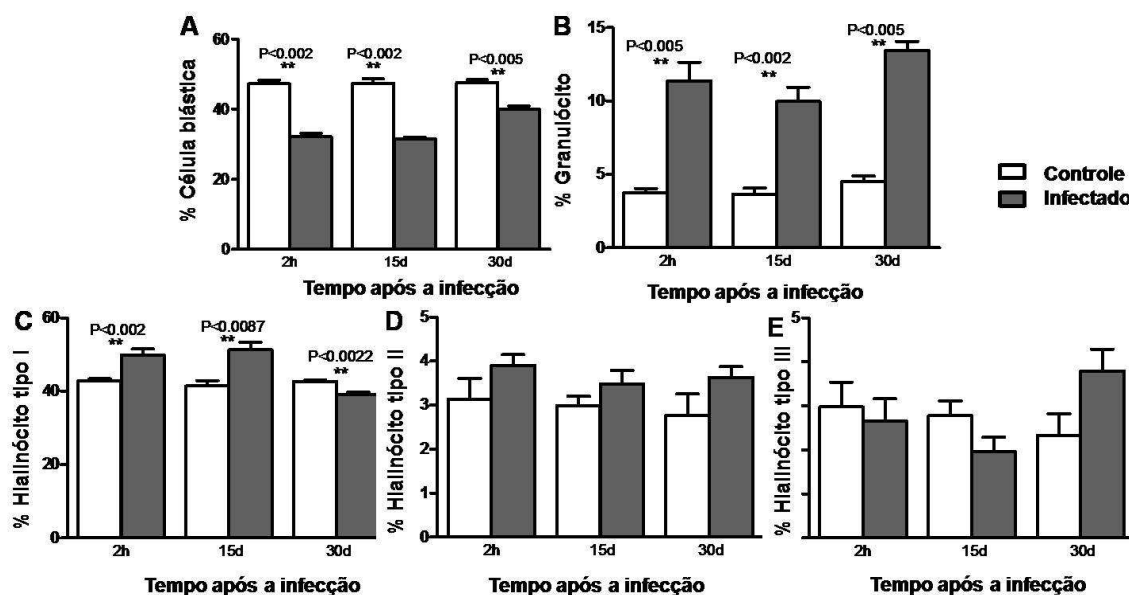
Figura 17 (A-E). Cinética diferencial dos hemócitos de *B. glabrata* sadios e infectados pelo *S. mansoni* nos tempos de 2h, 15d e 30d após a exposição aos miracídios. (A) Célula blástica. (B) Granulócito. (C) Hialinócito tipo I. (D) Hialinócito tipo II. (E) Hialinócito tipo III.



Os hialinócitos tipo I mantiveram-se elevados em caramujos *B. glabrata* infectados em todos os tempos avaliados, porém, em *B. straminea* essa elevação só foi visualizada nos dois primeiros tempos analisados (2h e 15d) (Figs. 11C e 12C).

Tanto nos hialinócitos tipo II quanto nos hialinócitos tipo III não identificamos nenhuma variação estatisticamente significativa em relação aos seus respectivos controles, nas duas espécies estudadas (Figs. 11D-E e 12D-E).

Figura 18 (A-E). Cinética diferencial dos hemócitos de *B. straminea* sadios e infectados pelo *S. mansoni* nos tempos de 2h, 15d e 30d após a exposição a miracídios. ((A) Célula blástica. (B) Granulócito. (C) Hialinócito tipo I. (D) Hialinócito tipo II. (E) Hialinócito tipo III.



DISCUSSÃO

A interação do hospedeiro intermediário e do *S. mansoni* tem sido objeto de vários estudos, sendo a maioria deles utilizando *Biomphalaria glabrata*/*S. mansoni* como modelo (Coelho et al. 2004). O *B. glabrata* é muito importante para a transmissão da esquistossomose no Brasil, este caramujo apresenta linhagens altamente suscetíveis à infecção pelo parasita. Por outro lado, o *B. straminea*, apesar de menos suscetível a infecção, o mesmo também é considerado um importante vetor biológico para o *S. mansoni* (Dias et al. 1987).

Para entender os mecanismos utilizados pelo parasita para garantir sua sobrevivência nos hospedeiros, é preciso compreender os mecanismos internos de defesa que estão disponíveis no hospedeiro (Bayne 2009). Os moluscos possuem uma impressionante capacidade para se proteger contra as infecções provocadas por potenciais agentes patogênicos. Este sistema de defesa é constituído por componentes humorais e celulares (hemócitos) (Vargas-Albores and Barracco, 2001).

A primeira classificação dos hemócitos de *B. glabrata* foi realizada há algumas décadas e só recentemente ela foi revisada e atualizada por Cavalcanti et al. (2011). Este estudo enfatiza os achados encontrados por estes autores, pois foram identificados os mesmos tipos celulares tanto em *B. glabrata* como em *B. straminea*. A similaridade dos tipos celulares encontrados nos dois estudos pode estar associada ao aprimoramento no procedimento de coleta, processamento e análise das amostras.

Neste estudo foram identificados cinco tipos celulares na hemolinfa de ambas as espécies, são eles: células blásticas, granulócitos, hialinócitos do tipo I, hialinócitos do tipo II e hialinócitos do tipo III. Além de identificar os tipos de hemócitos, foi realizada uma descrição comparativa destas células em *B. glabrata* e *B. straminea* após a infecção por miracídios de *S. mansoni*. Neste estudo foram encontradas diversas alterações celulares, principalmente: maior produção de glicogênio, aumento de projeções citoplasmáticas, maior adesão celular, entre outros. Muitas das alterações na morfologia das células encontradas foram semelhantes em ambas as espécies de caramujos.

As células blásticas em *B. glabrata* passaram a apresentar alteração no formato ficando mais alongados e com projeções citoplasmáticas. Tais alterações não foram evidentes em *B. straminea*.

Alguns autores indicam que em situação de exposição a agentes externos as células blásticas ou prohemócitos, em outras ordens de invertebrados, dividem-se e se diferenciam em outros tipos celulares (Barracco et al. 1993; Brayner et al. 2005, 2007). Não foi identificado estas células se dividindo como foi visto nos hialinócitos tipo I, mas identificamos modificações celulares que podem estar condicionadas ao processo de diferenciação em hialinócitos do tipo I, pois além de mais alongados, este tipo celular passou a apresentar projeções semelhantes aos encontrados nestas células. Como não fizemos estudos para o acompanhamento dessas células *in vivo*, apenas sugerimos esta diferenciação.

Os granulócitos já foram identificados em diversos trabalhos estudando algumas espécies de moluscos *B. glabrata* (Cheng and Auld 1977; Cavalcanti et al. 2009 and 2011) e *B. tenagophila* (Barracco et al. 1993). Esta célula é facilmente diferenciada dos demais tipos celulares pela presença de grânulos eletrodensos distribuídos em seu citoplasma.

Neste estudo foi possível evidenciar a degranulação em *B. straminea*, porém em *B. glabrata* não foi evidenciado nenhum granulócito externalizando grânulos. Cavalcanti et al. (2009) trabalhando com as mesmas espécies, sem exposição ao *S. mansoni*, não identificou nenhuma liberação de grânulos em *B. glabrata* e nem em *B. straminea*. Sendo assim, estes achados sugerem que este tipo de resposta celular esteja relacionada à infecção pelo *S. mansoni*.

