



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

BÁRBARA BROOKLYN TIMÓTEO NASCIMENTO SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DO CARAMUJO
Pomacea lineata SPIX, 1827 (MOLLUSCA: PULMONATA) EXPOSTOS AO
Schistosoma mansoni SAMBON, 1907**

**RECIFE
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

BÁRBARA BROOKLYN TIMÓTEO NASCIMENTO SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DO CARAMUJO
Pomacea lineata SPIX, 1827 (MOLLUSCA: PULMONATA) EXPOSTOS AO
Schistosoma mansoni SAMBON, 1907**

**Tese apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciência
Animal Tropical, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal Tropical.**

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadores:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

RECIFE

2018

BÁRBARA BROOKLYN TIMÓTEO NASCIMENTO SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DO CARAMUJO
Pomacea lineata SPIX, 1827 (MOLLUSCA: PULMONATA) EXPOSTOS AO
Schistosoma mansoni (SAMBON, 1907)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade.

Bárbara Brooklyn Timóteo Nascimento Silva

Aprovada em 19 de fevereiro de 2018 .

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves - CPqAM - FIOCRUZ

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos - CPqAM - FIOCRUZ

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

Ao meu amado e querido esposo Pablo Henrique, que esteve sempre ao meu lado e aos meus pais, razão do meu existir, dedico.

AGRADECIMENTOS

Posso, tudo posso Naquele que me fortalece, nada e ninguém neste mundo vai me fazer desistir. Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos, deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar... (Celina Borges)

Sem Deus, eu nada teria realizado. Meu Senhor e meu Deus te louvo e agradeço por todos os momentos em que fostes o meu chão, o meu alento e a minha única esperança. Obrigada por me conceder tamanha graça de ser uma Doutora! Jamais imaginei isso para mim, mas Tu realizaste este sonho. Obrigada!

Aos meus amados pais, Brenio Soares e Marinalva Timóteo, por terem me ensinado valores que são essenciais em minha vida: humildade, força, gratidão, respeito e perseverança. Por sempre terem investido em minha educação e acreditado que eu conseguiria. Palavras não são suficientes para agradecer-lhes. Amo vocês!

Ao meu esposo, Pablo Henrique, por seu amor, paciência, compreensão e cumplicidade. Sinceramente eu não teria conseguido se não fosse sua força me dizendo vai em frente! Você consegue! Não desiste! Só você me via quando chegava em casa após os experimentos que davam errado, em casa em frente ao computador produzindo um artigo com toda aquela pressão que só quem passa sabe! Obrigada Binho por ser tão compreensivo! Te amo!

À minha irmã Barbarella, pela amizade, carinho e amor e por ser um exemplo de dedicação e perseverança para conquistar seus objetivos. E não poderia deixar de falar no presente que ela me deu: Melissa, amor de titia.

Aos meus orientadores, os professores Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira pela oportunidade de ser sua orientanda. Pela acolhida e confiança, pelos ensinamentos e exemplo profissional desde a graduação.

Aos meus co-orientadores, professores Luiz Carlos Alves e Fabio Brayner por terem me acolhido de braços abertos. Por me apoiarem e estarem ao meu lado em todos os momentos desta tese. Vocês são excepcionais e eu os admiro muito como pessoa e profissionais. Obrigada de coração! Vocês têm grande parcela nesta conquista.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical pela oportunidade e concessão do local para a realização deste trabalho.

Ao corpo de professores do PPGCAT, em especial aos professores Anísio Soares e Pabyton Cadena por toda atenção e ajuda durante este doutoramento.

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami, pela estrutura concedida para realização dos experimentos. E aos amigos que fiz: Nairromberg (você foi essencial neste trabalho, muito gentil e dedicado, me ensinando com paciência e apoiando em tudo), Elverson (mais uma vez me ajudando desde o mestrado), Gabriel, às “Amandas”, Iany, Camila, Fernanda, Rafael Padilha, Olávio, Carmelita e Janaina, agradeço a acolhida e a grande ajuda.

Às minhas “bests”, Hilda, Aline Mariano, Carol, Welma, Cintia, Solange e Ismaela pelo apoio, incentivo e momentos felizes e de descontração que tivemos. A experiência de cada uma de vocês contribuiu com esta pesquisa e me proporcionou alicerces para seguir em frente. Obrigada de coração meninas pela amizade e companheirismo!

Aos amigos do laboratório de histologia: Rebeca, Clóvis, Marina, Aline Lira e Nane que sempre me ajudaram quando precisei e tornaram os dias mais leves e divertidos na rotina do laboratório. Especialmente Yuri, meu tradutor preferido, pela dedicação e prontidão em sempre me ajudar quando eu precisei.

À professora e amiga Fernanda Ângelo, pela disponibilidade e paciência na colaboração com este projeto.

Ao amigo Gyl Maciel, pela grande ajuda desde o mestrado me ensinando a cuidar dos aruás e pela sua imensa contribuição com esta pesquisa.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão desta pesquisa, muito obrigada!

FONTE FINANCIADORA

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi obter dados relacionados à imunidade de caramujos *Pomacea lineata* quando expostos aos miracídios de *Schistosoma mansoni*, visto que estes caramujos coabitam no mesmo ambiente com os caramujos hospedeiros intermediários obrigatórios para este parasita e não são vetores. Para isso, a geração F1 *P. lineata* provenientes de um criadouro comercial foi utilizada neste estudo. Para tanto, coletou-se a hemolinfa de *P. lineata* sadios e expostos à miracídios de *S. mansoni*, em diferentes tempos, formando os seguintes grupos experimentais: I- Caramujos não infectados e analisados após 24 horas da exposição luminosa; II - Caramujos expostos aos miracídios de *S. mansoni* e analisados após 24 horas da exposição luminosa; III - Caramujos não infectados e analisados após 48 horas da exposição luminosa; IV- Caramujos expostos aos miracídios de *S. mansoni* e analisados após 48 horas da exposição luminosa. A exposição desses animais aos miracídios de *S. mansoni* demonstrou alterações significativas nas análises da contagem total de hemócitos, fenoloxidase, óxido nítrico e proteínas totais. Houve marcação positiva do TNF alfa nos agranulócitos e granulócitos. Foram descritos três tipos de hemócitos em *P. lineata*: agranulócitos, hialinócitos e granulócitos. Houve também alteração no tecido fibromuscular do músculo pedal com a presença de vários esporocistos circundados por tecido de granulação. Assim, podemos concluir que quando expostos ao *S. mansoni*, o sistema imune do *P. lineata* desencadeia uma série de mecanismos para protegê-lo do parasita e que essa proteção se dá com mais intensidade nas primeiras 24h após a exposição.

Palavras-chave: *Pomacea lineata*, imunidade, *Schistosoma mansoni*, hemócitos, miracídios, microscopia eletrônica de transmissão.

ABSTRACT

The objective of this work is to obtain data related to the immunity of *Pomacea lineata* snails when exposed to the miracidia of platelets *Schistosoma mansoni*, since these snails cohabit in the same environment with the host snails obligatory intermediates for this parasite. For this, the F1 generation of *P. lineata* from a commercial breeding site was used in this study. The hemolymph of these *P. lineata* snails were collected and exposed to the miracidia of *S. mansoni*, at different times, forming the following experimental groups: I - Uninfected snails and analyzed after 24 hours of light exposure; II - Snails exposed to *S. mansoni* miracidia and analyzed after 24 hours of light exposure; III - Uninfected snails and analyzed after 48 hours of light exposure; IV - Snails exposed to *S. mansoni* miracidia and analyzed after 48 hours of light exposure. The exposure of these animals to *S. mansoni* miracidia showed significant changes in the analysis of total hemocytes, phenoloxidase, nitric oxide and total proteins. There was positive labeling of TNF alpha in agranulocytes and granulocytes. Three types of hemocytes were described in *P. lineata*: agranulocytes, hyalinocytes and granulocytes. There was also alteration in the fibromuscular tissue of the pedal muscle with the presence of several sporocysts surrounded by granulation tissue. Thus, we can conclude that when exposed to *S. mansoni*, the immune system of *P. lineata* triggers a series of mechanisms to protect it from the parasite and that this protection occurs more intensely in the first 24 hours after exposure.

Keywords: *Pomacea lineata*, immunity, *Schistosoma mansoni*, hemocytes, miracidia, transmission electron microscopy.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Exemplos de caramujos *Pomacea lineata*.....21
- Figura 2.** Massa de ovos madura de caramujo *Pomacea lineata*.....23
- Figura 3.** Exemplos de caramujos do gênero *Biomphalaria*: A. *Biomphalaria glabrata*; B. *Biomphalaria tenagophila*; C. *Biomphalaria straminea*.....28
- Figura 4.** Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*: A. Vermes adultos; B. Ovos eliminados com as fezes de uma pessoa infectada. C. Eclosão na água e liberação de um miracídio; D. No interior do caramujo, cada miracídio transforma-se em um esporocisto primário, que gera esporocistos filhos, os quais formam cercárias em seu interior; E. Caramujo libera as cercárias que nadam ao encontro do homem, onde completam sua evolução para chegarem a vermes adultos.....38
- Figura 5.** Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2009 - 2014.....41

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Contagem total de hemócitos em caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h.....78
- Figura 2.** Imagens dos diferentes tipos de hemócitos classificados para o caramujo *Pomacea lineata* (A) agranulócito; (B) agranulócito em divisão; (C)

granulócito e (D) hialinócitos. Coloração Giemsa, Barras = 20µm. Setas curtas – grânulos (n=5 caramujos/tratamento).....78

Figura 3. Contagem diferencial de agranulócitos em caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h.....79

Figura 4. Contagem diferencial de hialinócitos em caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h.....79

Figura 5. Contagem diferencial de granulócitos em caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h.....80

Figura 6. Atividade da enzima fenoloxidase na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h.....80

Figura 7. Dosagem de óxido nítrico na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h.....81

Figura 8. Concentração de proteínas totais na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h.....81

Figura 9. Imunohistoquímica para o TNF-α nos hemócitos presentes na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata*. A, B e C - agranulócito, granulócito e hialinócito (controle); D, E e F - agranulócito, granulócito e hialinócito (24h após

exposição ao *Schistosoma mansoni*) e G, H e I - agranulócito, granulócito e hialinócito (48h após exposição ao *Schistosoma mansoni*). Barras = 20µm.....82

Figura 10. Corte histológico do músculo pedal (pé) dos caramujos dos grupos experimentais. (A-B) controle 24 h; (C-D) expostos 24 h e (E-F) expostos 48 h. asteriscos - tecido epitelial, Tfm - tecido fibromuscular, setas - esporocistos, Detalhe - esporocisto circundado por tecido de granulação. ponta de seta - área com fibrose acentuada e tecido de granulação. Coloração H.E. Barras = 10µm.....83

CAPÍTULO III

Figura 1. Eletromicrografia de hemócitos de caramujos *Pomacea lineata* sadios. (A-B) agranulócitos; (C-D) hialinócitos; (E-F) granulócitos. N- núcleo, seta longa- retículo endoplasmático rugoso, seta curta- vacúolos, ponta de seta- projeções citoplasmáticas, g- grânulos eletroluscentes, m- mitocôndrias, r- ribossomos.....107

Figura 2. Eletromicrografia de hemócitos de caramujos *Pomacea lineata* após 24 horas de exposição ao *Schistosoma mansoni*. (A-B) agranulócitos; (C-D) hialinócitos; (E-F) granulócitos. N- núcleo, seta longa- retículo endoplasmático rugoso, seta curta- vacúolos, ponta de seta- projeções citoplasmáticas, g- grânulos eletroluscentes, m- mitocôndrias, r- ribossomos, asteriscos- vesículas fagocíticas.....108

Figura 3. Eletromicrografia de hemócitos de caramujos *Pomacea lineata* após 48 horas de exposição ao *Schistosoma mansoni*. (A-B) agranulócitos; (C-D) hialinócitos; (E-F) granulócitos. N- núcleo, seta longa- retículo endoplasmático rugoso, seta curta- vacúolos, ponta de seta- projeções citoplasmáticas, g- grânulos eletroluscentes.....109

SUMÁRIO

Capítulos	Pág.
I	
1. Introdução	17
2. Revisão de Literatura.....	19
2.1 Filo Mollusca.....	19
2.2 <i>Pomacea lineata</i> : características e importância.....	21
2.3 <i>Biomphalaria</i> spp.....	27
2.4 Sistema imunológico dos gastrópodes.....	29
2.4.1 Imunidade celular.....	30
2.4.2 Imunidade humoral.....	33
2.5 <i>Schistosoma mansoni</i>	37
2.6 Esquistossomose.....	38
3. Objetivos.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4. Referências.....	45
II	
Parâmetros imunológicos do caramujo <i>Pomacea lineata</i> Spix, 1827 (Mollusca: Caenogastropoda) expostos ao <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon, 1907.....	66
Resumo.....	67
Abstract.....	68
1. Introdução.....	69
2. Materiais e métodos.....	70
3. Resultados.....	75
4. Discussão.....	84
5. Conclusão.....	89
6. Agradecimentos.....	89
7. Referências.....	90
III	
Ultraestrutura de hemócitos de <i>Pomacea lineata</i> Spix 1827 (Gastropoda: Pulmonata) expostos ao <i>Schistosoma mansoni</i> Sambon 1907.....	100

Resumo.....	101
Abstract.....	102
1. Introdução.....	103
2. Materiais e Métodos.....	104
3. Resultados.....	106
4. Discussão.....	110
5. Conclusão.....	111
6. Referências.....	112
Anexos.....	118

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A imunidade dos moluscos vem sendo mais estudada nas últimas décadas, contudo, o conhecimento sobre os mecanismos celulares e moleculares de defesas imunitárias dos moluscos ainda está longe de ser compreendida (CANESI et al., 2002; PAUL, 2003; TISCAR; MOSCA, 2004; VASTA; AHMED, 2008), havendo ainda muitas discordâncias de como se dão estes mecanismos de resposta à infecção em moluscos (MELO, 2015).

A literatura abrange hoje muitos estudos que buscam a compreensão da resposta imune em diferentes grupos de invertebrados, demonstrando uma variabilidade de como se dá esta resposta em relação ao parasita. Esta variabilidade consiste na diferença entre os parasitas e também dos hospedeiros. Alguns autores afirmam que mesmo sendo uma resposta mais simples quando comparado aos vertebrados, eles conseguem sim, defender de forma específica aos possíveis agentes patogênicos (BAILEY; CHRISTOFORIDOU; LEWIS, 2013; SUN; UGOLINI; VIVIER, 2014). Não obstante, uma resposta imune mais complexa pode ser desencadeada gerando uma grande diversidade de moléculas responsáveis pela defesa desses organismos aos mais variados agentes patogênicos (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2013).

A relação parasita-hospedeiro depende, dentre outros fatores, do sistema intrínseco de defesa dos hospedeiros (MACHADO et al., 1988). O sistema de defesa dos moluscos possui uma resposta inata bastante desenvolvida, que consiste na defesa humoral, mediada por substâncias presentes na hemolinfa, e na defesa celular mediada por hemócitos (CAVALCANTI et al., 2012; VARGAS-ALBORES et al., 2001).

Além de fagocitar partículas estranhas, os hemócitos podem fazer a nodulação e no caso de invasores maiores, podem ainda realizar a encapsulação (WOOD; JACINTO, 2007). Os hemócitos produzem também moléculas efetoras como: a fenoloxidase, enzima que desencadeia processos de defesa contra patógenos através da melanização e ativação da via do óxido nítrico (GONZALEZ-SANTOYO; CÓRDOBA-AGUILAR, 2011), e também a citocina Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) encontrada na hemolinfa de alguns moluscos (HUGHES et al., 1990, 1993;

BOYER, 1994; GRANATH et al., 1994; OTTAVIANI et al., 1995; BETTI et al., 2006; DE ZOYSA et al., 2009).

Nos moluscos, dentro da família *Ampullariidae*, o gênero *Pomacea* possui o maior número de espécies, com cerca de 50 (HORGAN; STUART; KUDAVIDANAGE, 2012). Seu habitat é caracterizado, geralmente, por zonas marginais mais rasas dos corpos hídricos, predominando nos ambientes lânticos, mas também sendo capaz de habitar sistemas lóticos e correntes rápidas por pouco período de tempo (KWONG et al., 2008). Nesses ambientes, frequentemente compõem a maior parte das faunas nativas de moluscos de água doce (COWIE, 2003).

As espécies do gênero *Pomacea* são encontradas em quase toda América do Sul e Central, onde está principalmente distribuída no Brasil, Argentina, Costa Rica, Guiana, Venezuela, Bolívia, Uruguai, Guatemala, Cuba e com apenas uma espécie no sudeste dos Estados Unidos (DARBY, 1999; BARBOZA; COSTA; ROMANELLI, 2006; TANAKA; SOUZA; MÓDENA, 2006). No Brasil as espécies de moluscos do gênero *Pomacea* apresentam distribuição setentrional e litorânea, observando-se em habitats dulcícolas desde o Nordeste até o Sudeste do país (THIENGO, 1995), sendo nativa principalmente na região da Mata Atlântica (HAYES et al. 2009).

A maioria dos estudos com *P. lineata*, envolve aspectos relacionados à biologia, ecologia e fisiologia, pois são considerados como espécies invasoras (HORGAN; STUART; KUDAVIDANAGE, 2012), também são bastante utilizados no acompanhamento da qualidade das águas (PAULINI; PAULINI, 1971; DAS; KAHANGAROT, 2010), visto que atuam como bioindicadores no ambiente onde são encontrados (MELO et al., 2000; MARQUES; BARBOSA, 2001; COLER et al., 2005) pois a densidade de *P. lineata* no ambiente está diretamente ligada às boas condições hídricas (JUNIOR et al., 2013). Estes caramujos também são grandes protagonistas em ensaios toxicológicos por serem bastante sensíveis à mudança de ambiente (BATALLA, 1997; MELO et al., 2000; PÊSSOA et al., 2007). Um estudo referente à imunidade de *P. lineata* foi obtido no trabalho de Silva (2014) onde a autora descreve aspectos relacionados ao sistema de defesa desses animais em condições normais e de estivação induzida.

Os indivíduos dessa espécie habitam ambientes aquáticos, principalmente lagos, poços e riachos e partilham do mesmo ambiente com espécies de caramujos

hospedeiro do verme trematódeo *Schistosoma mansoni* (GUIMARÃES et al., 2009). Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são bem investigados na literatura em relação a este parasita, já que são os responsáveis pela disseminação do *S. mansoni*, entretanto, não há estudos pertinentes para o comportamento do sistema de defesa do *P. lineata* em relação a este trematódeo, sendo relevante o conhecimento nesta perspectiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Filo Mollusca

Espécimes do Filo Mollusca estão entre os invertebrados mais evidentes e familiares e incluem formas tais, como os mariscos, as lulas, os polvos e os caramujos. Este filo abrange sete classes: Monoplacophora (possuem uma única concha simétrica), Polyplacophora (conhecidos por quítons, tem corpo oval e é coberto não apenas por uma placa de concha única, mas de oito placas sobrepostas), Aplacophora (pequenos animais de corpo vermiforme), Gastrópoda (maior classe do filo, com conchas espirais assimétricas, incluem caracóis, caramujos e lesmas), Pelecypoda ou Bivalvia (concha composta por duas valvas, como os mexilhões, ostras e mariscos), Scaphopoda (moluscos marinhos escavadores e que apresentam a concha em forma de tubo cilíndrico alongado, conhecidos por conchas-presas ou dentes) e Cephalopoda (animais de maior porte dentre os invertebrados, onde a cabeça projeta-se em um círculo de grandes tentáculos ou braços preenseis, são os náutilos, sépias, lulas e polvos) (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

O interesse no estudo dos moluscos se deve, tal como no caso de muitos outros animais, à sua participação na manutenção do equilíbrio ecológico da natureza, como por exemplo, seu papel na reciclagem de detritos (DEYRUP-OLSEN; MARTIN, 1987). O filo Mollusca é considerado o segundo maior em número de espécies após os Arthropoda. Na costa brasileira, estão registradas cerca de 1.600 espécies marinhas. Devido à presença de conchas calcárias, o grupo está amplamente representado no registro fóssil que data desde o Período

Cambriano. Os moluscos são invertebrados com grande capacidade adaptativa, estando representados nos mais variados tipos de ambiente e com hábitos os mais diversos. A maioria das espécies é marinha: alguns gastrópodes e bivalves atingiram o ambiente de água doce e apenas parte dos primeiros alcançaram o ambiente terrestre. Há grupos de gastrópodes e bivalves comensais e gastrópodes endoparasíticos, estes últimos muito modificados, sendo reconhecidos como moluscos pelas características larvais (RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2002).

As características que definem a monofilia de Mollusca são: celoma reduzido, sistema circulatório aberto, presença de manto com espículas calcárias e rádula. O celoma restringe-se às regiões do coração, gônadas e rins. O manto é uma área ampla de epitélio dorsal com cutícula engrossada, que produz espículas ou uma ou mais conchas calcárias. A rádula localiza-se na cavidade bucal e é formada por um cinturão de dentes quitinosos curvos, tendo como principais funções a raspagem e a coleta de alimentos. Outros caracteres também são reconhecidos na maioria dos representantes desse grupo. Um deles é a presença de uma concha produzida pelo manto, que se completamente desenvolvida, recobre a maior parte do corpo do animal, protegendo-o contra predadores. Outro carácter, o músculo pedal ou pé, assemelhando-se a uma ampla sola rastejadora ventral, recoberta por epitélio ciliado e glândulas mucosas, que produzem muco que lubrifica a superfície auxiliando a locomoção (RIBEIRO-COSTA; ROCHA, 2002) e também fornecendo uma barreira inicial à colonização de patógenos (VIEIRA et al., 2004)

São animais que exibem virtualmente todos os tipos de hábitos alimentares: herbívoros, carnívoros, consumidores de detritos e de suspensão e parasitas. No entanto, algumas generalizações podem ser feitas como a utilização da rádula para raspar o alimento (com exceção da classe Bivalve que são filtradores), a digestão é extracelular graças às enzimas digestivas presentes nas glândulas salivares, bolsas esofágicas e divertículos digestivos. O sistema sanguíneo vascular é uma hemocele. O sangue flui das brânquias para uma (ou mais) aurícula (s). A partir de cada aurícula, o sangue passa pelo ventrículo central que o bombeia através da aorta para a distribuição aos seios teciduais. O coração é circundado por uma cavidade celômica (cavidade pericárdica) que recebe um ultrafiltrado de hemolinfa. O sistema nervoso consiste de um anel nervoso, a partir do qual se estende um par de cordões nervosos podais e um par de cordões viscerais. Os órgãos sensoriais típicos são os

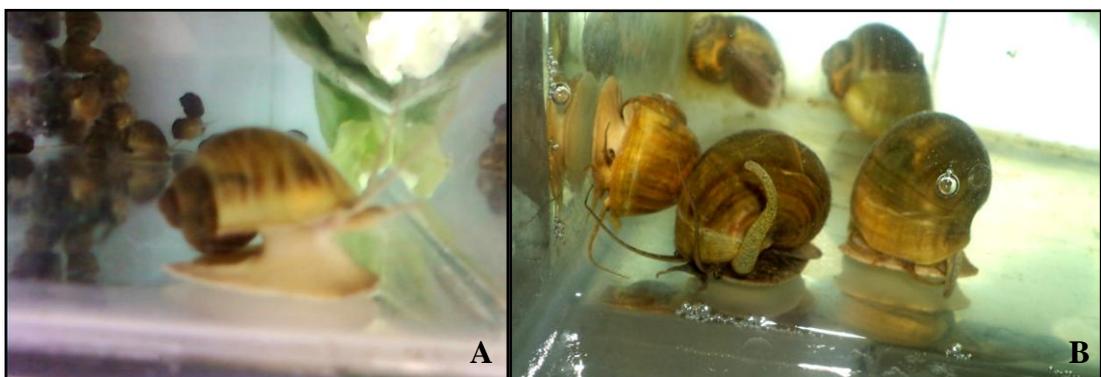
tentáculos, os olhos, os estatocistos e um ou dois osfrádios na cavidade do manto (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

2.2 *Pomacea lineata*: características e importância

A espécie *Pomacea lineata* Spix, 1827, caramujo popularmente conhecido como aruá (Fig. 1), pertence ao filo Mollusca, classe Gastropoda, que possui em torno de 50.000 espécies vivas, dentre estas, 30.000 são gastrópodes. Além disso, conhecem-se cerca de 35.000 espécies fósseis, pois o filo tem uma longa história geológica, onde os registros fósseis datam do período Cambriano (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

Este gastrópode insere-se na família Ampullariidae, também conhecida como os ampularídeos tropicais (MELO et al., 2000) e habita zonas baixas das margens dos rios, riachos, lagos e pântanos de águas calmas. A espécie *P. lineata* pode ser amplamente encontrada no continente sul-americano, mas encontra-se dispersa na região Nordeste do Brasil (GUIMARÃES, 1981). Apresentam concha de tamanho médio, geralmente globular, de coloração castanho-esverdeada, ornamentada com faixas espirais escuras, espira geralmente curta, opérculo córneo e flexível, não calcificado. O pé tem a forma de escudo e sua coloração pode variar de cinza escuro à amarelada (THIENGO, 1995).

Figura 1. Exemplos de caramujos *Pomacea lineata*. Fonte: do autor.



Os representantes do gênero *Pomacea* no Brasil são conhecidos popularmente como aruá, aruá-do-banhado, aruá-do-brejo, caramujo-do-banhado, fuá e arauá (IHERING, 1968; SANTOS, 1982). Além de *P. lineata* há um amplo número de espécies incluídas neste gênero, tais como: *P. canaliculata* Lamarck, 1804, *P. bridgesii* Reeve, 1856, *P. paludosa* Say, 1829, *P. sordida* Swainson, 1823, *P. aulanieri* Hupé & Deville, 1850, *P. columellaris* Gold, 1848, *P. curumim* Simone, 2004, *P. decussata* Moricand, 1836, *P. diffusa* Blume, 1957, *P. dolioides* Blume, 1957, *P. glauca* Linnaeus, 1758, *P. guyanensis* Lamarck, 1819, *P. haustum* Reeve, 1856, *P. maculata* Perry, 1810, *P. meta* Ihering, 1915, dentre outras.

São dioicos, com fertilização interna, ovíparos (BURELA; MARTÍN, 2007), cujos machos possuem um pênis que se origina na borda direita do manto e aloja-se num saco basal, denominado saco ou bolsa do pênis, isto permite a distinção dos sexos na dissecação (MESQUITA; COELHO; SANTOS, 1990). Os machos são geralmente menores que as fêmeas e estas últimas iniciam a ovoposição 24 horas após a cópula e as desovas são sempre postas acima do nível da água (THIENGO, 1995). Nas fêmeas, o ovário, também conhecido por glândula de albumina, é constituído por túbulos ramificados branco-amarelados, situados superficialmente sobre a glândula digestiva (THIENGO, 1987).

