

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

**Cultura de células de tecidos de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e
Biomphalaria glabrata (Say, 1918) como ferramenta no estudo das
interações entre hospedeiro invertebrado e *Schistosoma mansoni* (Sambom,
1907)**

por

Aristeu Silva Neto

Belo Horizonte

2016

TESE DCS-CPqRR

A. SILVA NETO

2016

Aristeu Silva Neto

Cultura de células de tecidos de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria glabrata* (Say, 1918) como ferramenta no estudo das interações entre hospedeiro invertebrado e *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Coorientação: Dra. Luciana Maria Silva

Belo Horizonte

2016

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

S586c Silva Neto, Aristeu.
2016

Cultura de células de tecidos de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria glabrata* (Say, 1918) como ferramenta no estudo das interações entre hospedeiro invertebrado e *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907) / Aristeu Silva Neto. – Belo Horizonte, 2016.

XII, 79 f.: il.; 210 x 297mm.
Bibliografia: f.: 66 - 78

Tese (Doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansoni/transmissão 2. . *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. Interações Hospedeiro-Parasita/genética I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação). III. Silva, Luciana Maria (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

Aristeu Silva Neto

Cultura de células de tecidos de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) e *Biomphalaria glabrata* (Say, 1918) como ferramenta no estudo das interações entre hospedeiro invertebrado e *Schistosoma mansoni* (Sambom, 1907)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Doenças Infeciosas e Parasitárias.

Orientação: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho

Coorientação: Dra. Luciana Maria Silva

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente

Profa. Dra. Andreia Teixeira de Carvaho (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Profa. Dra. Deborah Aparecida Negrão-Côrrea (UFMG) Titular

Profa. Dra. Florence Mara Rosa (UFJF) Titular

Profa. Dra. Roberta Lima Caldeira (CPqRR/FIOCRUZ) Titular

Profa. Dra. Marina de Moraes Mourão (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 31/08/2016

*“Queremos buscar a verdade, não importa aonde ela nos leve.
Mas para encontrá-la, precisaremos tanto de imaginação quanto de ceticismo. Não
teremos medo de fazer especulações, mas teremos o cuidado de distinguir a especulação do
fato.”*

Carl Sagam

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Paulo Marcos (CPqRR) e Dra. Luciana Silva (FUNED) e à Dra. Consuelo Fortes-Dias (FUNED), pela colaboração, suporte, paciência, incentivo e dedicação que foram fundamentais no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao agora biólogo Kaíque Ferreira de Souza, cujas contribuições durante sua iniciação científica foram primordiais para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos e colaboradores Fábio Ribeiro, Dr. Hélio Hideo Babá, Dr. Wander Jeremias, Dra. Ana Carolina Mattos, Dra. Flávia Couto e Rafael Pimenta (CPqRR), Dr. Fábio Brayner e Dr. Luiz Carlos (CPqAM).

Aos colaboradores João Batista dos Santos e Dr. Engles Maciel (Sítio Santa Inês).

Aos apoios técnicos de grande ajuda nesta tese, em especial à Ana do Carmo Valentim, Rebeca Lima, Paula Ortolani, Lutiana Amaral e Patrícia Cota (SEA-FUNED), Josiane, Heloísa e Letícia (SBC-FUNED), Áureo, Sueleny, Dra. Neuza, Dra. Rafaella e Dr. Naftale (Lesq-CPqRR), à Dra. Liana e toda a equipe do moluscário Lobato Paraense.

Aos estudantes Gardênia, Vanessa, Milene, Cristhiane, Marcela, Gabriel, Bryan e demais bolsistas e estagiários do Laboratório de Biologia Celular e Laboratório de Enzimologia Aplicada da Fundação Ezequiel Dias, e do Laboratório de Esquistossomose da Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

A esquistossomose mansoni é uma doença endêmica no Brasil, causada pelo trematódeo digeneico *Schistosoma mansoni*. Em seu ciclo de vida, o parasito tem uma passagem obrigatória por caramujos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiros invertebrados que ocupam papel central no processo de transmissão da doença. O estudo da interação entre parasito-hospedeiro invertebrado vem se desenvolvendo ao longo dos anos, entretanto sem solucionar a carência de modelos *in vitro* que simulem a infecção. As células Bge, modelo estabelecido para se estudar a interação, não estão mais disponíveis nos bancos de células comerciais, restando apenas modelos celulares de curta duração. Com o objetivo de explorar novas ferramentas no estudo das interações parasito-hospedeiro invertebrado em esquistossomose, realizamos o presente estudo que estabeleceu, caracterizou e explorou a funcionalidade de culturas celulares primárias de espécimes adultos de *Biomphalaria* como modelos na interação *in vitro* com esporocistos de *S. mansoni*. Foram utilizadas duas espécies de caramujos, *Biomphalaria glabrata*, como modelo susceptível à infecção por *S. mansoni*, e *Biomphalaria tenagophila* Taim, como modelo de resistência absoluta à infecção por este mesmo parasito. Baseados em características ultraestruturais das células em culturas primárias derivadas de diversos tecidos, selecionamos as células derivadas da glândula digestiva e do tubo renal sacular para os ensaios de interação com o parasito. As culturas celulares derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* Taim foram capazes de matar, *in vitro*, esporocistos primários de *S. mansoni*. As culturas primárias derivadas do tubo renal sacular dessa mesma linhagem, e as culturas homólogas de *B. glabrata*, dos dois tecidos, não apresentaram esta atividade letal em ensaios *in vitro*. Para acompanhamento de possíveis alterações moleculares nas culturas celulares após interação com o parasito, utilizamos a expressão do transcrito *aif*, estimulador da atividade e proliferação de hemócitos, como indicador. Após a interação, a expressão de *aif* foi aumentada, somente nas células derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* Taim, corroborando os resultados anteriores. A análise ultraestrutural das células das culturas testadas mostrou que, dentre as células derivadas da glândula digestiva, há um perfil de hemócitos tipo-granulócitos diferentes dos hemócitos tipo-granulócitos circulantes. O perfil ultraestrutural de células derivadas do tubo renal sacular apresentaram semelhança com o obtido, anteriormente, para células do órgão produtor de hemócitos (APO). No entanto, os testes de atividade sugerem que, apesar das semelhanças, tratam-se de culturas distintas. Para a obtenção de modelos não senescentes, foi realizada a tentativa de imortalização das culturas de células derivadas do tubo renal sacular de *B. tenagophila* Taim, através da

introdução do gene da telomerase transcriptase reversa. Entretanto as tentativas de imortalização dos modelos analisados foram ineficazes, com dificuldades na obtenção de culturas livres de contaminantes biológicos e ausência de proliferação celular. O presente trabalho mostra, pela primeira vez, a ação letal de hemócitos presentes na glândula digestiva de caramujos *B. tenagophila* linhagem Taim contra esporocistos de *S. mansoni*. A prioridade para continuação da linha de pesquisas aponta para novas tentativas de imortalização visando a obtenção de uma nova ferramenta para o estudo da interação *Biomphalaria/S. mansoni*.

Palavras-chave: Esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria*; Interações parasito-hospedeiro; cultura de células de invertebrados.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an endemic disease in Brazil caused by *Schistosoma mansoni*, a digenetic trematode. In its life cycle, the parasite has an obligatory passage through invertebrate *Biomphalaria* hosts, which play a central role in the transmission of the disease. Although a number of studies have been developed on the invertebrate host-parasite interaction, *in vitro* – cells (standing for *Biomphalaria glabrata* embryonic cells), in the past. However, those cells are no longer commercially available and short-time cell models have emerged as alternatives. Aiming at exploring such models in schistosomiasis, in the present study we have established and characterized primary cell cultures from different organs and tissues of *Biomphalaria*. Based on ultrastructural features of the cells in culture, we focused the study on digestive gland and saccular kidney cells. Although the cells from saccular kidney cultures resembled the cells from the hemocyte producing organ (APO), previously described, activity tests have suggested that these cultures are not the same. Next, we have investigated the ability of the selected cultured cells to interact with *S. mansoni* sporocysts using *in vitro* assays. *B. glabrata* and *B. tenagophila* Taim have been used as models of susceptibility and absolute resistance against the parasite infection, respectively. Cells from the digestive gland of *B. tenagophila* Taim have been able to fully eliminate primary sporocysts of *S. mansoni in vitro*. Homolog cultures from *B. glabrata* have been apparently ineffective, as well as cells derived from the saccular kidney of both species. The present study has shown, for the first time, that hemocytes from digestive gland of *Biomphalaria tenagophila* Taim may play a role in the resistance to *S. mansoni* infection. Detailed ultrastructural analyses of these cells have shown a granulocyte-like profile. Possible molecular changes have been monitored by the expression of *aif*–a gene known to stimulate hemocyte activity and proliferation–after the hemocyte-sporocyst interaction. *Aif* expression has increased only in digestive gland cells of *B. tenagophila* Taim, which supports our previous results. Immortalization attempts have been carried out by introducing the telomerase reverse transcriptase gene with no success. The present study has open new possibilities of use of an *in vitro* model to investigate invertebrate host-parasite interactions in schistosomiasis.

Keywords: Schistosomiasis; *Schistosoma mansoni*; *Biomphalaria*; Host-parasite interactions; invertebrate cell cultures.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	14
Figura 2 - Hemócitos de <i>B. glabrata</i> em microscopia óptica (MO) e em interface de contraste diferencial (DIC).....	23
Figura 3 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de hemócitos de <i>B. glabrata</i>	23
Figura 4 - Dissecção parcial pelo lado direito de caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i>	25
Figura 5 - Cultura de ovotesti	26
Figura 6 - Órgão produtor de hemócitos (APO).....	27
Figura 7 - Cultura primária de células da região do APO de <i>B. glabrata</i>	29
Figura 8 – Células <i>Bge</i>	31
Figura 9 - Dissecção de caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i>	35
Figura 10 - Células derivadas do tubo renal sacular (SK) e glândula digestiva (DG) de <i>Biomphalaria</i> após 36 horas em cultivo primário.	43
Figura 11 – Ultraestrutura de célula em cultura primária derivada da glândula digestiva de <i>B. tenagophila</i> Taim.....	44
Figura 12 - Interação de células derivadas do tubo renal sacular de <i>Biomphalaria</i> e esporocistos de <i>S. mansoni</i> transformados <i>in vitro</i>	45
Figura 13 - Interação de células derivadas da glândula digestiva de <i>Biomphalaria</i> e esporocistos de <i>S. mansoni</i> transformados <i>in vitro</i>	46
Figura 14 - Interação de células derivadas da glândula digestiva de <i>B. tenagophila</i> Taim e esporocistos de <i>S. mansoni</i> transformados <i>in vitro</i> , em meio livre de soro fetal bovino.	47
Figura 15 – Interações entre esporocistos transformados <i>in vitro</i> culturas celulares primárias.	48
Figure 16 - Viabilidade de células derivadas do tubo renal sacular de <i>B. tenagophila</i> após 36 horas de cultivo.....	49
Figura 17 - Viabilidade de células derivadas do tubo renal sacular de <i>B. tenagophila</i> após 192 horas de cultivo.....	50
Figura 18 - Células derivadas do tubo renal sacular de <i>B. tenagophila</i> Taim em cultura primária.....	51
Figura 19 - Digestão enzimática do plasmídeo pGRN 145	52
Figure 20 - Acompanhamento da transformação de células cultivadas derivadas do tubo renal sacular de <i>B. tenagophila</i>	53
Figura 21 - Amplificação de possíveis transcritos de <i>B. tenagophila</i> Taim e <i>B. glabrata</i> por PCR convencional.	54
Figura 22 – Curva padrão de eficiência do alvo mioglobina em qRT-PCR de <i>B. tenagophila</i> Taim.....	54
Figura 23 - Curva padrão da eficiência do alvo <i>aif</i> em qRT-PCR de <i>B. tenagophila</i> Taim.....	55
Figure 24 – Expressão natural de <i>aif</i>	55
Figure 25 – Expressão relativa de <i>aif</i> em células de culturas primárias desfiadas com esporocistos transformados <i>in vitro</i>	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIF – *Allograft inflammatory factor*

APO – Órgão Produtor de Hemócitos – “*Amebocyte Producing Organ*”

cdNA – Fita complementar de ácido desoxirribonucleico

CT – Ciclo de *Threshold*

DG – Glândula digestiva – “*Digestive Gland*”

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EcoRI – Enzima de restrição isolada da bactéria *Escherichia coli*

FREP – Proteína Relacionada à Fibrinogênio – “*Fibrinogen Related Protein*”

LB – Meio de cultura Luria-Bertani

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PCR – Reação em cadeia da polimerase – “*Polimerase Chain Reaction*”

qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase reversa quantitativa – “*Quantitative Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*”

RNA – Ácido ribonucleico

SSSS – Solução Salina Estéril para Caramujos – “*Snail Saline Sterile Solution*”

SK – Tubo Renal Sacular – “*Sacular Kidney*”

TM-TPS – Tetrametil-tetrapalmitilespermina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSONI	13
1.2 INTERAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO INVERTEBRADO	17
1.3 SISTEMA INTERNO DE DEFESA DE <i>Biomphalaria</i>	19
1.4 A PRODUÇÃO DE HEMÓCITOS EM <i>Biomphalaria</i>	24
1.5 DIFICULDADES NA CULTURA DE CÉLULAS DE MOLUSCOS	30
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3 METODOLOGIA	34
3.1 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CARAMUJOS <i>Biomphalaria</i> NO LABORATÓRIO	34
3.2 TRATAMENTO DE CARAMUJOS <i>B. tenagophila</i> COM METRONIDAZOL	34
3.3 CULTURA CELULAR PRIMÁRIA DE TECIDOS DE <i>Biomphalaria</i>	35
3.4 INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS DE CULTURA PRIMÁRIA DE <i>B. tenagophila</i> E <i>B. glabrata</i> E ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS DE <i>S. mansoni</i>	36
3.5 ENSAIOS DE ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM CELULAR IMORTAL DE <i>B. tenagophila</i>	37
3.5.1 Imortalização espontânea	37
3.5.2.1 Obtenção de plasmídeo contendo gene da Telomerase	37
3.5.2.2 Transformação de células em cultura com plasmídeo pGRN145	38
3.6 CARACTERIZAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS EM CULTURA DE <i>B. tenagophila</i>	39
3.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE CARAMUJOS <i>Biomphalaria</i> CONTRA <i>S. mansoni</i>	39
3.8.1 Extração de RNA total	40
3.8.2 Iniciadores para q-PCR	40
3.8.3 Teste dos iniciadores sintetizados através de PCR convencional	41
3.8.4 Ensaio de qRT-PCR	41
4 RESULTADOS	43
4.1 ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS DE <i>Biomphalaria</i>	43
4.3 EXTENSÃO DO TEMPO DE CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DERIVADAS DO TUBO RENAL SACULAR E GLÂNDULA DIGESTIVA DE <i>B. tenagophila</i>	49
4.4 IMORTALIZAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DO TUBO RENAL SACULAR DE <i>B. tenagophila</i> COM GENE DA TELOMERASE	51
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS EM CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS	53
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICES	79
APÊNDICE 1 – Artigo publicado no periódico <i>Micron</i> (2014).	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematódeos digeneicos do gênero *Schistosoma* Weinland, 1858. Estima-se que cerca de 258 milhões de pessoas em todo mundo necessitem de tratamento para a doença, sendo que 61,6 milhões de pessoas foram reportadas por terem sido tratadas para esquistossomose no ano de 2014. As principais formas de contágio são através do trabalho rural em áreas alagadas, recreação e lazer em águas contaminadas e a ausência de saneamento básico em regiões subdesenvolvidas (OMS, 2016).

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

No Brasil, a esquistossomose mansoni, descrita pela primeira vez por Pirajá da Silva em 1908, é endêmica e considerada um grave problema de saúde pública. A infecção acontece através da penetração ativa das formas infectantes do *S. mansoni* pela pele e mucosas quando o homem entra em contato com águas contaminadas. O ciclo de transmissão da doença ocorre quando hospedeiros vertebrados infectados, principalmente o homem, eliminam os ovos do parasita pelas fezes, que alcançam o ambiente aquático dos caramujos *Biomphalaria*, hospedeiros invertebrados. Neste ambiente os miracídios do *S. mansoni* infectam os moluscos que posteriormente liberarão larvas infectantes para os mamíferos, as cercárias (BRASIL, 2008; COELHO et al, 2008, LENZI et al, 2008).

Os miracídios, após a adesão e penetração, continuam um processo de perda de estruturas, com desaparecimento do epitélio ciliado, desaparecimento de musculatura subepitelial e sistema nervoso, num período de até 48 horas; com o sistema nervoso podendo perdurar mais alguns dias. Os miracídios transformam-se em estruturas de paredes cuticulares contendo as células germinativas, e passam a ser chamados de esporocistos primários, localizados na massa cefalopodal (COELHO et al, 2008).