Com esses achados podemos inferir que provavelmente os granulócitos de *B. straminea* possuem um maior papel na resposta imune do que o mesmo tipo celular em *B. glabrata*, pois Lai et al. (2002) trabalhando com *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae) descreveu que no processo inicial de lesão a cascata de coagulação e, posteriormente, a cicatrização ocorreu com a migração de granulócitos. Esses autores descreveram ainda que estas células lisaram-se liberando materiais granulares em torno do local da lesão, sugerindo que a pro-fenoloxidase é liberada pelos granulócitos através da ruptura dos mesmos e são sintetizados ou estocados em grânulos.

Dentre todas as células avaliadas, os hialinócitos tipo I foram as que apresentaram maiores alterações morfológicas. Tais alterações foram similares em *B. glabrata* e *B. straminea*.

Foi observado um aumento na emissão de projeções citoplasmáticas mais expressivo em *B. glabrata*, por isso, conseguimos evidenciar uma maior adesão entre os hialinócitos tipo I. Tal agregação de células lembra o processo de encapsulamento. Boemhler et al. (1996) através de um experimento *in vitro* incubou os hemócitos com esporocisto de *S. mansoni* e conseguiu identificar células (possivelmente, o hialinócito tipo I descrito neste estudo) aderindo-se ao esporocito inicializando um processo de encapsulamento e sugere que o mesmo processo poderia ocorrer *in vivo*. É importante ressaltar que apesar da emissão de filopódios em *B. straminea* não identificamos a mesma adesão celular vista em *B. glabrata*. Estes resultados estão de acordo com Souza et al. (1997) que identificaram que *B. glabrata* exibiu frequente proliferação focal de amebócitos em diversos órgãos (reação granulomatosa), *B. tenagophila* e *B. straminea* raramente apresentaram tais alterações reativas, sugerindo que o mecanismo de resistência à infecção miracidial provavelmente segue caminhos distintos nas diferentes espécies de moluscos.

Da mesma forma, Borges e Andrade (2003) estudando o processo de encapsulamento em *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* observaram que nas glândulas renais e digestivas, apenas hemócitos “*spreading*” puderam ser identificados. De acordo com os autores estas células apresentaram inúmeras filopódios interdigitantes, formando uma complexa rede de prolongamentos citoplasmáticos.

Os hialinócitos do tipo I frequentemente apresentam vacúolos pinocíticos (Cavalcanti et al. 2009). Tais vacúolos também foram evidentes neste trabalho e, em grande parte dos HY1, foi possível observar longas extensões citoplasmáticas, maiores até do que foram observados no trabalho de Cavalcanti e colaboradores (2009). Seguindo esta mesma linha de raciocínio, Cajaraville e Pal (1995) trabalhando com molusco bivalve da espécie *Mytilus galloprovincialis* relataram que os hialinócitos apresentaram na região cortical grupos de vesículas endocíticas.

Cavalcanti et al. (2009) estudando morfologicamente os hialinócitos do tipo I indicaram que tais células apresentavam-se constantemente em divisão, tanto em *B. glabrata* como em *B. straminea*. Tal achado foi também constatado no nosso estudo.

Foi identificado também um aumento na quantidade de grânulos de glicogênio no citoplasma das duas espécies. Travers et al. (2008) ao trabalharem com *Haliotis tuberculata* (molusco bivalve) reportaram a presença de glicogênio nos hemócitos. Da mesma forma, Cavalcanti et al. (2009) trabalhando com *B. glabrata* e *B. straminea* também indicaram a presença de grânulos de glicogênio nessas espécies mesmo sem estarem expostos a miracidios de *S. mansoni*. Porém, neste estudo a quantidade de glicogênio foi bem superior aquelas evidenciadas em hemócitos de caramujos sadios. Em alguns hialinócitos do tipo I a presença de glicogênio ocupava grande parte da célula.

Matricon e Letocart (1999) trabalhando com *B. glabrata* identificaram que hemócitos grandes apresentaram muitas regiões com presença de glicogênio. Em nosso estudo, foi possível observar que os grânulos de glicogênio apresentavam tamanhos variados e estavam situados no citoplasma de todos os hialinócitos do tipo I, tanto em *B. glabrata* como em *B. straminea*. Achados semelhantes foram encontrados por Cajaraville e Pal (1995) que trabalhando com molusco bivalve da espécie *Mytilus galloprovincialis* identificaram a presença de glicogênio no citoplasma celular de granulócitos.

Os hialinócitos tipo II foram encontrados nos estudos de Cavalcanti et al. (2009) ao caracterizarem estruturalmente os hemócitos de *B. glabrata* e *B. straminea*. Morfologicamente, este tipo celular se assemelha ao oenocitóide de invertebrados como o *Culex quinquefasciatus* (Brayner et al. 2005). Este tipo celular não apresentou muitas alterações celulares, apenas projeções citoplasmáticas visualizadas na microscopia óptica. Na ultra-estrutura em *B. glabrata* foi evidente a presença de vacúolos e em *B. straminea* a presença de mitocôndrias. O aumento no número de vesículas e mitocôndrias também foram encontrados por Brayner et al. 2007, quando analisaram oenocitóides de *C. quinquefasciatus* desfiados com *W. bancrofti*.

No hialinócitos do tipo III foi identificado que as maiores alterações morfológicas foram evidenciadas em *B. glabrata*. Este hemócito apresentou diâmetro celular maior

comparado ao controle, e com presença de filopódios. Em *B. straminea* não foi evidenciada alteração relevante associada à infecção.

A ligação de lectina/carboidrato pode estar envolvida no processo de reconhecimento do *S. mansoni* e ativação dos hemócitos de *Biomphalaria*. Portanto, a expressão de ligantes de lectinas em hemócitos de *Biomphalaria* estaria associada à susceptibilidade do caramujo contra a infecção pelo *S. mansoni* (Guillou et al. 2004, Martins-Souza et al. 2006). Em nosso estudo, identificamos uma relação entre resíduos de carboidratos e a infecção pelo *S. mansoni*, pois, tanto em *B. glabrata* como em *B. straminea* houve uma maior expressão desses resíduos de carboidratos, específicos para as lectinas trabalhadas, após a infecção pelo *S. mansoni*. Em estudo realizado por Martins-Souza et al. (2006) trabalhando com hemócitos de *B. glabrata* BH (cepa de caramujos com elevada suscetibilidade ao *S. mansoni*), *B. tenagophila* Cabo Frio (moderada suscetibilidade) e *B. tenagophila* Taim (cepa completamente resistente), e sua ligação com lectinas conjugadas a FITC (ConA, PNA, SBA e WGA) sugerem que o papel de lectinas/carboidratos não é totalmente compreendido, mas pode haver correlação da sua presença com a susceptibilidade ou resistência ao parasita.

Sullivan et al. (1984) trabalhando com *B. glabrata* sugerem que o número de hemócitos pode variar de acordo com certos estímulos, entre eles a resposta à infecção por trematódeos. Neste trabalho, identificamos variações nos mesmos tipos celulares em *B. glabrata* e *B. straminea*. As células que apresentaram sua cinética alterada após a infecção foram: células blásticas, granulócitos e hialinócitos do tipo I.