A reprodução é a garantia da continuidade de uma espécie no ambiente, e para os gastrópodes terrestres esta função vital é continuada pela deposição de ovos. A glândula de albumina representa uma grande importância no desenvolvimento de caramujos terrestres, visto que este órgão é responsável pela produção de ovos, fazendo parte do sistema reprodutor das fêmeas e está envolvida no processo de reprodução (THIENGO, 1995). Quando em estágio de maturação a glândula apresenta uma cor alaranjada e tem tamanho variado, mas de forma geral é bem volumosa (CARREÓN-PALAU et al., 2003).

As fêmeas maduras depositam uma massa brilhante que pode chegar a 400 ovos de cor alaranjada a rosada (Fig. 2) sempre acima da superfície da água e nos substratos de seus habitats (BURELA; MARTÍN, 2007), podendo também ser facilmente visualizada na vegetação emergente, estruturas e rochas acima do nível da água ao longo do ambiente onde estes animais são encontrados (COLER et al., 2005). À medida que os ovos amadurecem, a cor torna-se mais clara, atingindo uma

tonalidade esbranquiçada, quando próximo à eclosão. Esta ocorre, geralmente, 15 dias após a ovoposição, em uma temperatura média de 25°C (THIENGO, 1995).

Figura 2. Massa de ovos madura de caramujo *Pomacea lineata*. Fonte: do autor.



A respeito da importância ecológica, a espécie *P. lineata* é bastante estudada, sendo útil para o avanço das diretrizes de qualidade de água para proteger a biota aquática (DAS; KHANGAROT, 2010), e também exercendo um papel importante na “limpeza natural” do leito dos rios e outros corpos de água (PAULINI; PAULINI, 1971). Segundo Marques e Barbosa (2001), moluscos estão entre os macroinvertebrados bioindicadores, uma vez que são sensíveis à poluição e variações do habitat. Nos anos 60 surgiram as primeiras tentativas de quantificar o grau de poluição levando em conta a incidência de uma determinada espécie e sua tolerância à poluição. Também atuam como controladores biológicos naturais do *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (CIMERMAN; CIMERMAN, 2005). É importante destacar ainda que esta espécie também possui grande importância na cadeia alimentar, pois serve de alimento para peixes, anfíbios, répteis, entre outros animais (PAULINI; PAULINI, 1971), além de também servirem como alimento humano (STORER et al., 2003).

Várias pesquisas também apontaram a importância do gênero *Pomacea* no monitoramento da qualidade de águas no Nordeste do Brasil (COLER et al., 2005). Melo et. al. (2000) propuseram o *P. lineata* como um organismo teste de toxicidade aguda em emissários de uma fábrica utilizando neonatos, semelhante ao trabalho de Melo (2000) que usou a mesma espécie como organismo teste de toxicidade em

mananciais de água doce e Batalla (1997) que estudou o efeito de toxicidade ao herbicida *Paraquat* na resistência do caramujo. Outra pesquisa utilizando esta espécie foi a de Pessôa et al. (2007) que além de avaliar a toxicidade aguda, observou os efeitos citotóxico e espasmolítico tanto no molusco quanto na sua desova.

Houve também efeitos negativos na introdução de caramujos, tanto em habitats naturais como em áreas agrícolas no Sudeste Asiático, (RAWLINGS et al., 2007) pois estes animais são considerados como pragas agrícolas em plantações de arroz no Oriente (COLER et al., 2005). Os membros de gastrópodes de água doce da família *Ampullariidae*, conhecido como caramujos, tem um histórico impressionante de espécies invasoras. Espécies de três gêneros, *Pila*, *Pomacea* e *Marisa*, têm demonstrado uma capacidade tenaz para sobreviver e se espalhou rapidamente nos habitats de água doce em que tenham sido introduzidas (HALE, 1964; COWIE, 1995).

Na medicina popular estes animais são utilizados com finalidades terapêuticas, em diferentes culturas humanas desde tempos antigos, tanto o animal inteiro como os produtos e substâncias dele extraídos, assim como sua desova, no tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais (COSTA NETO, 2006). Nomura (1996) relatou na Inglaterra do século XVIII, que o *P. lineata* era consumido principalmente para dissolver cálculos renais e no Nordeste brasileiro, e na Argentina contra a disenteria e quando aplicados como emplastro, acredita-se que ajudam na cicatrização de feridas (SANTOS, 1982).

Os estudos farmacológicos únicos descritos na literatura demonstraram o efeito espasmolítico de *P. lineata* e desova na traqueia do porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) sem efeito sobre seu tom espontâneo além de efeitos espasmolíticos e antiespasmódicos no íleo do cobaia. Estes resultados validaram o seu uso popular no tratamento de doenças respiratórias com broncoconstrição sem demonstrar efeitos colaterais e no tratamento de distúrbios caracterizados por espasmos gastrointestinais (PESSÔA et al. 2007).

A desova desse gastrópode já foi usada no tratamento de luxação dos pés e também contra disenteria. No Norte e Nordeste brasileiros utiliza-se o caramujo e sua desova como remédio contra as doenças do aparelho respiratório como tosse,

asma e tuberculose (PESSÔA et al., 2007). Registros locais também indicam que na comunidade de Várzea da Marituba, baixo São Francisco alagoano, o uso da desova de *P. lineata* para tratar “carnegão” (abscesso) (MARQUES, 1995) e no povoado de Remanso, Chapada Diamantina recomendava a desova no tratamento de torções, inchaços nos pés e asma (COSTA NETO, 2000). O tratamento para a asma com a desova deste molusco também foi estudada por Branch; Silva (1983). Há também registros de que a hemolinfa desse gastrópode é rica em cálcio; por conseguinte, poderia receitá-la contra o raquitismo e o muco, tinha o poder de cura contra verrugas e manchas de pele, bem como dores de cabeça e acidez gástrica (GUIMARAES, 1981).

Entre os animais com um elevado potencial como fonte de alimentos podem ser encontrados moluscos do gênero *Pomacea*, que são ricos em proteínas, carboidratos, gordura, glicogênio e aminoácidos essenciais (GUIMARÃES, 1981). Sua produção vem ganhando notoriedade e vem sendo utilizada como fonte de alimento, principalmente em regiões pobres devido ao alto valor nutricional que esses animais apresentam (JUNIOR et al., 2013).

De acordo com Pessôa et al. (2015), *P. lineata* pode ser usado como uma fonte de proteína, assim como outros tipos de carne consumida pelo homem. Estes autores certificaram que o molusco é um bom alimento, uma vez que é fonte de proteína de alta qualidade nutricional, e enquanto esta proteína é de origem animal, apresenta melhor aproveitamento pelo organismo em relação à maioria das proteínas de origem vegetal. Ainda apresenta baixos teores de lipídios e carboidratos e valor energético (65,7 kcal / 100 g), abaixo de outras carnes magras, como peixe (96,5 kcal) e frango (106,7 kcal), altos teores de cálcio e ferro, minerais essenciais com importantes propriedades fisiológicas (MAHAN; ESCOT-STUMP, 2002). Um elevado teor de cálcio, também foi encontrado na desova de *P. lineata*, fato este que pode ser explicado pela necessidade deste íon para a construção da concha (PESSÔA et al. 2015).

Na indústria, Barboza e Romanelli (2004) em seu estudo concluíram que as farinhas de vísceras produzidas a partir dos moluscos *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) e *P. lineata* podem ser utilizadas como matérias primas, constituindo-se ótimas fontes de nutrientes como proteínas de alto valor biológico, sais minerais e

vitaminas do complexo B, considerado um ingrediente nutricional importante na elaboração de ração para animais domésticos movimentando atualmente um crescente mercado. Bombeo-Tuburan et al. (1995) estudou a aplicação desse caramujo, como o suprimento de alimentos na cultura do camarão, concluindo que há aumento na produção de camarão e melhora na distribuição de tamanho e frequência de colheita.

Por serem animais encontrados em ambientes dulcícolas que geralmente estão predispostos a longos períodos de estiagem, os *P. lineata*, assim como todos os gastrópodes pulmonados, desenvolveram estratégias para sobreviverem a estes estresses ambientais. Uma dessas estratégias é a estivação, denominada por alguns autores como “sono de verão” ou dormência na estação seca (STOREY; STOREY, 2012), uma referência ao estado de dormência que algumas espécies, tanto de vertebrados como de invertebrados, assumem em resposta às temperaturas ambientais elevadas ou ao perigo de desidratação, ou ambos, podendo estar associado com uma depressão metabólica profunda (GUPPY; WITHERS, 1999; ROJAS et al., 2000).

Segundo Storey (2002) durante a estivação, os moluscos não se alimentam e as suas reservas de energia são utilizadas apenas para sustentar o metabolismo basal. Conseqüentemente, não há energia disponível para o crescimento. Moreno-Rueda (2008) mostrou que durante a estivação ocorre perda de peso. Condições áridas que restringem a disponibilidade de água e de alimentos são o ponto comum para estivação, quase sempre acompanhado por altas temperaturas do verão. Os principais fatores necessários para o sucesso na estivação envolvem água: conservação de água do corpo, ajustes para lidar com a restrição de água e, às vezes mudança para a manipulação de produtos finais nitrogenados (STOREY; STOREY, 2012).

Uma forte depressão da taxa metabólica durante a estivação minimiza o uso de energia para prolongar o tempo total de sobrevivência (KÜLTZ, 2005). A estivação não é necessariamente desencadeada apenas por fatores ambientais, pois quando expostos a luz artificial constante, o anfíbio *Scaphiopus couchii* (Baird, 1854) entra em dormência e espontaneamente, deixam de se alimentar na fase em que estariam em estivação (PINDER; STOREY; ULTSCH, 1992).

Adaptações fisiológicas e comportamentais das mais variadas são encontradas na fauna de água doce, com o intuito de resistir às secas intermitentes. Segundo Abílio et al. (2007) e Willians (2006) nos gastrópodes o opérculo veda completamente a abertura da concha em alguns animais, como no *P. lineata*; há o desenvolvimento de pseudo-brânquias e produção de lamelas vedando a concha, como no *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848); espécies de *Melanoides tuberculata* Miffler, 1774 escavam o sedimento e permanecem em estivação.

2.3 *Biomphalaria* spp.: características e importância

Os caramujos do gênero *Biomphalaria* pertencem ao filo Mollusca, classe Gastropoda, ordem Pulmonata, subordem Basommatophora, família Planorbidae e compreendem apenas moluscos terrestres ou de água doce, sem opérculo que feche a concha quando o animal se retrai para dentro (REY, 2002). Possuem grande relevância clínica e epidemiológica, pois agem como hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose. Onze espécies deste gênero são descritas no Brasil, destas, *B. glabrata* SAY, 1818, *B. straminea* Dunker, 1848 e *B. tenagophila* d' Orbigny, 1835 são encontradas naturalmente infectadas com o parasita (SCHOLTE et al., 2012).

Indivíduos do gênero *Biomphalaria* são amplamente distribuídos no Brasil (NUNES; RODRIGUES, 2007). A distribuição da esquistossomose no país coincide com a distribuição geográfica das espécies de *Biomphalaria* susceptíveis; no entanto, o nível de susceptibilidade em cada espécie ou linhagem do molusco pode influenciar na prevalência da infecção humana (MATTOS, 2011). Além disso, os caramujos apresentam uma boa capacidade de adaptação a diversos nichos ecológicos (GUIMARÃES et al., 2009).

O *B. glabrata* (Fig. 3A) é o mais suscetível dos hospedeiros intermediários no Brasil devido à sua distribuição e eficiência na transmissão da esquistossomose. Já a *B. tenagophila* (Fig. 3B) possui distribuição ao longo da costa, desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul. Por outro lado, a *B. straminea* (Fig. 3C), uma das mais adaptadas às variações climáticas, é encontrada em quase todas as bacias hidrográficas e apresenta uma resistência intermediária à infecção pelo *S. mansoni*

(MARCHIORI, 1999). Estes caramujos habitam áreas naturais ou corpos d'água artificiais, frequentemente efêmeros, sujeitos à secas periódicas.

Figura 3. Exemplos de caramujos do gênero *Biomphalaria*: A. *Biomphalaria glabrata*; B. *Biomphalaria tenagophila*; C. *Biomphalaria straminea*. Fonte: CARVALHO et. al. 2005.



Entre os planorbídeos hospedeiros intermediários de *S. mansoni*, duas principais espécies ocorrem no estado de Pernambuco, o *B. glabrata*, considerada a espécie mais importante tanto pela amplitude de distribuição quanto pela eficiência na transmissão, dos elevados índices de infecção, e o *B. straminea* (SILVA et al., 2008) que possui uma alta dispersão geográfica (BRASIL, 2007), mostrando-se como principal agente na manutenção do ciclo do parasita (FERNANDEZ; PIERI, 2001).

Entre as espécies que carregam o parasita, a principal sem dúvida é a *B. glabrata*, que possui alta susceptibilidade, agindo como principal e eficiente vetor do parasita, agravando ainda mais o quadro da doença mundialmente. Sua alta taxa de susceptibilidade, garante a espécie um potencial alvo de estudos de interação parasita-hospedeiro, apoiando no desenvolvimento para a compreensão acerca desse tema (PORTELA JUNIOR, 2016).

A interação *Biomphalaria-S. mansoni* vai depender da compatibilidade fisiológica e bioquímica entre hospedeiro e parasita, onde o sucesso da infecção se manifestará de acordo com a ação do sistema interno de defesa do caramujo. A capacidade de reação do sistema de defesa desses hospedeiros intermediários na destruição do parasita é o que define a susceptibilidade do *Biomphalaria* à infecção ao *Schistosoma* (SOUZA et al, 1997).

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* apresentam diferentes graus de susceptibilidade dependendo da espécie em questão e da linhagem ao qual pertencem. Como o *B. tenagophila*, por exemplo, apresenta a linhagem Taim-RS altamente resistente, enquanto que a Cabo Frio-RJ é mais susceptível à infecção a

esta parasitose (COELHO, 1995), bem como a linhagem R3 da espécie *B. straminea* que é altamente resistente à infecção quando comparado ao *B. straminea* natural, que é pouco susceptível (PORTELA JUNIOR, 2015).

Bayne e colaboradores (1980 a, b) verificaram que a hemolinfa livre de células e retirada de linhagens susceptíveis e resistentes de *B. glabrata* não é competente em alterar visivelmente a morfologia do esporocisto *in vitro*, o mesmo acontecendo com a hemolinfa contendo hemócitos de linhagens susceptíveis. Por outro lado, o esporocisto é eliminado quando incubado com fatores solúveis da hemolinfa e hemócitos de linhagens resistentes, demonstrando assim a presença de substâncias competentes para a destruição do parasita. Além disso, os hemócitos de linhagens susceptíveis, quando incubados juntamente com fatores solúveis da hemolinfa de linhagens resistentes, adquirem capacidade de destruir os esporocistos. Um estudo de Granath & Yoshino (1984) relatou que a transferência de plasma obtido de linhagens resistentes de *B. glabrata* para linhagens suscetíveis, resultou em uma redução da taxa de infecção de linhagens de *B. glabrata* suscetíveis pelo *S. mansoni*.

2.4 Sistema imunológico dos gastrópodes

A imunidade dos gastrópodes é ainda pouco conhecida, em parte porque a maioria dos estudos foca em um segmento muito pequeno da diversidade desta classe de moluscos. A superfície macia e úmida do corpo dos gastrópodes é envolvida por um epitélio ciliado que produz muco, fornecendo uma armadilha física inicial e barreira à colonização de patógenos (VIEIRA et al., 2004). O isolamento do muco do corpo do caracol *A. fulica* (Bowdich, 1822), conhecido como gigante africano sugere também que o muco proporciona uma barreira química. A produção regular e eliminação constante do muco no corpo do animal, provavelmente também é vantajoso na limpeza da superfície a qual eles deslizam, protegendo-os de agentes patogênicos como bactérias que são estimulados a crescer em biofilmes no muco (LOKER, 2010).

O sistema circulatório dos gastrópodes é aberto, ou seja, a hemolinfa circula fora de vasos, sendo preenchido com células de defesa circulantes chamadas

hemócitos (anteriormente chamados de amebócitos) que desempenham funções de fagocitose e reações de encapsulamento (MATRICON-GONDRAN; LETOCART, 1999). O sistema imunológico dos moluscos envolve tanto respostas humorais, incluindo produção de espécies reativas de oxigênio (PIPE, 1992), atividade da enzima fenoxidase, secreção antimicrobiana de péptido (MITTA et al., 2000), como várias reações de células imunes, altamente especializadas, os hemócitos (SMINIA; VAN DER KNAAP, 1987).

A hemolinfa dos gastrópodes normalmente contém hemócitos que não se espalham ou se espalham minimamente quando colocados em superfícies artificiais, enquanto a maioria das células normalmente espalhadas avidamente formam projeções citoplasmáticas (filopodia ou pseudopodia), e acredita-se ser o protagonista na fagocitose e nas respostas de encapsulamento. Hemócitos de gastrópodes são caracteristicamente pegajoso e prontamente formam agregados, sendo uma tendência a ser mais pronunciada nas espécies marinhas e de água doce (LOKER, 2010).

2.4.1 Imunidade celular

Hemócitos

Para ser ativada a resposta celular, deve ocorrer primeiramente o reconhecimento dos parasitos pelos hemócitos (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012). Na defesa celular, os hemócitos apresentam papel central na imunidade inata. São células com morfologia e conteúdo enzimático variáveis, diferentes subpopulações, com aderências diferentes e propriedades de fagocitose (VAN DER KNAAP; LOKER, 1990; MATRICON-GONDRAN; LETOCART, 1999).

Os hemócitos, protagonistas da defesa celular, são divididos em subpopulações que recebem nomenclaturas diferentes de acordo com a espécie gastrópoda em questão e também da classificação por autor, pois em algumas espécies estas células recebem nomenclaturas diferentes dependendo de quem as estudou, como o caso da *Pila globosa*, Mahilini e Rajendran (2008) nomearam estas células de agranulócitos, granulócitos I (=progranulócitos) e granulócitos II, e granulócitos III, enquanto que Ray e colaboradores (2012) para esta mesma espécie

classificaram em agranulócitos, semigranulócitos e granulócitos. Em *Bradybaena similis* e *Megalobulimus abbreviatus*, as células foram divididas em células redondas, hialinócitos e granulócitos (ROHR; AMATO, 2014).

Em *P. canaliculata* também observamos uma nomenclatura diferente sendo empregada em seus tipos de hemócitos. Shozawa e Suto (1990) denominaram estas subpopulações de hemócitos como células não granulares, células com grânulos eletroluscente, e células com grânulos eletrodensos, enquanto Cueto et al. (2013; 2015) as classificaram em agranulócitos, hialinócitos e granulócitos.

A maioria dos estudos relata que os hemócitos circulantes em *Biomphalaria* são compostos por, pelo menos, duas populações celulares, principalmente baseadas em características morfológicas e funcionais: hialinócitos (células de tamanho menor e sem grânulos) e granulócitos (células de tamanho maior e com grânulos) (LO VERDE; GHERSON; RICHARDS, 1982; LIE; JEONG; HEYNEMAN, 1987; BARRACCO et al, 1993). Recentemente, Cavalcanti et al. (2012) caracterizaram os hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* e *B. straminea* encontrando as seguintes subpopulações de hemócitos: células blásticas (consideradas como células jovens ou precursoras de outros hemócitos), granulócitos, hialinócitos tipo I, hialinócitos tipo II e hialinócitos tipo III. Oliveira et al. (2010) apenas nomearam os hialinócitos e granulócitos em *B. tenagophila*.

Células blásticas são os menores tipos celulares encontrado na hemolinfa das duas espécies de caracóis, *B. glabrata* e *B. straminea*. Este tipo de célula também foi descrito na hemolinfa de *B. tenagophila* (BARRACCO et al., 1993) e no molusco bivalve *Haliothis tuberculata* (Linnaeus, 1758) (TRAVERS et al., 2008). Os granulócitos são um tipo de célula que já foi visto na hemolinfa de *B. glabrata*, *B. straminea* (CHENG; AULD, 1977; CAVALCANTI et al. 2012) e *B. tenagophila* (BARRACCO et al., 1993). Este tipo de célula foi também descrito em outros gastrópodes: *Turbo cornutus* (Lightfoot, 1786) (DONAGHY et al, 2010.) e *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758) (RUSSO; LAGADIC, 2004). Cheng; Auld (1977) foram os primeiros a relatarem a presença de hialinócitos na hemolinfa de *B. glabrata*. Barracco et al. (1993) trabalhou com *B. tenagophila* e caracterizou também os hialinócitos como células de pequeno tamanho. No estudo de Cavalcanti et al. (2012) descobriram que hialinócitos tipo I foram o segundo menor tamanho e também mais prevalente tipo celular encontrado na hemolinfa em *B. glabrata* e *B.*

straminea. Estes autores também caracterizaram os hialinócitos como células de maior capacidade de aderência em relação aos granulócitos.

Após a invasão de bactérias, fungos, vírus ou protozoários, os hemócitos rapidamente migram para o local da infecção para fagocitar e destruir os invasores (RUSSO; BREHÉLIN; CARTON, 2001; SILVA et al., 2000). Se a concentração de patógenos é muito grande, os hemócitos se agregam e formam nódulos a fim de imobilizá-los e de removê-los da circulação (STRAND; PECH, 1995). A formação de nódulos é uma reação rápida que demanda uma mudança nos hemócitos circulantes, que passam a se comportarem como células adesivas aptas a se ligarem ao alvo (LAVINE; STRAND, 2002). Também estão envolvidos no reconhecimento de corpos estranhos, respostas de encapsulamento, fagocitose e reações citotóxicas (MATRICON-GONDRAN; LETOCART, 1999; JOHNSTON; YOSHINO, 2001). A fagocitose é um processo de defesa celular altamente conservado, constituindo a primeira resposta dos hemócitos a invasão do organismo por partículas estranhas em pequenas concentrações (LAVINE; STRAND, 2002; STUART; EZEKOWITZ, 2008).

Ultraestrutura de hemócitos

O estudo ultraestrutural de hemócitos de invertebrados tem sido abordado na literatura como forma de caracterizar e classificar estas células, entretanto esses dados são escassos. Uma série de pesquisas com espécimes do filo artrópoda tem sido desenvolvidas e apresentam resultados similares em seus achados (SILVA et al., 2000b, HILLYER; CHRISTENSEN 2002; FALLEIROS et al., 2003; LING et al., 2003; BRAYNER et al., 2005; CUNHA et al., 2009) e estas contribuem para caracterização morfológica e ultraestrutural dos hemócitos, assim como a padronização do sistema de classificação de células na classe dos insetos (KURIHARA et al., 1992, HILLYER; CHRISTENSEN, 2002).

Para os gastrópodes alguns estudos foram realizados com caramujos hospedeiros intermediários para a esquistossomose. Barraco e colaboradores (1993) caracterizaram os hemócitos de *B. tenagophila* sadios através da microscopia de luz e transmissão, como hialinócitos e granulócitos. Os hialinócitos apresentavam ribossomos livres e não parecem conter corpos semelhantes a lisossomos, enquanto os granulócitos contêm um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido,

dicioissomos e alguns corpos densos semelhantes a lisossomos. Os granulócitos não apresentam um aspecto granular característico e os poucos grânulos observados no citoplasma devem corresponder a um sistema lisossômico.

Outras organelas foram encontradas nos hialinócitos de *B. glabrata*: mitocôndrias e aparelho de golgi, e nos granulócitos observaram grânulos com aspecto de vesículas digestivas, mitocôndrias, retículos endoplasmáticos, aparelho de golgi, vacúolos e vesículas eletrodensas. Destacando nos granulócitos a presença de grânulos que caracterizam este tipo celular (SANTOS; DINIZ, 2009) diferente do encontrado em células de *B. tenagophila* (BARRACO et al., 1993).

Em caramujos *B. glabrata* e *B. straminea* infectados pelo *S. mansoni*, na microscopia eletrônica de transmissão foi identificado cinco tipos celulares na hemolinfa: células blásticas, granulócitos e hialinócitos do tipo I, II e III. As espécies de *B. straminea* para células blásticas não apresentaram muitas modificações morfológicas, porém em *B. glabrata* este tipo celular passou a apresentar alterações no formato da célula. Em *B. glabrata* infectados estas células não se mostraram com alterações morfológicas, porém, em *B. straminea* foi possível identificar liberação de grânulos. Os hialinócitos tipo I apresentaram-se com maior adesão celular e maior quantidade de grânulos de glicogênio. Os hialinócitos do tipo II e III apresentaram poucas alterações morfológicas após a infecção nas duas espécies estudadas (CAVALCANTI et al., 2012).

Helal et al. (2014) utilizou caramujos de *B. alexandrina* infectados individualmente por *S. mansoni* e caracterizaram e identificaram a forma celular dos hemócitos tanto na hemolinfa como no tecido, examinados por microscopia óptica e eletrônica. O exame dos hemócitos revelou três tipos de diferentes células classificadas de acordo com a sua forma e conteúdo granular. Estas células são granulócitos, amebócitos e hialinócitos. A microscopia eletrônica também revelou o papel importante dos granulócitos e amebócitos como mecanismo de defesa contra a infecção do caramujo.

2.4.2 Imunidade humoral

A imunidade humoral inclui espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, peptídeos antimicrobianos, de matriz celular e de melanização da hemolinfa (LAVINE; STRAND, 2002; GONZALEZ-SANTOYO; CÓRDOBA-AGUILAR, 2011). O óxido nítrico (NO-Nitric Oxide) é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui uma importante molécula reguladora do sistema imune (HIBBS JR. et al. 1988; MARLETTA et al., 1988; DUSSE et al., 2003). No entanto o NO é potencialmente tóxico. Embora o oxigênio seja fundamental para os organismos aeróbios, espécies intermediárias reativas que se formam em suas reações são também extremamente prejudiciais aos componentes celulares como lipídeos, ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, entre outros (PEREIRA, 2000).

A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE et al., 2003). Funcionando como resposta imunológica no controle de infecções, porém devem ser produzidos de forma equilibrada, pois podem afetar as próprias células (CASTRO, 2009). Evidências mostram que, em resposta à infecção por trematódeos, os hemócitos são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico que estão envolvidos na morte do esporocisto primário (ADEMA et al 1994, BAYNE et al. 2001). Em estirpes resistentes de *B. glabrata*, o óxido nítrico desempenha um papel fundamental na defesa contra esporocistos de *S. mansoni*. Hahn e colaboradores (2001) concluíram que o NO é diretamente responsável pela mediação da citotoxicidade na morte dos esporocistos. Para Grandoni e Ascenzi (2002) esta molécula vai limitar o desenvolvimento de *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Schistosoma*, em todos os estágios do ciclo de vida do parasita.