A larva apresenta movimentos ameboides que diminuem com o tempo até a sua completa imobilidade. As células germinativas, entre 50 a 100, iniciam intenso processo de multiplicação que faz com que o esporocisto primário dobre de tamanho após 72 horas. Após 14 dias da penetração, as células germinativas dos esporocistos primários geram os esporocistos secundários, quando em condições ideais. No 18º dia após a penetração, os esporocistos secundários migram para os espaços intertubulares da glândula digestiva, em um processo que dura cerca de três dias, onde sofrem modificações que completam seu desenvolvimento e possibilitam que suas células germinativas originem as cercárias. A completa transformação em cercárias e sua liberação para o meio aquático ocorrem no período entre o 27º e 30º dia após a penetração, nas condições de luminosidade e temperatura adequada (28°C). Cada miracídio pode gerar de 100 a 300 mil cercárias (OLIVER e MAO, 1949; PAN, 1965; KECHEMIR e COMBES, 1988).

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

hospedeiro, sendo tais reações importantes para a patogenia da esquistossomose mansoni (LENZI et al, 2008).

A doença clínica pode ser classificada em duas fases principais: a fase inicial aguda, dermatite cercariana e esquistossomose aguda, e fase crônica, intestinal hepatointestinal e hepatoesplênica. Na forma hepatoesplênica pode ocorrer rompimento de varizes esofagianas, que resultam muitas vezes em óbito do paciente. Com menos frequência podem aparecer complicações e outras formas da doença, como as formas neurológicas, que apresentam grande prejuízo para o paciente podendo gerar invalidez e até mesmo o óbito. Muitas das mortes por esquistossomose podem estar relacionadas às manifestações neurológicas, porém não há nenhum dado preciso de sua importância, uma vez que as complicações não são de notificação obrigatória (DRUMMOND et al, 2006).

Devido aos sintomas inespecíficos e inconstantes da esquistossomose mansoni, o diagnóstico só pode ser confirmado com a presença de ovos eliminados nas fezes ou por biópsia retal dos pacientes. Os métodos imunológicos baseados na pesquisa de anticorpos específicos ainda não permitem certeza quanto à especificidade da doença. Pode haver reações cruzadas com outros helmintos e não fornece o diagnóstico de cura parasitológica, uma vez que os pacientes continuam com resposta imunológica após cura quimioterápica. Novos métodos como a PCR e a pesquisa de antígenos circulantes se apresentam como promissores (COELHO et al, 2008; OMS, 2016).

O praziquantel é atualmente o medicamento indicado para o tratamento da doença, sendo efetivo para todas as espécies de esquistossomos, seguro e de baixo custo. Entretanto a cura parasitológica não resulta em resistência dos pacientes contra uma nova infecção, apesar de diminuir as chances desta evoluir para as formas mais graves da doença. O praziquantel tem sido usado para o controle da esquistossomose há mais de 20 anos em países como Arábia Saudita, Brasil, Camboja, China, Egito e Marrocos (OMS, 2016).

A prevenção e controle da esquistossomose baseiam-se no tratamento das pessoas infectadas em áreas endêmicas, controle dos vetores, melhoramento das condições de saneamento básico e educação em saúde (OMS, 2016).

1.2 INTERAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO INVERTEBRADO

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

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

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

mais suscetível do que outra (PARAENSE e CORREA, 1963a; PARAENSE e CORREA, 1963b).

Caramujos susceptíveis à infecção por *S. mansoni* podem, eventualmente, apresentar esporocistos mortos por seu sistema de defesa e esporocistos viáveis, em um mesmo espécime. Naturalmente, a infecção pode variar desde a destruição rápida do esporocisto, momentos após penetrar no molusco, até o desenvolvimento completo e a liberação de cercárias. Esse fato ocorre provavelmente porque há um padrão de compatibilidade entre parasita e hospedeiro, tendo em vista que há uma grande variedade genética de ambos os seres envolvidos, sendo o sucesso ou insucesso da infecção determinada pelo status de compatibilidade fenotípica entre molusco e trematódeo (THÉRON e COUSTAU, 2005; BAYNE, 2009).

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

Das espécies vetoras da esquistossomose mansoni no Brasil, considera-se *B. glabrata* como a mais suscetível, capaz de liberar maior número de cercarias após infecção, sendo apontada como a de maior importância epidemiológica, além de ser a espécie mais usada para estudos da interação *Biomphalaria/S. mansoni*. Outra espécie com grande potencial de transmissão é a *B. tenagophila*, que apresenta grande importância na transmissão da esquistossomose nas regiões Sul e Sudeste. Um fato bem comprovado em *B. tenagophila* é a variação do grau de susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni*, em função de sua localização geográfica, desde altamente suscetível até completamente resistente, como a linhagem *B. tenagophila* Taim. O caráter de resistência dessa linhagem já foi demonstrado ser dominante sobre a susceptibilidade, além de esta linhagem apresentar um marcador molecular único e dominante quando comparado com outras linhagens da espécie, evidenciando o potencial da utilização dessa linhagem no controle biológico da esquistossomose, sendo possível rastrear seu material genético após introdução no campo (COELHO, 1995; VIDIGAL et al, 2000;

ROSA et al, 2004; ROSA et al, 2005; FERNANDEZ, 2007; COELHO et al, 2008a; COELHO et al, 2008b).

Análises comparativas dos perfis diferenciais de expressão de genes de linhagens de *Biomphalaria*, expostos e não-expostos ao *S. mansoni*, demonstraram grande potencial para desvendar aspectos ainda não esclarecidos a respeito da susceptibilidade do molusco ao trematódeo. A expressão de diversos genes é potencializada após a estimulação de hemócitos com antígenos do parasita, em linhagens resistentes ao *S. mansoni*, sendo que o mesmo não ocorre nos moluscos susceptíveis. Alguns desses genes foram observados, dentro de uma mesma linhagem de caramujos, em alta-expressão em adultos resistentes e não-expressos nos juvenis e sub-adultos susceptíveis. Entretanto, tais estudos ainda são preliminares e meramente especulativos, uma vez que o conhecimento do perfil de expressão de um gene não implica em desvendar completamente sua função e sua importância para a relação *Biomphalaria/S. mansoni* (RAGHAVAN et al, 2003; LOCKYER et al, 2008).

1.3 SISTEMA INTERNO DE DEFESA DE *Biomphalaria*

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

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

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

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

Em um estudo recente, com uma série de 18 alvos, Larson et al, (2014) encontraram um padrão entre resistência e a expressão constitutiva elevada de alguns transcritos em hemócitos de caramujos *B. glabrata*. Um dos alvos com maior destaque neste estudo foi o gene *aif*, um fator de proliferação e migração celular, ativador de macrófagos e também de hemócitos de moluscos (ZHANG et al., 2013). Super-expresso, principalmente em hemócitos de linhagens resistentes, a maior taxa constitutiva de *aif* pode indicar uma maior ativação dos hemócitos nestes caramujos, aumentando não somente o número, mas também o comportamento dos hemócitos, facilitando a identificação e destruição do *S. mansoni* pelo sistema interno de defesa (LARSON et al, 2014).

Outro componente presente na hemolinfa e também relacionado ao fenótipo resistente são proteínas relacionadas à fibrinogênio (FREPs), com atividade de lectinas e que apresentam sequências similares às superfamílias de imunoglobulinas. A abundância dessas proteínas aumenta com o decorrer da infecção por patógenos digenéticos, promovendo a precipitação de proteínas do parasita (ADEMA et al, 1997; BAYNE, 2009).

A presença das FREPs em vertebrados e invertebrados, protostômios e deuterostômios, mostram que essa família de proteínas existe antes mesmo da divisão desses dois grupos. Proteínas de fibrinogênio, em vertebrados, estão associadas ao processo de coagulação plaquetária, algo inexistente em moluscos. Para os invertebrados, as FREPs estão associadas apenas a função de reconhecimento de estruturas não próprias, papel desempenhado por lectinas. A produção das FREPs é associada às células efectoras da defesa nos caramujos, no caso, hemócitos circulantes (ADEMA et al, 1997; BAYNE, 2009).

O desenvolvimento de patógenos digenéticos durante o curso de uma infecção intramolusco, independente do aumento de expressão das FREPs, mostrou uma tendência de dissociação da participação dessas proteínas no processo de resistência (ADEMA et al, 1997). No entanto, caramujos *B. glabrata* resistentes à *S. mansoni*, tratados com RNA interferente para os transcritos de FREP-3, uma proteína da família FREP, apresentam uma quebra em sua resistência, em cerca de 30% dos caramujos tratados, tornando-os susceptíveis à infecção. FREP-3 é capaz de reconhecer resíduos de α -D-galactose potencializando a ação de reconhecimento por parte dos hemócitos e aumentando a ação de fagocitose dessas células (HANINGTON et al, 2010).

Os fatores da hemolinfa são pouco eficazes em destruir os esporocistos sem a participação dos hemócitos, células circulantes que são os principais efetores da destruição do parasita pelo sistema interno de defesa do molusco, sendo capazes de migrar livremente de dentro para fora dos tecidos. Os hemócitos são capazes de realizar fagocitose e encapsulamento de patógenos, além de promover o fenômeno de explosão respiratória. Apesar da importância dos hemócitos, não se deve subestimar a importância dos fatores solúveis da hemolinfa, cujos fatores auxiliam a atuação dos hemócitos. Estudos realizados com caramujos resistentes e susceptíveis demonstraram que é possível aumentar a resistência de um caramujo suscetível contra *S. mansoni* apenas com a transferência da hemolinfa de caramujos resistentes (BAYNE et al, 1980a; BAYNE et al, 1980b; JEONG et al, 1983; GRANATH e YOSHINO, 1984; VAN DER KNAAP e LOKER, 1990; FRYER e BAYNE, 1996; PEREIRA et al, 2008; BAYNE, 2009).

As características morfológicas e bioquímicas dos hemócitos circulantes na hemolinfa do molusco permitem a classificação dessas células em mais de um tipo. Alguns autores sugerem sua classificação em duas populações distintas, a saber, hialinócitos e granulócitos. Os hialinócitos correspondem a 10% dos hemócitos circulantes, são células esféricas e

pequenas com um grande núcleo circundado por uma fina camada de citoplasma, não apresentando pseudópodes ou filapódios. Seu citoplasma é rico em ribossomos e mitocôndrias, apresentando um retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido e pequena quantidade de lisossomos. Os granulócitos, que representam 90% dos hemócitos circulantes, são células maiores e polimórficas, com rápida adesão a superfícies devido à alta capacidade de emitir pseudópodes. Apresentam citoplasma grande, contendo grânulos basofílicos, complexo de Golgi bem desenvolvido, densos aglomerados de lisossomos e mitocôndrias, com grande presença da enzima fosfatase ácida (HARRIS, 1975; LOVERDE et al, 1982; BARRACCO et al, 1993; BEZERRA et al, 1997; JOHNSTON e YOSHINO, 2001; MARTINS-SOUZA et al, 2003).

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

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

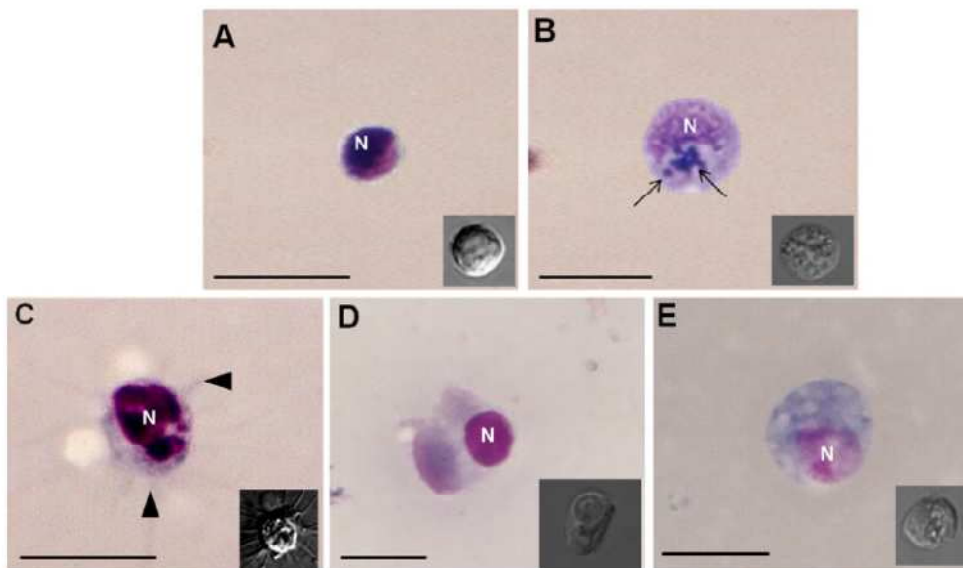


Figura 2 - Hemócitos de *B. glabrata* em microscopia óptica (MO) e em interface de contraste diferencial (DIC)

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

Hemocytes of *B. glabrata* (TEM)

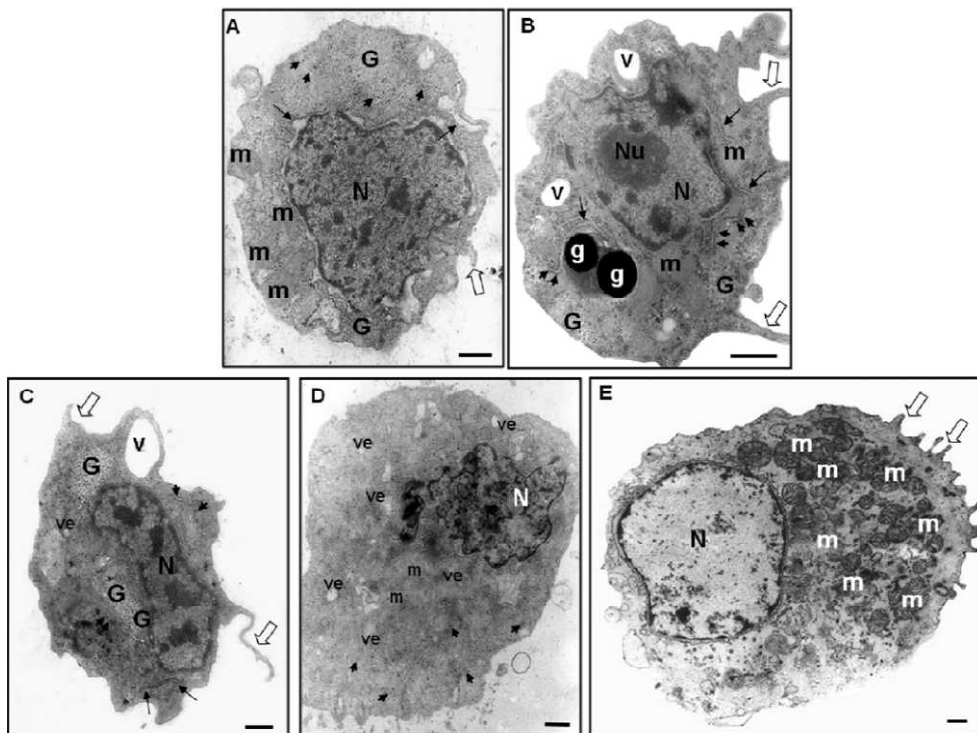


Figura 3 - Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de hemócitos de *B. glabrata*.

(A) célula tipo blástica apresentando perfil esférico e alta relação núcleo/células com um núcleo central de grande porte (N), citoplasma fino com ilhas de glicogênio (G) e ribossomos dispersos (cabeça de seta). Mitocôndrias (m) e filopódios (seta aberta) também estão

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

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

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

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

1.4 A PRODUÇÃO DE HEMÓCITOS EM *Biomphalaria*

Os hemócitos de *Biomphalaria* parecem ser originados de forma multicêntrica a partir de uma camada endotelial de células que ocupam os espaços vasculares ao longo de todo o corpo do caramujo. A anatomia desses moluscos está representada pelo desenho na figura 4. Infiltrados e aglomerados de hemócitos já foram descritos em órgãos como ovotesti, glândula digestiva e tecido renal, de moluscos infectados. A cavidade do coração é outro local onde já foram encontrados aglomerados de hemócitos, mesmo em caramujos não infectados. A

estudos que células do tipo fibroblasto, encontradas em diversas regiões e tecidos dos moluscos estudados, tem a capacidade de diferenciação em hemócitos quando devidamente estimuladas (PAN, 1958).