Apesar de trabalharmos com duas espécies de caramujos, a dinâmica celular se comportou de forma similar nos dois vetores biológicos, ou seja, as células blásticas diminuíram, enquanto que os granulócitos e hialinócitos do tipo I aumentaram significativamente, com exceção do último período de avaliação para HY1 em *B. straminea*. A avaliação foi realizada até o trigésimo dia após a infecção, pois o objetivo foi analisar a dinâmica hemocitária logo após a penetração do miracídio e a saída das cercárias no caramujo.

Houve uma redução na contagem de células blásticas em caramujos infectados, esta diminuição foi mais evidente em *B. straminea*. As células blásticas são conhecidas como células imaturas (Hine 1999; Cima et al. 2001). Sendo assim, sua redução após a

infecção sugere uma diferenciação desta célula em outro tipo celular. Johansson et al. (2000), Meister (2004) e Aladaileh et al. (2007), trabalhando respectivamente com Crustáceo, *Drosophila* e *Saccostrea glomerata*, levantaram a possibilidade que estas células possam atuar como “stem cell” da qual outras células são formadas. Em muitos invertebrados, vários tipos de hemócitos são formados pela diferenciação de “stem cell” que são morfológicamente similares às células blásticas de *B. glabrata* e *B. straminea*.

Oliveira et al. (2010) trabalhando com a espécie *B. tenagophila* resistente e suscetível à infecção pelo *S. mansoni* identificaram que as células de defesa têm comportamentos diferentes em moluscos resistentes e suscetíveis. Dos cinco tipos celulares presentes na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea* infectados com *S. mansoni*, apesar dos granulócitos aumentarem em relação ao controle, este tipo celular se destacou na análise diferencial das duas espécies, ou seja, enquanto em *B. glabrata* os granulócitos foram diminuindo com o tempo, em *B. straminea* houve uma flutuação com um acentuado aumento no último período avaliado. Período este que coincide com a saída das cercárias.

Os hialinócitos tipo I também variaram nas duas espécies de caramujos. Esta variação numérica sugere o papel desta célula na resposta dos caramujos ao *S. mansoni*. Resultados semelhantes foram encontrados por Seta et al. (1996) ao analisarem o comportamento dos amebócitos circulantes de *B. glabrata* e *B. tenagophila* a diferentes estímulos (tinta nanquim, miracídeos de *S. mansoni* e fratura da concha) perceberam que houve um aumento significativo, apenas no número de amebócitos estrelados (provavelmente, similar ao HY1 deste trabalho) quando os moluscos foram infectados por *S. mansoni*, o que sugere a especificidade da reação ao parasitismo.

Os demais tipos celulares (HY2 e HY3) não apresentaram nenhuma variação significativa o que, somado a poucas alterações morfológicas, sugere uma reduzida ou nenhuma participação dessas células no processo de defesa contra o *S. mansoni*.

Este foi o primeiro estudo que identificou as alterações morfológicas em hemócitos de *B. straminea* após a infecção por *S. mansoni* e consolida a nova classificação celular de *B. glabrata* estabelecida por Cavalcanti et al (2009). Evidenciamos neste trabalho que existem alterações morfológicas e na dinâmica celular após a infecção. Através de nossos achados podemos inferir que tais alterações foram

evidentes nas duas espécies de caramujos e que diferenças relacionadas à resposta celular entre as mesmas são visíveis. Talvez, tais diferenças após a infecção por *S. mansoni* seja um dos fatores determinantes na suscetibilidade ou não presentes em *B. glabrata* e *B. straminea*.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e Laboratório de Imunopatologia Professor Keizo Asami

SUPORTE FINANCEIRO

Esta pesquisa teve apoio financeiro do PAPES IV/FIOCRUZ.

REFERÊNCIAS

Aladaileh S, Nair SV, Birch D, Raftos DA (2007) Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: morphology and function. J Invertebr Pathol 96:48-63. doi:10.1016/j.jip.2007.02.011

Barracco MA, Steil AA, Gargioni R (1993) Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. Mem Inst Oswaldo Cruz 88:73-83. doi:10.1590/S0074-02761993000100012

Bayne CJ (2009) Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. Mol Biochem Parasitol 165:8-18 Review. doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.01.005

Boehmler AM, Fryer SE, Bayne CJ (1996) Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by *Biomphalaria glabrata* hemolymph *in vitro*: alteration of hemocyte behavior after poly-L-lysine treatment of plastic, and the kinetics of killing by different host strains. J Parasitol 82:332-5.

Borges CMC, Andrade ZA (2003) Extra-cellular matrix changes in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 135-139 doi: 10.1590/S0074-02762003000100017.

Brayner FA, Araujo HRC, Cavalcanti MGS, Alves LC, Peixoto CA (2005) Ultrastructural characterization of the hemocytes of *Culex quinquefasciatus* (DIPTERA: Culicidae). Micron 36:359–367. doi: 10.1016/j.micron.2004.11.007

Brayner FA, Araújo HR, Santos SS, Cavalcanti MG, Alves LC, Souza JR, Peixoto CA (2007) Haemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of the mosquito *Culex quinquefasciatus* to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. Med Vet Entomol. 21:112-20. doi:10.1111/j.1365-2915.2007.00673.x

Cajaraville, Miren P, Pal, Santi G (1995) Morphofunctional Study of the Haemocytes of the Bivalve Mollusc *Mytilus galloprovincialis* with Emphasis on the Endolysosomal Compartment. Cell Struct Funct 20: 355-367 doi:10.1247/csf.20.355

Carvalho OS, Scholte RGC, Amaral RS (2007) Distribuição dos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

Cavalcanti MGS, Mendonça AMB, Filho FC, Silva, L. F., Barbosa CCGS, De Castro CMMB, Alves LC, Brayner, FAS (2009). Comparative characterization of hemocytes of *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea*. XII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise.

Cavalcanti MGS, Mendonça AMB, Filho FC, Silva, L. F., Barbosa CCGS, De Castro CMMB, Alves LC, Brayner, FAS. (2011) Avaliação morfológica dos hemócitos de *Biomphalaria glabrata*: uma comparação entre as células sadias e infectadas com *Schistosoma mansoni*. Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Cheng TC, Auld KR (1977) Hemocytes of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. J Invertebr Pathol 30:119-22. doi:10.1016/0022-2011(77)90052-0

Cima F, Perin A, Burighel P, Ballarin L (2001) Morpho-functional characterization of haemocytes of the compound ascidian *Botrylloides leachi* (Tunicata, Ascidiacea). Acta Zoologica 82: 261–274, doi: 10.1046/j.1463-6395.2001.00087.x

Coelho PMZ, Carvalho OS, Andrade ZA, Martins-Sousa RL, Rosa FM, Barbosa L, Pereira CAI, Caldeira RL, Iannotti-Passos LK, Godard ALB, Moreira IA, Oliveira GC, Franco GR, Teles HMS, Negro-Corra D (2004) *Biomphalaria tenagophila*/*Schistosoma mansoni* Interaction: Premises for a New Approach to Biological Control of

Schistosomiasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 99: 109-111 doi: 10.1590/S0074-02762004000900020

Dias LCS, Ueta MT, Guaraldo AMA. (1987) Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. 29:205-212.

Fernandez MA, Thiengo SC 2002. Susceptibility of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) from Serra da Mesa dam, Goiás, Brazil to infection with three strains of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 59-60 doi: 10.1590/S0074-02762002000900013.

Guillou F, Mitta C, Dissous R, Pierce R, Coustau C 2004. Use of individual polymorphism to validate potencial funcional markes: case of a candidate lectin (Bgsl) differentially expressed in susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. Com Biochem Physiol 138: 175-181 doi:10.1016/j.cbpc.2004.03.010

Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. (2001a) Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. J Parasitol 87:778-85 doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0778:IONOIK]2.0.CO;2.

Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ (2001b) Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. J Parasitol 87:292-9 doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[0292:KOSMSB]2.0.CO;2

Hine PM (1999) The inter-relationships of bivalve hemocytes. Fish Shelfish Immunol 9: 367-385 doi:10.1006/fsim.1998.0205

Johansson MW, Keyser P, Sritunyalucksana K, Söderhäll K (2000) Review: Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture.191:45-52. doi:10.1016/S0044-8486(00)00418-X

Lai SC, Chen CC, Hou RF (2002) Immunolocalization of prophenoloxidase in the process of wound healing in the mosquito *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 39:266-74 doi: 10.1603/0022-2585-39.2.266

Machado-Silva JR, Galvão C, de Oliveira RM, Presgrave OA, Gomes DC (1995) *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: comparative morphological studies of some Brazilian strains. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 37: 441-447 doi: 10.1590/S0036-46651995000500010

Machado-Silva JR, da Silva CH, Pereira MJ, de Oliveira RM, Pinto RM, Gomes DC (2000). Differences in Brazilian strains of *Schistosoma mansoni* evaluated by means of morphometric analysis of cercariae of both sexes. Mem Inst Oswaldo Cruz 95: 839-842 doi: 10.1590/S0074-02762000000600015

Martins-Souza RL, Pereira CAJ, Martins Filho OA, Coelho PMZ, Corrêa Jr A, Negrão-Corrêa D. (2006). Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz 101: 185-192 doi: 10.1590/S0074-02762006000900029

Matricon-Gondran M, Letocart M (1999). Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. J Invertebr Pathol 74:224-34.doi:10.1006/jipa.1999.4876

Meister M (2004). Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. Curr Opin Immunol, 16: 10-15. doi:10.1016/j.coi.2003.11.002

Negrão-Corrêa DA, Coelho PMZ, Andrade ZA, Martins-Souza RLM, Pereira CAJ (2008) *Biomphalaria* e *Schistosoma mansoni*: papel do sistema interno de defesa do molusco na suscetibilidade ao parasito. In: *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.

Oliveira AL, Levada PM, Zanotti-Magalhaes EM, Magalhães LA, Ribeiro-Paes JT (2010) Differences in the number of hemocytes in the snail host *Biomphalaria tenagophila*, resistant and susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. Genet Mol Resv 9:2436-45. doi: 10.4238/vol9-4gmr1143

Seta L, Magalhães LA, Carvalho JF (1996). Behavior of hemolymph amebocytes from planorbidae in the presence of *Schistosoma mansoni* larvae parasitism, after inoculation of Indian ink or fracture of the shell. Rev Saude Publica.30:332-40. doi: 10.1590/S0034-89101996000400006

Souza CP, Borges CC, Santana AG, Andrade ZA (1997) Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B. straminea* with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 92:517-22 doi: 10.1590/S0074-02761997000400014

Sullivan JT, Cheng TC, Howland KH (1984). Mitotic responses of the anterior pericardial wall of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) subjected to challenge. J Invertebr Pathol 44:114-116.

Travers MA, Silva PM, Goïc LN, Marie D, Donval A, Huchette S, Koken M, Paillard C (2008). Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. Fish Shellfish Immunol 24:400-11. doi:10.1016/j.fsi.2007.10.001

Van der Knaap WP, Loker ES (1990). Immune mechanisms in trematode-snail interactions. Parasitol Today 6:175-82. doi:10.1016/0169-4758(90)90349-9

Vargas-Albores F and Barracco M (2001). Mecanismos de defense de los moluscos bivalves, con énfasis en pectínidos. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura A. N. Maeda-Matinez (ed), Cap 7: 127-146.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Existem cinco tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de *B. glabrata*, são eles: células blásticas, granulócitos, hialinócitos do tipo I, hialinócitos tipo II e hialinócitos tipo III.
 2. Os mesmos tipos celulares encontrados em *B. glabrata* foram identificados na hemolinfa de *B. straminea* apresentando similaridade morfológica nas duas espécies estudadas.
 3. Após a exposição ao *S. mansoni* ocorreram alterações morfológicas nos hemócitos de ambas as espécies. As células blásticas em *B. glabrata* apresentaram-se com projeções citoplasmáticas (filopódios), enquanto a de *B. straminea* pouco alterou morfológicamente. Os granulócitos de *B. straminea* passaram a liberar grânulos (degranular), enquanto este tipo celular em *B. glabrata* pouca alteração foi descrita. Os hialinócitos do tipo I, em ambas as espécies, passaram a apresentar mais ilhas de glicogênio e projeções citoplasmáticas e em *B. glabrata* tais células mostraram mais adesão. Os hialinócitos tipo II e III de ambas as espécies de caramujos estudados foram as células com menos alterações morfológicas após a exposição a miracídios de *S. mansoni*.
 4. Na contagem diferencial as células blásticas, granulócitos e hialinócitos do tipo I variaram de forma similar em *B. glabrata* e em *B. straminea*, porém, o número de granulócitos em *B. glabrata* reduziu no último período de avaliação (30 dias), enquanto em *B. straminea* ocorreu uma variação com aumento nos mesmo período de estudo.
 5. Após a infecção por miracídios de *S. mansoni*, observou-se uma maior marcação das lectinas trabalhadas tanto em *B. glabrata* como em *B. straminea*.
-

6. Na avaliação das lectinas, observamos que o hialinócito do tipo I foi a célula que mais marcou, o que indica que tal tipo celular apresenta resíduos de carboidratos específicos para todas as lectinas trabalhadas.
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDUL-SALAM, J. M.; MICHELSON, E. H. *Biomphalaria glabrata* amoebocytes assay of factors influencing in vitro phagocytosis. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 36, p. 52-59, 1980.

ADEMA, C. M. et al. Schistosomicidal activities of *Lymnaea stagnalis* haemocytes: the role of oxygen radicals. **Parasitology**, v. 109, p. 479-485, 1994.

AKIRA, S. Toll receptor families: structure and function. **Semin Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 1-2, fev. 2004.

AMEN, R.I. et al. Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian *Schistosoma trichobilharzia ocellata*. **Parasitology**, v. 104, p. 33-40, 1992.

ANDRADE, Z. A. A esquistossomose no Brasil após quase um século de pesquisas. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 35, p. 509-513, 2002.

AZEVEDO, C. M.; BORGES, C. C.; ANDRADE, Z. A. Behavior of *Schistosoma mansoni*-induced histopathological lesions in *Biomphalaria glabrata* submitted to ionizing radiation. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 37, n. 3, p.218-221, mai-jun. 2004.

BARBOSA, F. S. The problem of the generic position of the real or potential vectors of *Schistosoma mansoni*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 5, p.42-47, jan-fev. 1963.

BARBOSA, F. S.; COELHO, M. V. **Publ. avulsas Inst. Aggeu Magalhães**, v. 3, p. 55. 1954.

BARBOSA, F. S.; DOBBIN, J. E. Effects of the dry season on *Australorbis glabratus*. **Publ. avuls. Inst. Aggeu Magalhães**, v.1, p. 145-148. 1952.

BARRACCO, M. A. et al. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**; v. 88, n. 1, p. 73-83, Jan-Mar. 1993.

BAYNE, C. J. Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. **BioScience**, v. 40, p. 723-731. 1990.