A fenoloxidase é uma enzima que catalisa a oxidação de compostos fenólicos presentes na hemolinfa, o produto final dessa oxidação é a melanina (ROWLEY; BROOKMAN; RATCLIFFE, 1990; MARMARAS et al., 1993; LEE et al, 1999; SILVA et al., 2000). A melanização é um mecanismo de defesa amplamente conhecido em insetos e também estudado em outros invertebrados, e tem como um dos principais ativadores a enzima fenoloxidase, que é o ponto chave neste processo (LING; YU, 2005)

Esta enzima é ativada proteoliticamente em resposta a infecções e antes da ativação é chamada de profenoloxidase (ASHIDA et al., 1983; SILVA et al., 2000). A ativação da cascata de profenoloxidase é necessária para o processo de melanização e morte dos microorganismos isolados nos nódulos ou cápsulas. Oxidações subseqüentes de fenóis pela fenoloxidase levam à produção de quinonas, que são moléculas citotóxicas que inativam ou matam grande parte dos patógenos, levando à produção de melanina (MA; KANOST, 2000) como também, de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que também participam na defesa contra parasitos (GONZALEZ-SANTOYO; CÓRDOBA-AGUILAR, 2011).

A fenoloxidase é uma enzima bastante ativa e os produtos intermediários de sua ativação são tóxicos tanto para os microrganismos invasores como para o próprio animal, por isso sua ativação é limitada ao local da infecção, caso contrário poderia levar a uma melanização generalizada e letal para o animal (KANOST, 1999). Esta enzima é fundamental na adesão hemócito-microrganismo. Um grande número de inibidores de proteases tem sido identificado na hemolinfa. Além de participarem das defesas humorais, esses inibidores inativam muitas proteases que são liberadas pelos patógenos invasores (SILVA, 2002).

Os organismos aprisionados na infecção são destruídos pelo complexo enzimático da profenoloxidase, sendo a principal enzima ativada a fenoloxidase (KURIHARA; SHIMAZU; WAGO, 1992; STRAND; PECH, 1995; RIBEIRO; SIMÕES; BREHÉLIN, 1996). A fenoloxidase constitui um dos mais importantes componentes do sistema de defesa, fazendo parte de uma cascata enzimática é ativada pelos granulócitos através da exocitose de fatores sinais, acarretando a síntese de proteínas que aumentam a adesividade e a produção de quinonas tóxicas resultando no processo de melanização que inativa ou destrói o invasor (SÖDERHÄLL, 1982; RATCLIFFE et al., 1985; RATCLIFFE; ROWLEY, 1987).

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas, ocorrendo em todas as células e partes delas. Exibem grande diversidade de funções biológicas, atuando como os instrumentos moleculares por meio dos quais a informação genética é expressa (OLIVEIRA, 2015). Estas macromoléculas são utilizadas para a obtenção de energia quando há redução das reservas de carboidratos, (PINHEIRO, 1996), ocorrendo a degradação das proteínas em

aminoácidos para síntese das proteínas essenciais, e em cetoácidos, para a gliconeogênese, mantendo assim as concentrações de glicose em níveis vitais (BAYNES; DOMINICZAK, 2000).

Além de serem utilizadas como reserva energética, para Vargas-Albores e colaboradores (2001) a defesa humoral dos moluscos é representada principalmente pelas proteínas plasmáticas presentes na hemolinfa dos gastrópodes. Miracídeos de *S. mansoni* foram totalmente eliminados quando expostos a fase solúvel da hemolinfa, demonstrando a presença de compostos capazes de reagir contra patógenos (SANTOS; RODRIGUES, 2006). Uma alternativa para melhor entender os mecanismos envolvidos na suscetibilidade é obter informações sobre as diferenças de expressão das proteínas dos hemócitos de caramujos que se infectam ou não. Para identificar e compreender essas diferenças é fundamental conhecer as alterações nos níveis de expressão de proteínas dos hemócitos em cada fenótipo (OLIVEIRA, 2015).

Novos estudos foram realizados na identificação dessas proteínas existentes na hemolinfa dos gastrópodes. Uma delas é o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) que foi identificado por Boyer (1994) em um estudo imunocitoquímico e indicou a presença de TNF- α em hemócitos de moluscos correspondentes a uma molécula de 53 kDa detectada por análise de *Western blot*, demonstrando que esta proteína diminui durante a infecção por *S. mansoni*. Granath et al. (1994) identificaram uma proteína semelhante ao TNF- α na hemolinfa de gastropódes.

Já foi demonstrado que hemócitos de *Mytilus* mostraram resposta ao TNF- α heterólogo produzindo moléculas do tipo TNF- α em resposta a componentes bacterianos (HUGHES et al., 1990; 1993; OTTAVIANI et al., 1995). Este fator pode afetar a função dos hemócitos bivalves (*Mytilus* sp.) através de vias de transdução conservadas e sugerem que a resposta dos hemócitos à citocina é influenciada pelos componentes solúveis da hemolinfa e que na presença do soro da hemolinfa houve a estimulação da fagocitose que apresentou dano celular (BETTI et al., 2006). Esta citocina tumoricida e indutora de apoptose foram encontradas em alguns tipos de hemócitos dos moluscos *Bellamyia bengalensis* (Gastropoda: Prosobranchia) e *Lamellidens marginalis* (Bivalvia: Eulamellibranchiata) pela citometria de fluxo (RAY et al, 2016). De Zoysa et al. (2009) caracterizaram e analisaram a expressão do

primeiro TNF- α homólogo em molusco abalone, chamado como AbTNF- α , em uma infecção bacteriana.

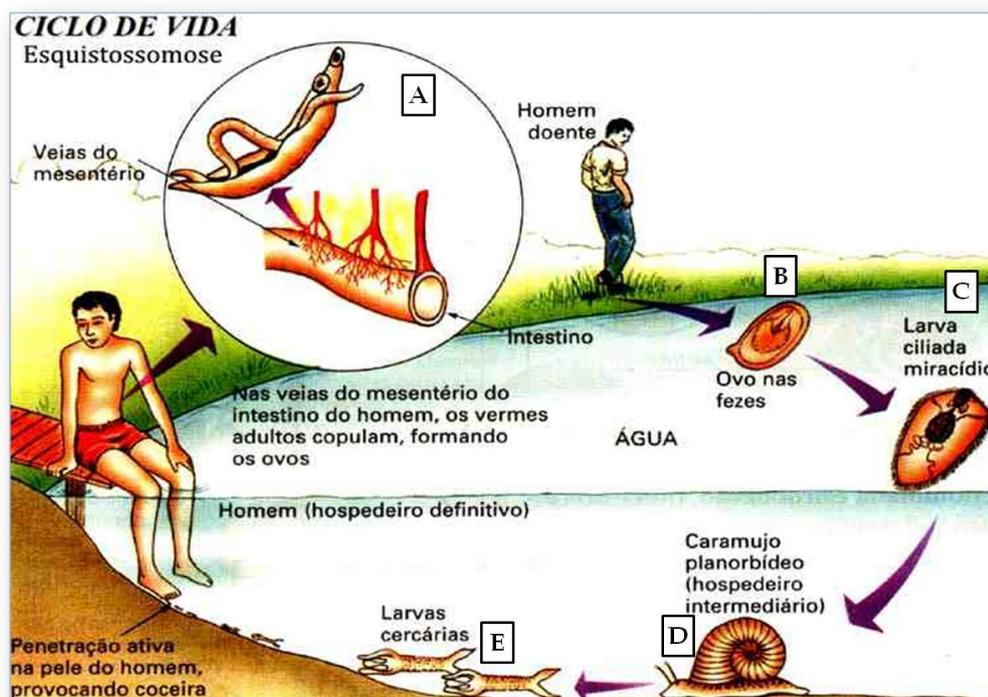
2.5 *Schistosoma mansoni*

Na classe Trematoda, subclasse Digenea do filo Platyhelminthes, encontramos a família Schistomatida, que apresenta vermes de sexos separados, parasitos de vasos sanguíneos de mamíferos e aves, onde o *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, responsável por esta endemia está inserido. As espécies do gênero *Schistosoma*, que tem importância epidemiológica em medicina humana são: *S. haematobium* Bilhartz, 1852, *S. japonicum* Katsurada, 1904, *S. mekongi* Brickner e Bruce, 1978, *S. intercalatum* Fischer, 1934 e o *S. mansoni* Sambon 1907 (NEVES, 2005).

Para chegar a ser um verme adulto, o *S. mansoni* passa por diversas fases de desenvolvimento completando assim seu ciclo biológico (Fig. 4). A transmissão dos trematódeos digenéticos se dá pela liberação de seus ovos através das fezes do homem previamente infectado (KATZ; ALMEIDA, 2003). Em contato com a água doce, os miracídios eclodem, uma larva ciliada, previamente desenvolvida, que morrem se não encontrarem os caramujos hospedeiros intermediários para se alojar (FERREIRA, et. al., 2003). O miracídio apresenta capacidade para infectar, não só os moluscos vetores, mas também não vetores e em alguns casos até mesmo girinos (GRIMES *et al.*, 2015).

Se encontrarem os caramujos do gênero *Biomphalaria* dão continuidade ao ciclo e o parasita sofre divisão mitótica por poliembrionia, passando por estágios conhecidos como esporocistos, até originarem numerosas formas infectantes móveis conhecidas como cercárias, competentes para penetrar nos tecidos epidérmicos ou mucosas dos humanos, seus hospedeiros definitivos, através de proteases secretadas por glândulas de penetração localizadas em sua extremidade encefálica (FERREIRA, et. al., 2003). As cercárias são liberadas em boas condições de luminosidade e temperatura do ambiente, podendo sobreviver até dois dias após a liberação. Após a entrada na pele do homem essas cercárias se tornam esquistossômulos (GRIMES *et al.*, 2015).

Figura 4. Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*: A. Vermes adultos; B. Ovos eliminados com as fezes de uma pessoa infectada. C. Eclosão na água e liberação de um miracídio; D. No interior do caramujo, cada miracídio transforma-se em um esporocisto primário, que gera esporocistos filhos, os quais formam cercárias em seu interior; E. Caramujo libera as cercárias que nadam ao encontro do homem, onde completam sua evolução para chegarem a vermes adultos (Disponível em <http://www.abcdamedicina.com.br/esquistossomose-doenca-ciclo-e-contaminacao-vacina-contra-barriga-dagua.html>).



Os esquistossômulos alcançam a rede vascular dos pulmões através dos vasos cutâneos, em seguida chegam ao coração e são enviados pela circulação sistêmica a vários órgãos e tecidos. Quando conseguem atingir o sistema porta hepático, cerca de três semanas depois da penetração das cercárias, terminam seu desenvolvimento, chegando ao amadurecimento sexual e acasalamento. Nesse estágio, o casal se localiza nas vênulas do plexo mesentérico inferior. Estando em seu habitat definitivo, a fêmea fecundada começa a liberar os ovos. Após um período de aproximadamente 40 dias, os ovos já podem ser vistos nas fezes do indivíduo parasitado, tempo geralmente definido para diagnóstico e posteriormente o tratamento do doente. Os vermes adultos vivem em média entre três e dez anos (REY, 2002; FERREIRA, et. al., 2003).

2.6 Esquistossomose

Considerada como um grave problema de saúde pública, a esquistossomose é uma endemia parasitária típica das Américas, Ásia e África. Chegou ao Brasil com os escravos africanos trazidos pela Colônia Portuguesa, mas há referências da doença muito antes dessa época (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) inclui a esquistossomose na lista de doenças tropicais negligenciadas, pois não só prevalecem em condições de pobreza, como também contribuem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam forte entrave ao desenvolvimento de países (BRASIL, 2010). A esquistossomose é uma infecção presente em todas as regiões do globo, principalmente em áreas de condições de higiene e saneamento básico precários. A veiculação do agente etiológico é por meio hídrico, uma vez que, fases do ciclo de vida do parasita ocorrem no meio aquático, onde a forma infectante do hospedeiro vertebrado, a cercária, é liberada por moluscos infectados (BRASIL, 2007).

Há alguns anos, a esquistossomose ocorria principalmente em indivíduos de áreas rurais. Contudo, o êxodo rural em busca de novas oportunidades de sobrevivência, bem como o turismo em busca de lazer, favorecidos pelas alterações ambientais, desigualdades socioeconômicas, acesso desigual aos bens e serviços públicos, têm sido responsáveis pelo processo de urbanização desta infecção parasitária (VASCONCELOS et al., 2009; MELO et al., 2011). O padrão de distribuição espacial da doença indica que a dinâmica de transmissão do *S. mansoni* depende da relação entre as pessoas e o ambiente (BARBOSA et al., 2000; CARDIM et al., 2008).

Os focos de transmissão da esquistossomose ocorrem em áreas peridomiciliares urbanas e rurais de comunidades precárias em saneamento básico (BRASIL, 2012). Contudo, tem-se observado o surgimento de novos sítios de transmissão no país, como em regiões litorâneas, fato descrito na Ilha de Itamaracá - PE (BARBOSA, 2000) e em Porto de Galinhas – PE (BARBOSA, 2011), a notificação de casos da doença. Houve uma mudança na distribuição geográfica da esquistossomose nos últimos 50 anos, no entanto, mesmo com programas de controle bem sucedidos, o número de pessoas infectadas ou sob risco de contrair a doença não foi reduzido (ENGELS et al., 2002).

Estima-se que 207 milhões de pessoas estejam infectadas e 779 milhões expostas ao risco de contrair a doença (STEINMANN et al., 2006; WHO, 2011). De

acordo com o “rank” da DALY’S (Disability-Adjusted Life Years), que quantifica o número perdido em anos de vida, devido a problemas relacionados com a doença, a esquistossomose é colocada apenas atrás da Malária. A esquistossomose é responsável por 1,7- 4,5 milhões/ DALY’s anualmente (STEINMANN et al., 2006). Além disso, aproximadamente 280 mil mortes por ano são atribuídas à esquistossomose (VAN DER WERF et al., 2003).

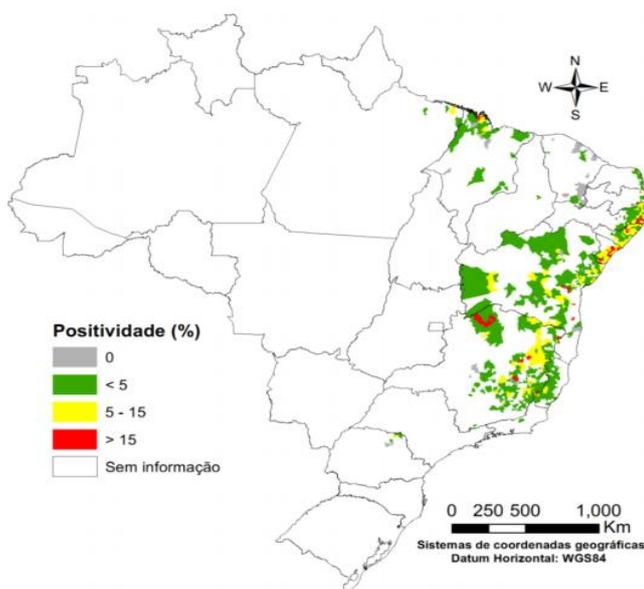
Conhecida pelos brasileiros como barriga d’água, xistosa ou doença do caramujo, a esquistossomose mansoni ou mansônica é caracterizada, na forma mais grave, pela hepatoesplênica, o aumento do fígado e do baço (KATZ; ALMEIDA, 2003). No Brasil, a esquistossomose é um grave problema de saúde pública, abrangendo 19 estados. Nas regiões sudeste e nordeste, existem focos de transmissão contínua, desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto nas regiões norte e sul existem apenas áreas de média extensão e focos isolados (COURA; AMARAL, 2004; TELES, 2005). Passos e Amaral (1998) certificaram que 2,5 milhões de pessoas são portadoras da esquistossomose no Brasil, porém outro levantamento, apresentado por Katz e Peixoto (2000) indica que mais de 8 milhões de pessoas estão infectadas e outras 30 milhões estão expostas ao risco de infecção. No entanto, segundo a OMS, no Brasil existem aproximadamente 7 milhões de pessoas infectadas e outras 42 milhões vivendo em área de risco (WHO, 2010).

As estratégias de vigilância e controle da esquistossomose no Brasil buscam reduzir a ocorrência de formas graves, óbitos e prevalência da infecção, indicando medidas para reduzir o risco de expansão da doença (KATZ; ALMEIDA, 2003). Soluções permanentes para este problema incluem a restrição de contato humano com água contaminada e prevenção de novas contaminações do meio ambiente com os ovos do parasita (CHITSULO et al., 2000; FERREIRA et al., 2003; LUNA et al., 2005). Além do adoecimento, o risco de óbito por esquistossomose é uma realidade. Esta doença prevenível e tratável provocou no período de 1990 a 2010 um número expressivo de formas graves, com uma média de 1.567 internações e 527 óbitos (BRASIL, 2011a; 2011c).

As áreas endêmicas e focais abrangem 19 unidades federais em nosso país, ocorrendo de forma endêmica em nove, nos estados de Alagoas, Maranhão, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais.

No Pará, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas (Fig. 5). As áreas mais afetadas são caracterizadas por condições precárias ou inexistentes de saneamento básico, pobreza e baixos níveis de escolaridade (BRASIL, 2011b).

Figura 5. Distribuição da esquistossomose, de acordo com a faixa de positividade, por município. Brasil, 2009 - 2014. Fonte: Sistema de informação do programa de esquistossomose/SVS/MS.



No Estado de Pernambuco, a esquistossomose é historicamente endêmica na região rural (COUTINHO et al., 1997). Municípios prioritários para ações de esquistossomose em Pernambuco são Belém de Maria, Jaqueira, Tracunhaém, Primavera, Machados, Itaquitinga, Lagoa do carro, São Vicente Ferrer, Araçoiaba, Amaraji, Rio Formoso, Gameleira, Vicência, Nazaré da Mata, Água Preta, Aliança, Serinhaém, Paudalho, Timbaúba, Escada, Goiana e Ipojuca, de acordo com o Plano integrado de ações estratégicas do Ministério da saúde (BRASIL, 2012). Em Pernambuco, que ocupa o 3^o lugar em prevalência na Região Nordeste, a endemia está presente basicamente em áreas que circundam a faixa litorânea, correspondendo à chamada Zona da Mata Sul e Norte (FAVRE et. al., 2001).

Um conjunto de medidas deve ser tomado para o controle e erradicação da esquistossomose em uma área endêmica. Tais medidas podem citar um adequado saneamento básico e destino dos resíduos, educação ambiental, eliminação dos criadouros do molusco, assim como evitar o contato com coleções hídricas

contaminadas. Entretanto, fatores biológicos, demográficos, socioeconômicos, políticos e culturais estão envolvidos na formação dos quadros endêmicos (VASCONCELES et al. 2009; CUNHA; GUEDES, 2012). De acordo com o plano integrado de ações estratégicas do ministério da saúde de 2011 foram propostas algumas formas para redução do número de doentes por esquistossomose, tais como: atividades de educação em saúde; realização de exames parasitológicos na população; avaliação do percentual de positividade; tratamento; mapeamento das áreas de risco e vigilância dos caramujos (BRASIL, 2011b).

O tratamento para esquistossomose tem como finalidade sua cura, redução da carga parasitária do hospedeiro, impedimento da evolução para as manifestações graves da doença, minimização de produção e eliminação dos ovos do helminto como uma forma de prevenção primária da transmissão. O tratamento pode ser direcionado individualmente ou em nível populacional, conhecido como tratamento coletivo (VITORINO et al., 2012).

Recentemente, Gomes e colaboradores (2016) observaram uma redução do percentual de positividade a níveis considerados aceitáveis e de baixa endemicidade com o tratamento coletivo com a droga praziquantel no município de Jaboatão dos Guararapes - PE sugerindo sua efetividade, já que houve poucas mudanças sócio-sanitárias e ambientais nas localidades sob intervenção. No período de 2011 à 2015 cerca de 931 mil pessoas foram tratadas com o praziquantel, comprimido 600mg, gerando um montante de R\$ 1.418.539,30 aos cofres públicos, de acordo com o sistema de informação de insumos estratégicos do ministério da saúde (BRASIL, 2011b).

Para o controle da esquistossomose, além do tratamento dos pacientes infectados, é muito importante que as populações de caramujos sejam controladas como uma forma de redução do risco de transmissão da doença (SILVA FILHO et al., 2009). Um método utilizado para quebrar o ciclo evolutivo de *S. mansoni* é através do controle ou tratamento profilático das massas de água que servem como locais de transmissão, utilizando-se agentes moluscidas que destruirão o seu hospedeiro intermediário, o caramujo (PERRETT; WHITFIELD, 1996; LUNA et al., 2005).

Entretanto, o tratamento de grandes criadouros de caramujos é difícil devido ao grande impacto ambiental provocado por estas substâncias, contudo, pequenos

focos podem ser controlados por tais compostos. Outra medida também utilizada é o controle biológico da população de vetores através da competição com espécies de caramujos também de água doce refratários à infecção. Porém há também um problema nesta estratégia, visto que há uma rápida coadaptação entre as espécies competidoras (FERREIRA et al., 2003).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Obter dados relacionados à imunidade dos *Pomacea lineata* quando são expostos ao *Schistosoma mansoni* em condições experimentais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar aspectos relacionados à imunidade celular e humoral de *P. lineata* exposto ao *S. mansoni*;
- Identificar alterações relacionadas à histologia do músculo pedal de *P. lineata* exposto ao *S. mansoni*;
- Caracterizar morfologicamente hemócitos de *P. lineata* sadios e expostos ao *S. mansoni*;
- Determinar alterações morfológicas nos hemócitos de *P. lineata* exposto ao *S. mansoni*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO, F. J. P. et al. (2007) Macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade ambiental de corpos aquáticos da caatinga. **Oecol. Bras.**, 11(3): 397-409.

ADEMA, C. M. et al. (1997) A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94 (16): 8691-8696.

ASHIDA, M.; ISHIZAKI, Y.; IWAHANA, H. (1983) Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell wall or b-1,3-gulcans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 113 (2), 562-564.

BAILEY, M.; CHRISTOFORIDOU, Z.; LEWIS, M. (2013) Autoimmunity Reviews Evolution of immune systems : Specificity and autoreactivity. **Autoimmunity Reviews**, 12: 643–647.

BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S.; SILVA, C. B.; BARBOSA, F. S. (2000) Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Pernambuco. **Rev. de Saúde Públ.**, 34: 337-341.

BARBOZA, S. H. R.; ROMANELLI, P. F. (2004) Estudo do aproveitamento das vísceras dos moluscos Escargot (*Achatina fulica*) e Aruá (*Pomacea lineata*) para incorporação em ração animal. **Alim. Nutr.**, Araraquara, 15 (3): 245-250.

BARBOZA, S. H. R.; COSTA, D. P. S.; ROMANELLI, P. F. (2006) Processamento e avaliação sensorial da carne dos moluscos Escargot (*Achatina fulica*) e Aruá (*Pomacea lineata*). **Alim. Nutr.**, Araraquara, 17 (4): 413-418.

BARBOSA, C. S. et al.(2011) The endemisation of schistosomiasis in Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, 10 years after the first epidemic outbreak. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, 106 (7): 878-883.

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.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. (1980a) Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. **Journal of Parasitology.**, 66(3): 413-419.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. (1980b) *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, 50: 409-416.

BAYNE, C. J.; HAHN, U. K.; BENDER, R. C. (2001). Mechanisms of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. **Parasitology**, 123: 159-167.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. (2000) **Bioquím. méd.**, 1ª ed. São Paulo: Editora Manole, Cap.18; 28, pág. 218; 260.

BATALLA, J. F. (1997) Efeito do herbicida Paraquat sobre o gastrópode *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Ampullariidae, Prosobranchia): Bioensaios em laboratório. Dissertação de mestrado, João Pessoa (Brazil): 137 p.

BETTI M, CIACCI C, LORUSSO LC, CANONICO B, FALCIONI T, GALLO G, AND CANESI L. (2006) Effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on *Mytilus* hemocytes: role of stress-activated MAP kinases. **Biol Cell** 98: 233–244.

BRASIL. (2010) Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev. de Saúde Pública**, São Paulo, 44 (1): 200-202.

BRASIL. (2007) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 180 p.

BRASIL. (2012) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases : plano de ação 2011-2015** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 104p.

BRASIL. (2011a) Ministério da Saúde. **Morbidade Hospitalar do Sistema Único de Saúde**. Departamento de Análise de Situação de Saúde.

BRASIL. (2011b) Ministério da Saúde. **Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose – SIPCE**.

BRASIL. (2011c) Ministério da Saúde. **Sistema de Informação Sobre Mortalidade (SIM)**. Departamento de Análise de Situação de Saúde.

BRANCH, L. C.; SILVA, M. F. (1983) Folk medicine in Alter do Chão, Pará, Brazil. **Acta Amazonica**, 13: 737-797.

BRAYNER, F. A.; ARAÚJO, 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.

BOMBEO-TUBURAN I., FUKUMOTO S., RODRIGUEZ E. M. (1995). Use of the golden apple snail, cassava, and maize as feeds for the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in ponds. **Aquaculture** 131: 91-100.

BOYER, O.O.M.O. (1994). Characterization of immunoreactive TNF α molecules in the gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comp. Immunol.**, 18: 211-218.

BURELA, S.; MARTÍN, P. R. (2007) Nuptial feeding in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). **Malacologia**, 49 (2): 465–470.

BUCKLING, A., KASSEN, R.; BELL, G. & RAINEY, P.B. (2000) Disturbance diversity in experimental microcosms. **Nature**, 408 (6815): 961-964.

CANESI, L. et al. (2002) Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. **Microsc. Res. Tech.** 57: 469-476.

CARDIM, L. L.; BAVIA, M. E.; FERRAUDO, A. S.; CARNEIRO, D. D. M. T.; SILVA, M. M. N.; BRITO, V. S.; MARTINS, M. S.; DANTAS FILHO, A. M. (2008) Avaliação da Esquistossomose Mansônica mediante as Geotecnologias e Técnicas Multivariadas no Município de Jacobina, Bahia. **Rev. Baiana de Saúde Pública**, 32 (1): 29-42.

CARREÓN-PALAU, L. et al. (2003) Desarrollo morfológico e histológico del sistema reproductor de *Pomacea patula catemacensis* (Baker 1922) (Mollusca, Caenogastropoda: Ampullariidae). **Rev. Chil. Hist. Nat.** 76: 665-680.

CARVALHO, O. S. et al. (2005) Moluscos de importância médica no Brasil. Belo Horizonte. **Fiocruz**. 52 p.

CASTRO, D. P. **Fatores que interferem no desenvolvimento de tripanosomatídeos em *Rhodnius prolixus*: I- Efeito de fisalinas sobre o sistema imune; II- *Serratia marcescens* isolada da microbiota intestinal.** 2009. 137f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2009.

CAVALCANTI, M. G. et al. (2012) Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**. 43(2–3): 285-291.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. (2013) Variable immune molecules in invertebrates. **The Journal of experimental biology**, 216 (23): 4313-4319.

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

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. (2000) The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, 77: 41-51.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. (2005) **Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais**. 2ª Ed. São Paulo – Editora Atheneu, p. 212-221.

COELHO, P. M. Z. (1995) Relação molusco/parasita: resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In FS Barbosa, **Tópicos em Malacologia Médica**, Fiocruz Rio de Janeiro, p. 208-218.