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

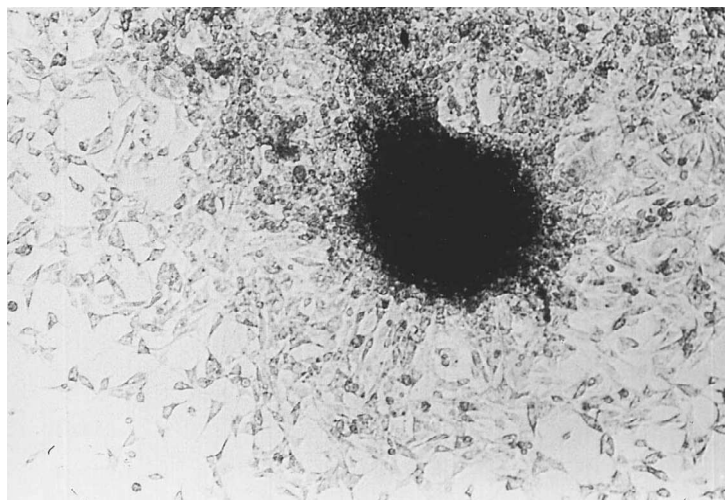


Figura 5 - Cultura de ovotesti.

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

Dentre as possíveis regiões produtoras de hemócitos, a região renopericárdica vem sendo amplamente estudada por vários autores. Em 1975, Lie et al, divulgam, em resultados obtidos através de estudos empregando caramujos *B. glabrata*, saudáveis e infectados com *Echinostoma lindoense*, *E. paraensei* e *E. liei*; um órgão que sofre hiperplasia nos caramujos infectados. Este órgão, não descrito nos trabalhos de Pan de 1958 e 1963, localizado entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto, apareceu como um dos responsáveis pela produção de hemócitos em larga escala, sob condições patológicas. Entre este órgão e a

parede da região sacular do tubo renal encontra-se o coração (figura 6). Assim sendo, os autores consideraram esta região como um novo local para a produção de hemócitos, diferente da descrita por Pan, sendo posteriormente nomeada de Órgão Produtor de Amebócitos (hemócitos) ou APO – do inglês “*Amebocyte Producing Organ*”. O APO é uma fina camada de células, onde as reações mitóticas são muito ínfimas ou ausentes, em caramujos não infectados (SMINIA, 1974; LIE et al, 1975; JEONG et al, 1983; SULLIVAN e SPENCE, 1994; SULLIVAN e SPENCE, 1999; BARBOSA et al, 2006a; BARBOSA et al, 2006b; SOUZA e ANDRADE, 2006; VASQUEZ e SULLIVAN, 2001a; VASQUEZ e SULLIVAN, 2001b).



Figura 6 - Órgão produtor de hemócitos (APO).

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

Em estudos de transferência da resistência ao *S. mansoni*, entre caramujos resistentes e susceptíveis, foram utilizados vários tecidos para o transplante. O primeiro tecido transplantado foi a hemolinfa bruta, apenas porção solúvel e apenas porção celular. Em todos os casos foi possível transferir parte da resistência para caramujos susceptíveis. O transplante de outros tecidos do caramujo com ligação direta ou indireta na produção das células de defesa também foi realizado, no entanto apenas o transplante do APO obteve sucesso na

transferência da resistência. O APO é uma estrutura microscópica, de difícil dissecção, inclusive para a rotina de secção serial, sendo complicado afirmar que o transplante deste órgão não implica no transplante do tecido endotelial vascular, ou de tecidos adjacentes localizados na região Reno - pericárdica. Apesar das dificuldades e do tamanho reduzido do órgão, os resultados com os transplantes contribuíram para o fortalecimento de um postulado unicêntrico para a origem dos hemócitos, baseado no APO, tido como o correspondente do molusco à medula óssea dos vertebrados (SMINIA, 1974; BAYNE et al, 1980; LOKER e BAYNE, 1982; JEONG et al, 1983; GRANATH e YOSHINO, 1984; SULLIVAN e SPENCE, 1994; SULLIVAN e SPENCE, 1999; VASQUEZ e SULLIVAN, 2001a; VASQUEZ e SULLIVAN, 2001b; BARBOSA et al, 2006a; BARBOSA et al, 2006b; SOUZA e ANDRADE, 2006).

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

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

Barbosa et al, em 2006b, realizaram a cultura primária de células retiradas da região do APO. Neste estudo, foram identificados três tipos celulares (figura 7), sendo predominante um tipo celular que apresentou núcleo grande e citoplasma delgado, descrição próxima a um hialinócito. Um segundo tipo celular, de núcleo menor e citoplasma largo, era encontrado em

menor quantidade na cultura, porém era a forma predominante na hemolinfa. O terceiro tipo celular apresentava núcleo pouco visível, sendo especulado que esses três tipos poderiam ser derivados de um único tipo celular em diferentes estádios de desenvolvimento celular. De acordo com os autores, as células do APO migraram livremente em cultura, sem o emprego de tripsinização. Em estudos posteriores a cultura de células da região do APO, de caramujos resistentes a infecção por *S. mansoni*, foi capaz de imobilizar e matar esporocistos primários *in vitro* (BARBOSA et al, 2006b; BARBOSA 2007).

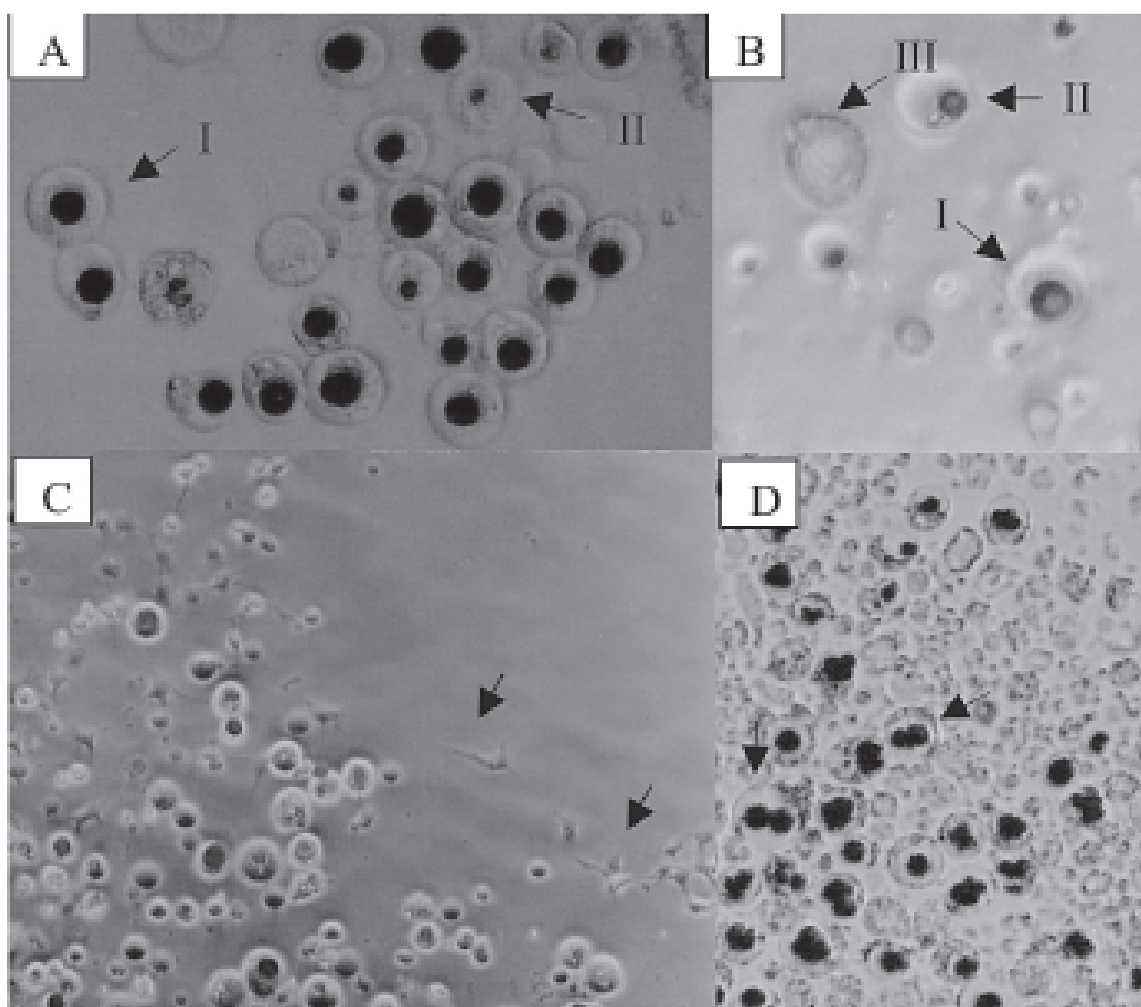


Figura 7 - Cultura primária de células da região do APO de *B. glabrata*.

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

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

1.5 DIFICULDADES NA CULTURA DE CÉLULAS DE MOLUSCOS

A habilidade de isolar e manter determinados tipos celulares em cultura pode ser uma importante ferramenta para estudos que visam compreender e analisar diversos mecanismos celulares complexo, bem como a interação tecidos/órgão com diversos fatores ambientais. Tais modelos *in vitro* representam uma grande atenuação no consumo de animais, facilidade de manipulação e economia de matérias e substâncias a serem testadas (YOSHINO et al, 2013).

Bem estabelecidas dentro de modelos vertebrados, culturas celulares apresentam significativa importância no campo de estudos para animais invertebrados, basicamente artrópodes. Atualmente existem mais de 500 linhagens celulares estabelecidas dentro do filo Arthropoda, sendo em sua maioria, desenvolvida para responder questões de cunho entomológico e epidemiológico (YOSHINO et al, 2013). Células de insetos também tem sido empregadas para elucidar processos fisiológicos (FALLON e GERENDAY, 2010), expressão de genes heterólogos (MORAES et al, 2012), produção de vacinas contra influenza (COX e HOLLISTER, 2009), desenvolvimento de ferramentas e protocolos de transgenia (MATHUR et al, 2010) e métodos de genômica funcional (GUNSALUS e PIANO, 2005).

Diferente do que acontece com o grupo dos insetos, são muito raras as linhagens celulares de moluscos. Apenas uma linhagem, conhecida como Bge – células embrionárias de *Biomphalaria glabrata* – foi estabelecida com sucesso por Hansen em 1976 (Figura 8). Apesar de inúmeras tentativas, não foram obtidas outras linhagens de células de moluscos, o segundo maior filo, em número de espécies, do Reino Animal (YOSHINO et al, 2013).

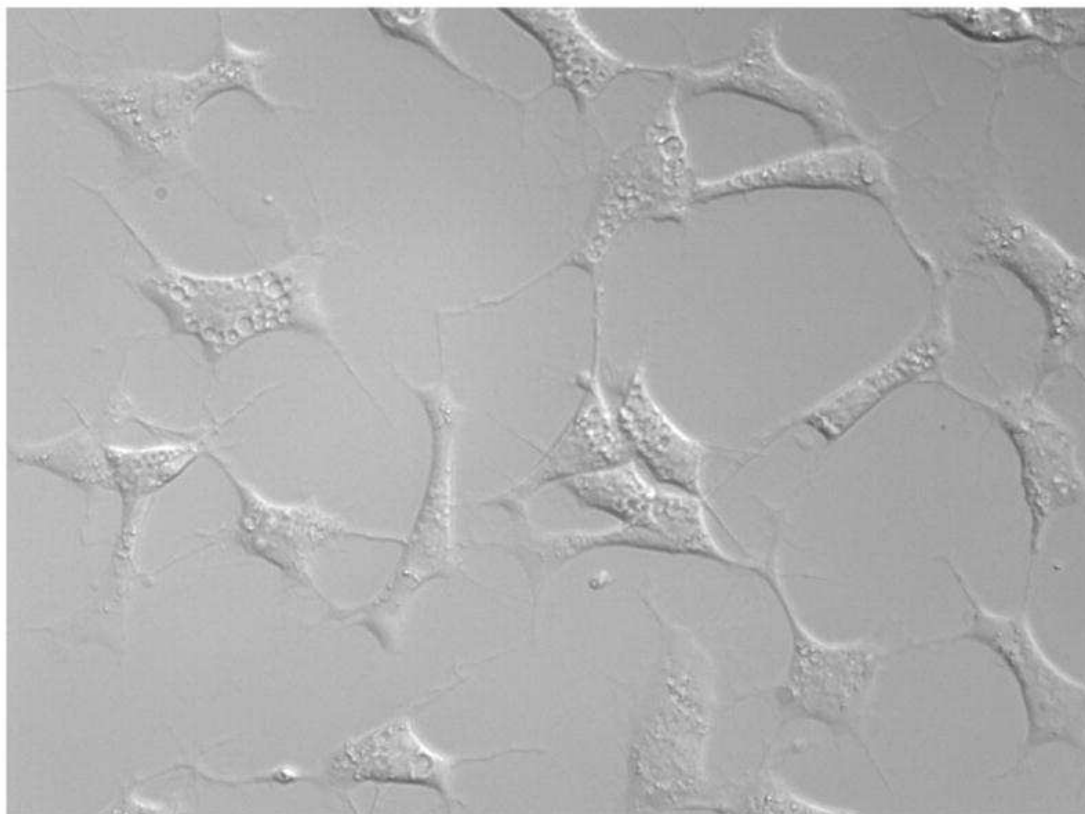


Figura 8 – Células Bge.

Morfologia típica das células Bge. FONTE: YOSHINO et al, 2013.

O estabelecimento de condições que conduzam à uma nova linhagem celular em molusco enfrenta diversas e distintas dificuldades. Uma das principais barreiras é a obtenção de explantes de cultura primária axênicos, livres de contaminantes. Hansen (1976) optou por trabalhar com células embrionárias pela facilidade de obtenção de culturas sem contaminantes, uma vez que não há microbiota dentro dos ovos. Todo o procedimento de obtenção das células era realizado submerso em soluções contendo antibióticos como medida de prevenir contaminações dos explantes. Entretanto, antibióticos e antifúngicos podem apresentar um efeito deletério para as células em cultura, e mesmo sua utilização não garante que não apareçam bactérias, protozoários ou fungos nas culturas (YOSHINO et al, 2013).

Dificuldades na proliferação das células em cultura são comumente encontradas no cultivo de tecidos de indivíduos adultos. Esta foi uma segunda razão pela qual Hansen (1976) preferiu utilizar células embrionárias para estabelecer novas linhagens celulares. Em muitos casos, a dificuldade de proliferação das células em cultura pode estar relacionada à condição de cultivo ou ao próprio meio de cultura. Dentre os diversos fatores que dificultam o processo, podemos destacar a determinação, no meio de cultura, da concentração ideal de nutrientes orgânicos e inorgânicos, melhor osmolaridade, fatores que promovem proliferação de células,

fatores que inibem o crescimento celular, sobrecarga de sinalizadores, componentes deletérios do soro fetal adicionado como suplemento. Somam-se a lista de dificuldades encontrar uma superfície de adesão celular, desconhecimento de componentes da matriz extracelular de moluscos, dificuldade de estabelecimento do momento de passagem e subcultura, danos celulares causados por enzimas e processos de dissociação de células, fatores liberados pelas próprias células que exercem papel de inibição de proliferação e promovem morte celular (YOSHINO et al, 2013).

Apesar dos conhecimentos obtidos nos últimos anos na interação *Biomphalaria/S. mansoni*, essa relação requer maiores estudos em alguns aspectos. Em relação a forma de atuação do sistema interno de defesa, como ele elimina o trematódeo em certas linhagens de *Biomphalaria* e não em outras, e quais mecanismos empregados pelos hemócitos nesse processo. Estes estudos são essenciais para o entendimento do mecanismo de defesa/susceptibilidade destes moluscos. A compreensão dos mecanismos responsáveis pelos diferentes graus de susceptibilidade das espécies do caramujo, que apresenta diferenças inter e intraespecíficas, é um fascinante campo de investigação e do ponto de vista pratico pode resultar em novos métodos de controle da esquistossomose.

Os estudos já foram desenvolvidos no campo da cultura de células de tecidos de caramujos utilizaram como base a espécie *B. glabrata* (BAYNE et al, 1975; BENEX e GANTIER, 1975; BENEX e JACOBELLI, 1980; HANSEN, 1976; IWANAGA, 2002; BARBOSA et al, 2006b). A espécie *B. tenagophila*, a segunda espécie em importância epidemiológica no Brasil, apresenta uma linhagem completamente resistente ao *S. mansoni* se tornou de grande valia em estudos que visam conhecer com maior detalhamento o complexo sistema interno de defesa de *Biomphalaria*.

Culturas celulares de prováveis tecidos produtores de hemócitos constituem um modelo interessante para estudar a interação *Biomphalaria/S. mansoni*, uma vez que a utilização de um modelo de cultura de células completamente resistentes poderá trazer grandes contribuições para o entendimento da forma de atuação do sistema interno de defesa do molusco sobre o parasito.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos *in vitro* de cultura de células para estudos morfológicos e moleculares da interação *Biomphalaria/S. mansoni* em cenário de resistência absoluta e parcial do hospedeiro em confrontos com esporocistos primários transformados *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Cultivar células de diferentes tecidos e órgãos de caramujos *Biomphalaria tenagophila*, das linhagens resistente (Taim) e susceptível (Joinville).