BAYNE, C.J.; et al. Citotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Exp. Parasitol.**, v. 50, p. 409-416. 1980.

BEZERRA, F.S.M. et al. Comparative study on the effect of cyclic nucleotides related to the function of *Biomphalaria glabrata* hemocytes and human granulocytes. **Acta Trop.**, v.72, p.275-280. 1999.

BOEHMLER, A. M.; FRYER, S. E., BAYNE, C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by *Biomphalaria glabrata* hemolymph in vitro: alteration of hemocyte behavior after poly-L-lysine treatment of plastic, and the kinetics of killing by different host strains. **J Parasitol.** Abr, v.82, n.2, p.332-335. 1996.

BORGES, C. M. C.; ANDRADE, Z. A. Extra-cellular Matrix Changes in *Schistosoma mansoni*-infected *Biomphalaria glabrata*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p.135-139. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de vigilância e controle da esquistossomose**, 2 ed., Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2008.

BRASIO, B. C. et al. Verificação da resposta de miracídios de *Schistosoma mansoni* a substâncias provenientes de moluscos Planorbídeos, **Rev Saude Publica**, v.19, p. 154-170. 1985.

BUGGE, J.; WEBER, R. E. Oxygen binding and its allosteric control in hemoglobin of the pulmonate snail, *Biomphalaria glabrata*. **Am J Physiol.** fev, v. 276, p. 347-356. 1999.

CAMPBELL, G. et al. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **Proc Royal Society London**, v. 267, p. 2351-2358. 2000.

CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L. **Identificação morfológica de *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* hospedeiros intermediários do**

Schistosoma mansoni. BeloHorizonte: Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, 2004.1 CD. (Série Esquistossomose; n.6).

CARVALHO, O. S.; NUNES, I. M.; CALDEIRA, R. L. **Distribuição dos hospedeiros intermediários no Brasil**. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. Brasília: Ministério de Saúde, 2007, p. 85-108.

CARVALHO, O. S. et al. **Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros Intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil**. In: *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar, ed. FIOCRUZ, 2008, p. 392-418.

CHAIA G. Technic for concentration of miracidia. **Rev Bras Malariol Doencas Trop.** Abr, v.8, n. 2, p.355-357. 1956.

CHENG, T. C. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. Review. **Ann N Y Acad Sci.** v. 266, p. 343-79. 1975.

CHENG, T. C.; AULD, K. R. Hemocytes of the pulmonate Gastropod *Biomphalaria glabrata*. **J Invertebr Pathol.**, v. 30, p. 119-122. 1977.

CHENG, T. C.; BUTLER, M. S. Experimentally induced elevations in acid phosphatase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). **J. Invertebr. Pathol.**, v. 34, p. 119-129. 1979.

CHERNIN E. Transplantation of larval *Schistosoma mansoni* from infected to uninfected snails. **J Parasitol.** Jun, v. 52, n. 3, p. 473-482. 1966.

CHERNIN E. Some host-finding attributes of *Schistosoma mansoni* miracidia. Review **Am J Trop Med Hyg.**, v. 23, n. 3, p.320-327, maio. 1974.

CHERNIN, E.; ANTOLICS, V. M. Neonatal susceptibility of Brazilian *Biomphalaria* to Puerto Rican *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol.** v. 61, n. 2, p. 377-378, abr. 1975.

COELHO, M.V. Ação das formas larvárias de *Schistosoma mansoni* sobre a reprodução de *Australorbis glabratus*. **Publ. avul. Inst. Aggeu Magalhães**, v.3, p. 39-53. 1954.

COELHO, M. V. Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. **Rev. bras. Biol.**, v.17, n. 325-337. 1957.

COELHO, P. **Relação molusco/parasita: resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria***. In: Tópicos em Malacologia Médica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1995.

CONNORS VA, DE BURON I, GRANATH WO JR. *Schistosoma mansoni*: interleukin-1 increases phagocytosis and superoxide production by hemocytes and decreases output of cercariae in schistosome-susceptible *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol.**, New York; v. 80, n. 1, p.139-148, Fev. 1995.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 13-19. 2004.

COUSTAU, C.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: Modulation of hemocyte surface polypeptides detected in individual snails, *Biomphalaria glabrata*, following larval exposure. **Exp. Parasitol.**, New York, n. 79, p. 1-10. 1998.

DEJONG, R. J. et al. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. **Mol Biol Evolution**, v. 18, p. 2225-2239. 2001.

DIAS, L. C. S.; UETA, M. T.; GUARALDO, A. A. M.A Suscetibilidade de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila* a diferentes cepas de *Schistosoma mansoni*, **Rev. Insl. Med. trop.** São Paulo, v. 29, n. 4, p.205-212, julho-agosto. 1987.

DIKKEBOOM, R. et al. Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*. **Parasitol Res**, v. 75, p. 148-154. 1988.

FRYER, S. E.; BAYNE, C. J. Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strainspecific manner by absorbed plasma components. **Dev Comp Immunol**, v. 20, p. 23-337. 1996.

GRANATH, W. O. JR.; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol**, v. 58, n. 188-193. 1984.

GRANATH, W. O. JR. et al. Interleukin 1 activity in haemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: presence, differential expression, and biological function. **Cytokine**. v. 6, n. 1, p. 21-27, jan. 1994.

GRANATH, W. O. JR.; YOSHINO, T. P. Lysosomal enzyme activities in susceptible and refractory strains of *Biomphalaria glabrata* during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol**, v. 69, n. 6, p.1018-1026, dez. 1983.

GRANATH, W. O. JR; YOSHINO, T. P. *Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol**, v. 58, n. 188-193. 1984.

GREENBERG, S. Diversity in phagocytic signalling. **J Cell Sci.**, v.114, n. 6, p.1039-1040, mar. 2001.

GUARALDO, A. M. A. et al. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria glabrata* (Sambon, 1907) e *Biomphalaria tenagophila* (Say, 1818). **Rev. Saúde Pública**, v.15, p.436-448. 1981.

HAHN, U. K. et al. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. **Dev Comp Immunol**, v. 24, p. 531-541, 2000.

HAHN, U. K. et al. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. **J Parasitol**, n. 87, p. 292-299. 2001.

HANINGTON, P. C., et al. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, n. 107, v. 49, p. 21087-21092, dez. 2010.

HARRISON, A. D.; MCKILLOP, W. B. **Arch. Hydrobiological**, v. 57, 1980.

HARRY, H. W.; CUMBIE, B. G.; MARTINEZ, J. J. Studies on the quality of fresh water of Puerto Rico relative to the occurrence of *Australorbis glabratus* (Say). **Am J Trop Med Hyg.** v. 6, n. 2, p. 313-322, mar. 1957.

HELDIN, C.H.; PURTON, M. **Signal transduction.** Chapman & Hall, Ltd., London, 1996.

HOTEZ, P. J. et. al. Africa is desperate for praziquantel. **Lancet.**, v. 376, p. 496-508, ago. 2010.

IWANAGA, S. The limulus clotting reaction. **Curr Opin Immunol.**, v. 5, n. 1, p. 74-82. Review, fev. 1993.

JEONG, K. H. et al. The Ultrastructure of the amebocyteproducing organ in *Biomphalaria glabrata*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 7, p. 217-228. 1983.

JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. Leukocytes of *Biomphalaria glabrata*: morphology and behaviour of granulocytic cells *in vitro*. **J Invert Pathol**, v. 28, p. 357-362. 1984.