COLER, R. A. et al. (2005) Applying Weight Gain in *Pomacea lineata* (SPIX 1824) (Mollusca: Prosobranchia) as a Measure of Herbicide Toxicity. **Braz. J. Biol.**, 65 (4): 617-623.

COSTA NETO, E. M. (2000) Conhecimento e usos tradicionais de recursos faunísticos por uma comunidade afro-brasileira. Resultados preliminares. **Interciência**, 25 (9): p. 423-431.

COSTA NETO, E. M. Os moluscos na zooterapia: medicina tradicional e importância clínico-farmacológica. **Biotemas**, v. 19, n. 3, p. 71-78, 2006b.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. (2004) Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 99(5): 13-9.

COWIE, R. H. E T. (2003) The Apple Snails of the Americas (Mollusca: Gastropoda: Ampullariidae: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea*, *Pomella*): A Nomenclatural and Type Catalog. **Malacologia**, 45(1): 41–100.

CUETO JA, VEGA IA, CASTRO-VAZQUEZ A. (2013) Multicellular spheroid formation and evolutionary conserved behaviors of apple snail hemocytes in culture. **Fish Shellfish Immunol.** 34: 443–453.

CUETO JA, RODRIGUEZ C, VEGA IA, CASTRO-VAZQUEZ A. (2015) Immune Defenses of the Invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Phagocytic Hemocytes in the Circulation and the Kidney. **PLoS ONE** 10 (4): e0123964. doi: 10.1371 / journal.pone.0123964.

CUNHA, L. D. A.; GUEDES, S. A. G. (2012) Prevalência de esquistossomose mansônica na cidade de Nossa Senhora do Socorro. **Ideias & Inovação.** 1(1):41-8.

CUNHA, FRANKLIN M.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; ALBUQUURQUE, A. C.; ALVES, L. C.; LIMA, E. A. L. A. (2009) Caracterização dos hemócitos de operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) e avaliação hemocitária após parasitismo por *Metarhizium anisopliae*. **Neotrop. entomol.**, Londrina , 38(2): 293-297.

DARBY, P. C. A. (1999) Comparison of Sampling Techniques for Quantifying Abundance of the Florida Apple Snail (*Pomacea Paludosa* Say). **Journal Molluscan Studies**, 65 (2): 195–208.

DAS, S.; KHANGAROT, B. S. (2010) Efeitos do cobre sobre o desenvolvimento de ovos e eclosão de um caracol de água doce pulmonate *Lymnaea luteola* L. **J. Hazard Mater**, 179: 665-675.

DE ZOYSA, M., PUSHPAMALI, W.A., WHANG, I., KIM, S.J., LEE, J. (2008) Mitochondrial thioredoxin-2 from disk abalone (*Haliotis discus discus*): Molecular characterization, tissue expression and DNA protection activity of its recombinant protein. *Comp. Biochem. Physiol.* - **B Biochem. Mol. Biol.** 149: 630–639.

DEYRUP-OLSEN, I.; MARTIN, W. (1987) Osmolyti processing in the gut and na important role of the rectum in the land slug., *Ariolimax columbianus* (Pulmonata, Arionidae). **J. Exp. Zool.** 243: 33-38.

DONAGHY, L. et al. (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.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M. (2003) Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, 39 (4): 343-350.

ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. (2002) The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop.** 82: 139-46.

FALLEIROS, A. M. F.; BOMBONATO, M. T. S.; GREGÓRIO, E. A. (2003) Ultrastructural and quantitative studies of hemocytes in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Braz Arch Biol Technol** 46: 287-294.

FERNANDEZ, M. A.; PIERI, O. S. (2001) Infection by *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 in the first four months of life of *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848) in Brazil. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, 96: 185-192.

FERREIRA, M. U.; FORONDA, A. S.; SCHUMAKER, T. T. S. **Fundamentos biológicos da parasitologia humana.** 1 ed. São Paulo: ed Manole Ltda, 2003, 125-126p.

GOMES, A. C. L.; GALINDO, J. M.; NATÁLIA NUNES DE LIMA, N. N.; ÉLLYDA VANESSA GOMES DA SILVA, E. V. G. (2016) Prevalência e carga parasitária da esquistossomose mansônica antes e depois do tratamento coletivo em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco. **Epidemiol. Serv. Saude**, 25(2): 243-250.

GONZÁLEZ-SANTOYO, I.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. (2012) Phenoloxidase: a key component of the insect immune. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, 142 (1): 1–16.

GRANATH, W. O. JR.; CONNORS, V. A.; TARLETON, R. L. (1994) Interleukin-1 activity in hemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: Presence, differential expression, and biological function. **Cytokine** 6: 21-27.

GRANATH, W. O. JR.; YOSHINO T. P. (1984) *Schistosoma mansoni* passive transfer of resistance by serum in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, 58: 188-193.

GRADONI, L.; ASCENZI, P. (2002) Nitric Oxide Limits Parasite Development in Vectors and in Invertebrate Intermediate Hosts. **IUBMB Life**, 53: 121-123.

GRIMES, J. E. *et al.* (2015). The role of water, sanitation, and hygiene in reducing schistosomiasis: a review. **Parasite and Vectors**, 8: 766.

GUIMARÃES C.T. (1981) Algumas observações de campo sobre Biologia e ecologia de *Pomacea haustorium* (Reeve 1856) (Mollusca, pilídeo). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 4 (76): 343-351.

GUIMARÃES, R. J. P. S. *et al.* (2009) Spatial distribution of *Biomphalaria* mollusks at São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil, using geostatistical procedures. **Acta tropica**, 109 (3): 181-186.

GUPPY, M., WITHERS, P. (1999) Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. **Biol. Rev. Camb. Soc.** 74: 1–40.

HALE, M. C. (1964) **The ecology and distribution of the introduced snail, *Marisa cornuarietis*, (Ampullariidae) in South Florida.** In *MSc thesis*. University of Miami, School of Marine and Atmospheric Science.

HAHN, R. U.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. (2001) Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. **J Parasitol.** 187: 778-785.

HAYES, K. A. et al. (2009) Molluscan models in evolutionary biology: apple snails (gastropoda: ampullariidae) as a system for addressing fundamental questions. **American Malacological Bulletin**, 27: 47–58.

HELAL, E. G.; EL-DAFRAWY, S. M.; MOHAMED, A. H.; ABOU-EL-NOUR, B. M.; IBRAHIM, S. (2014) Ultrastructural study on *Biomphalaria alexandrina* haemocytes infected with *Schistosoma mansoni* in Egypt and its correlation with nitric oxide level. **J Egypt Soc Parasitol.** 44 (1): 113-24.

HIBBS JR., J.B., et al. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157: 87- 94.

Hillyer J F, Christensen B M (2002) Characterization of hemocytes from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Histochem Cell Biol** 117: 431-440.

HORGAN, F. G.; STUART, A. M.; KUDAVIDANAGE, E. P. (2012) Impact of invasive Apple snails on the functioning and services of natural and managed wetlands. **Acta Oecologica**, 54: 90–100.

HUGHES, T. K., et al. (1990) Interaction of immunoreactive monokines (interleukin 1 and tumor necrosis factor) in the bivalve mollusc *Mytilus edulis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**;87:4426–9.

HUGHES, T.K., SMITH, E.M., BARNETT, J.A., CHARLES, R. AND STEFANO, G.B. (1993) LPS stimulates invertebrate hemocytes: a role for immunoreactive TNF and IL-1. **Dev. Comp. Immunol.** 15: 117–122

KATZ, N.; ALMEIDA, K. (2003) Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**,55 (1): 38-43.

KURIHARA, Y.; SHIMAZU, T.; WAGO, H. (1992) Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) I. Phase microscopic study. **Appl Entomol Zool** 27: 225-235.

KWONG, K. L. et al.(2008) Determinants of the distribution of apple snails in Hong Kong two decades after their initial invasion. **Malacologia**, 50 (1): 293–302.

IHERING, R. V. (1968) **Dicionário dos Animais do Brasil**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 790p.

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: 786–793.

KANOST, M. R. (1999) Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Dev. Comp. Immunol.**, 23: 291-301.

KÜLTZ, D. (2005) Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu. Rev. Physiol.** 67: 225-257.

KURIHARA, Y.; SHIMAZU, T.; WAGO, H. (1992) Classification of hemocytes in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae): II-possible roles of granular plasmatocytes and oenocytoids in the cellular defense reactions. **Appl. Entomol. Zool.**, 27: 237-242.

JUNIOR, E. S. et al. (2013) The effect of stocking density on the growth of apple snails native *Pomacea bridgesii* and exotic *Pomacea lineata* (Mollusca, Gastropoda). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 85 (2): 753–760.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 32: 1295-1309.

LEE, H.S. et al. (1999) The prophenoloxidase of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. **FEBS Lett.**, 444, (2-3): 255-259.

LIE, K. J.; JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D. (1987) Molluscan host reactions to helminthic infection. In: Soulsby, E.J.L (Ed.), Protozoa, Arthropods and Invertebrates. CRC Press Inc., **Boca Raton, FL**: 211–270.

LING, E.; SHIRAI, K.; KANEKATSU, R.; KIGUCHI, K. (2003) Classification of larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*, by acridine orange and propidium iodide staining Histochem. **Cell Biol** 120: 505-511.

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

LOKER E. S. (2010) “**Gastropod immunobiology,**” in **Invertebrate Immunity**, ed. Soderhall K., editor. (AUSTIN: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media):17-43.

LO VERDE, P.T., GHERSON, J., RICHARDS, C.S. (1982) Amebocytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*, fine structure. **Dev. Comp. Immunol.**, 31: 999.

LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, M. C.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT’ANA, A. E. G. (2005) A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 97: 199-206.

MA, C. C.; KANOST, M. R. (2000) A beta 1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta* agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. **J. Biol. Chem.**, 275 (11): 7505- 7514.

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

MAHAN, LK, ESCOT-STUMP, S. (2002) Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos. In: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia . (Roca Ltda). Roca Ltda, São Paulo: 30-64.

MAHILINI H, RAJENDRAN A. (2008). Categorization of hemocytes of three gastropod species *Trachea vittata* (Muller), *Pila globosa* (Swainson) and *Indoplanorbis exustus* (Dehays). **J Invertebr Pathol**. 97: 20–26.

MARCHIORI, C. H. (1999) First occurrence of *Biomphalaria straminea* in the South Goiano, Brazil, **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, 33(6): 622-623.

MARLETTA, M.A., *et al.* (1988) Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry**, 27: 8706-8711.

MARMARAS, V. J. *et al.* (1993) Defense mechanisms in insects: certain integumental proteins and tyrosinase are responsible for nonselfrecognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata*. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 23: 169-180.

MARQUES, J. G. W. (1995) **Pescando pescadores: etnoecologia abrangente no baixo São Francisco alagoano**. NUPAUB-USP, São Paulo, Brasil, 304p.

MARQUES, M. M.; BARBOSA, F. Na fauna do fundo, o retrato da degradação. **Ciência hoje**, v. 30, n. 175, p. 72-75, 2001.

MATTOS, A. C. A. (2011). **Estudo do sistema inato de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) frente ao *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907.** Tese de doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Belo Horizonte, MG.

MATRICON-GONDRAN, M.; LETOCART, M. (1999) Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. **J. Invertebr. Pathol.** 74: 224–234.

MELO, L. E. L. et al. (2000) Developing the gastropod *Pomacea lineata* (Spix, 1827) as a toxicity test organism. **Hydrobiologia**, 429: 73-78, 2000.

MELO, A. G. S.; MELO, A. M.; OLIVEIRA, C. C. C.; OLIVEIRA, D. S.; SANTOS, V. P.; JERALDO, V. L. S. (2011) Esquistossomose em área de transição rural-urbana: Reflexões epidemiológicas. **Cienc. Cuid. Saúde**, 10 (3): 506-513.

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

MESQUITA, E. F. M.; COELHO, A. C. S.; SANTOS, J. A. (1990) Anatomia e histologia do aparelho reprodutor masculino de *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Mollusca, Gastropoda, Pillidae). **Rev. Bras. Zool.** 7(1-2): 197-206.

MITTA, G.; VANDENBULCKE, F.; NOËL, T.; ROMESTAND, B.; BEAUVILLAIN, J. C.; SALZET, P.; ROCH, P. (2000) Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. **J. Cell Sci.** 113: 2759- 2769.

MORENO-RUEDA, G. (2008) The colour white diminishes weight loss during aestivation in the arid-dwelling land snail *Sphincterochila (Albea) candidissima*. **Iberus**, 26 (1): 47-51.

NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. (2012) Interaction of *Schistosoma mansoni* Sporocysts and Hemocytes of *Biomphalaria*. **Journal of Parasitology Research**, 2012.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11ª Ed., São Paulo: Atheneu, 2005.

NOMURA, H. (1996) **Usos e costumes dos animais**. Fundação Vingt- Um Rosado/ETFERN/UNED, Mossoró, Brasil, 1996, 82p.

NUNES, C. V.; RODRIGUES, I. R. C. (2007) Distribuição de caramujos hospedeiros da esquistossomose mansoni em 10 bairros da periferia de Belém. **Caderno de Saúde Coletiva**, 15(4): 439-448.

OLIVEIRA, A. L, LEVADA PM, ZANOTTI-MAGALHAES EM, MAGALHÃES LA, RIBEIRO-PAES J.T.(2010) Differences in the number of hemocytes in the snail host *Biomphalaria tenagophila*, resistant and susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. **Genetics and Molecular Research**, 9 (4): 2436–2445.

OLIVEIRA, I. H. R. (2015) Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos hemócitos de populações de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835)(Gastropoda: Planorbidae) suscetível e resistentes a *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 (Trematoda: Schistosomatidae). 73p. **Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais**. Minas Gerais. Brasil.

OTTAVIANI, E., CASELGRANDI, E. AND FRANCESCHI, C. (1995) Cytokines and evolution, *in vitro* effects of IL-1 alpha, IL-1 beta, TNF alpha and TNF beta on an ancestral type of stress response. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 207: 288–292

PAUL, W. E. (2003) **Fundamental immunology**. Lippincott, Williams and Wilkins, 5 ed., Philadelphia: 1077-1103.

PAULINI, H. M.; PAULINI, E. (1971) Observações de laboratório sobre controle biológico de *Biomphalaria glabrata* pela *Pomacea* sp.(Ampullariidae). **Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.**, 23: 135-149.

PEREIRA, L. S. (2000) Resposta imune do carrapato bovino *Boophilus microplus*: investigação da produção de espécies reativas de oxigênio pelos hemócitos. **Dissertação de mestrado ao Instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo.** São Paulo.

PERRETT, S.; WHITFIELD, P. J. (1996) Currently available molluscicides. **Parasitol Today**, 12: 156-159.

PESSÔA, H. L. F., OLIVEIRA, RCM, SILVA JLV, SANTOS RF, DUARTE JC, COSTA MJC, SILVA BA. (2007) Avaliação da toxicidade aguda, efeitos citotóxico e espasmolítico de *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Caenogastropoda). **Braz J Pharmacogn**, 17 (1): 76-84.

PESSÔA H. L. F, CONCEIÇÃO M. L., PAZ, A. M. R., SILVA B. A., COSTA M. J. C. J. Assessment of Nutrient Value and Microbiological Safety of *Pomacea lineata* (2015) **Med. Food. June**, 18 (7): 824-829.

PINDER, A.W.; STOREY, K. B.; ULTSCH, G. R. (1992) Aestivation and hibernation. In: Feder, M.E., Burggren, W.W. (Eds.), **Environmental Biology of the Amphibia.** University of Chicago Press, Chicago, p. 250–274.

PIPE, R. K. (1992) Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Dev. Comp. Immunol.** 16: 111-122.

RAO, V. B.; SATYAMURTI, P.; BRITO, J. J. B. (2008) On the 1983 drought in Northeast Brazil, **J. Climat.**, 6: 43-51.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F. (1987) **Insect responses to parasites and other pathogens.** In: JOULSBY, E. J. L. (Ed.). *Immune responses in parasitic*

infection: immunology, immunopathology and immunoprophylaxis, protozoa, arthropods and invertebrate. Florida: C. R. C. Press: 123-254.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGEALD, S. W.; RHODES, C. P. (1985) Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Int. Rev. Cytol.**, 97: 183-279.

RAY M, BHUNIA NS, BHUNIA AS, RAY S. (2012) A comparative analyses of morphological variations, phagocytosis and generation of cytotoxic agents in flow cytometrically isolated hemocytes of Indian molluscs. **Fish Shellfish Immunol.** 34: 244–253.

RAY, M., BHUNIA, N. S., BHUNIA, A. S., RAY, S. (2016). Expression analyses of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and inducible nitric oxide synthase in the hemocyte morphotypes of two commercially important Indian molluscs. **Aquaculture Reports**, 4, 30-35.

RAWLINGS, T. A. et al. (2007) The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. **BMC, Evol. Biol.**, 7 (97): 1-14.

REY, L. (2002) **Bases da Parasitologia Médica**. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 379 p.

RIBEIRO, C.; SIMÕES, N.; BREHÉLIN, M. (1996) Insect immunity: the haemocytes of armyworm *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their role defence reactions *in vivo* and *in vitro* studies. **J. Insect Physiol.**, Oxford, 42 (9): 815-822.

RIBEIRO-COSTA, C. S.; ROCHA, R. M. (2002) **Invertebrados: manual de aulas práticas**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 226p.

ROHR, R. A.; AMATO, S. B. (2014) Hemócitos de *Bradybaena similaris* e *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Stylommatophora). **Iheringia**, Sér. Zool. 104: 209-215.

ROJAS, J. M. et al. (2000) Variabilidade geográfica em a tolerância térmica y economia hídrica del gasteropodo intermareal *Nodilittorina peruviana* (Gastropoda: Littorinidae, Lamarck, 1822). **Rev. Chil. Hist. Nat.**, Santiago, 73 (3): 543-552.

ROWLEY, A. F.; BROOKMAN, J. L.; RATCLIFFE, N. A. (1990) Possible involvement of the prophenoloxidase system of the locust, *Locusta migratoria*, in antimicrobial activity. **J. Invert. Pathol.**, 56: 31-38.

RUPPERT, E.E.; FOX, R. S.; BARNES, R.D. (2005) **Zoologia dos Invertebrados**. 7 ed. São Paulo: Editora Roca, 1168p.

RUSSO, J.; BREHÉLIN, M.; CARTON, Y. (2001) Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. **J. Invert. Pathol.**, 47: 167-172.

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: 303–311.

SANTOS, E. (1982) **Moluscos do Brasil (Vida e Costumes)**. Belo Horizonte, MG: Ed. Itatiaia Ltda.(Coleção Zoologia Brasileira, vol 7), 142p.

SANTOS, M. A. V.; RODRIGUES, I. R. C. (2006) Estudo in vitro da ação letal da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* sobre os miracídeos de *Schistosoma mansoni*. **Revi. Paraense de Medicina**, 20 (2): 13–16.

SCHOLTE, R. G. C. et al. (2012) Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni*, in Brazil. **Geospatial Health**, 6, n. (3): 95-101.

SHOZAWA A, SUTO C. (1990) Hemocytes of *Pomacea canaliculata*: I. Reversible aggregation induced by Ca²⁺. **Dev Comp Immunol**. 14: 175–184.

SILVA, C.; GARY, B. D.; RAU, M. E. (2000a) Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Dev. Comp. Immunol.**, 24: 367-379.

SILVA, C.; DUNPHY, G. B.; RAU, M. E. (2000b) Interaction of hemocytes and prophenoloxidase system of fifth instar nymphs of *Acheta domesticus* with bacteria. **Dev Comp Immunol** 24: 367-379.

SILVA, C. C. (2002) Aspectos do sistema imunológico dos insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 24: 68-72.

SILVA, N. F. S.; COGO, J.; WIEPIESKI C. C. P.; LAVERDE JUNIRO, R. (2008) Bioensaio de atividade moluscicida adaptado para a avaliação de extratos de plantas medicinais. **Arq. Ciências Vet. Zool.** 11: 179-181.

SILVA, B. B. T. N. (2014) Aspectos imunológicos do caramujo *Pomacea lineata* (Spix, 1827) sob condições de estivação induzida. 2014. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA FILHO, C. R. M.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; RIBEIRO, A. P. L. (2009) Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 19(4): 919-923.

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

SÖDERHÄLL, K. (1982) The prophenoloxidase activating system and melanization a recognition mechanism of arthropods: a review. **Dev. Comp. Immunol.**, 6: 601-611.

SOUZA, C. P. D.; BORGES, C. C.; SANTANA, A. G.; ANDRADE, Z. A. (1997). Comparative histopathology of *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* and *B.*

straminea with variable degrees of resistance to *Schistosoma mansoni* miracidia. **Mem. do Inst. Oswaldo Cruz**, 92: 517-522.

SUN, J. C.; UGOLINI, S.; VIVIER, E. (2014) Immunological memory within the innate immune system. **The EMBO journal**, 33(12): 1295–303.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. (2006) Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, 6(7): 411-25.

STORER, T. I et al. (2003) **Zoologia geral**. 6 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 850p.

STOREY, K.B. (2002) Life in slow lane: molecular mechanisms of estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*: **Mol. Integr. Physiol.**, 133: 733-754.

STOREY, K.B; STOREY, J.M. (2012) Aestivation: signalling and hypometabolism. **J. Exp. Biol.** 215: 1425-1433.

STRAND, M. R.; PECH, L. L. (1995) Immunological basis for compatibility in parasitoid host relationships. **Annual Rev. Entomol.**, 40: 31-56.

STUART, L. M, EZEKOWITZ, R. A. (2008) Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. **Nat. Rev. Immunol**, 8 (2): 131-141.

TANAKA, M. O.; SOUZA, A. L. T.; MÓDENA, É. S. (2006.) Habitat structure effects on size selection of snail kites (*Rostrhamus sociabilis*) and limpkins (*Aramus guarauna*) when feeding on apple snails (*Pomacea spp.*). **Acta Oecologica**, 30 (1): 88–96.

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

TISCAR, P. G.; MOSCA, F. (2004) Defense mechanisms in farmed marine molluscs. **Vet. Res. Comm.** 28 (Suppl. 1): 57-62.

THIENGO, S. C. (1987) Observations on the morphology of *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Ampullariidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82 (4): 563-570.

THIENGO, S. (1995) Família Pilidae Connoly, 1927 (Ampulariidae Gray, 1824). In: BARBOSA, FS (org.) **Tóp. Malacol. Méd.**, Editora Fiocruz, p. 50-69.

TRAVERS, M. A. et al. (2008) Morphologic, cytometric and functional characterisation of abalone (*Haliotis tuberculata*) haemocytes. **Fish Shellfish Immunol.**, 24: 400–411.

VAN DER KNAAP, W. P.; LOKER, E. S. (1990) Immune mechanisms in trematode snail interactions. **Parasitol. Today**, 6: 175–182.

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

VASCONCELOS, C. H.; CARDOSO, P. C. M.; QUIRINO, W. C.; MASSARA, C. L.; AMARAL, G. L.; CORDEIRO, R.; CARVALHO, O. S. (2009) Avaliação das medidas de controle da esquistossomose mansoni no município de Sabará, Minas Gerais, Brasil 1980-2007. **Caderno de Saúde Pública**, 25 (5): 997-1006.

VASCONCELOS, C. H., et al. (2009) Avaliação de medidas de controle da esquistossomose mansoni no município de Sabará, Minas Gerais, Brasil, 1980-2007. **Cad Saude Publica**, 25(5): 997-1006.

VASTA, G. R.; AHMED, H. 2009. Animal lectins: A functional view. CRC Press, **Boca Raton FL**: 475-491.

VIEIRA, T. C.; COSTA-FILHO, A.; SALGADO, N. C. (2004) Acharan sulfate, the new glycosaminoglycan from *Achatina fulica* Bowdich 1822. Structural heterogeneity, metabolic labeling and localization in the body, mucus and the organic shell matrix. **Eur J Biochem**, 271: 845-854.

VAN DER WERF, M. J., et al. (2003) Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Trop**, 86(2-3): 125-39.

VITORINO, R. R., et al. (2012) Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev Soc Bras Clin Med.**, 10(1): 39-45.

WILLIAMS, D. D. **The biology of temporary waters**. Oxford Univ. Press. Oxford, U. K. 337p, 2006.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. Schistosomiasis: Countries x Indicators: This table shows countries in rows and indicators in columns for a particular year. Geneva: WHO, 2010. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/index.html?units=minimal®ion=all&country=bra&countries=bra&year=2009. Acesso em: 20 mar. 2017.

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

**Parâmetros imunológicos do caramujo *Pomacea lineata* Spix, 1827 (Mollusca:
Caenogastropoda) expostos ao *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907**

Bárbara Brooklyn Timóteo Nascimento Silva^{1*}, Luiz Carlos Alves², Fábio André Brayner dos Santos², Nairomberg Cavalcanti Portela Junior², Fernanda das Chagas Angelo Mendes Tenório³, Aline Cristina Silva Lira⁴, Yuri Mateus Lima de Albuquerque¹; Valéria Wanderley Teixeira¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹

¹*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Bairro de Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.*

²*Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami, Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE - Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.*

³*Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE - Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.*

⁴*Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Bairro de Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.*

Parâmetros imunológicos de *Pomacea lineata*

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois

Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: btms10@hotmail.com

RESUMO

Pomacea lineata atua como controlador biológico natural do *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, pois são encontrados no mesmo ambiente. Entretanto, não há relatos na literatura sobre a infecção do *P. lineata* por esse trematódeo. Assim, este trabalho investigou parâmetros relacionados à imunidade dos *P. lineata* após exposição por 24 e 48h ao *S. mansoni* em condições experimentais. A geração F1 desses caramujos foi utilizada neste estudo. Foram analisadas a contagem total e diferencial dos hemócitos, fenoxidase, óxido nítrico, proteínas totais, expressão do TNF α nos hemócitos e a histopatologia do pé. A exposição ao *S. mansoni* promoveu aumento no número total de hemócitos, aumento dos granulócitos, redução dos agranulócitos e hialinócitos, aumento nos níveis da fenoxidase, proteínas totais e óxido nítrico. Houve expressão do TNF α nos agranulócitos e granulócitos, aumentando de intensidade após exposição ao trematódeo. A histopatologia do pé revelou a presença de esporocitos na camada fibromuscular circundados por tecido de granulação apenas no período de 24h. Já com 48 h observou-se fibrose acentuada nessa camada e pouco tecido de granulação. Assim, podemos concluir que *P. lineata* parece desencadear uma série de estratégias imunológicas de forma bem efetiva que lhe confere certa resistência ao *S. mansoni*.

Palavras-chave: miracídio, hemócitos, resistência, *Pomacea lineata*, *Schistosoma*.