Desafiar as culturas celulares obtidas contra esporocistos primários de diferentes linhagens geográficas de *S. mansoni*.

Caracterizar a morfologia estrutural e ultraestrutural das células de *Biomphalaria* em culturas, após desafio com esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*.

Obter perfil de genes diferencialmente expressos entre as culturas de células derivadas do tubo renal sacular e glândula digestiva, antes e após desafio frente aos esporocistos primários.

Caracterizar as subpopulações de células derivadas do tubo renal sacular e da glândula digestiva, cultivadas após desafio.

Induzir imortalização das células derivadas do tubo renal sacular e da glândula digestiva de *B. tenagophila* Taim.

3 METODOLOGIA

3.1 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CARAMUJOS *Biomphalaria* NO LABORATÓRIO

Os caramujos *B. tenagophila* da linhagem Taim, utilizados durante os experimentos, são criados e mantidos no Sítio Santa Inês, no município de Bananal em São Paulo, em instalações adaptadas para esse fim. Os moluscos foram enviados diretamente da fazenda para uso em laboratório, sendo mantidos no laboratório em aquário com volume de 70 litros de água, por até 2 meses. O reservatório foi coberto com gaze, como medida de proteção contra fugas e proliferação de organismos externos, e com uma bomba para circulação e aeração da água. Os caramujos foram alimentados com folhas de alface limpas, tratadas com hipoclorito e lavadas em água corrente. A água do reservatório foi trocada uma vez a cada duas semanas enquanto os caramujos estivessem em laboratório. Cada lote de caramujos enviados de Bananal foi mantido isolado. Os caramujos mortos foram imediatamente removidos da cuba assim que constatada a sua morte, observada através da coloração da sua concha, pelo grande extravasamento de hemolinfa ou pela retração excessiva do animal para dentro da concha.

Os caramujos *B. tenagophila* da linhagem Joinville e da espécie *B. glabrata*, linhagem BH, utilizados nos experimentos, foram obtidos junto ao Moluscário Lobato Paraense do Centro de Pesquisas René Rachou, de acordo com suas normas e técnicas de criação. O código de permissão de acesso do patrimônio genético dos caramujos utilizados neste trabalho é o 056/2012/SECEX/CGEN.

3.2 TRATAMENTO DE CARAMUJOS *B. tenagophila* COM METRONIDAZOL

Os caramujos com diâmetro de concha entre 10-15 mm, mantidos no laboratório ou oriundos do moluscário do CPqRR, foram submetidos a um tratamento anti-helmíntico com metronidazol, capaz de eliminar helmintos e alguns protozoários, antes de todos os experimentos, pelo período de dois dias, como forma de amenizar a contaminação das culturas celulares. Cada grupo de 20 caramujos foi tratado por dois dias em solução de metronidazol 250 mg/ml, em volume aproximado de 1000 mL. Após o primeiro dia de tratamento, a solução de Metronidazol foi trocada e os caramujos mantidos em tratamento por mais um dia. Durante o processo de tratamento, os caramujos não foram alimentados. Ao final do segundo dia de tratamento os caramujos foram submetidos à anestesia com solução de pentobarbital sódico 0,4 mg/ml ficando submersos na solução anestésica por pelo menos 6 horas antes da dissecação.

3.3 CULTURA CELULAR PRIMÁRIA DE TECIDOS DE *Biomphalaria*

Os reagentes utilizados no preparo dos meios de cultura empregados foram de procedência da Sigma-Aldrich (Estados Unidos), de linha de produtos própria para cultivo celular. Os plásticos utilizados para cultivo e manutenção das células foram de procedência da Corning (Estados Unidos). Em todos os experimentos, a água utilizada foi bidestilada estéril, livre de DNases, RNases e pirogênicos, obtida através de equipamentos de tratamento de água da Millipore (Estados Unidos) e autoclavação. *B. tenagophila*, de ambas as linhagens, e *B. glabrata* foram dissecados de acordo com metodologia estabelecida por Silva-Neto, 2012 (Figura 9).

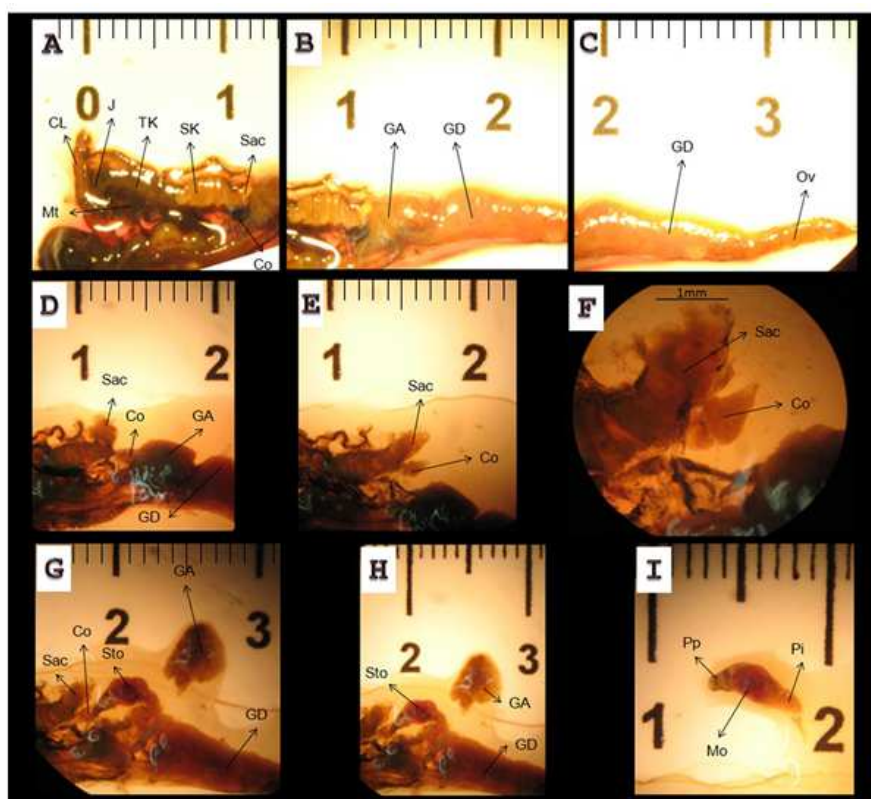


Figura 9 - Dissecção de caramujos do gênero *Biomphalaria*.

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

Explantos de diferentes regiões dos caramujos, medindo em torno de 1 mm, foram plaqueados em placas de 24 poços com 300 µL/poço de meio de cultura Schneider suplementado com 10% soro fetal bovino (Gibco BRL), 11 µg/ml de insulina bovina, 296 µg/ml de glutamina (SILVA-NETO, 2012), ou meio de Hansen, cuja base consiste de Schneider 20% suplementado com 10% soro fetal bovino (inativado a 56°C por 30 minutos), 1060 µg/ml de D-galactose, 354 µg/ml de lactoalbumina hidrolisada e 3600 µg/ml de trealose (HANSEN, 1976). Ambos os meios foram suplementados com as seguintes quantidades de antibióticos: 10 µg/ml de anfotericina B, 125 µg/ml de primocin, 25 µg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de gentamicina. As placas de cultura foram mantidas em câmara úmida, sob temperatura de 15°C ou 26°C, dependendo do experimento a ser realizado. Foram descartados todos os poços que apresentaram contaminação por bactérias, fungos, protozoários ou pequenos helmintos, parasitas dos moluscos, de acordo com inspeção visual e por microscopia óptica. Em situações de repique ou lavagem de células, as mesmas foram retiradas dos poços de cultura através de pipetagem e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos, sem utilização de freios para a parada do rotor. O sobrenadante foi descartado e a células ressuspensas em solução salina estéril para caramujos - SSSS (SMINIA, 1974) ou em meio de cultura.

A viabilidade celular foi avaliada por coloração com azul de Tripán e contagem de células mortas em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. As células foram retiradas da cultura, homogeneizadas e uma alíquota de 50 µl utilizada para análise. A esta alíquota era adicionado 1 volume de azul de Tripán, sendo aplicados 10 µl à câmara de Neubauer para realização da contagem. Quando necessário, foram aplicadas análises estatísticas com o teste t para amostras não pareadas.

3.4 INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS DE CULTURA PRIMÁRIA DE *B. tenagophila* E *B. glabrata* E ESPOROCISTOS PRIMÁRIOS DE *S. mansoni*

Para experimentos de interação entre células de cultura primária e esporocistos transformados *in vitro*, foram utilizados os meios de cultura descritos no item anterior, retirando-se apenas o soro fetal bovino.

Culturas celulares primárias derivadas dos tecidos tubo renal sacular e glândula digestiva, de caramujos *B. tenagophila* Taim e Joinville e da espécie *B. glabrata* foram avaliadas quanto a sua viabilidade, após 36 horas e após 192 horas de cultivo, na temperatura

de 26°C. Posteriormente foram introduzidos, em cada poço, cerca de 15 esporocistos primários de *S. mansoni* transformados *in vitro*, gentilmente cedidos pelo Dr. Hélio H. Babá, segundo metodologia de (MATTOS et al, 2006). Os esporocistos e as células foram incubados por 24-48 horas, na temperatura de 26°C, e os resultados da interação observados por microscopia óptica.

Como uma das variantes do ensaio de interação parasito-hospedeiro invertebrado, foi utilizado o coquetel de inibidores de proteases (Cat.: P8849) da Sigma-Aldrich (Estados Unidos), contendo inibidores os AEBSF (serino proteases), bestatina (amino peptidases), pepstatina A (proteases aspárticas), e-64 (cisteino proteases), fosforamidona (tipotermolisina). Foi acrescido EDTA (metalo proteases) na concentração final 1 mM.

A variável contagem de esporocistos (n) foi transformada para $\log(n+1)$ para normalização dos dados e foi submetida ao teste t para dados paramétricos.

3.5 ENSAIOS DE ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM CELULAR IMORTAL DE *B. tenagophila*

3.5.1 Imortalização espontânea

Células em cultivo primário, derivadas do tubo renal sacular e da glândula digestiva de caramujos *B. tenagophila*, linhagem geográfica Taim, foram cultivadas na temperatura de 15°C em meio Schneider. Células com 36 horas de cultura foram coletadas de uma placa de 24 poços e reunidas em um tubo de centrifuga. A viabilidade celular foi aferida e as células lavadas em meio novo e plaqueadas em placas de 6 poços, na proporção de 10^4 células por poço, em 1 ml de meio novo (FRESHNEY, 2005). As células foram acompanhadas através de medição da viabilidade e observação em microscopia óptica.

3.5.2.1 Obtenção de plasmídeo contendo gene da Telomerase

Uma cepa da Bactéria *Escherichia coli* GC10, contendo plasmídeo pGRN145 com o gene da enzima telomerase transcriptase reversa, de tamanho 3.398 pb, foi adquirida junto à ATCC (American Type Cell Collection, Estados Unidos), sendo mantida congelada a - 80°C.

As bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar (Peptona, Extrato de leveduras, NaCl, ágar) contendo 37 µg/ml do antibiótico cloranfenicol. As placas foram incubadas por 12 horas a 37°C. Em seguida, foi selecionado um clone para inoculação de 5 ml de meio LB

líquido com 37 µg/ml de cloranfenicol, incubado por tempo e condições semelhantes às placas. Da cultura líquida, foram utilizados 2,5 ml para inocular 250 ml de meio LB líquido, 37 µg/ml de cloranfenicol, incubado pelo mesmo período e condições já descritos. Após crescimento, a cultura foi centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* submetido ao processo de extração de DNA plasmidial pelo kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega – Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante.

Após a extração, o DNA plasmidial foi quantificado por espectrofotometria em sistema GeneQuant (Pharmacia – GE – Estados Unidos). Para confirmação da presença do plasmídeo pGNR145, 1 µg de DNA plasmidial foi digerido, por 2 horas a 37°C, pela enzima *EcoRI* (Promega) e o resultado analisado em gel de agarose 0,8%.

3.5.2.2 Transformação de células em cultura com plasmídeo pGRN145

Células em culturas primárias, derivadas do tubo renal sacular de caramujos *B. tenagophila*, linhagem geográfica Taim, mantidas na temperatura de 26°C, foram coletadas de uma placa de 24 poços, após 36 horas de cultivo, e reunidas em um tubo de centrifuga. A viabilidade celular foi aferida e as células lavadas, por 2 vezes, em 1 volume de meio Schneider sem suplementação.

Para a transformação das células foi utilizada uma formulação de lipossomo 1:1,5 (M/M) do lipídio catiônico (N, N^I, N^{II}, N^{III} - tetrametil - N, N^I, N^{II}, N^{III} - tetrapalmitil-espermina – TM-TPS) e dioleil-fosfatidiletanolamina em água (Cellfectin® Reagent – Invitrogen). Nove µl da formulação de lipossomo foram diluídos para volume final de 100 µl em meio de cultura sem suplementação. Dois µg do plasmídeo pGRN145 foram diluídos em 100 µl de meio de cultura sem suplementação. As soluções de lipossomo e DNA plasmidial foram combinadas, gentilmente misturadas por pipetagem e incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, a solução de transformação foi diluída para 1 ml de meio sem suplementação e utilizada para ressuspender 9×10^5 células. As células foram plaqueadas em poços de cultura de placa de 6 poços e incubadas por 5 ou 24 horas a 26°C. Após transformação, as células foram retiradas das placas, lavadas em meio suplementado e replaqueadas na ordem de 4×10^5 células por poço, em 2 ml de meio de cultura. O controle da transformação foi realizado por acompanhamento via microscopia óptica. Este experimento

foi realizado em quadruplicata, com a utilização dois controles, um para repique e outro para mudança de meio.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DA ULTRAESTRUTURA DAS CÉLULAS EM CULTURA DE *B. tenagophila*

A caracterização da ultraestrutura das células dos diversos tecidos obtidos foi realizada em colaboração com o grupo do Dr. Luiz Carlos Alves no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz unidade Pernambuco, e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Assami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Células em culturas derivadas de tecidos de caramujos adultos foram analisadas em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV).

Um pool de 10^5 células, coletadas em diferentes poços de culturas, com 36 horas de cultivo, foram lavadas em solução SSSS e fixadas com a solução de Karnofsky (glutaraldeído 2,5%, formoldeído 4% e tampão cacodilato 0,1 M). As amostras fixadas foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixadas em 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato. As amostras foram então gradualmente desidratadas em acetona para MET e embebidas em resina de Epon, ou tratadas com etanol para MEV. Cortes ultrafinos foram realizados dos blocos e montados em grade para dupla contrastação com citrato de chumbo e acetato de uranila (MET). Para análises de MEV o material foi metalizado com partículas de ouro. As amostras foram então observadas ao microscópio eletrônico. Das amostras obtidas, apenas células da região do ovotesti foram submetidas tanto a MET e MEV, sendo as demais submetidas somente a MET.

3.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DE CARAMUJOS *Biomphalaria* CONTRA *S. mansoni*

Miracídios de *Schistosoma mansoni* da cepa LE foram provenientes do moluscário do Centro de Pesquisas René Rachou. Os miracídios foram provenientes do excedente gerado pelo moluscário sendo obtidos pelas técnicas padrões de rotina do mesmo.

Setenta caramujos de cada uma das linhagens geográficas Taim e Joinville de *B. tenagophila*, e da espécie *B. glabrata*, foram mergulhados, individualmente, em poços de placa de cultura de 24 poços, contendo 30 miracídios em 1 ml de água desclorada, por 60 minutos, sob exposição à luz artificial. Após a incubação, os caramujos foram transferidos para uma caixa de criação, onde foram mantidos em grupos isolados de cada espécie. Após 35

dias de infecção, os mesmos foram expostos a luz artificial por duas horas para verificar eliminação de cercarias.

3.8 ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLEICOS EM AMOSTRAS DE CARAMUJOS *B. tenagophila* DESAFIADOS COM *S. mansoni*

3.8.1 Extração de RNA total

Em todos os experimentos para a extração e manipulação dos ácidos nucleicos, visando análise de transcritos, foram utilizados materiais, soluções e peças de equipamentos previamente tratados e livres de RNAses.

As amostras de tecidos congelados de caramujos *B. tenagophila* foram maceradas em gral, na presença de nitrogênio líquido, utilizando pistilo de porcelana. Após maceração, os tecidos foram transferidos para tubo de centrifuga, e homogeneizados com reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as condições estabelecidas pelos protocolos do fabricante, utilizando um homogeneizador de amostras (Heidolph – Alemanha). Os RNAs foram precipitados na presença de isopropanol e lavados com etanol 75%. Ao final, o material resultante foi dissolvido em água livre de RNAses, quantificado em espectrofotômetro, e avaliada a integridade em gel de agarose 1%. O material foi armazenado a – 80°C.