JOHNSTON, L. A.; YOSHINO, T. P. Analysis of lectin and snail plasma binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 112, p. 469-479. 1996.

JONES, J. C. **Pathways and pitfalls in the classification and study of insect hemocytes.** In: GUPTA, A. P. Insect Hemocytes. Cambridge: Cambridge University, 1979. p. 279-300.

KADER, A. A. The effect of ecological parameters on the distribution of snail vectors of schistosomiasis. **J Egypt Soc Parasitol.**, v. 31, n. 1, p.145-152, abr. 2001.

KATZ, N.; ROCHA, R.S. ; PEREIRA, J.P. Controle da esquistossomose em Peri-Peri (Minas Gerais) através de repetidos tratamentos clínicos e aplicações de moluscicida. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 22, supl. 4, p. 203-221. 1980.

KATZ, N.; CARVALHO, O. S. Recent introduction of schistosomiasis mansoni into the south of the State of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 78, n. 3, p.281-284, jul-set. 1983.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 33, p. 303-308. 2000.

KAWAZOE, U. et al. Competição biológica entre *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) Em criadouros naturais do município de Ourinhos, SP (Brasil). **Rev Saude Publica**, v.14, p. 65-87. 1980.

KAWAZOE, U. Alguns aspectos da biologia de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) (Pulmonata, Planorbidae). II. Fecundidade e fertilidade. **Rev Saude Publica**, v. 11, p. 47-64. 1977.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 32, n. 10, p.1295-309, out. 2002.

LEIPPE, M., RENWRANTZ, L. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. **Dev Comp Immunol.**, v.12, n. 2, p. 297-308. 1988.

LEMOS, Q. T. Contribution to the histology of *Biomphalaria glabrata*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 32, p. 343-347. 1999.

LIE, K. J. Survival of *Schistosoma mansoni* and other trematode larvae in *Biomphalaria glabrata*: a discussion of interference theory. **Trop. Geogr. Méd.** v. 34, p. 111-122, 1982.

LIE, K. J., HEYNEMAN, D., Tissue reactions induced by *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **Ann Trop Med Parasitol.**, v. 74, n. 2, p. 157- 166, abr. 1980.

LOKER, E. S., et al. Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. **Immunol Rev**, v.198, p. 10-24. 2004.

LOKER, E. S. et al. *Schistosoma mansoni*: Agglutination of sporocysts, and formation of gels on miracidia transforming in plasma of *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol**, v. 58, p. 56-62. 1984.

LOVERDE, P. T. Do antioxidants play a role in schistosome host-parasite interactions? **Parasitol Today**, v. 14, p. 284-289. 1998.

LUCENA, D. T. Planorbídeos transmissores da esquistossomose no Nordeste do Brasil. **Rev Bras Malariol Doenc Trop.**, v.15, p.13-26. 1963.

MALDONADO, J. F, ACOSTA-MATIENZO, J. Longevity and rates of infectivity of the free-swimming miracidia of *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol.**, v. 33, n.2, p. 24, dez. 1947.

MARTINS-SOUZA, R. L. et al. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, Suppl 1, p. 185-192, Set. 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. **Parasitology**. v.136, n. 1, p. 67-76, jan. 2009.

MATRICON-GONDRAN, M.; LETOCART, M. Internal Defenses of the Snail *Biomphalaria glabrata* II. Defense Cells Have Different Phagocytic Responses to Various Injected Foreign Materials. **J Invertebr Pathol**, v. 74, p. 235–247. 1999.

MITTA, G., F. et al. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. **J. Biol. Chem.** v. 275, p.12954-12962, 2000.

MONÉ Y et al. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9, p. 813, set. 2010.

MORGAN, J. A. T. et al. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. **Parasitology**, v. 123, p. 211-228. 2001.

MUTHUKRISHNAN, S. et al. OxyPred: prediction and classification of oxygen-binding proteins. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 5, p. 250-252, dez. 2007.

NEGRÃO-CORRÊA D. A., et al. ***Biomphalaria* e *Schistosoma mansoni*: papel do sistema interno de defesa do molusco na suscetibilidade ao parasito.** In:

Schistosoma mansoni Esquistossomose uma visão multidisciplinar, ed. FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2008, p. 485-509.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 10th edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2002.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11th edição. Editora Atheneu, São Paulo, 2005.

PAN, C.T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabrata*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg**, v. 14, p. 931-75.1965.

PARAENSE W.L. Fauna planorbídica do Brasil. In CS Lacaz, GR Baruzzi, WJR Siqueira (eds), **Introdução à Geografia Médica do Brasil**, Edgard Blucher & USP, São Paulo, p. 213-239, 1972.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arq. Mus. Nac.**, [S.l.], v. 55, p. 105-128, 1975.

PARAENSE, W.L., CORRÊA, L.R., 1963. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo 5, 15–22

PARAENSE, W.L., CORRÊA, L.R.. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.** 64, 822–826. 1978

PARAENSE, W L. The schistosome vectors in the Americas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 1-16, Rio de Janeiro, 2001.

PELLON, A. B.; TEIXEIRA, L. **Distribuição geográfica da esquistossomose no Brasil**. Div. Org, San, Rio de Janeiro, 1950.

PEREIRA, C. A. J. **Influência de Fatores Solúveis da Hemolinfa de Co-infecções com *Angiostrongylus vasorum* na Susceptibilidade de *Biomphalaria tenagophila* à Infecção por *Schistosoma mansoni***. Dissertação. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

PIERI, O.S.; **Studies on the host snails of schistosomiasis from North-eastern-Brazil, with special reference to diapause by *Biomphalaria glabrata* (Say).** Brighton,.Tese de Doutorado.University of Sussex-U.K, 1985.

PIERI, O. S.; FAVRE, T. C. **Diapausa em *Biomphalaria glabrata*.** In: *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar, ed. FIOCRUZ, 2008, p. 419-431.

PIERI, O. P.; JURBERG. Aspectos etológicos na sobrevivência dos caramujos vetores da xistosomose ao tratamento com moluscicidas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 1, p. 47-55. 1981.

PIMENTEL-SOUZA, F. Et al. Comportamento elementar do caramujo *Biomphalaria glabrata*. II) Localização e tamanho da massa cefalopodal exposta. **Braz J Med Biol Res.**,v. 9, n. 2, p. 123-128, 1976.

PIMENTEL-SOUZA, F. et al. Behaviour of *B. glabrata* (Gastropoda: Pulmonata) under different light conditions. **Can J. Zool.**, v. 62, p. 2328-2338, 1984.

REIS, S.M.P.M.; MAGALHÃES, L.A.; CARVALHO, J.F. Ação da inoculação de hemolinfa no mecanismo de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). **Rev Saúde Pública**, v. 29, p. 259-264, 1995.

REY, L. **Parasitologia** 3ª. Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001.

RICHARDS, C. S. Estivation of *Biomphalaria glabrata* (Basommatophora: Planorbidae). Associated characteristics and relation to infection with *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg.** v.16, n. 6, p. 797-802, nov. 1967.

RICHARDS, C. S. *Schistosoma mansoni*: susceptibility reversal with age in the snail host *Biomphalaria glabrata*. **Exp Parasitol.** v. 42, n. 1, p. 165-168, jun. 1977.