ABSTRACT

Pomacea lineata acts as the natural biological controller of *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*, as they are found in the same environment. However, there are no reports in the literature about *P. lineata* infection due to this trematode. Thus, this work investigated parameters related to the immunity of *P. lineata* after exposure for 24 and 48h to *S. mansoni* under experimental conditions. The F1 generation of these snails was used in this study. The total and differential counts of hemocytes, phenoloxidase, nitric oxide, total proteins, expression of TNF α in hemocytes and histopathology of the headfoot organ were analyzed. Exposure to *S. mansoni* promoted increase in the total number of hemocytes, increase of granulocytes, reduction of agranulocytes and hyalinocytes, increase in phenoloxidase levels, total proteins and nitric oxide. There was TNF α expression in the agranulocytes and granulocytes, increasing in intensity after exposure to the trematode. Headfoot histopathology revealed the presence of sporocytes in the fibromuscular layer surrounded by granulation tissue only within 24 h. At 48 h, there was marked fibrosis in this layer and little granulation tissue. Thus, we can conclude that *P. lineata* seems to trigger a series of immunological strategies in a very effective way that confers some resistance to *S. mansoni*.

Keywords: miracidia, hemocytes, resistance, *Pomacea lineata*, *Schistosoma*.

1. INTRODUÇÃO

Pomacea lineata Spix, 1827 (Mollusca: Caenogastropoda) é um caramujo de água doce pertencente à classe Gastrópoda e a subclasse Pulmonata onde temos os moluscos mais bem sucedidos devido à conversão da cavidade do manto em pulmão (Ruppert et al. 2005). Esta espécie é encontrada no continente sul-americano (Barboza et al. 2006), sendo bem percebida em habitats dulcícolas da região Nordeste ao Sudeste do Brasil (Thiengo, 1995).

Esses caracóis apresentam uma ampla importância ecológica como protetor da biota aquática no monitoramento da qualidade das águas (Das; Khangarot, 2010), além de ter o papel na “limpeza natural” do leito dos rios e de outros corpos de água (Paulini; Paulini, 1971). Eles também atuam como macroinvertebrados bioindicadores, visto que, são sensíveis à poluição e variações do habitat (Marques; Barbosa 2001) e também adequados para sinalizar contaminantes (Itziou; Dimitriadis, 2011; Abdel-Halim et al., 2013). Vale destacar sua atuação como controladores biológicos naturais do *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), visto que são encontrados no mesmo ambiente (Cimerman; Cimerman, 2005), desses caramujos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni* (Pirajá da Silva, 1908), platelminto da classe Trematoda responsável pela esquistossomose (Ferreira et al., 2003).

Como já demonstrado por Machado et al. (1988) e Abou-el-Naga (2012), em *Biomphalaria* sp. o órgão mais atingido pelos esporocistos de *S. mansoni* nos caramujos é o pé. No processo de penetração, o parasita sofre alterações morfológicas e fisiológicas, sendo transformado em esporocisto primário que permanece no tecido fibromuscular dessa região do hospedeiro próximo ao local de penetração. As larvas das outras espécies de Digenea se distribuem pelo pé, glândula digestiva e também ovotestis. Recentemente Nacif-Pimenta et al., (2012) descreveram a resposta in vivo em tecidos de *B. tenagophila* infectado pelo trematódeo.

Os gastrópodes apresentam de uma forma geral, um grande poder de resistência e adaptação (Pinder et al., 1992; Abe, 1995). A dinâmica de resistência e susceptibilidade à infecção depende da influência de vários fatores do sistema imunológico inato dos moluscos (Santos et al., 2011; Negrão-Corrêa et al., 2012;), que envolvem a interação da resposta celular e humoral (Dunn 1986; Jiravanichpaisal et al., 2006).

Na resposta celular, os hemócitos apresentam papel central na imunidade inata. São células com morfologia e conteúdo enzimático variáveis, com diferentes subpopulações, apresentam aderências diferentes formando projeções citoplasmáticas (filopodia ou pseudopodia) e propriedades de fagocitose e encapsulamento do patógeno (Van Der Knaap; Loker 1990; Matricon-Gondran; Letocart 1999; Loker, 2010).

Simultaneamente, a defesa humoral age com a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) (Pipe 1992), com atividade enzimática da fenoloxidase e secreção de proteínas antimicrobianas (Mitta et al., 2005), desenvolvendo assim respostas específicas para diferentes categorias de patógenos, estabelecendo respostas secundárias eficazes, como também a melanização e reações citotóxicas (Roger et al., 2008).

Outro mecanismo de defesa encontrado nos moluscos é o Fator Necrose Tumoral alfa (TNF α), uma citocina imunorreguladora e inflamatória liberada por macrófagos de mamíferos levando a apoptose, septicemia, inflamação e necrose de tumores. (Engels al, 2006). Em geral, os dados até agora descritos mostram que os componentes da sinalização de citocinas em hemócitos de invertebrados estão envolvidos principalmente na morte celular (Igaki et al., 2002; Moreno et al., 2002; Beschin et al., 2003).

De acordo com Milward-de-Andrade (1978), animais do gênero *Pomacea* têm demonstrado sua capacidade de destruir ovos e formas juvenis de *B. glabrata*. No entanto, os mecanismos de resistência imunológica do *P. lineata* expostos ao *S. mansoni* ainda não foram descritos, fazendo-se necessário para a formação de alternativas que possam ser utilizadas

para o combate ao hospedeiro intermediário obrigatório deste verme, o *B. glabrata*, visto que estes caramujos partilham do mesmo ambiente. Em virtude da ausência de relatos na literatura sobre a infecção do *P. lineata* para este parasita de grande importância na saúde pública, a presente pesquisa investigou os parâmetros imunológicos da contagem total e diferencial de hemócitos, fenoloxidase, óxido nítrico, proteínas totais, TNF alfa e histopatologia do músculo pedal de *P. lineata* expostos ao *S. mansoni* em condições experimentais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFRPE) pela licença N° 48/2016.

2.1 Obtenção dos moluscos: Os moluscos da espécie *P. lineata* foram provenientes de um criadouro comercial e posteriormente transferidos para o Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (DMFA – UFRPE), onde passaram por um período de aclimação em aquário com água sem cloro, com aeração artificial, em temperatura ambiente ($26 \pm 1^\circ \text{C}$). A geração F1 desses caramujos foi utilizada neste estudo. Os animais foram alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa*) previamente higienizadas e a água do aquário reciclada semanalmente, tendo sempre o pH em torno de 7,0 controlado pela utilização de hidróxido de sódio. A água também era enriquecida com carbonato de cálcio.

2.2 Formação dos grupos experimentais: Foram formados quatro grupos com 5 animais cada:

Grupo I- Caramujos não infectados e analisados após 24 horas da exposição luminosa;

Grupo II - Caramujos expostos aos miracídios de *S. mansoni* e analisados após 24 horas da exposição luminosa;

Grupo III - Caramujos não infectados e analisados após 48 horas da exposição luminosa;

Grupo IV- Caramujos expostos aos miracídios de *S. mansoni* e analisados após 48 horas da exposição luminosa.

2.3 Obtenção de miracídios: Fezes de camundongos (*Mus musculus*) previamente infectados pela cepa LE de *S. mansoni*, foram cedidas pelo Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-UFPE para a realização da técnica de sedimentação espontânea. As fezes foram maceradas suavemente em água destilada e peneiradas para um cálice de sedimentação. Este material foi lavado com água destilada até que o sobrenadante estivesse límpido, fazendo com que todos os sedimentos fossem retirados. Na última lavagem o material foi deixado em repouso *overnight*, protegido da luz a uma temperatura em torno de 8-10°C. No dia seguinte o sobrenadante foi desprezado e o sedimento que continha os ovos do parasita, exposto à luz artificial pelo período de uma hora para a eclosão dos miracídios. Os miracídios obtidos foram contados e uma média da quantidade de miracídios por mL de água foi mensurada.

2.4 Exposição dos caramujos: Cada caramujo foi colocado individualmente em contato com 10 miracídios dispersos na água. O sistema caramujo + miracídio foi exposto à luz artificial para induzir a infecção por um período de 1 hora. Os caramujos do grupo controle também foram expostos à luz artificial, entretanto a água estava livre de miracídios.

2.5 Coleta de hemolinfa para análises imunológicas. A concha dos animais foram limpas com álcool a 70% e seca em papel absorvente. Uma pequena ruptura na concha foi dada próxima à cavidade pericárdica, onde a hemolinfa foi coletada. Um pedaço de papel filtro triangular foi colocado nesta abertura para absorção da água ainda existente dentro da concha afim de que não contaminasse a amostra. Utilizando uma agulha de insulina um pequeno corte foi dado na cavidade pericárdica e com ajuda de uma micropipeta de ponteiros previamente siliconizadas, a hemolinfa foi coletada nas proporções para cada análise. Cada animal foi analisado individualmente.

2.5.1 Contagem total e diferencial de hemócitos. Uma alíquota de 10 μL de hemolinfa por indivíduo foi adicionada a 10 μL de solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M. Após a mistura, as amostras foram levadas a câmara de Neubauer e em seguida a contagem foi realizada em microscópio óptico de luz (objetiva 40 x) e o número total de hemócitos por microlitro de hemolinfa foi determinado. Para a contagem diferencial (porcentagem) uma mesma alíquota dessa amostra foi transferida para lâminas, após a secagem, coradas com giemsa e analisados em microscópio óptico de luz, onde foram contadas 100 células para cada indivíduo. Para cada grupo experimental foram analisados cinco caramujos individualmente e o número total de células ou a proporção de cada tipo celular foram expressos por média aritmética.

2.5.2 Atividade da Fenoloxidase. Amostras de 100 μL de hemolinfa por caramujo/tratamento foram diluídas em 200 μL de tampão fosfato de sódio a 0,1M e mantidas a -20°C até serem utilizados. Triplicatas de 50 μL da mistura hemolinfa/tampão foram transferidas para microplacas de 96 poços. Ativação da enzima foi realizada utilizando 50 μL de L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) 4g/L (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Absorbância foi obtida a 492 nm durante 2h. A atividade enzimática foi obtida nos primeiros 20 minutos da avaliação.

2.5.3 Dosagem de Óxido Nítrico. Para a produção de óxido nítrico, utilizou-se 50 μL de hemolinfa por caramujo adicionando 70 μL de sufamilamida. Cinco repetições foram utilizadas por tratamento. As concentrações de NO^{-2} foram obtidas após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente da mistura de 50 μL de cada amostra e 50 μL de NEED (dicloridratonaphtyletílenamine) a 1% (Faraldo et al. 2006). A produção de óxido nítrico na hemolinfa dos caramujos foi determinada com o uso do reagente de Griess (Green et al. 1981), com leitura da absorbância realizada em leitora de microplacas ELx800TM (Biotek Instruments Inc) com filtro de 540nm e do programa Gen5 ELISA (Biotek[®]). A curva padrão foi realizada com concentrações crescentes de nitrito de sódio 0.8-200 μM . A quantidade de

nitrito nas amostras foi correlacionada com valores de absorvância obtidos a partir da curva padrão.

2.5.4 Proteínas totais. A concentração de proteínas totais foi obtida em triplicada através do reagente Bradford (Bradford 1976). Alíquotas de 50µL de hemolinfa/caramujo (n=10) por grupo foram diluídas em 200µL de tampão fosfato de sódio a 0,1M e transferidas para microplacas de 96 poços, adicionando-se em cada poço 100µL de reagente de Bradford. Absorvância foi medida em 595nm com leitora de microplacas (ELx800 - Biotek[®]) após 15 minutos de incubação em temperatura ambiente. A curva padrão de proteína foi determinada utilizando soro albumina bovina (BSA).

2.5.5 Imunohistoquímica pelo TNF- α . Para análise imunohistoquímica, estiraços de hemolinfa foram utilizados. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no microondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora. Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contracolorados com hematoxilina.

2.6 Análise histológica. Após a coleta de hemolinfa, os caramujos foram dissecados para coleta do pé. Para isso utilizou-se bisturi, pinça de ponta fina e uma tesoura. Em seguida o material foi fixado em formol tamponado e depois transferido para álcool a 70% até a inclusão em parafina histológica. Para isto, os materiais foram desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizado pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina histológica. Os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustado

para 5 μm . Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Os cortes obtidos foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H.E) e analisados em microscópio óptico de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

2.7 Análise estatística. As médias dos dados obtidos em todas as análises foram submetidas à análise de variância (ANOVA), comparados pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$) de probabilidade.

3. RESULTADOS

3.1 Contagem total e diferencial de hemócitos e sua classificação

A análise estatística mostrou um aumento significativo entre o número total de hemócitos entre os grupos controles e expostos 24 e 48 horas. Contudo, não houve diferença significativa entre os dois grupos expostos em relação ao tempo (Fig.1).

Foram identificados na hemolinfa do caramujo *P. lineata* três tipos celulares: agranulócitos, granulócitos e hialinócitos. Os agranulócitos representaram aproximadamente 45% entre as células, os hialinócitos 50% e os granulócitos sendo o tipo celular mais escasso, com apenas 5% do total. Os agranulócitos são células pequenas e redondas com um núcleo grande quase ocupando toda a célula, o citoplasma restringe a uma pequena área ao redor do núcleo (Fig. 2A), alguns estavam em processo final de divisão celular (Fig. 2B). Os hialinócitos apresentaram perfil polimórfico, com o núcleo localizado em uma posição central ou deslocado, de tamanho variável (Fig. 2D). Os granulócitos são células polimórficas, preenchidas com um número variável de grânulos bem visíveis (setas curtas) localizados na

periferia ou no centro da célula e com o nucléolo aparente (Fig. 2C). Esses tipos celulares não apresentaram alterações morfológicas em decorrência dos tratamentos.

Na contagem de agranulócitos e hialinócitos, houve uma diferença significativa entre os grupos controle e expostos nos dois tempos após exposição, demonstrando uma diminuição de quase 30% no número destes tipos celulares nos grupos expostos 24h e 48h (Figs. 3 e 4). Entretanto, para os granulócitos, constatou-se um aumento significativo de aproximadamente seis vezes, deste tipo celular nos grupos expostos em relação ao grupo controle de ambos os tempos após a exposição. Porém, não foi visto diferença significativa se comparado os dois grupos de exposição em relação ao mesmo tipo celular (Fig. 5).

3.2 Atividade da Fenoloxidase

A atividade da enzima fenoloxidase demonstrou um aumento significativo entre os grupos expostos 24h e 48h quando comparados com os respectivos grupos controle. No entanto, o grupo exposto 48h apresentou uma atividade desta enzima significativamente maior em relação ao grupo exposto 24h (Fig. 6).

3.3 Dosagem de Óxido Nítrico

A dosagem do óxido nítrico apresentou uma diminuição significativa entre os grupos expostos 24h e 48h quando comparados com os respectivos grupos controle. No entanto, o grupo exposto 24h apresentou uma dosagem desta substância significativamente menor em relação ao grupo exposto 48h (Fig. 7).

3.4 Proteínas totais

A concentração de proteínas totais na hemolinfa do caramujo *P. lineata* apresentou uma aumento significativo entre os grupos expostos 24h e 48h quando comparados com os respectivos grupos controle (Fig. 8).

3.5 Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica da expressão do TNF- α nos hemócitos dos caramujos dos grupos controles revelou marcação positiva nos agranulócitos e granulócitos (Fig. 9 A e B). Essa marcação se intensificou nos grupos expostos ao *S. mansoni* tanto após 24h (Fig. 9 D e E) quanto após 48 h (Fig. 9 G e H). Os hialinócitos apresentaram fraca marcação para todos os períodos de avaliação independente do tratamento.

3.6 Análise histopatológica

O pé dos caramujos dos grupos controles (24 e 48h) apresentou tecido epitelial do tipo simples colunar ciliado, com a presença de células caliciformes (Fig. 10 A). Abaixo desse epitélio, observa-se a presença do tecido fibromuscular (Tfm) (10 B). No grupo exposto 24h, o tecido epitelial apresentou-se similar ao dos grupos controles (Fig. 10 C), porém no tecido fibromuscular observou-se a presença de vários esporocistos (Fig. 10 D) circundados por tecido de granulação. Já no grupo exposto 48h, o tecido epitelial também não apresentou alterações (Fig. 10 E). No tecido fibromuscular não se observou mais a presença dos esporocistos, entretanto foi evidente a presença de áreas com fibrose acentuada apresentando pouco tecido de granulação (Fig. 10 F).

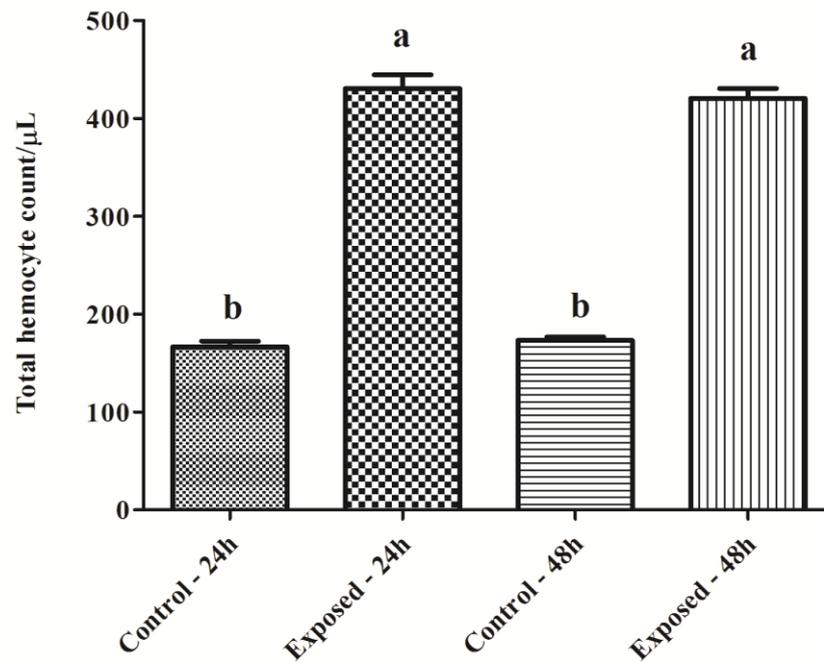


Figura 1. Contagem total de hemócitos em caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$) ($n = 5$ caramujos/tratamento).

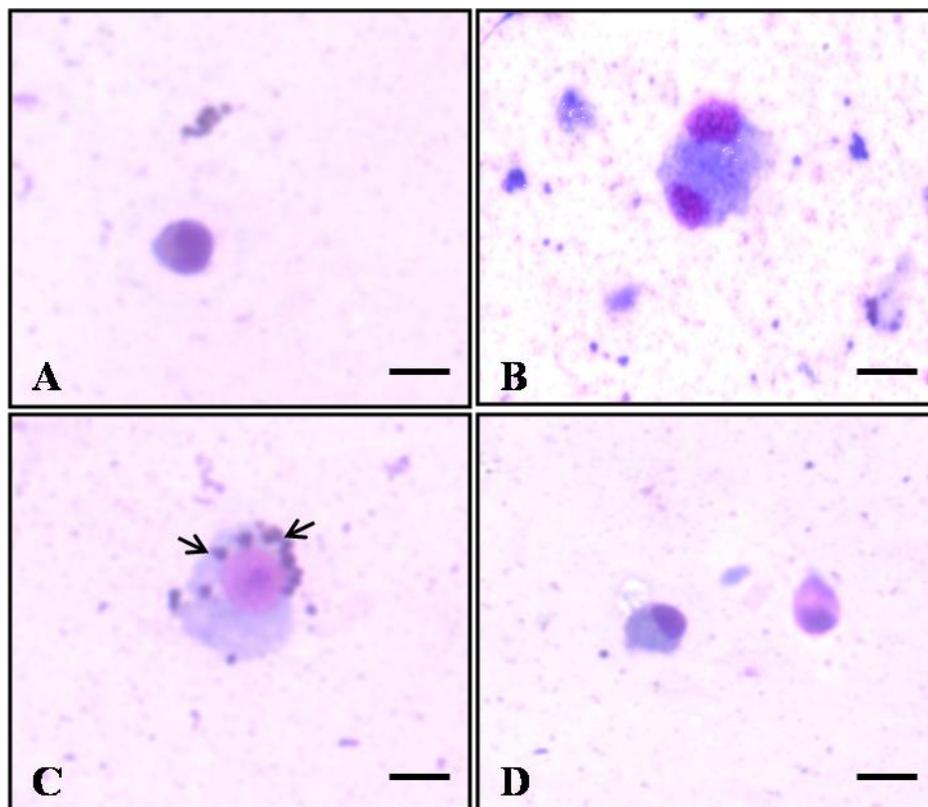


Figura 2. Imagens dos diferentes tipos de hemócitos classificados para o caramujo *Pomacea lineata* (A) agranulócito; (B) agranulócito em divisão; (C) granulócito e (D) hialinócitos. Coloração Giemsa, Barras = 10μm. Setas curtas – grânulos ($n=5$ caramujos/tratamento).

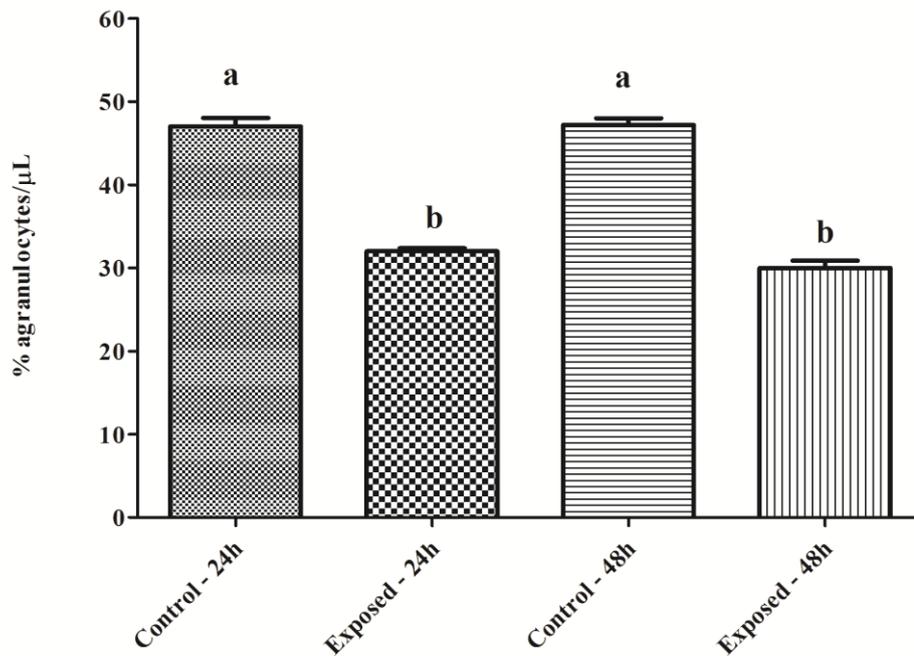


Figura 3. Contagem diferencial de agranulócitos em caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$) ($n = 5$ caramujos/tratamento).

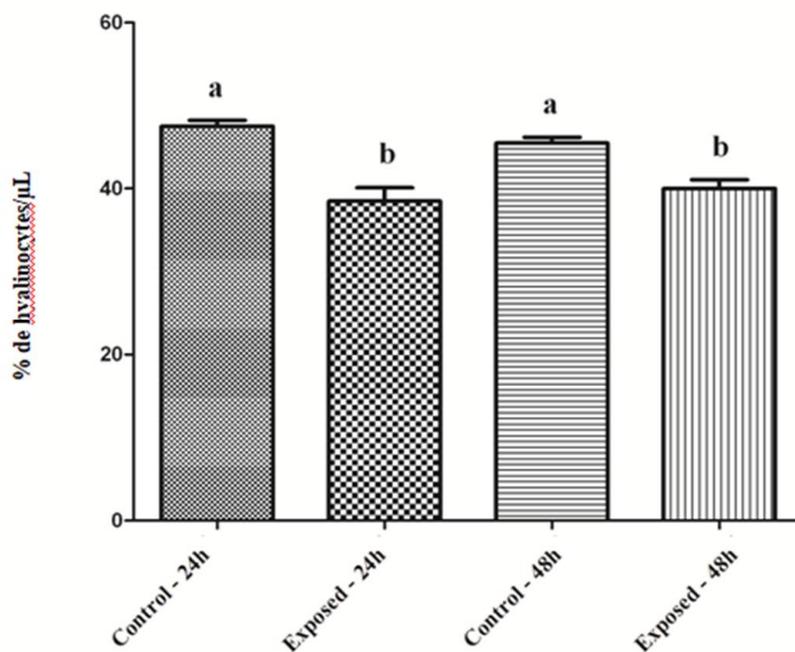


Figura 4. Contagem diferencial de hialinócitos em caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$) ($n = 5$ caramujos/tratamento).

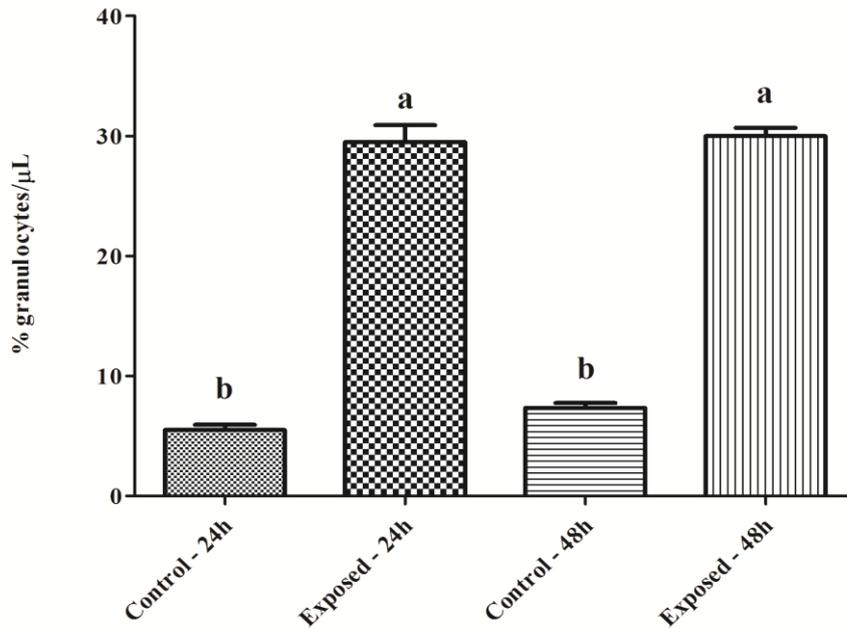


Figura 5. Contagem diferencial de granulócitos em caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$) ($n = 5$ caramujos/tratamento).