Quando o material de análise era constituído por células provenientes de cultura primária, o material já foi diretamente homogeneizado, excluindo-se a parte da maceração.

3.8.2 Iniciadores para q-PCR

Para a amplificação dos possíveis transcritos para a proteína FREP-3, foram sintetizados iniciadores específicos (IDT Integrated DNA Technologies – Estados Unidos) utilizando sequências descritas na literatura (HANINGTON et al, 2010; LARSON et al, 2014). As sequências dos iniciadores específicos para FREP-3 foram 5'- GCAGACTTGAGC ACTAAACAACAA -3' e 5'- CGAGGCAGTTGAAAGATTGG -3' e para *AIF* foram 5'- GTCAAGCTAAGACCCACCTGGAG -3' e 5'- TTGCCGAGTCCTTCAAACAGA -3'. Para a amplificação de um gene constitutivo, foram utilizados iniciadores específicos, de mesma procedência, a partir de sequências descritas na literatura para mioglobina de *B. glabrata*. As sequências dos iniciadores específicos para mioglobina foram 5'- TGGATGTTCCGAATG TTC -3' e 5'- TGACGTTGACCTGCTTGATG -3'.

3.8.3 Teste dos iniciadores sintetizados através de PCR convencional

Amostras de RNA total extraídas do corpo congelado de 4 caramujos *B. tenagophila* Taim e o pool de células da hemolinfa dos mesmos caramujos, nas condições não infectados ou infectados com *S. mansoni*, foram tratadas com DNase (Qiagen – Estados Unidos) e submetidas ao processo de liofilização para aumentar sua concentração. Após liofilização, as amostras foram reconstituídas no volume de 10 µl. 2 µg do RNA foi submetida ao processo de síntese de fita complementar de DNA. Inicialmente, o RNA foi incubado por 15 minutos a 70 °C com 0,5 µg de oligodT (Promega). A síntese da fita complementar ocorreu na presença de 200 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV (Promega), 10 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfato (Invitrogen), dissolvidos no tampão de reação próprio da enzima.

A reação de amplificação ocorreu a partir de 1,5 µg de cDNA, 20 pM de cada iniciador, utilizando-se o tampão Master Mix (Invitrogen). As PCR foram realizadas em 35 ciclos nas temperaturas 94°C/55°C/72°C pelos períodos de tempo de 4 minutos e 30 segundos/30 segundos/6 minutos, respectivamente. Os resultados das amplificações foram analisados em géis de agarose 1%.

3.8.4 Ensaios de qRT-PCR

Para a realização dos ensaios de qRT-PCR, as células obtidas a partir das culturas primárias dos tecidos foram processadas para obtenção de RNA total, utilizando o Kit RNeasy (QIAGEN) conforme instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com DNase TURBO DNA-free (Ambion), quantificadas através de espectrofotometria (NanoDrop) e sua qualidade analisada através do Bioanalyzer (Agilent). A síntese do cDNA foi realizada através do kit High-capacity (Life TechnologiesTM), seguindo as instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados foram os mesmos validados na PCR convencional, com temperatura de anelamento em 60°C. Os ensaios de qRT-PCR foram realizados utilizando o Power SYBR Green Master Mix (Invitrogen). A eficiência de cada par de iniciadores foi avaliada usando o programa Applied Biosystems 7500, utilizando as diluições seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 e calculada como descrito por BUSTIN et al (2009). Para cada transcrito investigado foram produzidas três réplicas biológicas e suas taxas de expressão gênica normalizadas pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste Anova para amostras não-paramétricas com teste de Tukey, no programa GraphPad Prim[®] 5.0. Foram consideradas estatisticamente significativos valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS DE *Biomphalaria*

Culturas celulares oriundas de caramujos das espécies *B. glabrata* e *B. tenagophila* apresentam o padrão morfológico similar sob microscopia óptica, como exemplificado na figura 10.

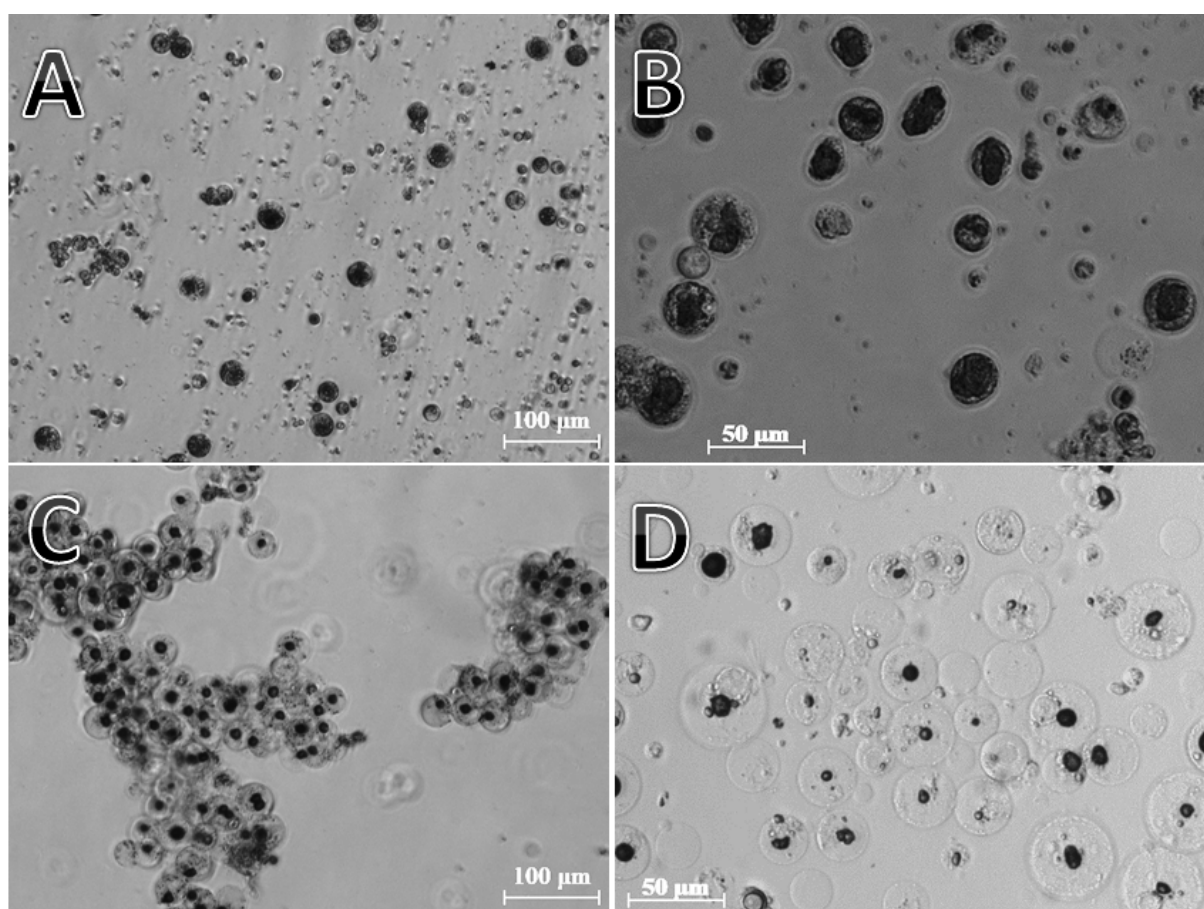


Figura 10 - Células derivadas do tubo renal sacular (SK) e glândula digestiva (DG) de *Biomphalaria* após 36 horas em cultivo primário.

Glândula digestiva (A-B) e tubo renal sacular (C-D); *B. glabrata* (A-C) e *B. tenagophila* Taim (B-D).

O estabelecimento e a caracterização ultraestrutural das culturas celulares primárias derivadas de tecidos de caramujos adultos da espécie *B. tenagophila*, linhagem geográfica Taim não infectados, encontram-se detalhadas no artigo publicado no periódico Micron, em junho de 2014 (Anexo).

Após obtenção dos dados de interação entre as culturas celulares primárias derivadas da glândula digestiva de caramujos *B. tenagophila* Taim e os esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*, observamos um perfil celular nas culturas derivadas dessa região que se assemelha a um eosinófilo, quando observadas em MET, com citoplasma repleto de grânulos eletrodensos (Figura 11).

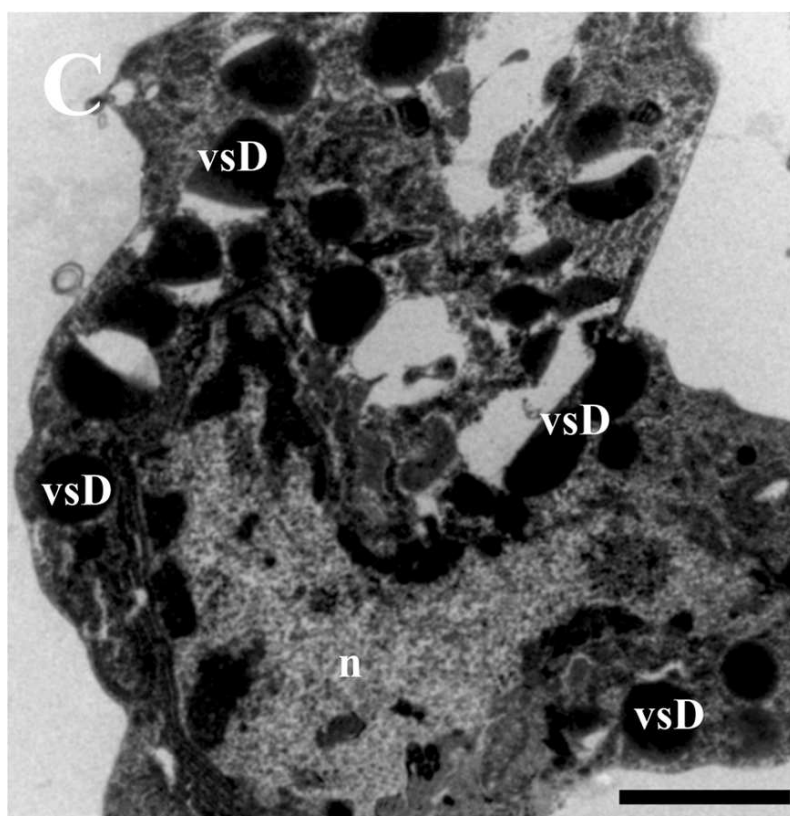


Figure 11 – Ultraestrutura de célula em cultura primária derivada da glândula digestiva de *B. tenagophila* Taim.

Célula com núcleo amorfo pouco eletrodense (n) apresentando inúmeros grânulos eletrodensos (vsD) espalhados pelo citoplasma. A barra negra mede 1 µm.

4.2 ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE CÉLULAS EM CULTURA PRIMÁRIA DERIVADAS DO TUBO RENAL SACULAR E DA GLÂNDULA DIGESTIVA DE CARAMUJOS *Biomphalaria* COM ESPOROCISTOS DE *S. mansoni* TRANSFORMADOS *in vitro*

As culturas celulares primárias, com 36 horas de cultivo, derivadas tubo renal sacular de *B. tenagophila* Taim (resistente), Joinville (suscetível) ou de *B. glabrata* não apresentaram interação aparente com esporocistos primários de *S. mansoni* em 24-48 horas, sob microscopia óptica (Figura 12).

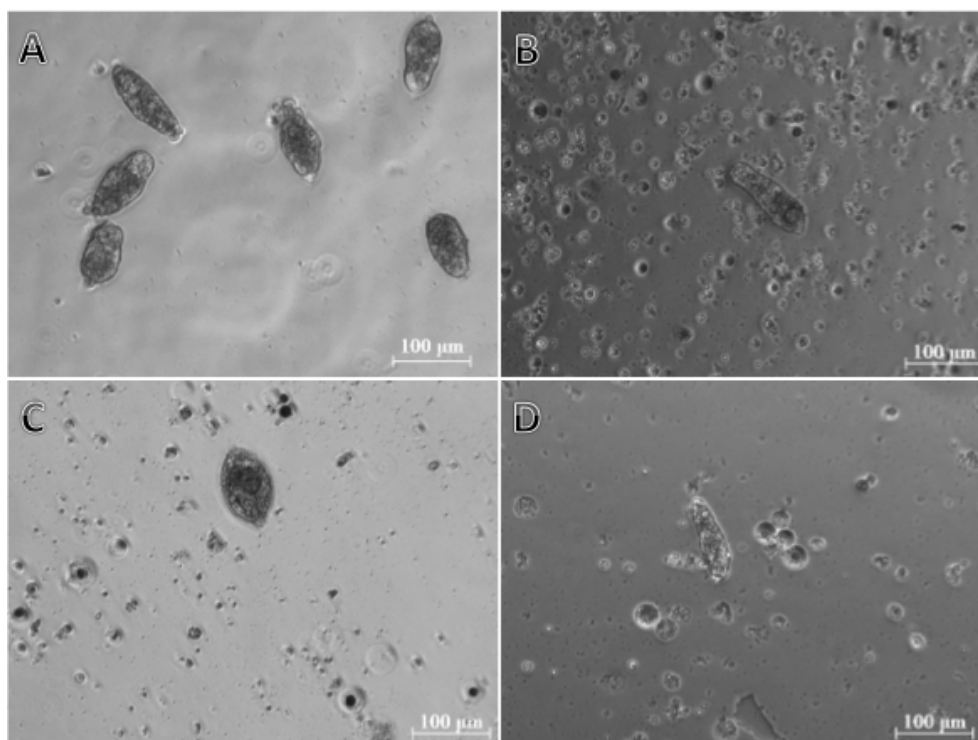


Figura 12 - Interação de células derivadas do tubo renal sacular de *Biomphalaria* e esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*.

A. Esporocistos transformados *in vitro* após 48 horas no meio Schneider. **B.** Esporocistos transformados *in vitro* após 48 horas no meio Schneider em contato com células derivadas do tubo renal sacular de *B. tenagophila* da linhagem resistente Taim. **C.** Esporocistos transformados *in vitro* após 48 horas no meio Schneider em contato com células derivadas do tubo renal sacular de *B. tenagophila* da linhagem susceptível Joinville. **D.** Esporocistos transformados *in vitro* após 48 horas no meio Schneider em contato com células derivadas do tubo renal sacular de *B. glabrata*.

A substituição do soro fetal bovino ativo pelo soro fetal bovino inativado, ou a utilização de um meio de cultura sem soro fetal bovino, não alterou o perfil morfológico apresentado na figura 13.

As culturas celulares primárias, com 36 horas de cultivo, derivadas da glândula digestiva, não apresentaram interação aparente (Figura 12) com esporocistos primários de *S. mansoni* em um período até 48 horas, sob microscopia óptica, em nenhuma das espécies e linhagens analisadas.

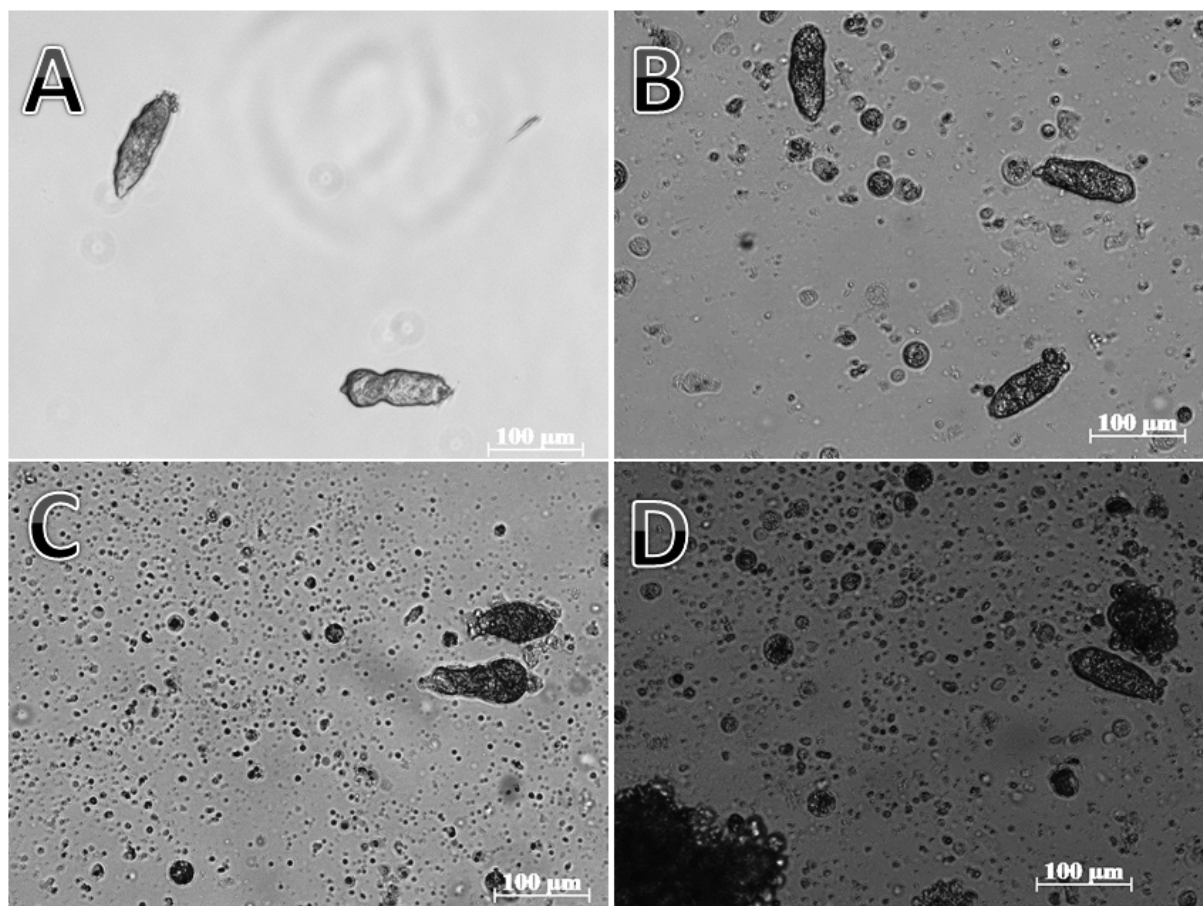


Figura 13 - Interação de células derivadas da glândula digestiva de *Biomphalaria* e esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*.