RICHARDS, C. S.; RENWRANTZ, L. R. Two lectins on the surface of *Helix pomatia* haemocytes: a Ca²⁺ dependent, GalNacspecific lectin and a Ca²⁺ independent, mannose 6-phosphate-specific lectin which recognizes activated homologous opsonins. **J Comp Physiol.**, v. 161, n. 43. 1991.

SALAMAT, Z.; SULLIVAN, J. T. Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). **Dev Comp Immunol.**, v. 33, n. 6, p.725-727, jun. 2009.

SAPP, K. K.; LOKER, E. S. Mechanism underlying digeneansnail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. **J Parasitol**, v. 86, p. 1012-1019, 2000.

SCHNEIDER, O.; ZELK, U.E. Differential display analysis of hemocytes from schistosome-resistant and schistosome-susceptible intermediate hosts. **Parasitol Research**, v.87, p.489-491. 2001.

SERRANO, D. R. et al. The influence of hydrocortisone on cellular defense mechanisms of *Biomphalaria glabrata*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.97, n. 6, p.881-885. 2002.

SILVA, C. A. et al. Efeito de tratamento cirúrgico sobre a atividade da enzima hepática lectina: colesterol aciltransferase (LCAT) na Esquistossomose mansônica. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, supl.1. 2002.

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

SMINIA, T.; VAN DER KNAAP, W.P.W. Cells and molecules in molluscan immunology. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 11, p. 17-28. 1987.

SMITH VJ, SÖDERHÄLL K. A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. **Dev Comp Immunol.** v. 15, n. 4, p. 251-261. 1991.

SOUZA, C.P. Estudo de moluscos do gênero *Biomphalaria* de Minas Gerais, com relação a adaptação parasito hospedeiro e importância na epidemiologia da esquistossomose. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo 28, 287–292. 1986.

SOUZA, C. P.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; COURA-FILHO, P. **Risk of transmission of schistosomiasis in the Parque Estadual do Rio Doce (PERD) MG, (Brazil) and its surroundings**, 1997.II: Malacological Survey in Dionísio, MG. In: VI International Symposium on Schistosomiasis, Belo Horizonte, p. 136.

SOUZA, S. S.; ANDRADE, Z. A. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 101, supl. I, p. 213-218, 2006.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis.**, v. 6, p. 411–425. 2006.

SULLIVAN, J. T.; CHENG, T. C.; HOWLAND, K. H. Mitotic responses of the anterior pericardial wall of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca) subjected to challenge. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 44, p.114-116. 1984.

SULLIVAN, J. T.; PIKIOS, S. S.; ALONZO, A. Q. 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.**, v. 90, p. 92- 96. 2004.

SULLIVAN, J. T., SPENCE, J. V. Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amebocyte-producing organ. **J Parasitol**, v. 80, p. 449- 453. 1994.

SULLIVAN, J. T., SPENCE, J. V. Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. **J Parasitol**, v. 85, p. 1065 -1071. 1999.

TELES, H. M. S.; CARVALHO, O. S. **Implicações da Biologia de *Biomphalaria* no Controle da Esquistossomose**. In: *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Ed. FIOCRUZ: Rio de Janeiro, 2008, p. 459-484.

TENSEN, C. P. et al. Molecular cloning and characterization of an invertebrate homologue of a neuropeptide Y receptor. **Eur J Neurosci.** v. 10, n. 11, p. 3409-3416. 1998.

THÉRON A, ROGNON A, PAGÈS JR. Host choice by larval parasites: a study of *Biomphalaria glabrata* snails and *Schistosoma mansoni* miracidia related to host size. **Parasitol Res.**, v.84, n. 9, p. 727-732, set. 1998.

TIERNEY, A. J., Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** v.128, n. 4, p. 791-804, abr. 2001.

TORGERSEN, K. M. et al.. Molecular mechanisms for protein kinase A-mediated modulation of immune function. **Review.Cell Signal.**; v. 14, n. 1, p. 1-9, jan. 2002.

UCHIKAWA, R., LOKER, E. S. Lectin-binding propeties of the surfaces of in vitro-transformed *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* sporocysts. **J Parasitol**, v. 77, p. 742-748. 1991.

UTZINGER J, TANNER M. Microhabitat preferences of *Biomphalaria pfeifferi* and *Lymnaea natalensis* in a natural and a man-made habitat in southeastern Tanzania. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**;v. 95, n. 3, p. 287-294, may-jun. 2000.

VALANNE, S.; WANG, J. H.; RÄMET, M. The Drosophila Toll signaling pathway. **J Immunol.** Review, v. 186, n. 2, p. 649-656, jan. 2011.

VAN DER KNAAP, W.; LOKER, E. Immune mechanisms in trematode-snails interactions. **Parasitol Today**, v. 6, p. 175-182. 1990.

VARGAS-ALBORES, F.; BARRACCO, M. A. **Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, con énfasis en Pectínidos.** Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciência y Acuicultura. Cap. 7: 127-146. 2001.

WEGGE, L.E. The activity of amoebocytes and of alkaline phosphatase during the regeneration of wall of the snail *Helix aspersa*. Q. J. **Microsc. Sci.**, v. 92, p. 307-321. 1951.

WHITE, M. M.; FRIED, B.; SHERMA, J. Effects of aestivation and starvation on the neutral lipid and phospholipid content of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni*. **J Parasitol.** v. 93, n. 1, p. 1-3, fev. 2007.

WILLIAMS, P.; COELHO, P.M.Z. Atraction of snail to betalights. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 67, p. 616-617. 1975.

WOLFE, L. et al. **Biology: the dynamic science.** Publicado por Cengage Learning EMEA, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record, Schistosomiasis**, v.86, n. 9, p.73–80. 2011.

YOSHINO, T. P. Encapsulation response of the marine prosobranch *Cerithidea californica* to natural infections of *Renicola buchanani* sporocysts (Trematoda:Renicolidae). **Int J Parasitol**, v. 6, p. 423-431, 1976.

YOSHINO, T. P.; GRANATH, W. O. JR. Surface antigens of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) hemocytes: functional heterogeneity in cell subpopulations recognized by a monoclonal antibody. **J Invertebr Pathol**. Mar; v. 45, n. 2, p. 174-186, 1985.

ZAMBON R. A, et al. The pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. **PNAS**, v. 102, p.7257-7262. 2005.

ANEXOS

ANEXO A: Parecer da Comissão de Ética

Título do Projeto: "Caracterização do sistema imune e identificação de receptores de membrana e moléculas solúveis presentes em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea*"

Pesquisador responsável: Fábio André Brayner dos Santos

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 18/02/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 02/08

Registro no CAAE: 0002.0.095.000-08

PARECER Nº 011/2008

O Comitê avaliou e considera que o Projeto em questão não envolve procedimentos relacionados às exigências de conduta ética envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96 e complementares.

Recife, 07 de março de 2008.


Aldemir Fernandes Freyre
Professor
Vice-Coordenador
CEPICPqAM/FIOCRUZ

ANEXO B: Confirmação de Submissão do Artigo

11/03/2011 Elsevier Editorial SystemTM

 Contact us 
Help 

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Author's Decision

Thank you for approving "Morphological character
glabrata and Biomphala

[View OC Results](#)
[Main Menu](#)

ANEXO C: Normas da Revista (MICRON)

ANEXO C: Normas da Revista (MICRON)

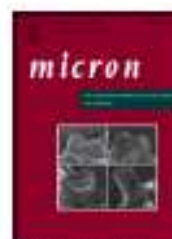

MICRON

The International Research and Review Journal for Microscopy

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0968-4328

DESCRIPTION

Micron aims to serve as an interdisciplinary forum for all work that involves new applications of microscopy or where microscopy plays a central role. The journal will publish on the design, application, practice or theory of microscopy and microanalysis, including reports on optical, electron-beam, and scanning-probe systems. It also aims at the regular publication of review papers.