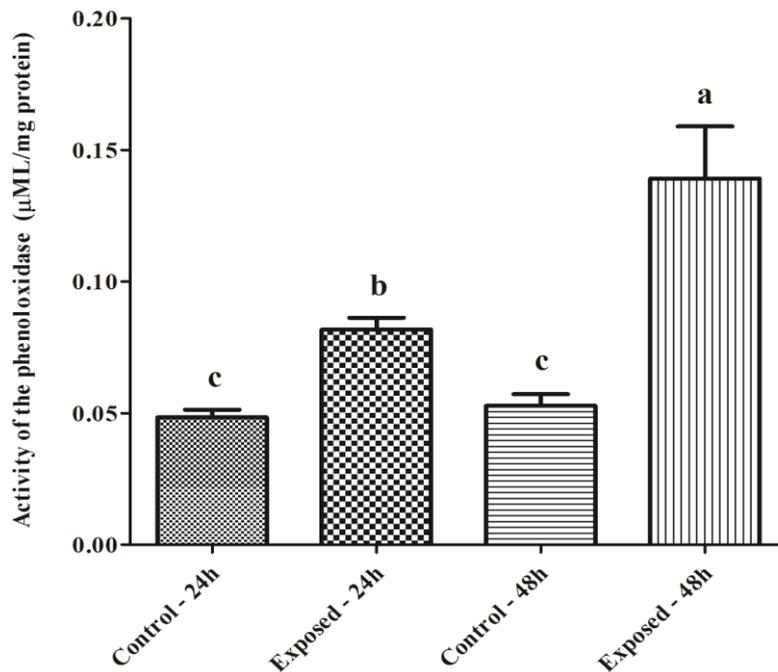


Figura 6. Atividade da enzima fenoloxidase na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$) ($n = 5$ caramujos/tratamento).

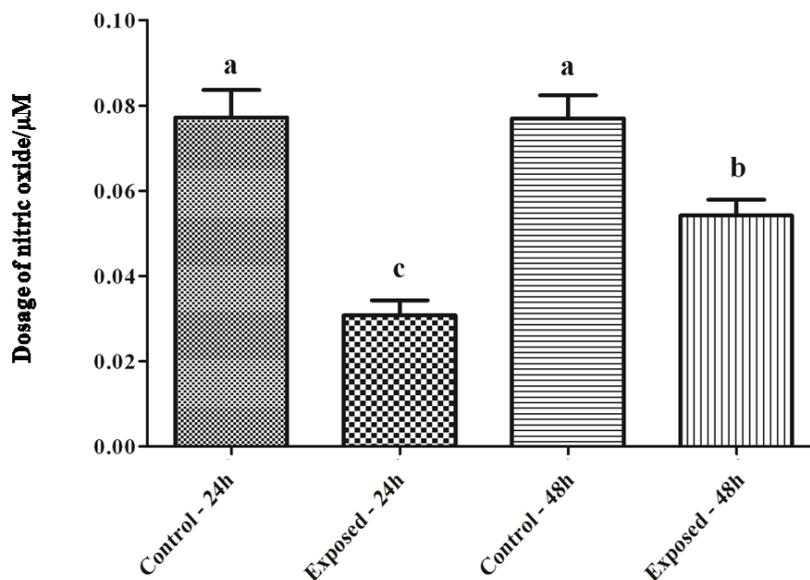


Figura 7. Dosagem de óxido nítrico na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$) ($n = 5$ caramujos/tratamento).

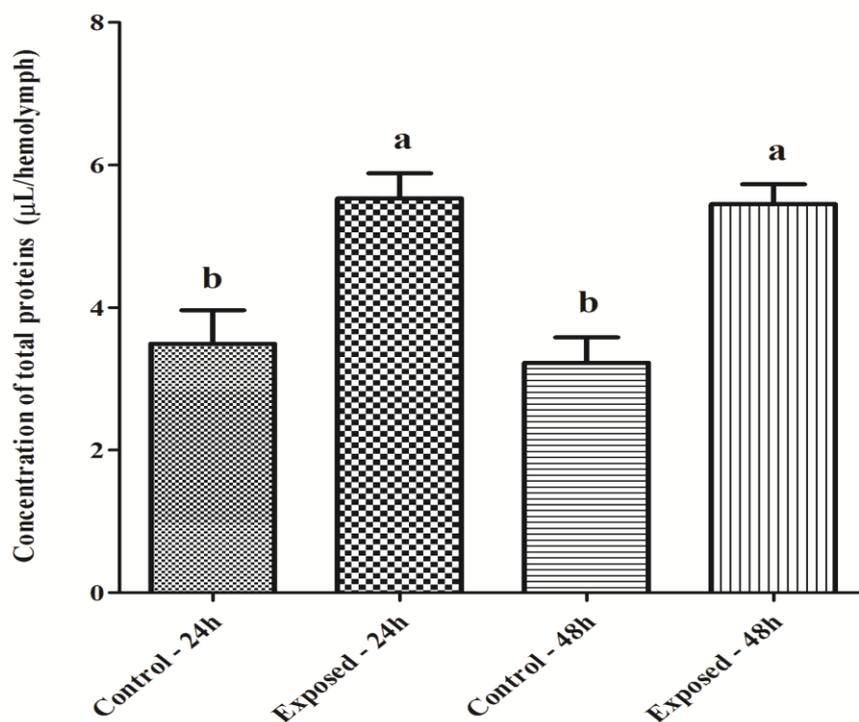


Figura 8. Concentração de proteínas totais na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata* desafiados pelo *Schistosoma mansoni* dos grupos controle 24h e 48h e grupos expostos 24h e 48h. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste Tukey a 5% ($p < 0,05$) ($n = 5$ caramujos/tratamento).

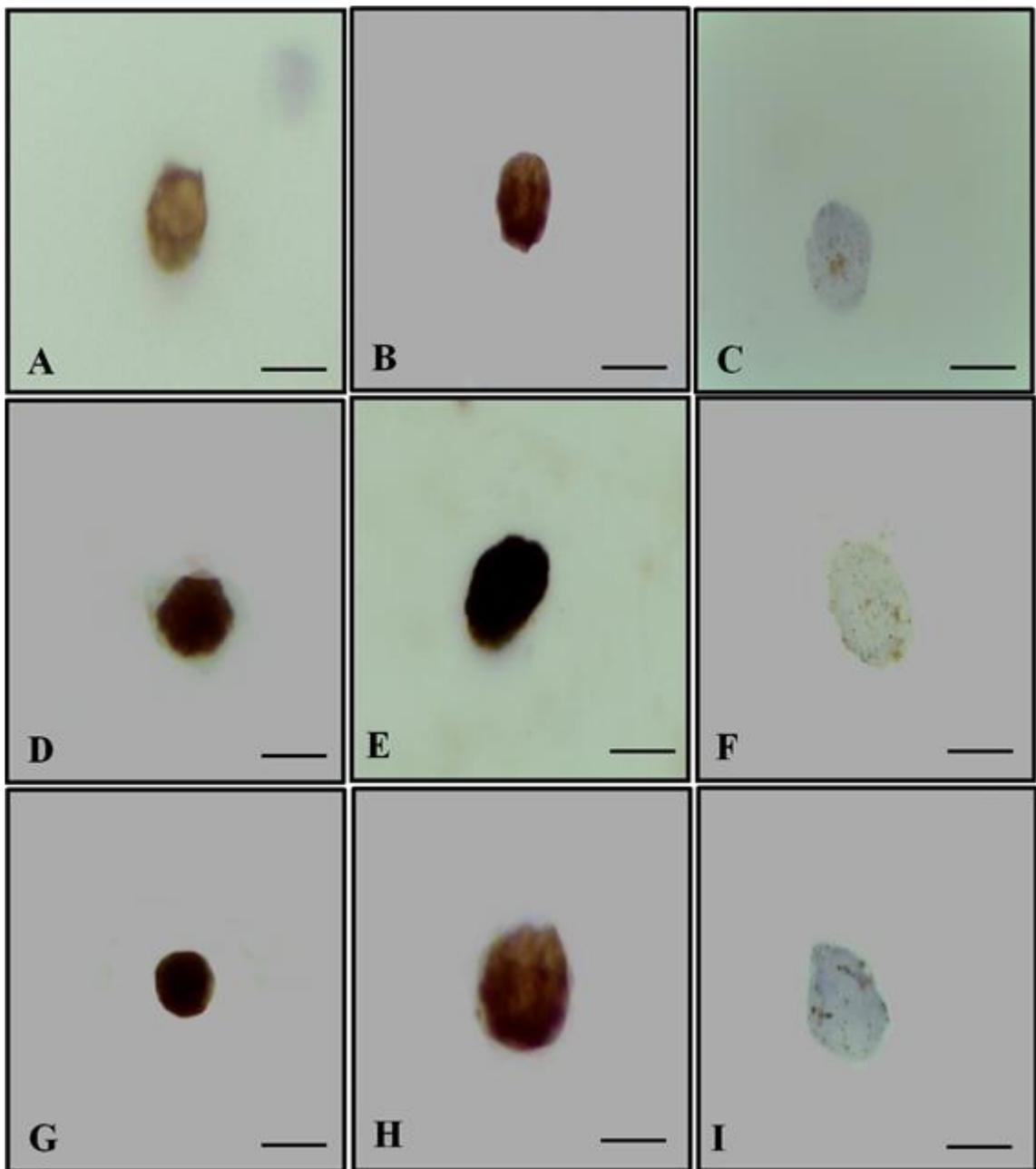


Figura 9. Imunohistoquímica para o TNF- α nos hemócitos presentes na hemolinfa de caramujos *Pomacea lineata*. A, B e C - agranulócito, granulócito e hialinócito (controle); D, E e F - agranulócito, granulócito e hialinócito (24h após exposição ao *Schistosoma mansoni*) e G, H e I - agranulócito, granulócito e hialinócito (48h após exposição ao *Schistosoma mansoni*). Barras = 50 μ m

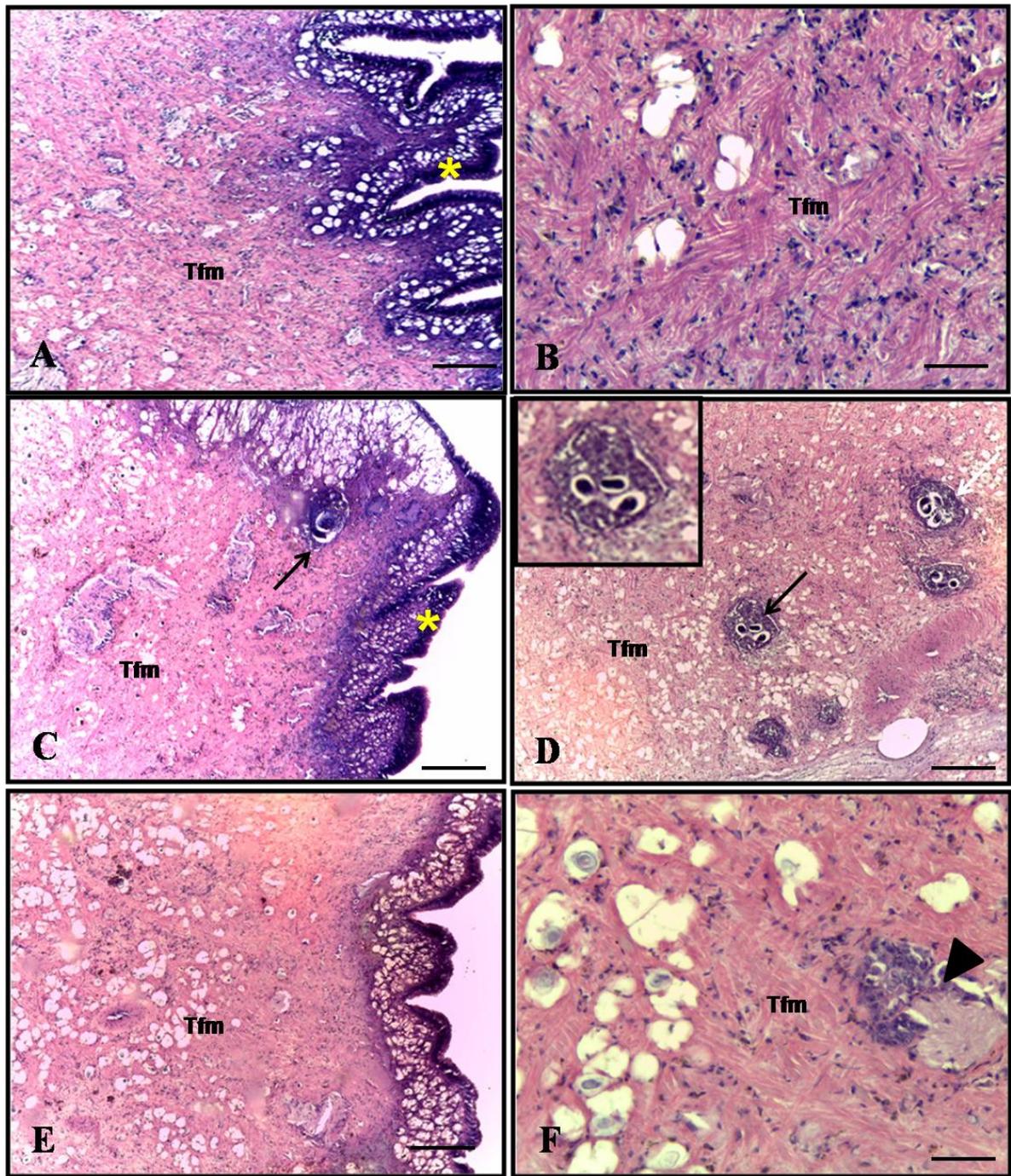


Figura 10. Corte histológico do músculo pedal (pé) dos caramujos dos grupos experimentais. (A-B) controle 24 h; (C-D) expostos 24 h e (E-F) expostos 48 h. asteriscos - tecido epitelial, Tfm - tecido fibromuscular, setas - esporocistos, Detalhe - esporocisto circundado por tecido de granulação. Ponta de seta - área com fibrose acentuada e tecido de granulação. Coloração H.E. Barras = 10µm.

4. DISCUSSÃO

Nos gastrópodes, a defesa imune celular tem os hemócitos como protagonista bem preparado para a debelação de microrganismos. Infecções no *B. glabrata* indicaram também um aumento destas células com 24 h após à exposição a mesma carga parasitária de *S. mansoni*, porém este número decaiu até chegar em 72 h (Allegretti et al., 2009). Em contrapartida, Oliveira et al. (2010b) trabalhando com caramujos *B. tenagophila* susceptíveis no tempo de 24 horas após a infecção não encontrou diferença significativa para o número total de células.

De acordo com Simões (2011), a contagem total dessas células pode ser alterada durante infecções e/ou estresses de origem ambiental. No presente estudo, as alterações observadas nos grupos desafiados 24h e 48h com o aumento significativo do número total de hemócitos em relação ao grupo controle, sugerem que os hemócitos estão envolvidos na defesa celular do *P. lineata* contra *S. mansoni*. A especificidade na relação entre parasito e hospedeiro sugere complexos mecanismos adaptativos. O sistema imune dos moluscos é de grande importância neste processo de interação Trematoda-caramujo, pois será ele que dará o desfecho de toda a infecção, podendo beneficiar o parasita ou o molusco. Há algumas décadas atrás não se conhecia, como hoje, os mecanismos de defesa dos moluscos como sendo um complexo e específico mecanismos pronto para ser acionado ao menor sinal de ameaça. Estes mecanismos envolvem ao mesmo tempo respostas mediadas por fatores dissolvidos na hemolinfa e por hemócitos (Neves et al., 2005).

Sabe-se que os hemócitos são divididos em subpopulações, e que estas, apresentam nomenclaturas diferentes dependendo da espécie gastrópoda estudada. Cavalcanti et al. (2012) classificaram cinco tipos celulares para *B. glabrata* e *B. straminea*: células blásticas, hialinócitos I, hialinócitos II, hialinócitos II e granulócitos. Oliveira et al. (2010b) apenas nomearam os hialinócitos e granulócitos em *B. tenagophila*. Enquanto que para e

Bradybaena similaris e *Megalobulimus abbreviatus*, as células foram divididas em células redondas, hialinócitos e granulócitos (Rohr; Amato 2014). Para *Pila globosa*, Mahilini; Rajendran (2008) nomearam estas células de agranulócitos, granulócitos I (progranulócitos) e granulócitos II, e granulócitos III. E Ray et al. (2012) para esta mesma espécie classificaram em agranulócitos, semigranulócitos e granulócitos.

Na espécie do gênero *Pomacea* já foram descritas em *P. canaliculata* por Shozawa; Suto (1990) como células não granulares, células com grânulos eletroluscente, e células com grânulos eletrodensos, enquanto Cueto et al. (2013; 2015) relataram agranulócitos, hialinócitos e granulócitos, como observado, neste trabalho, pela primeira vez em *P. lineata*.

Em *P. lineata*, os granulócitos apresentaram um aumento significativo de aproximadamente seis vezes após a infecção ao *S. mansoni* nos tempos de 24 h e 48 h, enquanto que os hialinócitos e os agranulócitos diminuíram significativamente. Em *B. tenagophila* e *B. straminea* observou-se apenas uma diferença significativa dos granulócitos com 2 h de infecção (Oliveira et al., 2010a; Cavalcanti et al., 2012). No entanto, Allegretti et al. (2009) em *B. glabrata* predominaram os hialinócitos, nos grupos infectados. Com esses achados podemos inferir que em *P. lineata* os granulócitos possuem um maior papel na defesa imune desses animais, e que cada espécie pode reagir de forma diferente ao *S. mansoni*.

Quando expostos a agentes externos, em outros invertebrados, o aumento do número de granulócitos já foi indicado por alguns autores como uma situação de divisão e diferenciação das células blásticas (ou agranulócitos) em outros tipos celulares (Barraco et al., 1993; Brayner et al., 2005, 2007). Esta redução na contagem de agranulócitos do presente estudo pode ser assim explicada, pelo fato de essas células serem consideradas como células imaturas (Hine 1999) e que após a infecção provavelmente diferenciaram-se em granulócitos para uma maior defesa do organismo.

Os hemócitos sozinhos não desempenham um papel completo e eficaz na imunidade dos invertebrados. Além de participarem dos processos de fagocitose, nodulação e encapsulação dos parasitos, eles precisam produzir uma série de compostos para eliminar o mais rápido possível o agente infeccioso (Martin et al., 2007; Galinier et al., 2013; Coustau et al., 2015). Um desses compostos é a fenoloxidase, uma enzima que parece estar envolvida no sistema imune de vários invertebrados no processo de melanização (Ratcliffe et al., 1985; Chen et al., 1995; Cerenius; Söderhäll 2004), inclusive em gastrópodes.

Mattos (2011) estudando caramujos resistentes e suscetíveis de *B. tenagophila* observou uma atividade significativamente maior da fenoloxidase na presença do esporocisto primário de *S. mansoni* do que na ausência do parasito. Porém, em espécies de *B. glabrata* e *B. straminea* esta enzima parece não ter uma função chave na defesa desses caramujos contra o trematódeo *S. mansoni* logo após a infecção (Melo 2015). Em nosso estudo, a variação de sua atividade, foi significativamente maior em *P. lineata* expostos após 48 h ao *S. mansoni*, apesar de também já ter apresentado uma atividade maior após o período de 24h em relação ao controle, sugerindo um aumento proporcional ao tempo de infecção garantindo por mais tempo o combate ao trematódeo.

Outra resposta imunológica humoral é a produção de espécies reativas de nitrogênio, o óxido nítrico (NO). Mecanismos de destruição dependentes de oxigênio nos moluscos, tais como *B. glabrata* são conhecidos por desempenhar um papel crucial na morte de esporocistos de *S. mansoni* (Hahn et al., 2000; 2001; 2001b Zahoor et al., 2009). Contudo, este fato não foi observado na hemolinfa de *P. lineata*, visto que os níveis séricos desta substância nos caramujos expostos foi significativamente menor quando comparados com os respectivos controles de 24h e 48h após a exposição ao *S. mansoni*, entretanto nos animais expostos 48 h apresentou um aumento significativo desta concentração de NO em relação aos expostos 24h. Podendo assim inferir que, diferentemente do *B. glabrata*, o NO parece não ter um papel

crucial na defesa dos *P. lineata* frente ao parasita e que este composto só começa a ser produzido com mais intensidade com o passar do tempo.

Vargas-Albores et al., (2001) preservam a ideia de que a defesa humoral dos moluscos é representada principalmente por proteínas plasmáticas presentes na hemolinfa. Em *P. canaliculata*, Lingpeng et al. (2011) dosaram as proteínas totais nestes caramujos após um ensaio toxicológico com glicosídeos de *Nerium indicum* buscando respostas imunes à esta planta e concluíram que o conteúdo de proteína total não foi afetada no final de 24 e 48 h seguido por uma significativa depleção no fim de 72 e 96 h. Zelck et al. (1995) quantificaram as proteínas em *B. glabrata* em diferentes tempos (12, 24, 48 e 72h) após a exposição ao *S. mansoni* e não houve diferenças significativas.

Tunholi et al. (2011) em estudo com o *B. glabrata*, avaliaram as proteínas totais da hemolinfa mesmo após algumas semanas pós-exposição a outro trematódeo, o *Echinostoma paraensei*, e não constatou aumento na concentração dessas macromoléculas, fato este, que também ocorreu com a espécie *B. tenagophila* (cepa Cabo Frio) frente ao *S. mansoni* (Oliveira 2015). Portela-Junior (2016) analisou o *B. straminea* e observou um aumento significativo da quantidade de proteínas extraídas de sua hemolinfa.

Em nossos achados, a concentração de proteínas totais foi significativamente maior nos grupos expostos aos miracídios em relação aos respectivos controles e também não foi observada diferença entre os grupos expostos em relação ao tempo. Um estudo *in vitro* realizado por Santos & Rodrigues (2006) mostrou que a exposição de miracídios à fase solúvel da hemolinfa resultou na morte de 100% dessas larvas, confirmando assim que a hemolinfa possui compostos capazes de reagir contra patógenos. De acordo com os estudos mencionados em caramujos do gênero *Biomphalaria*, infere-se que a quantidade de proteínas totais tende a diminuir nas espécies susceptíveis, no caso o *B. glabrata* e *B. tenagophila*, e que em espécies menos susceptíveis como *B. straminea*, a tendência das proteínas é aumentar

significativamente. Assim, de acordo com este imunoprônto, a espécie *P. lineata* se encaixaria como sendo menos susceptível ao *S. mansoni*, embora sabe-se que a susceptibilidade de um caramujo ao *S. mansoni* depende em grande parte de fatores genéticos (Newton 1952, 1953; Richards 1970, 1977).

De Zoysa et al. (2009) em um ensaio com *Haliotis discus discus* frente a uma infecção com três bactérias patogênicas, detectaram em um primeiro relato a presença de um membro ligado a superfamília do TNF alfa em moluscos. Os resultados deste estudo indicaram que TNF alfa pode responder a infecção patogênica e desempenhar um papel importante no sistema imunológico do *H. discus discus*. Apesar da homologia desta molécula com TNF- α humano, seu papel na regulação da resposta funcional e na relação parasito-hospedeiro ainda não foi esclarecido. Na presente pesquisa, houve uma expressão maior do TNF- α nos agranulócitos e granulócitos da hemolinfa de *P. lineata* com o passar do tempo pós exposição em relação ao grupo controle. Sugerindo assim, uma participação deste fator na resposta imune humoral dos caramujos ao *S. mansoni*. Apesar das proteínas pró-inflamatórias, como o TNF alfa, já terem sido identificadas em moluscos e apresentarem semelhanças funcionais com citocinas de vertebrados, ainda é imaturo afirmar o grau de homologia entre as proteínas de moluscos com citocinas de vertebrados, pois estudos mais detalhados precisam ser estabelecidos.

A histopatologia do músculo pedal do *P. lineata* revelou resultados semelhantes encontrados por Nacif-Pimenta et al. (2012) em um estudo com linhagens susceptíveis e resistentes de *B. tenagophila* frente à infecção ao *S. mansoni*, quanto a presença dos esporocistos sempre no tecido fibromuscular. Outros estudos histológicos realizados com diferentes estirpes de *B. glabrata* ou *B. tenagophila* infectados, mostraram que nos moluscos altamente suscetíveis existem esporocistos e cercárias em abundância no tecido do hospedeiro, e uma absoluta falta inicial de reação celular ao redor do parasita. (Guaraldo et

al., 1981, Sullivan; Richards 1981, Souza et al., 1995, 1997). Esses dados corroboram em parte com os nossos achados histopatológicos do pé de *P. lineata* frente ao parasita *S. mansoni*, revelando uma quantidade de esporocistos encistados no tecido fibromuscular com a presença de infiltrado hemocitário, nos caramujos avaliados 24h após exposição a *S. mansoni*. Entretanto nos caramujos avaliados após 48h de exposição não foram observados nos locais de esporocistos intensa fibrose, além da redução do infiltrado hemocitário, sugerindo um processo de inicial de cicatrização para remodelação do tecido fibromuscular.

5. CONCLUSÃO

Diante do exposto podemos afirmar que *P. lineata* desenvolve uma série de estratégias imunológicas com uma atividade maior da enzima fenoloxidase e também com o aumento da produção de proteínas totais e do número total de hemócitos, destacando-se o tipo celular dos granulócitos, assim como uma maior expressão da citocina TNF alfa nos caramujos expostos ao *S. mansoni*. Além disso, reação a nível tecidual no momento da penetração do miracídio com a formação de esporocistos no tecido fibromuscular do pé após 24 horas da exposição, não observado após 48h da infecção. Assim, podemos concluir que estes mecanismos imunológicos e histológicos conferem ao *P. lineata* resistência à infecção pelo *S. mansoni*.

6. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado, ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE e LIKA da UFPE, aos Laboratórios de Histologia e ao LECA da UFRPE por terem abertas suas portas para a realização deste estudo.

6. REFERÊNCIAS

Abe, AS .1995. Estivation in South American amphibians and reptiles. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 28, 1241–1247.

Abdel-Halim K, El-Saad AA, Talha M, Hussein A, Bakry N. 2013. Oxidative stress on land snail *Helix aspersa* as a sentinel organism for ecotoxicological effects of urban pollution with heavy metals. *Chemosphere*, 93, 1131-1138. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.06.042

Abou-El-Naga IF, Radwan, EH. 2012. Defense response of susceptible and resistant *Biomphalaria alexandrina* snails against *Schistosoma mansoni* infection. *Rev. Biol. Trop.*, 60 Suppl 3,1195-1204. DOI: 10.1590/S0074-02762010000700007

Allegretti SM, Carvalho JF, Magalhães LA, Zanotti-Magalhães EM. 2009. Behaviour of albino and melanic variants of *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (Mollusca: Planorbidae) following infection by *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. *Braz. J. Biol.*, 69 Suppl 1, 217-222. DOI: 10.1590/S1519-69842009000100029

Barboza SHR, Costa DPS, Romanelli PF. 2006. Processamento e avaliação sensorial da carne dos moluscos Escargot (*Achatina fulica*) e Aruá (*Pomacea lineata*). *Alim. Nutr.*, 17, 413-418.