A. Esporocistos transformados *in vitro* após 48 horas no meio Schneider. **B.** Esporocistos transformados *in vitro* após 48 horas no meio Schneider em contato com células derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* da linhagem resistente Taim. **C.** Esporocistos transformados *in vitro* após 48 horas no meio Schneider em contato com células derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* da linhagem susceptível Joinville. **D.** Esporocistos transformados *in vitro* após 48 horas no meio Schneider em contato com células derivadas da glândula digestiva de *B. glabrata*. Não há alterações visíveis na morfologia dos esporocistos em nenhuma das culturas testadas.

Ao longo desse trabalho, a linhagem geográfica oriunda de Joinville da espécie *B. tenagophila*, sempre foi considerada como padrão de susceptibilidade para comparação com *B. tenagophila* Taim. Posteriormente, nos testes de infecção para controle de susceptibilidade dos caramujos trabalhados, a linhagem Joinville apresentou susceptibilidade menor que 10% contra a cepa LE de *S. mansoni* que foi utilizada neste trabalho. Por esta razão, escolhemos comparar o perfil de resistência absoluta de *B. tenagophila* Taim apenas contra o padrão susceptível *B. glabrata*, não apresentando mais os resultados envolvendo os experimentos realizados com *B. tenagophila* Joinville.

Quando foi utilizado o meio de cultura Schneider, sem soro fetal bovino, as células de *B. tenagophila* linhagem Taim se mostraram aptas a destruírem completamente os esporocistos de *S. mansoni*, após 24 horas de interação, diferente das células derivadas de cultura homóloga de *B. glabrata* (Figura 14).

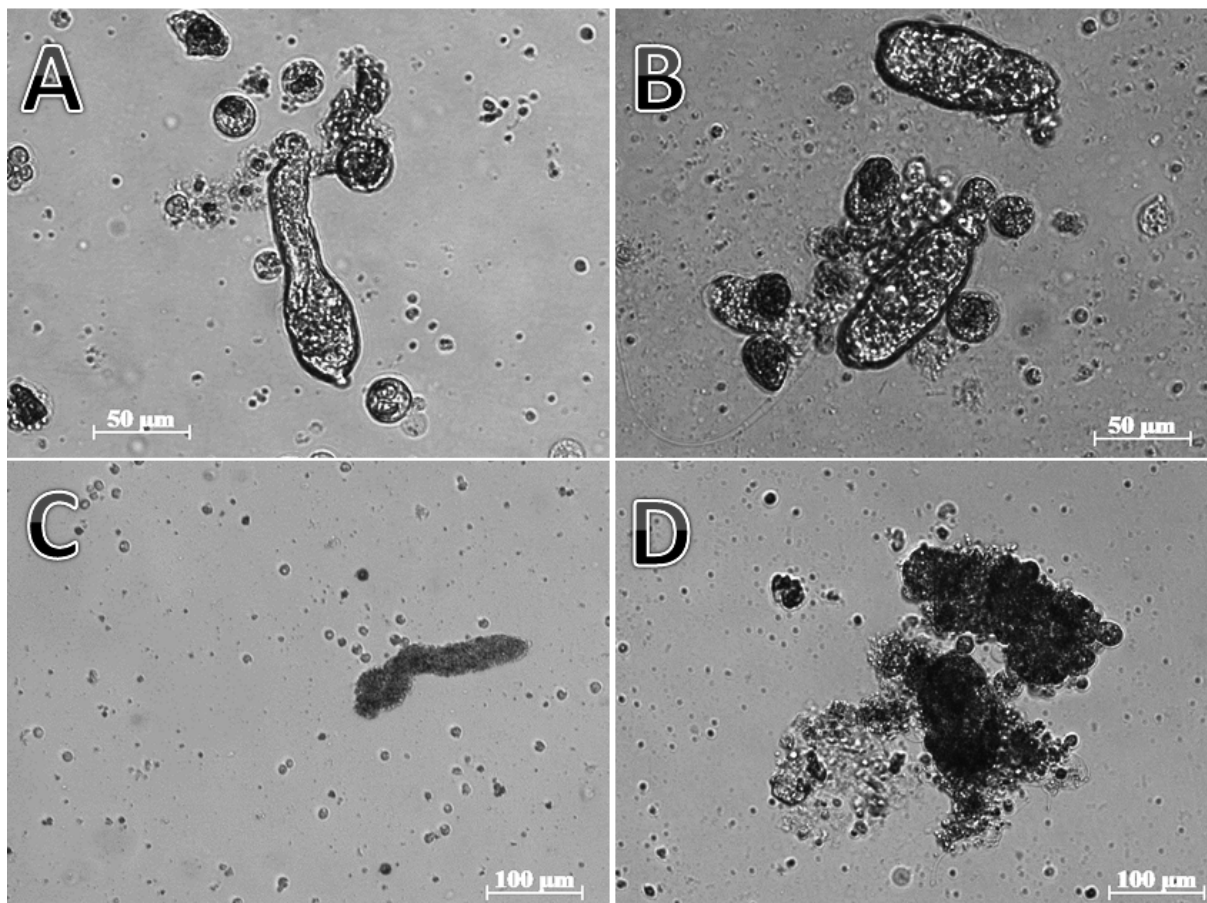


Figura 14 - Interação de células derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* Taim e esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*, em meio livre de soro fetal bovino.

A. Esporocistos transformados *in vitro* após 1 hora no meio Schneider, sem soro fetal, em contato com células derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* da linhagem resistente Taim. **B.** Esporocistos transformados *in vitro* após 8 horas no meio Schneider, sem soro fetal, em contato com células derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* da linhagem resistente Taim. **C.** Esporocistos transformados *in vitro* após 16 horas no meio Schneider, sem soro fetal, em contato com células derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* da linhagem resistente Taim. **D.** Esporocistos transformados *in vitro* após 24 horas no meio Schneider, sem soro fetal, em contato com células derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* da linhagem resistente Taim. Após 24 horas de interação não é mais possível reconhecer morfologicamente os esporocistos de *S. mansoni*. Microscopia óptica.

A diferença no perfil de destruição dos esporocistos apresentado pelas células em culturas primárias derivadas da glândula digestiva de caramujos adultos da linhagem Taim foi estatisticamente significativa, com valor $P < 0,05$, com relação as culturas da porção sacular

do tubo renal dos mesmos caramujos, e com relação as culturas provenientes de caramujos *B. glabrata* (Figura 15).

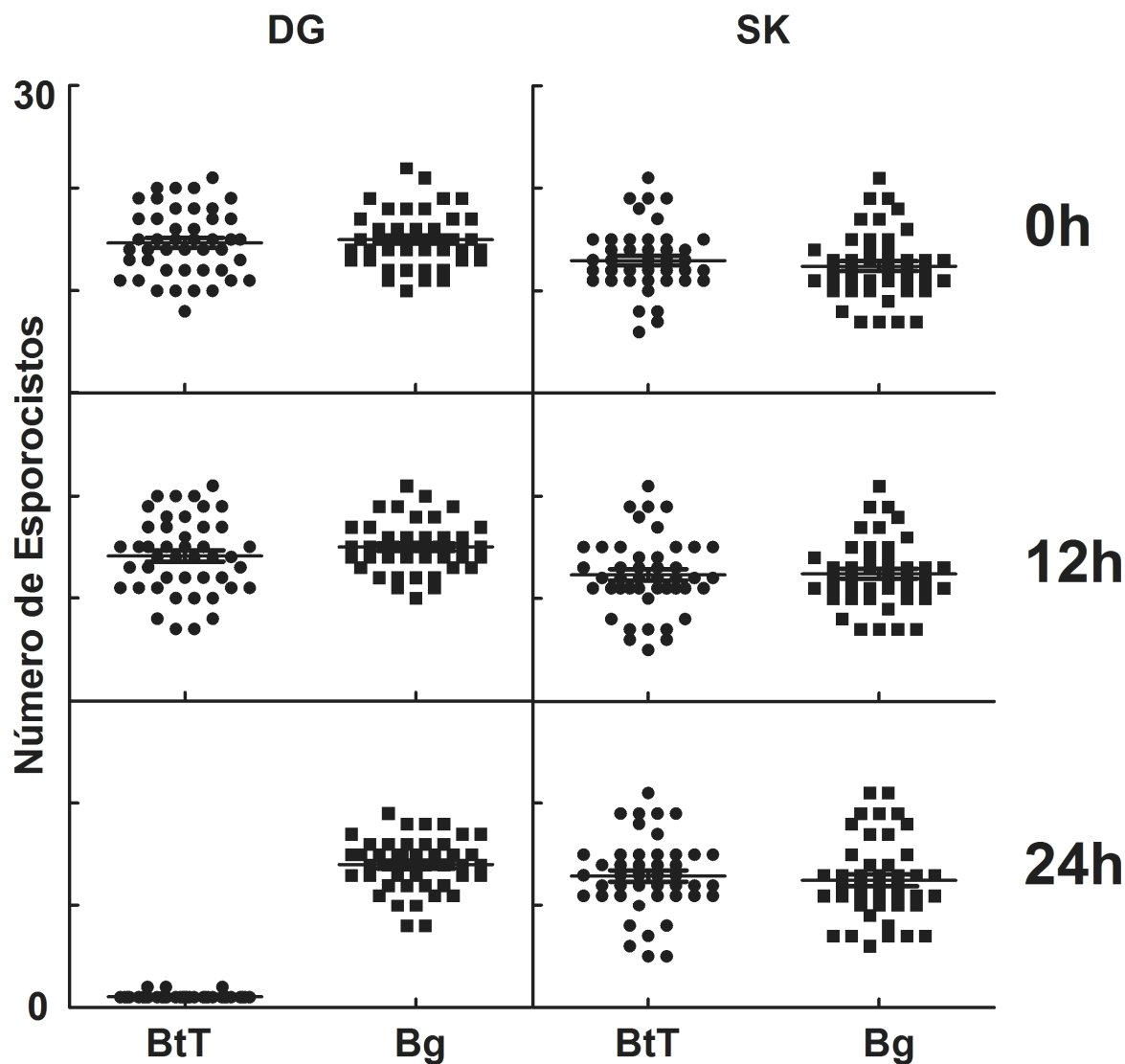


Figura 15 – Interações entre esporocistos transformados *in vitro* culturas celulares primárias.

Contagem do número total de esporocistos com integridade morfológica após interação com culturas celulares primárias derivadas da glândula digestiva (DG) ou da porção sacular do tubo renal (SK), de caramujos *B. tenagophila* Taim e *B. glabrata*, em três tempos distintos.

A adição de coquetel antiproteases ao meio de cultura, juntamente com os esporocistos transformados *in vitro*, não alterou o perfil morfológico da interação, sugerindo não se tratar de uma apenas ação proteolítica de enzimas produzidas pelas células desta cultura.

4.3 EXTENSÃO DO TEMPO DE CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DERIVADAS DO TUBO RENAL SACULAR E GLÂNDULA DIGESTIVA DE *B. tenagophila*

As células derivadas do tubo renal sacular em cultivo primário apresentaram viabilidade média superiores a 90% até 36 horas, quando cultivadas em meio Schneider a 15°C (figura 16). As células derivadas da glândula digestiva não apresentaram diferenças significativas em sua viabilidade nas diversas condições de cultivo testadas, mantendo viabilidade acima de 90% em todas as condições.

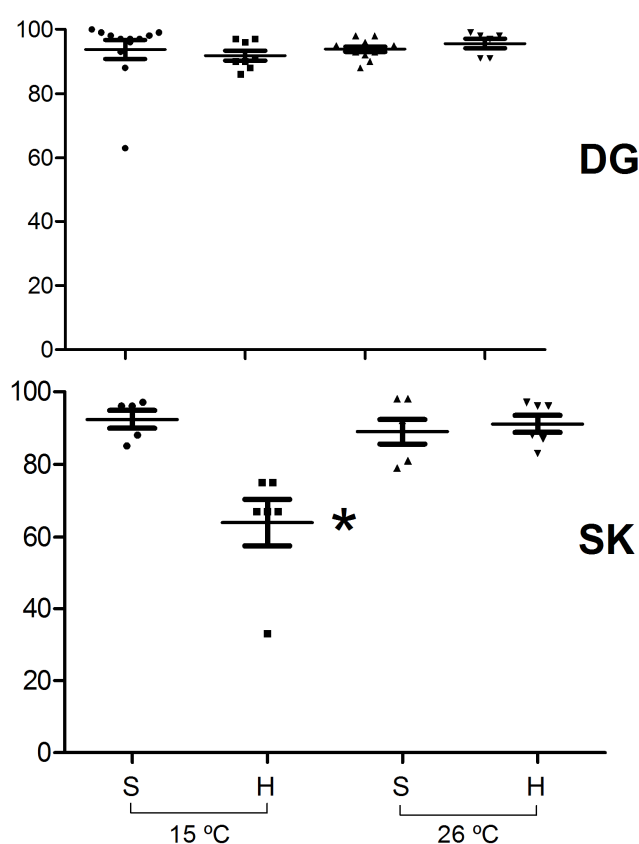


Figure 16 - Viabilidade de células derivadas do tubo renal sacular de *B. tenagophila* após 36 horas de cultivo.

Viabilidade (%) das culturas celulares derivadas do tubo renal sacular, após 192 horas de cultivo, nas condições de 15°C ou 26°C, nos meios de cultura Schneider (S) ou Hansen (H), das culturas da glândula digestiva (DG) e tubo renal sacular (SK). * indicam que os resultados são significativamente diferentes (valor $P < 0,05$).

Após 192 horas de cultivo, as células em culturas primárias derivadas do tubo renal sacular apresentam maior viabilidade na temperatura de 15°C ($P < 0,05$), quando comparadas as células cultivadas no mesmo meio, na temperatura de 26°C (Figura 17). As células em

culturas primárias derivadas da glândula digestiva contaminaram durante o cultivo, não sendo possível determinar sua viabilidade em períodos maiores de cultivo.

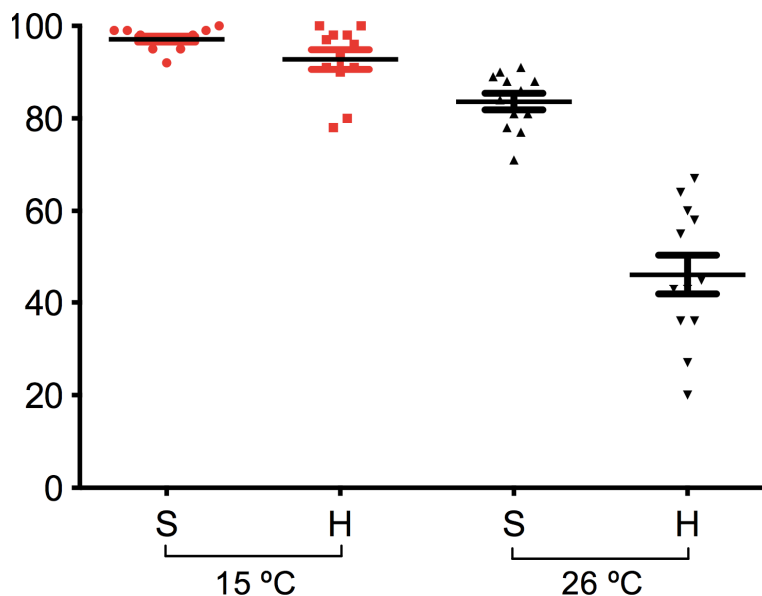


Figura 17 - Viabilidade de células derivadas do tubo renal sacular de *B. tenagophila* após 192 horas de cultivo.