The journal embraces original research work in biology, medicine, nanoscience and nanotechnology, materials science and engineering. Over the past several years, it has succeeded in publishing manuscripts within the shortest possible time while maintaining a high standard of refereeing and presentation. Author surveys indicate a high level of satisfaction with the journal.

AUDIENCE

Scientists and engineers involved in the design, application, practice or theory of microscopy and microanalysis.

IMPACT FACTOR

2009: 1.626 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2010

ABSTRACTING AND INDEXING

Aqualine Abstracts
 BIOMED
 BIOSIS
 Current Contents/Life Sciences
 EMBASE
 Elsevier BIOBASE
 INSPEC
 Research Alert
 SCISEARCH
 Science Citation Index
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors:

G. Cox, Electron Microscope Unit, F09, University of Sydney, Sydney, NSW 2006, Australia
(Biological Sciences)

R.F. Egerton, Dept. of Physics, University of Alberta, 11322 - 89 Avenue, Edmonton, T6G 2J1, Canada
(Physical Sciences)

J.R. Harris, Inst. of Zoology, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Müller Weg 6, D-55099 Mainz, Germany
(Biological Sciences)

Editorial Board:

U. Aebi, Basel, Switzerland

D. Bhella, Glasgow, UK

E.J. Boekema, Groningen, Netherlands

G. Botton, Hamilton, ON, Canada

F. Braet, Sydney, NSW, Australia

N.D. Browning, Davis, CA, USA

J.L. Carrascosa, Madrid, Spain

P. Gualtieri, Pisa, Italy

Sir P. Hirsch, FRS, Oxford, UK

F. Hofer, Graz, Austria

A. Holzenburg, College Station, TX, USA

J.L. Hutchison, Oxford, UK

H. Luensdorf, Braunschweig, Germany

D.A. Muller, Ithaca, NY, USA

L.-M. Peng, Beijing, China

M. Sarikaya, Seattle, WA, USA

M. Tzaphlidou, Ioannina, Greece

Z.L. Wang, Atlanta, GA, USA

Y. Zhu, Upton, NY, USA

GUIDE FOR AUTHORS

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

PREPARATION**Use of wordprocessing software**

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic Illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class "elsarticle", or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier "elsarticle" LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure**Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should consist of no more than 500 words and should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters including spaces, or, maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier.

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. An offprint order form will be supplied by the Publisher for ordering any additional paid offprints.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2010 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO D: Confirmação de Submissão do Artigo, Revista: Parasitology Research

Parasitology Research



Profile of the cellular response of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) infected by *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)

Journal:	<i>Parasitology Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cavalcanti, Marília; UFPB, Parasitology Mendonça, Adriana; CPqAM Docena, Cássia; CPqAM Padilha, Rafael; UFPE Barbosa, Constança; CPqAM De Castro, Célia; UFPE Alves, Luiz; CPqAM Brayner, Fábio; FIOCRUZ, Parasitology
Keywords:	<i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Biomphalaria straminea</i> , hemocyte behavior, morphology, <i>Schistosoma mansoni</i>

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO E: Normas da Revista (PARASITOLOGY RESEARCH)

ANEXO E: Normas da Revista (PARASITOLOGY RESEARCH)

29/4/2011

Parasitology Research



www.springer.com

Biomedical Sciences - Medical Microbiology | Parasitology Research



Parasitology Research

Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde

Editors: H. Mehlhorn, B. Chobotar

ISSN: 0932-0113 (print version)

ISSN: 1432-1955 (electronic version)

Journal no. 436

Instructions for Authors

Instructions for Authors

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title

springer.com/biomed/.../436?print_vie...

1/9

29/4/2011

Parasitology Research

- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT**Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 162 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

springer.com/biomed/.../4367print_vie...

29/4/2011

Parasitology Research

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones MJr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329

Article by DOI

Silfka MK, Whittin JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

TABLES

springer.com/biomed/.../4367print_vie...

3/9

29/4/2011

Parasitology Research

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

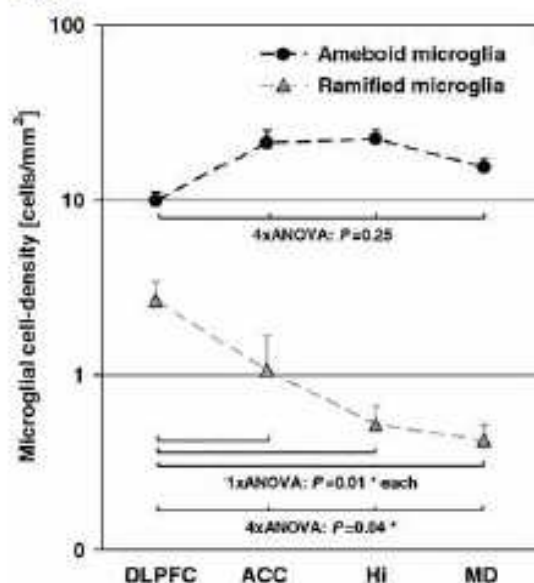
Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

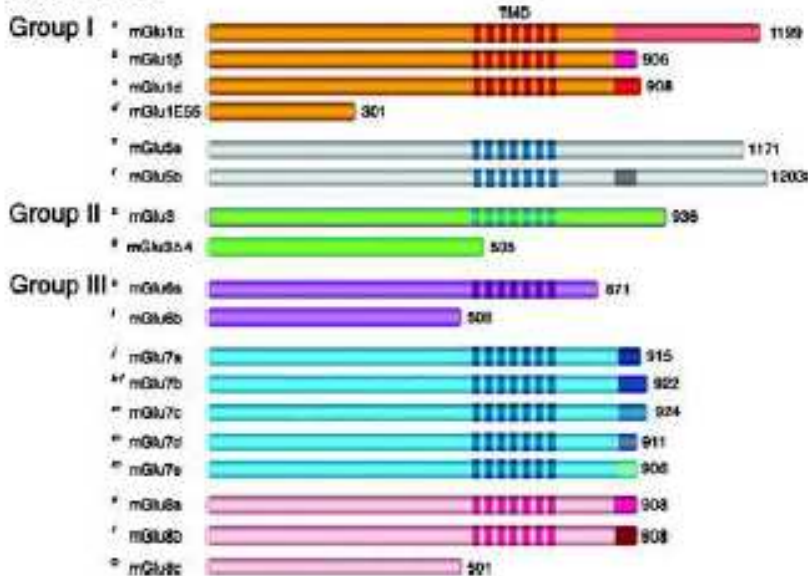
29/4/2011

Parasitology Research

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

**Combination Art**

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.

29/4/2011

Parasitology Research

- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 64 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

springer.com/biomed/.../436?print_vie...

6/9

29/4/2011

Parasitology Research

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names, affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vml (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

29/4/2011

Parasitology Research

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles.

Springer Open Choice**Copyright transfer**

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, they agree to the Springer Open Choice Licence.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proofreading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

29/4/2011

Parasitology Research

© Springer is part of Springer Science+Business Media