Barraco MA, Steil AA, Gargioni R. 1993. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 88, 73-83. DOI: 10.1590/S0074-02761993000100012

Beschin A, Bilej M, Lucas, R, De Baetselier, P. 2003. Functional convergence of invertebrate and vertebrate cytokine-like molecules based on similar lectin-like activity. In *Invertebrate Cytokines and the Phylogeny of Immunity: Facts and Paradoxes* (Beschinn, A. and Müller, W.E.G., eds.). *Progress in Molecular and Subcellular Biology Series* 145–163.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive methods for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bioch.*, 72, 248–254. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brayner FA, Araújo 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 F, Araújo HRC, Santos SS, Cavalcanti MGS, Alves LC, Souza JRB, et al. 2007. Haemocyte population and ultrastructural changes during the immune response of the mosquito *Culex quinquefasciatus* to microfilariae of *Wuchereria bancrofti*. *Med. Vet. Entomol.*, 21, 112-120. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2007.00673.x
- Cavalcanti MG, Filho FC, Mendonça AM, Duarte GR, Barbosa CC, Castro CM, et al. 2012. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. *Micron*, 43, Suppl 2–3, 285-291. DOI: 10.1016/j.micron.2011.09.002
- Cerenius L, Soderhall K. 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.*, 198, 116-26. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x
- Chen C, Durrant HJ, Newton RP, Ratcliffe NA. 1995. A study of novel lectins and their involvement in the activation of the prophenoloxidase system in *Blaberus discoidalis*. *Biochem. J.*, 310, 23-31.
- Cimerman B, Cimerman S. 2005. *Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais*. Atheneu, São Paulo.
- Coustau C, Gourbal B, Duval D, Yoshino TP, Adema CM, Mitta G. 2015. Advances in gastropod immunity from the study of the interaction between the snail *Biomphalaria glabrata* and its parasites: A review of research progress over the last decade. *Fish Shellfish Immunol.*, 46, Suppl 1, 5-16. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.01.036

- Cueto JA, Vega IA, Castro-Vazquez A. 2013. Multicellular spheroid formation and evolutionary conserved behaviors of apple snail hemocytes in culture. *Fish Shellfish Immunol.*, 34, 443–453. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.11.035
- Cueto JA, Rodriguez C, Vega IA, Castro-Vazquez A. 2015. Immune Defenses of the Invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Phagocytic Hemocytes in the Circulation and the Kidney. *Plos One* 10 (4): e0123964 DOI: 10.1371 / journal.pone.0123964
- Das S, Khangarot BS. 2010. Efeitos do cobre sobre o desenvolvimento de ovos e eclosão de um caracol de água doce pulmonate *Lymnaea luteola*. *J. Hazard Mater.*, 179, 665-675.
- Dunn PE. 1986. Biochemical aspects of insect immunity. *Ann. Rev. Entomol.*, 31, 321-339. DOI: 10.1146/annurev.en.31.010186.001541
- Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.*, 82, 139-46. DOI: 10.1016/S0001-706X(02)00045-1
- Faraldo AC, Nóbile PM, Daffre S, Gregório EA, Lello E. 2006. Prophenoloxidase activation in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Anais do XIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular* 136.
- Ferreira UM, Foronda AS, Schumaker TTS . 2003. Fundamentos biológicos da parasitologia humana. Manole, São Paulo.
- Galinier R, Portela J, Moné Y, Allienne JF, Henri H, Delbecq S, et al. 2013. Biomphalysin , a New b Pore-forming Toxin Involved in *Biomphalaria glabrata* Immune Defense against *Schistosoma mansoni*. *PLoS pathogens*, San Francisco 9, Suppl 3, 1–16. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003216

- Guaraldo AMA, Magalhães LA, Rangel HA, Pareja G. 1981. Evolução dos esporocistos de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) e *Biomphalaria tenagophila* (D'Orbigny, 1835). Rev. Saúde Pub., 15, 436-448. DOI: 10.1590/S0034-89101981000400008
- Green LC, De Luzuriaga KR, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR et al. 1981. Nitrate biosynthesis in man. Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 7764–7768.
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. 2000. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: Carbohydrate-specific stimulation. Dev. Comp. Immunol., 24, 531-541. DOI: 10.1016/S0145-305X(00)00017-3
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. 2001. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol., 187, 778-785. DOI: 10.1645/0022-3395(2001)087[0778:IONOIK]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
- Igaki T, Kanda H, Yamamoto-Goto Y, Kanuka H, Kuranga E, Agaki T, et al. 2002. Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. Embo J., 21, 3009–3018. DOI: 10.1093/emboj/cdf306
- Itziou A, Dimitriadis VK. 2011. Introduction of the land snail *Eobania vermiculata* as a bioindicator organism of terrestrial pollution using a battery of biomarkers. Sci. Total Environ., 409, 1181-1192. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2010.12.009
- Jiravanichpaisal P, Lee BL, Söderhäll K. 2006. Cell-Mediated Immunity In arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiol. 211, Suppl 4, 213-236. DOI: 10.1016/j.imbio.2005.10.015

- Lingpeng D , Wang W, Dong X, Hu R, Nan X. 2011. Molluscicidal activity of cardiac glycosides from *Nerium indicum* against *Pomacea canaliculata* and its implications for the mechanisms of toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 32, Suppl 2, 226-232. DOI: 10.1016/j.etap.2011.05.007
- Loker ES. 2010. Gastropod immunobiology. In Soderhall K (ed) (AUSTIN: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media), 17-43.
- Machado SMP, Magalhães LA, Artigas PT, Cordeiro NS, Carvalho JF. 1988 Verificação de antagonismo entre larvas de *Schistosoma mansoni* e larvas e outros Digenea em *Biomphalaria tenagophila* molusco planorbídeo de criadouro natural situado na região de Campinas, SP, Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, 22, 484-488.
- Mahilini H, Rajendran A. 2008. Categorization of hemocytes of three gastropod species *Trachea vittata* (Muller), *Pila globosa* (Swainson) and *Indoplanorbis exustus* (Dehays). *J Invertebr. Pathol.*, 97, 20–26. DOI: 10.1016/j.jip.2007.07.007
- Marques MM, Barbosa F. 2000. Na fauna do fundo, o retrato da degradação. *Ciênc. Hoje*, 30, Suppl 175, 72-75.
- Martin GG, Oakes CT, Tousignant HR. 2007. Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica*. *J. Mollus. Stud.*, 73, 355-365. DOI: 10.1093/mollus/eym032
- Matricón-Gondran M, Letocart M. 1999. Internal defenses of the snail *Biomphalaria glabrata*. I. Characterization of hemocytes and fixed phagocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 74, 224–234. DOI: 10.1006/jipa.1999.4876
- Mattos ACA. 2011. Estudo do sistema inato de defesa de *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) frente ao *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Dissertation, FIOCRUZ PE.

Melo, ES. 2015. Análise da variabilidade imunológica e da expressão dos genes FREPs entre as espécies *Biomphalaria glabrata* e *B. straminea* com diferentes perfis de suscetibilidade, frente à infecção por *Schistosoma mansoni*. Dissertation, FIOCRUZ PE.

Milward-de-Andrade R. 1978. Tentativa de colonização de lagoas do "Quadrilátero Ferrífero" (Nova Lima. MG. Brasil) com *Pomacea haustrum* (Reeve. 1856). In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 14º Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia, João Pessoa: p. 161.

Mitta G, Galinier R, Tisseyre P, Allienne JF, Girerd-Chambaz Y, Guillou F, et al. 2005. Gene discovery and expression analysis of immune-relevant genes from *Biomphalaria glabrata* hemocytes. Dev. Comp. Immunol., 29 Suppl 5, 393–407. DOI: 10.1016/j.dci.2004.10.002

Moreno E, Yan M., Basler K. 2002. Evolution of TNF signalling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by *Eiger*, the *Drosophila* homolog of the TNF superfamily. Curr. Biol., 12, 1263–1268. DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00954-5

Nacif-Pimenta R, Mattos ACA, Orfano AS, Barbosa L, Pimenta PFP, Coelho PMZ. 2012. *Schistosoma mansoni* in Susceptible and Resistant Snail Strains *Biomphalaria tenagophila*: *In Vivo* Tissue Response and *In Vitro* Hemocyte Interactions. Plos One, 7, e45637 1-12. DOI: 10.1371/journal.pone.0045637

Negrão-Corrêa, D, Mattos ACA, Pereira CAJ, Martins-Souza RL. 2012. Interaction of *Schistosoma mansoni* Sporocysts and Hemocytes of *Biomphalaria*. J. Parasit. Res., 2012, 1-6. DOI: 10.1155/2012/743920

Neves DP. 2004. Parasitologia Humana. Atheneu, São Paulo.

Newton WL. 1952. The comparative tissue reaction of two strains of *Australorbis glabratus* to infection with *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol., 38, 362-6. DOI: 10.2307/3273773

Newton WL. 1953. The inheritance of susceptibility to infection with *Schistosoma mansoni* in *Australorbis glabratus*. Exp. Parasitol., 2, 242-57. DOI:10.1016/0014-4894(53)90036-8

Oliveira ALD, Levada PM, Zanotti-Magalhaes EM, Magalhães LA, Ribeiro-Paes JT. 2010a. Differences in the number of hemocytes in the snail host *Biomphalaria tenagophila*, resistant and susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. Genet. Mol. Res., 9, 2436-2445. DOI:10.4238/vol9-4gmr1143

Oliveira ALD, Da Silva D, Manzano BC, Abdel-Hamid AZ, Marcelino MY, Zanotti-Magalhães EM, et al. 2010b. Genetic differences between strains of *Biomphalaria glabrata* (Planorbidae) that are susceptible and unsusceptible to schistosomiasis. Genet. Mol. Res., 9, 1450-1459. DOI: 10.4238/vol9-3gmr821

Oliveira IHR. 2015. Identificação das proteínas diferencialmente expressas nos homócitos de populações de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Gastropoda: Planorbidae) suscetível e resistentes a *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 (Trematoda: Schistosomatidae). Dissertation, Universidade Federal de Minas Gerais.

Paulini, HM, Paulini E. 1971. Observações de laboratório sobre controle biológico de *Biomphalaria glabrata* pela *Pomacea* sp.(Ampullariidae). Rev. Bras. Malario. Doen. Trop., 23,135-149.

Pinder AW, Storey KB, Ultsch GR. 1992. Aestivation and hibernation. In: Burggren, ww (ed), Environmental Biology of the Amphibia, University of Chicago Press, Chicago, pp 250–274.

- Pipe RK. 1992. Generation of reactive oxygen metabolites by the hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Dev. Comp. Immunol., 16, 111-122. DOI: 10.1016/0145-305X(92)90012-2
- Portela-Junior NC. 2016. Análise proteômica da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria straminea* R3 frente à exposição ao *Schistosoma mansoni*. Dissertation, FIOCRUZ PE.
- Ratcliffe NA, Rowley AF, Fitzgerald SW, Rhodes CP. 1985. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances. Int. Rev. Cytol., 97,183-350. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)62351-7
- Ray M, Bhunia NS, Bhunia AS, Ray S. 2012. A comparative analyse of morphological variations, phagocytosis and generation of cytotoxic agents in flow cytometrically isolated hemocytes of Indian molluscs. Fish Shellfish Immunol., 34, 244–253. DOI: 10.1016/j.fsi.2012.11.006
- Richards CS. 1970. Genetic of a molluscan vector of schistosomiasis. Nature, 227, 806-810. DOI: 10.1038/227806a0
- Richards CS. 1977. *Schistosoma mansoni*: susceptibility reversal with age in the snail host *Biomphalaria glabrata*. Exp. Parasitol., 42, 165-168. DOI: 10.1016/0014-4894(77)90074-1
- Roger E, Mitta G, Moné Y, Bouchut A, Rognon A, Grunau C, et al. 2008 Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomics approach. Mol. Biochem. Parasitol., 157, 205-216. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2007.11.003
- Rohr RA, Amato SB. 2014. Hemocytes of *Bradybaena similaris* and *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Stylommatophora). Iheringia, Sér. Zool., 104 Suppl 2, 209-215. DOI: 10.1590/1678-476620141042209215
- Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD. 2005. Zoologia dos Invertebrados. Editora Roca, São Paulo.

Santos MAV, Rodrigues IRC. 2006. Estudo in vitro da ação letal da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* sobre os miracídios de *Schistosoma mansoni*. Rev. Para. Med., 20 Suppl 2, 13–16.

Santos DVV, Santos MAV, Rodrigues IRC. 2011. Hemocyte production in *Biomphalaria glabrata* snails after exposure to different *Schistosoma mansoni* infection protocols. Rev. Pan-Amazônica Saúde, 2 Suppl 2, 33-38. DOI: 10.5123/S2176-62232011000200005

Shozawa A, Suto C. 1990. Hemocytes of *Pomacea canaliculata*: I. Reversible aggregation induced by Ca^{2+} . Dev. Comp. Immunol., 14, 175–184. DOI: 10.1016/0145-305X(90)90089-W

Simões E. 2011. Impacto da floração da alga nociva *Dinophysis acuminata* sobre o sistema imune de ostras *Crassostrea gigas* e mexilhões *Perna perna* cultivados em Santa Catarina. Dissertation, Universidade Federal de Santa Catarina.

Souza CP, Cunha RCP, Andrade ZA. 1995. Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria glabrata*. Rev. Inst. Med. Trop., 37, 201-206. DOI: 10.1590/S0036-46651995000300004

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, 517-522. DOI: 10.1590/S0074-02761997000400014

Sullivan JT, Richards CS. 1981. *Schistosoma mansoni*, NIH-SM-PR-2 estirpe, em ações sensíveis e não sensíveis de *Biomphalaria glabrata*: histologia comparativa. J. Parasitol., 5, 702-708.

- Thiengo S. 1995. Família Pilidae Connoly, 1927 (Ampulariidae Gray, 1824). In: BARBOSA, FS (org.) Tóp. Malacol. Méd; Editora Fiocruz, p. 50-69.
- Tunholi VM , Lustrino D , Tunholi-Alves VM , Mello-Silva CC , Maldonado A Jr, Pinheiro J, et al. 2011. Biochemical profile of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) after infection by *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). Parasitol. Res., 109, 885-891. DOI: 10.1007/s00436-011-2330-7
- Van Der Knaap WP, Loker ES. 1990. Immune mechanisms in trematode snail interactions. Parasitol. Today, 6, 175–182. DOI: 10.1016/0169-4758(90)90349-9
- Vargas-Albores F, Barracco MA. 2001. Defense mechanisms in bivalve mollusks, with emphasis in pectinids. In: Maeda-Martínez, A. N. (Ed.). Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Noriega Editores, México pp. 127–146.
- Zahoor Z, Davies AJ, Kirk RS, Rollinson D, Walker AJ. 2009. Nitric oxide production by *Biomphalaria glabrata* haemocytes: effects of *Schistosoma mansoni* ESPs and regulation through the extracellular signal-regulated kinase pathway. Parasit. Vectors, 2, 18. DOI: 10.1186/1756-3305-2-18
- Zelck UE, Becker W, Bayne CJ. 1995. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. Dev. Comp. Immunol., 19, 181-194. DOI: 10.1016/0145-305X(95)00012-I
- Zoysa M, Jung S, Lee J. 2009. First molluscan TNF- α homologue of the TNF superfamily in disk abalone: Molecular characterization and expression analysis. Fish Shellfish Immunol., 26, 625–631. DOI:10.1016/j.fsi.2008.10.004

**Ultraestrutura de hemócitos de *Pomacea lineata* Spix 1827 (Gastropoda: Pulmonata)
expostos ao *Schistosoma mansoni* Sambon 1907**

Bárbara Brooklyn Timóteo Nascimento Silva¹, Luiz Carlos Alves², Fábio André Brayner²,
Yuri Mateus Lima de Albuquerque¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹, Valéria Wanderley
Teixeira¹

¹*Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Bairro de Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.*

²*Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami, Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE - Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil.*

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois

Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: btms10@hotmail.com

RESUMO

A literatura relata vários estudos ultraestruturais de hemócitos envolvendo os caramujos hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*, entretanto, não há estudos dessa natureza para caramujos que coabitam no mesmo ambiente destes hospedeiros, como por exemplo, *Pomacea lineata*, um controlador biológico do *Biomphalaria glabrata* e, portanto, um possível hospedeiro para a esquistossomose. Assim, o objetivo deste estudo é analisar pela primeira vez a ultraestrutura dos hemócitos circulantes de *P. lineata*, bem como verificar se há alterações ultraestruturais destas células quando os caramujos são expostos ao parasita *S. mansoni*. Foram formados os seguintes grupos: I- Caramujos não infectados; II- Caramujos expostos aos miracídios de *S. mansoni*; III - Caramujos não infectados e IV- Caramujos expostos aos miracídios de *S. mansoni*. A análise foi realizada 24 e 48h pós-infecção. Foram identificados três tipos celulares: agranulócitos, hialinócitos e granulócitos. 24 e 48h pós-infecção apenas os agranulócitos e granulócitos apresentaram alterações ultraestruturais que variaram de intensidade, sendo, no entanto, mais efetiva com 24h, principalmente pela visualização de vacúolos fagocíticos nos granulócitos. Isto sugere um investimento maior da imunidade celular em *P. lineata* nas primeiras 24h da infecção, o que pode conferir a esta espécie uma maior resistência ao platelminto.

PALAVRAS-CHAVE: miracídio, hemócitos, ultraestrutura, *Pomacea lineata*, *Schistosoma*.

ABSTRACT

The literature reports several ultrastructural studies of hemocytes involving *Schistosoma mansoni* intermediate host snails, however, there are no studies of this nature for snails that cohabit in the same environment of these hosts, such as *Pomacea lineata*, a biological controller of *Biomphalaria glabrata* and, therefore, a possible host for schistosomiasis. Thus, the objective of this study is to analyze for the first time the ultrastructure of the circulating hemocytes of *P. lineata*, as well as to verify if there are ultrastructural alterations of these cells when the snails are exposed to the *S. mansoni* parasite. The following groups were formed: I- Uninfected snails; II - Snails exposed to the miracidia of *S. mansoni*; III - Uninfected snails and IV - Snails exposed to the miracidia of *S. mansoni*. The analysis was performed 24 and 48h after infection. Three cell types were identified: agranulocytes, hyalinocytes and granulocytes. 24 and 48h post-infection only the agranulocytes and granulocytes presented ultrastructural alterations that varied in intensity, being, however, more effective with 24 h, mainly due to the visualization of phagocytic vacuoles in the granulocytes. This suggests a greater investment of cellular immunity in *P. lineata* in the first 24h of the infection, which may give to this species a greater resistance to platyhelminth.

KEYWORDS: miracidium, hemocytes, ultrastructure, *Pomacea lineata*, *Schistosoma*.

1. INTRODUÇÃO

Os hemócitos são células que circulam livremente na hemolinfa e também nos tecidos dos gastrópodes, pois estes animais dispõem de um sistema vascular aberto, ou seja, a hemolinfa circula fora de vasos (Cheng et al. 1981, Jeong et al. 1983, Loker 2010). Embora estudados desde a década de 1970, os hemócitos nos moluscos compreendem populações morfológicas e funcionalmente heterogêneas, e sua identificação e caracterização ainda não são bem compreendidas (Wang et al. 2017).

Estas células participam ativamente da defesa inata de caramujos contra patógenos interagindo com fatores humorais encontrados na hemolinfa. Os hemócitos são responsáveis pelo encapsulamento, fagocitose e liberação de uma grande diversidade de moléculas citotóxicas (Bezerra et al. 1999, Vargas-Albores & Barraco 2001, Gonzalez-Santoyo & Córdoba-Aguilar 2011), que contribui para que uma resposta imune mais complexa seja desencadeada para atuar na defesa desses organismos aos mais variados agentes patogênicos (Cerenius & Söderhäll 2013).

Alguns estudos têm procurado mostrar aspectos morfológicos e ultraestruturais dessas células com base em estudos citoquímicos em animais não parasitados (Faulk et al. 1973, Sapp & Loker 2000b), outros trabalhos têm estudado *in vitro* a morfologia celular no momento do processo de encapsulamento do parasita (Hohl 1965, Rifkin et al. 1969, Loker et al. 1982, Van Der Knaap & Loker 1990, Sapp & Loker 2000b) e em outros, também há o estudo de algumas substâncias que podem ajudar a preservar o citoesqueleto a fim de facilitar a caracterização ultraestrutural dos hemócitos (Santos & Diniz 2009). Recentemente, uma espécie do gênero *Pomacea*, o *P. canaliculata*, teve os seus hemócitos caracterizados pela microscopia eletrônica com mais ênfase em suas organelas e nos grânulos presentes em algumas destas células, assim como a sua capacidade fagocítica quando expostos a fungos e bactérias (Cueto et al. 2015).

O caramujo *Pomacea lineata* Spix, 1827 é encontrado no continente Sul-americano, destacando a região Nordeste do Brasil em ambientes dulcícolas, como margens dos rios, riachos, lagos e pântanos de águas calmas (Guimarães 1981, Thiengo 1995). Por possuírem um ciclo de vida longo, serem de tamanho grande, apresentarem pouca mobilidade e alta sensibilidade a diferentes concentrações de poluentes no meio, espécimes de *P. lineata* são bem estudadas como bioindicadores (Melo et al. 2000, Marques & Barbosa 2001, Coler et al. 2005). Cimerman e Cimerman (2005) destaca a importância desta espécie como controladores biológicos naturais do *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), visto que estes animais partilham

do mesmo ambiente que este hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, platelminto responsável pela esquistossomose (Ferreira et al. 2003).

Há vários estudos ultraestruturais de hemócitos envolvendo os caramujos infectados com *S. mansoni*, entretanto, não há estudos que relatem alterações ultraestruturais nos hemócitos de *P. lineata*, pois por partilhar o mesmo ambiente com os hospedeiros intermediários do *S. mansoni*, são passíveis de infecção pelo platelminto. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar pela primeira vez se há alterações na ultraestrutura dos hemócitos de *P. lineata*, quando são expostos ao parasita *S. mansoni*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção de *P. lineata*. *P. lineata* foram provenientes de um criadouro comercial e posteriormente transferidos para o Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA – UFRPE), onde passaram por um período de aclimação em aquário com água sem cloro, com aeração artificial e filtros de limpeza, em temperatura ambiente ($26 \pm 1^\circ \text{C}$). A geração F1 desses caramujos foi utilizada neste estudo. Os animais foram alimentados com folhas de alface (*Lactuca sativa*) à vontade, previamente higienizadas e ração para peixes. A água do aquário foi reciclada semanalmente, tendo sempre o pH em torno de 7,0 controlado pela utilização de hidróxido de sódio. A água também era enriquecida com carbonato de cálcio. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFRPE) pela licença N° 48/2016.

Grupos experimentais. Foram formados quatro grupos com 5 animais cada:

Grupo I - Caramujos não infectados e analisados após 24 horas da exposição luminosa;

Grupo II - Caramujos expostos aos miracídios de *S. mansoni* e analisados após 24 horas da exposição luminosa;

Grupo III - Caramujos não infectados e analisados após 48 horas da exposição luminosa;

Grupo IV - Caramujos expostos aos miracídios de *S. mansoni* e analisados após 48 horas da exposição luminosa.

Obtenção dos miracídios. Fezes de camundongos (*Mus musculus*) previamente infectados pela cepa LE de *S. mansoni*, foram cedidas pelo Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-UFPE para a realização da técnica de sedimentação espontânea. As fezes foram maceradas

suavemente em água destilada e peneiradas para um cálice de sedimentação. Este material foi lavado com água destilada até que o sobrenadante estivesse límpido, fazendo com que todos os sedimentos fossem retirados. Na última lavagem o material era deixado em repouso *overnight*, protegido da luz a uma temperatura em torno de 8-10 °C. No dia seguinte o sobrenadante era desprezado e o sedimento que continha os ovos do parasita, exposto à luz artificial pelo período de uma hora para a eclosão dos miracídios.

Exposição dos caramujos. Cada caramujo foi colocado individualmente em contato com 10 miracídios dispersos na água. O sistema “caramujo + miracídio” foi exposto à luz artificial para induzir a infecção por um período de 1 hora. Os caramujos do grupo controle também foram expostos à luz artificial, entretanto sem exposição aos miracídios.

Coleta da hemolinfa. A concha dos animais foi limpa com álcool a 70% e secada com papel absorvente. Uma pequena ruptura na concha foi dada próxima à cavidade pericárdica, onde a hemolinfa foi coletada. Um pedaço de papel filtro triangular foi colocado nesta abertura para absorção da água ainda existente dentro da concha afim de que não contaminasse a amostra. Utilizando uma agulha de insulina um pequeno corte foi dado na cavidade pericárdica e com ajuda de uma micropipeta de ponteiros previamente siliconizadas a hemolinfa foi coletada em *pools* e distribuída em microtubos por grupo, resultando em quatro amostras (uma para cada grupo).

Microscopia eletrônica de transmissão (MET). Um *pool* de cada amostra foi coletada e centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado o fixador glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4%, depois guardado em tampão cacodilato de sódio à temperatura de 8-10°C, até a sua utilização. Foi realizada três lavagens com o tampão cacodilato de sódio 0,1M, p.H 7.2 e centrifugadas a 3000 rpm/3min. Em seguida houve a pós-fixação pela solução do Tetróxido de Ósmio (OsO_4) a 1% e novamente três lavagens com o mesmo tampão. Para desidratação foi utilizada acetona em concentrações crescentes. Posteriormente, foi realizada a infiltração em mistura de acetona e resina Epon- 812. A inclusão foi realizada no mesmo meio e mantida em estufa a 60 °C, durante 72 horas para a polimerização da resina. Os blocos obtidos foram aparados e seccionados em ultramicrotomo PORTER-BLUM MT-1 com a utilização de facas de vidro feitas em um “knife-maker” LKB, modelo 7800-B, m. Depois, esses cortes foram corados por uma mistura de partes iguais de

AZUR II a 1% em água destilada e azul de metileno a 1% em bórax a 1%. A coloração se processou a quente. As lâminas foram lavadas em água, secas e, a seguir, examinadas em microscópio comum marca OLYMPUS BX-50. Depois de selecionada a área a ser estudada, os blocos foram retrimados e os cortes ultrafinos realizados na espessura de 40 a 80 nm, com a utilização de navalha de diamante. Os cortes obtidos foram colhidos em telas de 300 malhas e corados pela solução alcoólica de acetato de uranila a 4% por 30 minutos e tratamento final com citrato de chumbo, durante 8 minutos em cada uma delas. Após esses procedimentos, as telas foram levadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão, onde foram obtidas as eletromicrografias.

3. RESULTADOS

A análise ultraestrutural dos hemócitos de *P. lineata* do grupo controle, tanto com 24 e 48h, apresentaram características semelhantes, onde os agranulócitos mostraram núcleo volumoso bastante eucromático sem nucléolo evidente, no citoplasma evidenciou-se retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, ribossomos dispersos e vacúolos (Fig. 1A-B). Os hialinócitos apresentaram projeções citoplasmáticas, núcleo pequeno eucromático e citoplasma com retículo endoplasmático rugoso, ribossomos dispersos e vacúolos (Fig. 1C-D). Nos granulócitos observaram-se também projeções citoplasmáticas, núcleo excêntrico e pequeno, numerosos grânulos citoplasmáticos eletroluscentes de formato alongado no citoplasma, além de retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, ribossomos e mitocôndrias (Fig. 1E-F).

Após 24 h da infecção os agranulócitos apresentaram projeções citoplasmáticas e maior desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso e dos vacúolos, além de mitocôndrias bem desenvolvidas (Fig. 2A-B). Já os hialinócitos não apresentaram alterações ultraestruturais significativas em relação aos animais do grupo controle para o mesmo período de avaliação (Fig. 2C-D). Entretanto, os granulócitos apresentaram aumento no volume do núcleo, projeções citoplasmáticas maiores, grânulos citoplasmáticos menores e mais numerosos, além de várias vesículas fagocíticas (Fig. 2E-F).