Viabilidade (%) das culturas celulares derivadas do tubo renal sacular, após 192 horas de cultivo, nas condições de 15°C ou 26°C, nos meios de cultura Schneider (S) ou Hansen (H). Cores diferentes indicam que os resultados são significativamente diferentes (valor $P < 0,05$).

Após 336 horas de cultivo, já não foi possível calcular viabilidade para células mantidas na condição de temperatura a 26°C, independente dos meios de cultura, bem como para células mantidas a 15°C em meio de Hansen. Células mantidas no meio Schneider, a 15°C, apresentaram viabilidade média em torno de 40% após 336 horas de cultivo. Após 504 horas de cultivo, a viabilidade celular nesta condição foi inferior a 20%, sendo os últimos poços desta cultura descartados após 720 horas, por não ser possível identificar células vivas, representando a durabilidade máxima dessas células em cultivo primário.

Além da queda na viabilidade, houve mudança no padrão morfológico da cultura. Até 192 horas de cultivo há predomínio de células esféricas, com núcleo grande, aparente circular e central. Algumas células apresentavam dois núcleos enquanto outras células apresentaram-se diminutas e núcleo não visível por microscopia de campo claro (Figura 18A).

Após 336 horas de cultivo, houve um decréscimo na população predominante na cultura, aumentando o número de células diminutas (Figura 18B) que foram coradas pelo Azul de Tripán. A população dessas células menores aumentou consideravelmente na cultura

com 504 horas, com redução da população das células cujo perfil foi observado no início da cultura (Figura 18C). Após 672 horas de cultivo (Figura 18D), foram raras as células com as características iniciais e que não foram mais encontradas a partir de 720 horas de cultivo; evidenciando a diferenciação celular promovida nas células pela extensão do seu em cultura.

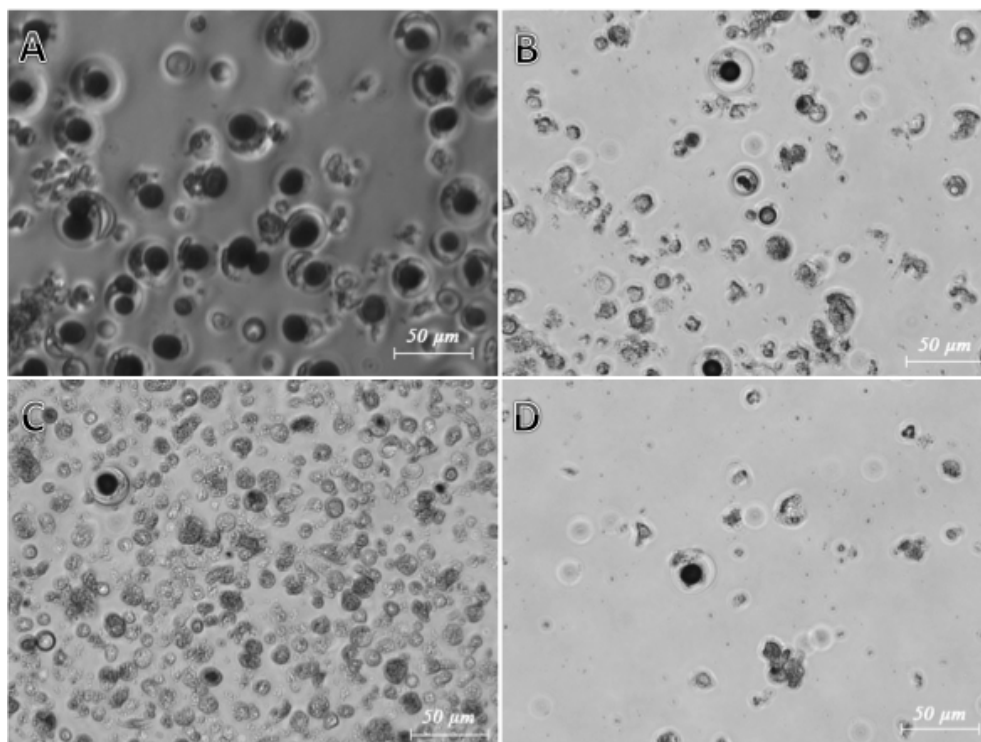


Figura 18 - Células derivadas do tubo renal sacular de *B. tenagophila* Taim em cultura primária.

Células derivadas do tubo renal sacular, cultivadas a 15°C em meio Schneider após 192 horas (A), 336 horas (B), 504 horas (C) e 672 horas (D).

4.4 IMORTALIZAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DO TUBO RENAL SACULAR DE *B. tenagophila* COM GENE DA TELOMERASE

O DNA plasmidial extraído das bactérias GC10, portadoras do plasmídeo pGRN145 contendo o gene da telomerase, foi obtido na concentração de 210 µg/ml. Após o tratamento com a enzima de restrição *EcoRI*, foram obtidos três fragmentos, sendo o maior de 14,0 Kb representando parte do plasmídeo que não foi digerida, um fragmento intermediário com 10,6 Kb representando a construção do plasmídeo e um fragmento menor, de 3,4 Kb, que representa o gene da enzima telomerase transcriptase reversa (Figura 19).

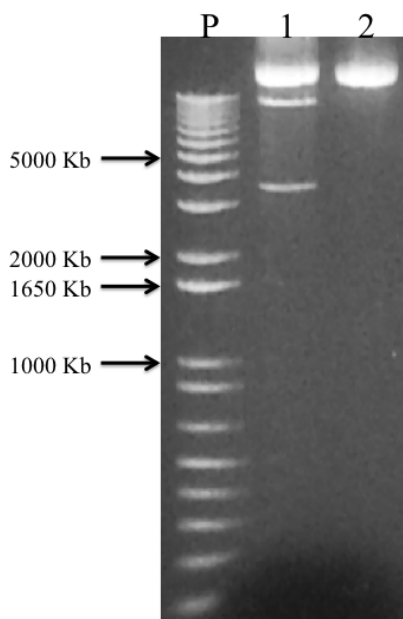


Figura 19 - Digestão enzimática do plasmídeo pGRN 145.

Digestão do plasmídeo pGRN 145 com a enzima *EcoRI*. **P.** Padrão de Massa Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); **1.** Plasmídeo pGRN 145 após digestão com a enzima *EcoRI*, apresentando fragmentos de 14 Kb, 10,6 Kb e 3,4 Kb; **2.** Controle negativo da reação: reação de digestão sem a presença da enzima *EcoRI*.

As células não sobreviveram ao experimento quando foram incubadas com o complexo lipossomo-plasmídeo por 24 horas, sendo essa metodologia descartada. Na interação do mesmo complexo com as células de cultura primária, por um período 5 horas, as células apresentaram viabilidade superior a 90%, sem alteração na morfologia das células (Figura 20 A-F).

Após incubação com o complexo lipossomo-plasmídeo, as células foram mantidas por 24 horas a 26°C e, posteriormente, a temperatura de cultivo ajustada para 15°C. Nessa condição, a cultura de células sobreviveu somente até o período de 185 horas, não sendo encontradas células viáveis após este período (Figura 20 G-I). Comparada com a imortalização natural, a técnica envolvendo o uso de uma membrana lipossômica mostrou-se ineficiente perante as células testadas.

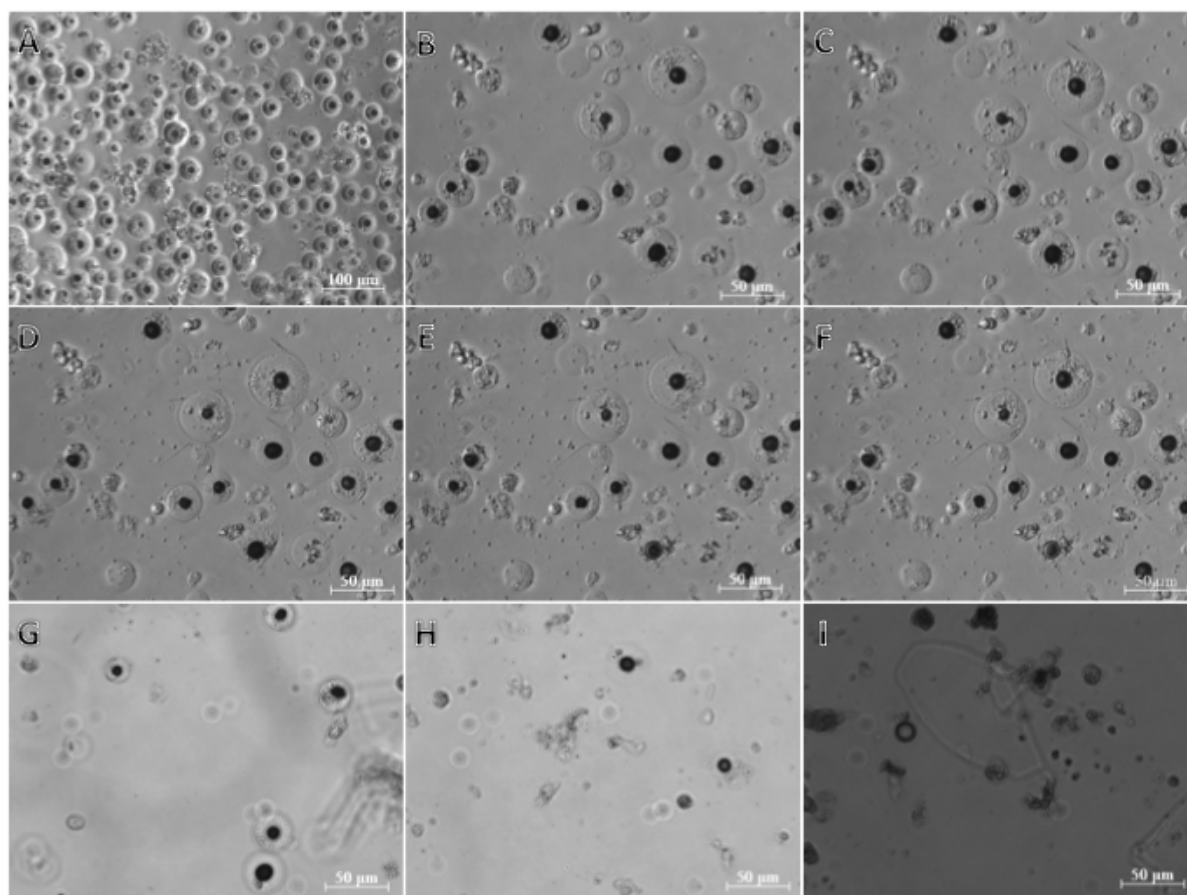


Figure 20 - Acompanhamento da transformação de células cultivadas derivadas do tubo renal sacular de *B. tenagophila*.

Campo representativo da cultura de células derivadas do tubo renal sacular após repique com 36 horas de cultivo (A). Em maior aumento (B), um mesmo campo e foi acompanhado nos tempos de 1h 15m (C), 2h 30m (D), 3h 45m (E) e 5h 00min (F) após início da transformação. Após a transformação a cultura apresentou células com características marcantes da cultura primária após 65 horas (G) e após 113 horas (H) de cultivo. Com 185 horas (I) não foram mais encontradas células sobreviventes.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS EM CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS

Um fragmento com menos de 200 pb foi amplificado de amostras de tecido de caramujos *B. glabrata* e *B. tenagophila* Taim infectados e não infectados, por PCR convencional utilizando iniciadores específicos para o éxon 5 do gene que codifica a proteína FREP-3, *aif* e mioglobina (Figura 21). Os fragmentos foram encontrados tanto em amostras de tecidos qual como em amostras de células em culturas das espécies correspondentes.

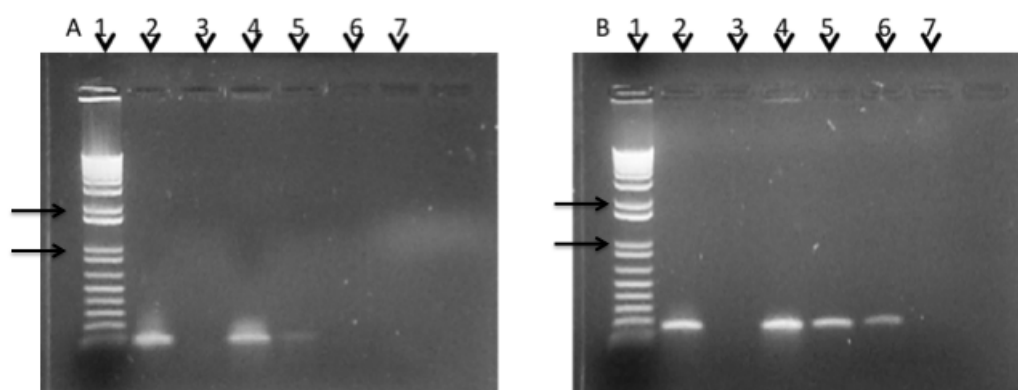


Figura 21 - Amplificação de possíveis transcritos de *B. tenagophila* Taim e *B. glabrata* por PCR convencional.

A – Iniciadores para mioglobina (controle de gene constitutivo). **B** – Iniciadores para FREP-3. **1.** Padrão de Massa Molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); **2.** Controle positivo, cDNA de *B. glabrata*. **3.** Controle negativo (sem DNA). **4-7.** cDNA *B. tenagophila* Taim. **4.** Sem diluir. **5.** Diluição 1:10. **6.** Diluição 1:100. **7.** Diluição 1:1000. As setas superiores indicam fragmentos do tamanho de 2000 Kb e as setas inferiores indicam fragmentos do tamanho de 1000 Kb.

Aif não apresentou boa amplificação em nenhuma das diluições acima, porém tornou-se detectável quando concentrado em 2 e 5 vezes do cDNA de *Biomphalaria* a 1,16µg/µl.

Nos ensaios de qRT-PCR, os alvos mioglobina e *aif* obtiveram eficiências entre 90% e 110%, respectivamente, e $R^2 > 0,985$ para ambos (Figuras 22, 23). Não foi possível estabelecer eficiência dentro dos padrões desejáveis para os iniciadores de FREP-3 e outros iniciadores deverão ser avaliados.

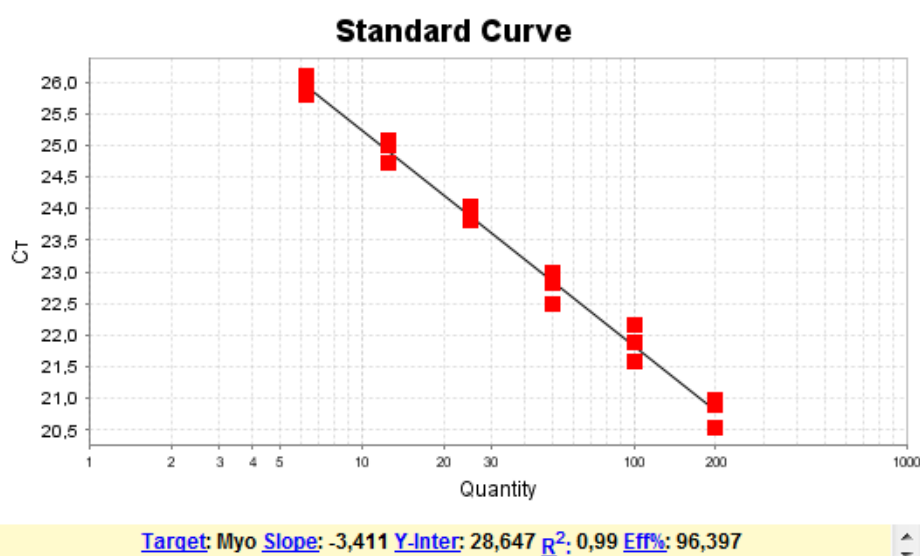


Figura 22 – Curva padrão de eficiência do alvo mioglobina em qRT-PCR de *B. tenagophila* Taim.