Nos animais analisados 48 h após a infecção verificou-se que os agranulócitos ainda apresentavam retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido e vacúolos maiores (Fig. 3A-B). Os hialinócitos mais uma vez não apresentaram alterações ultraestruturais (Fig. 3C-D). Com relação aos granulócitos não foram observados vesículas fagocíticas, porém, houve um aumento na quantidade de grânulos citoplasmáticos (Fig. 3E-F).

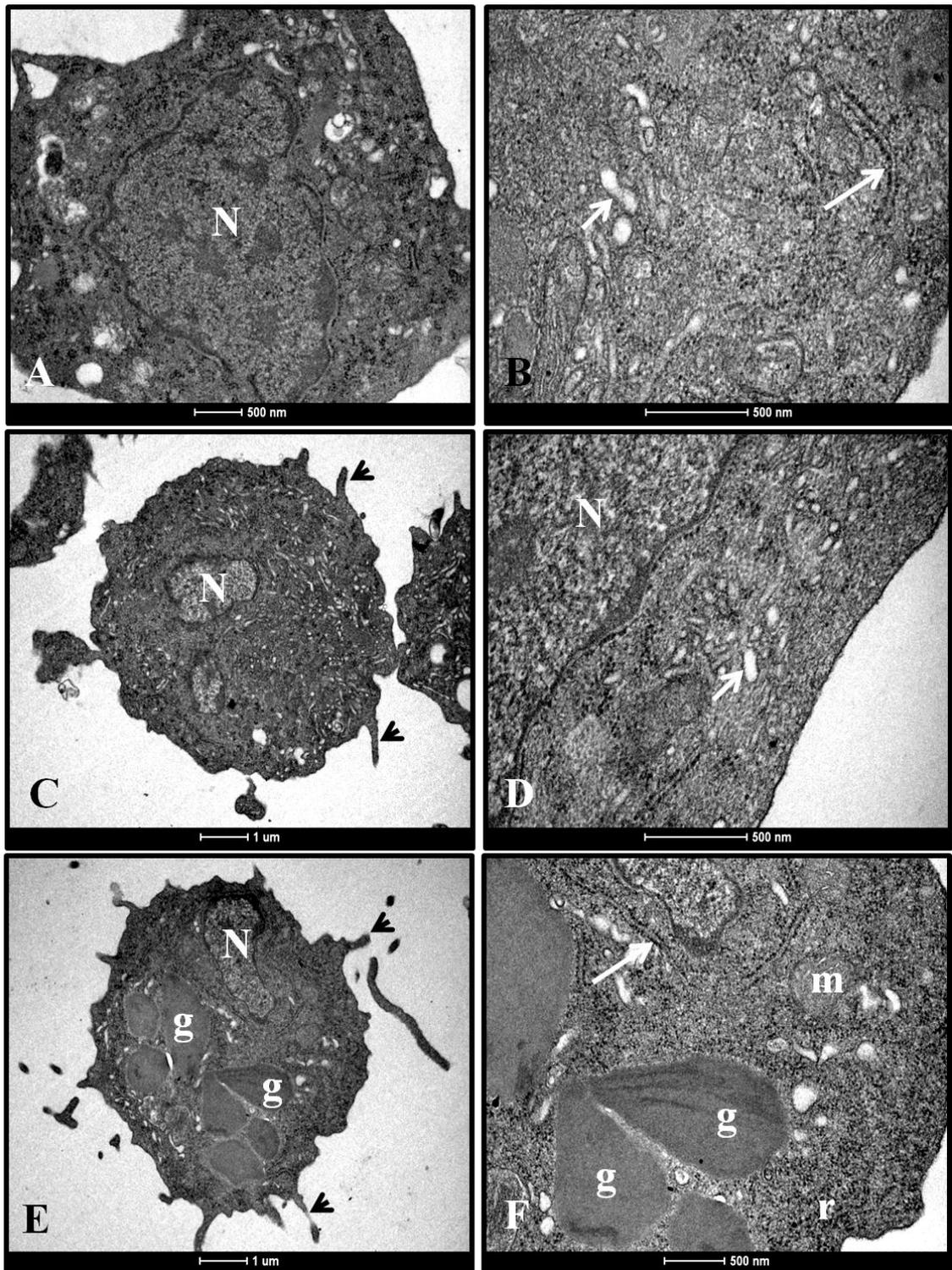


Figura 1. Eletromicrografia dos hemócitos de *P. lineata* do grupo controle. (A-B) Agranulócito; (C-D) Hialinócito e (D-E) Granulócito. (N - núcleo; seta longa - retículo endoplasmático rugoso; seta curta - vacúolos; m - mitocôndria; g - grânulos; ponta de seta – prolongamentos).

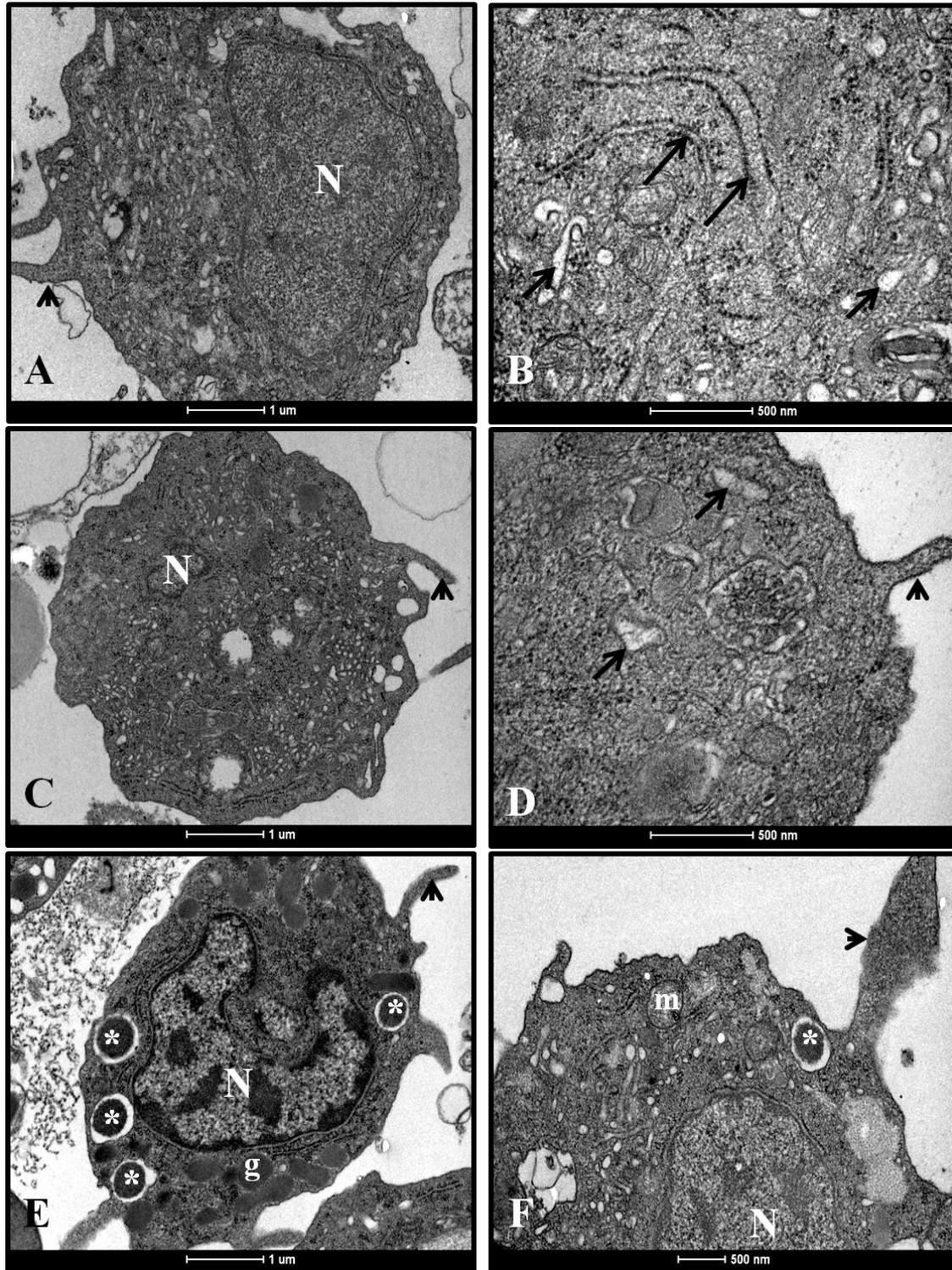


Figura 2. Eletromicrografia dos hemócitos de *P. lineata* 24 h pós-infecção pelo *S. mansoni*. (A-B) Agranulócito; (C-D) Hialinócito e (D-E) Granulócito. (N - núcleo; seta longa - retículo endoplasmático rugoso; seta curta - vacúolos; m - mitocôndria; g - grânulos; ponta de seta - prolongamentos; asteriscos - vesículas fagocíticas).

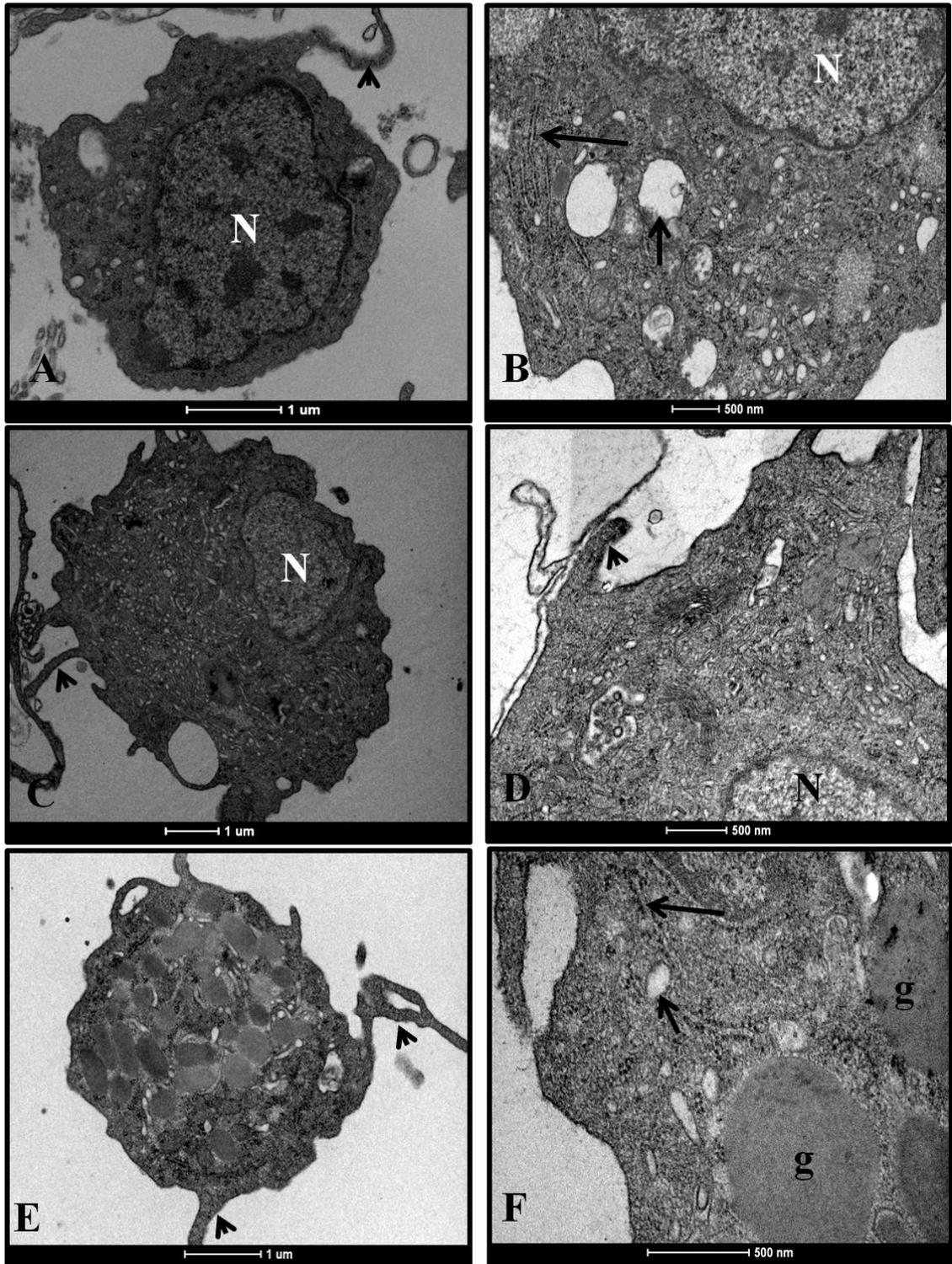


Figura 3. Eletromicrografia dos hemócitos de *P. lineata* 48 h pós-infecção pelo *S. mansoni*. (A-B) Agranulócito; (C-D) Hialinócito e (D-E) Granulócito. (N - núcleo; seta longa - retículo endoplasmático rugoso; seta curta - vacúolos; m - mitocôndria; g - grânulos; ponta de seta – prolongamentos).

4. DISCUSSÃO

Sabe-se que os hemócitos são as células responsáveis pelo sistema imune dos gastrópodes e que desempenham papel fundamental para determinar a susceptibilidade ou resistência do caramujo a uma infecção (Souza et al. 1995, Yoshino et al. 2001, Martins-Souza et al. 2003, Donaghy et al. 2010). A caracterização destas células é bastante explorada pelas suas características morfológicas, bioquímicas e ultraestruturais em espécies do gênero *Biomphalaria* (Bezerra et al. 1997; Johnston & Yoshino 2001), destacando as espécies de *B. glabrata* e *B. tenagophila*, e também outras espécies de moluscos bivalves (Cheng 1981, Rasmussen et al. 1985, Hinsch & Hunte 1990, Pipe 1990, Cajaraville & Pal 1995). Assim, pela primeira vez na literatura descrevemos ultraestruturalmente os hemócitos do caramujo *P. lineata*, expostos e não expostos ao *S. mansoni*.

Nossos resultados sugerem a presença de três tipos de células na hemolinfa de *P. lineata*: agranulócitos, hialinócitos e granulócitos. As características ultraestruturais dessas células nos caramujos não infectados foram semelhantes às descritas na literatura para *B. glabrata*, *B. straminea* e *P. canaliculata* (Cavalcanti et al. 2012, Cueto et al. 2015), sugerindo uma semelhança entre os gêneros *Pomacea* e *Biomphalaria*. Entretanto, nos caramujos infectados verificaram-se alterações ultraestruturais apenas nos agranulócitos e granulócitos.

As reações celulares à infecção por helmintos são consideradas como um mecanismo de resistência no sistema hospedeiro-parasita (Loker 2010). Assim, a estrutura dos hemócitos e as peculiaridades da atividade helmincítica são ferramentas úteis para caracterizar o sistema imunológico dos caramujos e definir seus mecanismos de resistência ao parasita. Dessa forma, o maior desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso e dos vacúolos nos agranulócitos e granulócitos pode estar associado ao aumento da síntese de peptídeos microbianos e produção de radicais tóxicos (Adema et al. 1997, Mitta et al. 2000a,b, Sapp & Loker 2000a,b, Iijima et al. 2003, Martin et al. 2007). Essas mesmas alterações também foram observadas nessas células em um estudo ultraestrutural da interação, *in vitro*, entre os hemócitos de *B. glabrata* e miracídios do *S. mansoni* (Araque et al. 2003).

O maior desenvolvimento das projeções citoplasmáticas provavelmente ocorre para envolver o miracídio correspondendo ao estágio inicial do encapsulamento observado classicamente em tecidos de moluscos infectados (Sapp & Loker 2000a,b). Entretanto, devemos mencionar que esses prolongamentos só foram observados nos agranulócitos após infecção, o que parece indicar que essas células seriam uma subpopulação de granulócitos hemicíticos tipo II (Delgado et al. 2001), pois alterações morfológicas nos granulócitos

durante a incubação revelaram sua natureza polimórfica o que provavelmente representaram várias fases na diferenciação (Ataev et al. 2016).

Em nosso estudo os hialinócitos apresentaram projeções citoplasmáticas independentemente da infecção, porém não apresentaram alterações ultraestruturais significativas. Isso poderia ser explicado pelo fato dessas células, além de apresentarem alta capacidade para se espalhar e aderir a substratos (Ataev et al. 2016), são consideradas uma condição proliferativa após vários estágios de amadurecimento dos granulócitos (Mix 1976) ou como células-tronco (blastocitos) devido à sua morfologia e imuno-reatividade com o anticorpo anti-humano CD34, que identifica células hematopoiéticas em mamíferos (Cima et al. 2000, Travers et al. 2008, Donaghy et al. 2010).

A presença de grânulos eletroluscentes nos granulócitos vai de encontro ao relatado na literatura para outras espécies de caramujo, ou seja, presença de grânulos eletrodensos (Martin et al. 2007, Travers et al. 2008, Donaghy et al. 2010, Di et al. 2011, Cavalcanti et al. 2012). No entanto, Shozawa e Suto (1990) relataram a presença de grânulos eletroluscentes e eletrodensos nos granulócitos de *P. canaliculata*, o que podemos supor ser uma característica peculiar do gênero. A presença de vacúolos fagocíticos nessas células 24 h pós-infecção pode ser devido a sua capacidade de se espalhar pelo substrato e aderir a outras células, além de possuir maior atividade fagocítica e oxidativa (Sunila & LaBanca 2003, Goedken et al. 2005), confirmando seu papel principal no processo de encapsular e destruir corpos estranhos (Van der Knaap & Loker 1990, Loker 2010), pois 48 h pós-infecção esses vacúolos não foram observados.

5. CONCLUSÃO

Os hemócitos de *P. lineata* apresentam semelhanças ultraestruturais a outras espécies de gastrópodos, porém quando desafiados por miracídios desencadeiam reações ultraestruturais apenas nos agranulócitos e granulócitos, sendo mais efetiva neste último tipo, 24 h pós-exposição. Isto sugere um investimento maior da imunidade celular em *P. lineata* nas primeiras 24 h da infecção, o que pode conferir a esta espécie uma maior resistência ao platelminto.

6. REFERÊNCIAS

- Adema C.M., Hertel L.A., Miller R.D. & Locker E.S. 1997. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:8691-8696.
- Araque W., Barrios E.E., Rodríguez P., Delgado V.S. & Finol, H.J. 2003. Ultrastructural study of the in vitro interaction between *Biomphalaria glabrata* hemocytes and *Schistosoma mansoni*. miracidia *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(7):905-908.
- Ataev G.L., Prokhorova E.E., Kudryavtsev I.V. & Polevshchikov A.V. 2016. The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata). *I. S. J.*13:164-171.
- Bezerra F.S.M., Coelho P.M,Z., Chaves M.M., Martins R.L. & Nogueira-Machado J.A. 1999. Comparative study on the effect of cyclic nucleotides related to the function of *Biomphalaria glabrata* hemocytes and human granulocytes. *Acta Tropic.*72:275-280.
- Bezerra F.S.M, Nogueira-Machado J.A., Chaves M.M., Martins R.L. & Coelho P.M.Z. 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.* 39:197-201.
- Cajaraville M.P. & Pal S.G. 1995. Morphofunctional study of the hemocytes of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis* with emphasis on the endolysosomal compartment. *Cell. Struct. Funct.* 20:355- 367.
- Cavalcanti M.G., Filho F.C., Mendonça A.M., Duarte G.R., Barbosa C.C., Castro C.M., Alves L.C. & Brayner F.A. 2012. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. *Micron.*43:285-291.
- Cerenius L. & Söderhäll K. 2013. Variable immune molecules in invertebrates. *J. Exp. Biol.*216(23):4313-4319.

Cheng T.C. 1981. Bivalves. In: Ratcliffe N.A., Rowley A.F. (Eds.), *Invertebrate Blood Cells*. New York Academic Press, p. 233-300.

Cima F., Matozzo V., Marin M.G. & Ballarin L. 2000. Haemocytes of the clam *Tapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): morphofunctional characterisation. *Fish and Shellfish Immunol.*10: 677-693.

Cimerman B. & Cimerman S. 2005. *Parasitologia Humana e seus fundamentos gerais*. 2ª ed. Atheneu, São Paulo, p.212-221.

Coler R.A., Coler R.R., Felizardo E.K.G. & Watanabe T. 2005. Applying Weight Gain in *Pomacea lineata* (SPIX 1824) (Mollusca: Prosobranchia) as a Measure of Herbicide Toxicity. *Braz. J. Biol.* 65(4):617-623.

Cueto J.A., Rodriguez C., Vega I.A. & Castro-Vazquez A. 2015. Immune Defenses of the Invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Phagocytic Hemocytes in the Circulation and the Kidney. *Plos one* 10 (4): e0123964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123964>

Delgado V., Barrios E.E., Bujanda A. & Araque W. 2001. Surface morphology and characteristics of hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Planorbidae) from two geographic sources. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 43:114-118.

Di G.L., Zhang Z.X., Ke C.H., Guo J.R., Xue M., Ni J.B. & Wang D.X. 2011. Morphological characterization of the haemocytes of the ivory snail, *Babylonia areolata* (Neogastropoda: Buccinidae). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 91(7):1489-1497.

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.

- Faulk W.P., Lim K.H., Jeong H., Heyneman D. & Price D. 1973. An approach to the study of immunity in invertebrates. *In*: Braun, W.; & Ungar, J. (Eds). *Non-Specific Factors Influencing Host Resistance*. Karger, Basel. p. 24-32.
- Ferreira M.U., Foronda A.S. & Schumaker T.T.S. 2003. Fundamentos biológicos da parasitologia humana. 1 ed. Manole Ltda. São Paulo, p.125-126.
- Goedken M., Morsey B., Sunila I., Dungan C. & De Guise S. 2005. The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.*24:177-183.
- González-Santoyo I. & Córdoba-Aguilar A. 2012. Phenoloxidase: a key component of the insect immune. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142 (1):1-16.
- Guimarães C.T. 1981. Algumas observações de campo sobre Biologia e ecologia de *Pomacea haustrum* (Reeve 1856) (Mollusca, pilídeo). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 4(76):343-351.
- Hinsch G.W. & Hunte M. 1990. Ultrastructure of phagocytosis by hemocytes of the American oyster. *Pathol. Mar. Sci.* 479-488.
- Hohl H.R. 1965. Nature and development of membrane systems in food vacuoles of cellular slime molds predatory upon bacteria. *J. Bacteriol.* 90: 755 -765.
- Iijima R., Kisugi J. & Yamazaki M. 2003. l-Amino acid oxidase activity of an antineoplastic factor of a marine mollusk and its relationship to cytotoxicity. *Dev. Comp. Immunol.*27:505-512.
- Jeong K.H., Lie K.J. & HeyneMan, D. 1983. The ultrastructure of the amebocyte producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Dev. Comp. Immunol.* 7(2):217-228.
- 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.* 87:786-793.

Loker E.S., Bayne C.J., Bukley P.M. & Kruse K.T. 1982. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 68:84-94.

Loker E.S. 2010. Gastropod immunobiology. In: Söderhäll, K. (ed.), *Invertebrate Immunity*, Landes Bioscience and Springer Science Business Media, p. 17-43.

Marques M.M. & Barbosa F. 2001. Na fauna do fundo, o retrato da degradação. *Ciência hoje.* 30(175):72-75.

Martin G.G., Oakes C.T., Tousignant H.R., Crabtree H. & Yamakawa R. 2007. Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica*. *J. Molluscan Stud.* 73:355-365.

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 glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol.* 136:67-76.

Melo, L.E.L. Coler R.A., Watanabe T. & Batalla J.F. 2000. Developing the gastropod *Pomacea lineata* (Spix, 1827) as a toxicity test organism. *Hydrobiol.* 429: 73-78.

Mitta G., Vandenbulcke F., Noël T., Romestand B., Beauvillain J.C., Salzet M. & Roch P. 2000a. Differential distribution and defense involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell. Sci.* 113:2759-2769.

Mitta G., Vandenbulcke F. & Roch P. 2000b. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS J.* 486:185-190.

Mix M.C. 1976. A general model for leukocyte cell renewal in bivalve mollusks. *Mar. Fish. Rev. US Natl. Mar. Fish. Serv.* 38:37- 41.

- Pipe R.K. 1990. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Cell Tiss. Res. 261:261-268.
- Rasmussen L.P.D., E. Hage & Karlog O. 1985. An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis* J. Invertebr. Pathol., 45(2):158-167.
- Rifkin E.T., Cheng T.C. & Hohl H.R. 1969. An electron microscope study of the constituents of encapsulating cysts in *Crassostrea virginica* formed in response to *Tylocephalum metacestodes*. J. Invertebr. Pathol. 14: 211-226.
- Santos M.A.V. & Diniz J.A.P. 2009. Aspectos ultraestruturais de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* Say (1818) (Gastropoda: Planorbidae) analisados sob microscopia eletrônica de transmissão. Acta Amaz. 39(3): 707-712.
- Sapp K.K. & Loker E.S. 2000a. Mechanism underlying digenean-snail specificity: role of miracidial attachment and host plasma factors. J Parasitol. 86:1012-1019.
- Sapp K.K. & Loker E.S. 2000b. A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae. J Parasitology. 86(5):1020-1029.
- Shozawa A. & Suto C. 1990. Hemocytes of *Pomacea canaliculata*: I. reversible aggregation induced by Ca^{2+} . Dev.Comp. Immunol.14:175-184.
- Souza C.P., Cunha R.C.P. & Andrade Z.A. 1995. Development of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria tenagophila*, *Biomphalaria straminea* and *Biomphalaria glabrata*. Rev. Inst. Med. Trop. 37:201-206.
- Sunila I. & LaBanca J. 2003. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. Dis. Aquat. Organ. 56: 163-170.
- Thiengo, S. 1995. Família Pilidae Connoly, 1927 (Ampulariidae Gray, 1824) , p. 50-69. In: BARBOSA, FS (org.) Tóp. Malacol. Méd. Fiocruz.

Travers M.A., Mirella Da Silva P., Le Goïc 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.* 24:400-411.

Van Der Knaap W.P. & Loker E.S. 1990. Immune mechanisms in trematode snail interactions. *Parasitol. Today.* 6:175-182.

Vargas-Albores F. & Barracco M.A. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos, com énfasis em Pectínidos. *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica. Ciencia y Acuicultura.* 7: 127-146.

Wang W., Li M., Wang L., Chen H., Liu Z., Jia Z., Qiu L. & Song L. 2017. The granulocytes are the main immunocompetent hemocytes in *Crassostrea gigas*. *Dev. Comp. Immunol.* 67: 221-228.

Yoshino T.P., Boyle J.P. & Humphries J.E., 2001. Receptor-ligand interactions and cellular signalling at the host-parasite interface. *Parasitol.* 123:143-157.