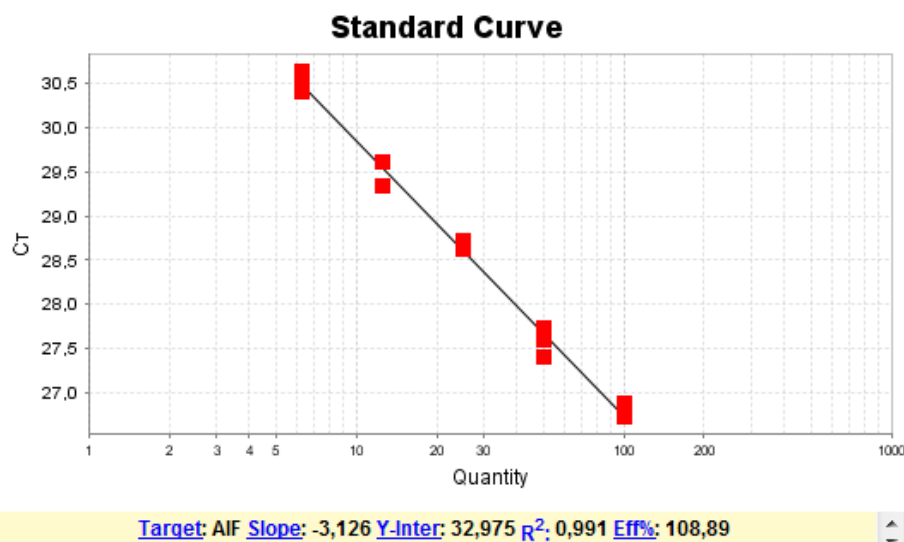


Figura 23 - Curva padrão da eficiência do alvo *aif* em qRT-PCR de *B. tenagophila* Taim.

A partir da padronização da eficiência, foram feitas as corridas envolvendo os alvos estabelecidos e as células em culturas com 24 horas de interação com os esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*. Antes da interação, as células em cultura de *B. glabrata* apresentou uma maior expressão de transcritos *aif* do que as células em cultura de *B. tenagophila* Taim, que tornam-se detectáveis apenas 2-3 cts após (Figura 24).

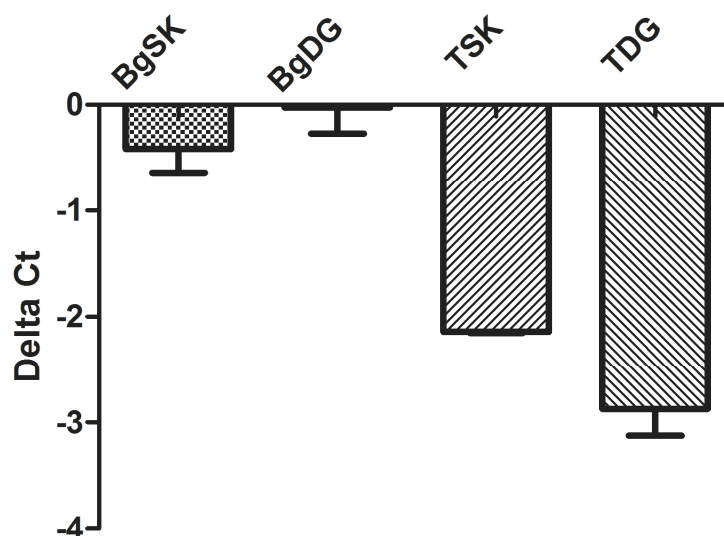


Figure 24 – Expressão natural de *aif*.

Ciclo de *Threshold* onde torna-se detectável a presença dos transcritos de *aif* em células de culturas primárias derivadas de glândula digestiva e tubo renal sacular dos caramujos *B. tenagophila* e *B. glabrata*. A diferença na expressão natural de *aif* entre as duas espécies analisadas é significativa (Valor $P < 0,05$).

A partir do momento em que se considera a interação de células em cultura primária de glândula digestiva e tubo renal sacular de *B. tenagophila* Taim e *B. glabrata* com esporocistos de *S. mansoni*, após 24 horas de contato, a expressão de *aif* aumenta, em torno de 2 vezes, nas células de glândula digestiva de *B. tenagophila*. O mesmo gene fica subexpresso nas culturas de tubo renal sacular de ambas as espécies e na glândula digestiva de *B. glabrata* (Figura 25).

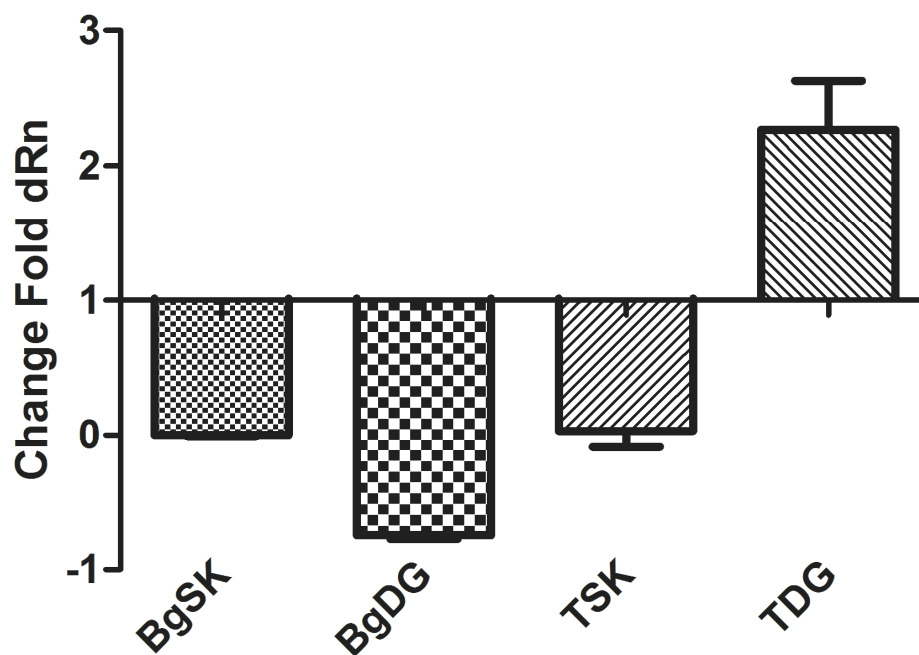


Figure 25 – Expressão relativa de *aif* em células de culturas primárias desafiadas com esporocistos transformados *in vitro*.

A diferença na expressão relativa de *aif* entre as células em culturas primárias derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* Taim e as células derivadas do tubo renal sacular da mesma espécie, e culturas homólogas da espécie *B. glabrata* é significativa (Valor $P < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O filo Molusca representa o segundo maior filo dentro do Reino animal, atrás apenas do filo dos artrópodes. Entretanto, quando comparamos o número de linhagens de células estabelecidas a partir de animais desses filios, disponíveis no mercado, vemos que existem mais de 500 linhagens depositadas na ATCC de células de artrópodes, e atualmente nenhuma linhagem de células de moluscos. As principais dificuldades, apontadas na literatura como um dos motivos para tal diferença entre grupos tão significantes, podem ser listadas como: contaminação com microbiota simbiote; baixa taxa de proliferação das células cultivadas; osmolaridade dos fluidos internos de moluscos e acerto de meio de cultura ideal; desconhecimento das propriedades das matrizes extracelulares de moluscos; desconhecimento do acúmulo de substâncias nocivas nas culturas; suplementação com soro fetal bovino e suas propriedades desconhecidas; desconhecimento da biologia celular destes animais, seus receptores e ligantes; quantidade ideal de células para repique (YOSHINO et al, 2013).

Em uma única oportunidade, Hansen (1976) conseguiu estabelecer a linhagem celular conhecida como *Bge*, derivada de células embrionárias de *B. glabrata*. Ao utilizar células embrionárias, Hansen conseguiu evitar um dos principais problemas para o estabelecimento de células de molusco que é a baixa taxa de proliferação celular. As células embrionárias utilizadas por Hansen apresentavam grande potencial de proliferação e ao final de várias passagens se tornaram uma linhagem celular imortal, através de um processo natural de tumorização (HANSEN, 1976; MCATEER e DAVIS, 1994; YOSHINO e cols 2013).

Além da proliferação, Hansen evitou o grande problema da contaminação das culturas celulares por microrganismos simbiotes dos caramujos. Ao realizar coleta de células em tecido estéril e mergulhado em solução salina contendo ampla variedade de antibióticos, Hansen obteve uma cultura axênica. Ao se trabalhar com explantes oriundos de tecidos de caramujos adultos, a contaminação por microrganismos é um dos grandes motivos de insucesso de inúmeros trabalhos em culturas celulares.

Apesar de ter sido amplamente utilizada em trabalhos de interação com o parasito (BENDER et al, 2002; CASTILLO et al, 2002; HUMPHRIES e YOSHINO, 2008; CASTILHO et al, 2007; YOSHINO et al, 2008; BAYNE, 2009; YOSHINO et al, 2013), atualmente a linhagem *Bge* não é mais encontrada no banco de células da ATCC, ficando restritas a alguns poucos laboratórios que mantem passagens desta linhagem. Odoemelam et al, (2009) realizaram um estudo de cariotipagem das linhagens celulares de *Bge* ainda

remanescentes, descobriram que seu número diploide está alterado do seu normal ($2n=36$), com várias aneuploidias que fazem o número de cromossomos variar entre 63 a 67 durante a metáfase. Apesar desta alteração, essas células representam o único modelo *in vitro* para estudar a interação morfológica e molecular entre *Biomphalaria-S. mansoni* (ODOEMELAM e cols 2009; YOSHINO et al, 2013).

Diferente dos trabalhos de Hansen, a maioria dos trabalhos envolvendo modelos celulares na interação parasito-hospedeiro em esquistossomose recorreu a células derivadas de explantes de caramujos adultos (BAYNE et al, 1975; BENEX e GANTIER, 1975; BENEX e JACOBELLI, 1980; IWANAGA, 2002; BARBOSA et al, 2006b) ou cultivaram, por curtos períodos, os hemócitos circulantes da hemolinfa (BAYNE et al, 1980; LOKER e BAYNE, 1982; DIKKEBOOM et al, 1988; BOEMHLER et al, 1996; HAHN, 2000; HAHN, 2001a; HAHN, 2001b; BAYNE, 2009; YOSHINO e COUSTAU, 2011). Pelo fato de os hemócitos circulantes já serem completamente diferenciados, as culturas de curta duração com hemócitos *in vitro* sobreviveram em média por 2 a 3 dias (YOSHINO et al, 2013).

Como alternativa a curta duração das células derivadas da hemolinfa, o cultivo de regiões hematopoiéticas representa uma opção válida para obtenção de células com atividade de hemócitos, porém sem a desvantagem de estarem completamente diferenciadas e com curto período de sobrevivência em condições *in vitro*. Dentre as regiões hematopoiéticas descritas em moluscos do gênero *Biomphalaria* (PAN, 1958), a região do APO (LIE et al, 1975) recebe uma maior atenção pelos trabalhos que comprovaram sua participação nos processos de resposta e transferência da resistência contra infecção por *S. mansoni* (SMINIA, 1974; BAYNE et al, 1980; LOKER e BAYNE, 1982; JEONG et al, 1983; GRANATH e YOSHINO, 1984; SULLIVAN e SPENCE, 1994; SULLIVAN e SPENCE, 1999; VASQUEZ e SULLIVAN, 2001a; VASQUEZ e SULLIVAN, 2001b; BARBOSA et al, 2006a).

Barbosa et al (2006b) obtiveram uma cultura de células derivadas da região do APO, com características que lembravam aos tipos celulares encontrados circulantes na hemolinfa dos caramujos. Apesar de não ter sido caracterizado plenamente, o modelo apresentado se mostrou eficaz na eliminação de esporocistos transformados *in vitro* (NACIF-PIMENTA et al, 2012). As mesmas células descritas por Barbosa et al, (2006b) foram identificadas em nosso estudo, porém, com uma análise detalhada da anatomia do caramujo antes da dissecação, identificamos essas células como pertencentes à parede do tubo renal sacular (SILVA-NETO, 2012).

A região do APO compreende parte do saco pericárdico e parede do tubo renal sacular, estando o APO localizado entre estas duas estruturas tornando difícil a sua identificação. A retirada de explante exclusivo dessa região é tecnicamente complexa e mesmo, quando realizada com maestria, não garante que o mesmo não leve células de estruturas próximas, como contaminantes. Por essa razão, o a denominação original de órgão produtor de hemócitos (APO) foi substituída, mais recentemente, por região produtora de hemócitos (AZEVEDO et al, 2006; BORGES et al, 2006; SOUZA e ANDRADE, 2006; SILVA et al, 2007; SOUZA e ANDRADE, 2012). Assim, não se pode descartar que culturas celulares anteriores da região do APO contivessem células provenientes da parede do tubo renal sacular (BARBOSA et al, 2006b; NACIF-PIMENTA et al, 2012), explicando a semelhança morfológica encontrada com as culturas descritas em nosso trabalho.

Ao analisar as células em cultura primária derivadas da região mesenquimal do tubo renal sacular, em microscopia eletrônica de transmissão, vemos que as mesmas não apresentam o perfil esperado para as células do APO, conforme descrito por Jeong et al (1983). Tendo em vista a dualidade da classificação morfológica destas células, foram realizados testes de atividade das células derivadas do tubo renal sacular em cultivo primário contra parasitos transformados *in vitro*, seguindo a metodologia utilizada por Nacif-Pimenta et al, (2012). Os resultados negativos obtidos nos testes de interação parasito-hospedeiro deste trabalho levam-nos a acreditar que as culturas celulares utilizadas em ambos os estudos são diferentes, apesar da semelhança morfológica encontrada entre ambas as culturas (APO e tubo renal sacular).

A ausência de uma caracterização mais detalhada nas células da região do APO (Barbosa et al, 2006b) restringem uma comparação mais objetiva com as células obtidas em nosso trabalho. Entretanto, a incompatibilidade ultraestrutural entre as células derivadas da região sacular do tubo renal e as células do APO (JEONG et al, 1983), a ineficácia em matar o parasito *in vitro*, diferente das células em culturas derivadas da região do APO (NACIF-PIMENTA et al, 2012), e as diferentes formas de dissecação e obtenção de explantes de tecidos do caramujo, justificam e corroboram com o argumento de serem culturas distintas. O fato de serem culturas distintas não invalida a hipótese de células do tubo renal sacular estarem presentes nas culturas derivadas da região do APO. Também, a ineficácia em matar os esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro* não descaracteriza o tubo renal sacular como região mesenquimal, mas corrobora com os dados obtidos por Sullivan e Spence (1999), que mostraram que o transplante da região sacular do tubo renal não é capaz de

transferir a resistência para um caramujo susceptível, descartando a possível função hematopoiética deste tecido. Portanto, as células da região sacular do tubo renal não constituem um modelo adequado para o estudo da interação *Biomphalaria/S. mansoni in vitro*.

Em sua maioria, trabalhos utilizando culturas celulares de molusco na interação *Biomphalaria/S. mansoni* foram baseados em hemócitos circulantes e em tecidos considerados produtores de hemócitos – APO e coração – sem nenhuma evidência contundente de que a produção de hemócitos seja centralizada em algum destes órgãos (AZEVEDO et al, 2006; BORGES et al, 2006; SOUZA e ANDRADE, 2006; SILVA et al, 2007; SOUZA e ANDRADE, 2012). Trabalhos como o de Bayne (1975) e Iwanaga (2002), que obtiveram células ameboides e tipo-fibroblastos a partir do ovotestis, corroboram para uma teoria multicêntrica de produção de hemócitos, já considerada por Pan (1958), em um estudo anatômico e histológico completo de caramujos *B. glabrata*.

Culturas celulares derivadas da glândula digestiva de quem já foram obtidas com sucesso em estudos anteriores (BENEX e GANTIER, 1975; BENEX e JACOBELLI, 1980; ROBLEDO e CAJARAVILLE, 1997; MITCHELLMORE et al, 1998; LE PENNEC e LE PENNEC, 2001; FAUCET et al, 2003), mas sempre com grande dificuldade devido as constantes contaminações por microrganismos presentes no muco e nas superfícies dos ductos digestivos (ROBLEDO e CAJARAVILLE 1997; GOMEZ-MENDIKUTE et al, 2005). Entretanto, a glândula digestiva pode ser facilmente identificada, é de fácil acesso e dissecação. Pelas facilidades na obtenção de explantes e pelas características morfológicas de suas células, nesse trabalho a cultura de células derivadas da glândula digestiva foi escolhida como segundo grupo de análise da interação entre células do hospedeiro invertebrado com os esporocistos transformados *in vitro*.

Dos trabalhos envolvendo culturas de células derivadas da glândula digestiva, nenhum havia apontado para a geração de células de defesa ou com formato parecido a um de seus precursores, nem havia sido relatada nenhuma evidência da presença de hemócitos neste tecido. No trabalho de Sullivan e Spence (1999), que aponta a propriedade não hematopoiética da porção sacular do tubo renal, o transplante de glândula digestiva mostrou-se igualmente ineficaz. Somado às outras evidências na literatura, a caracterização ultraestrutural das células em culturas primárias derivadas da glândula digestiva, a princípio, não apontou nenhuma característica típica de hemócitos. As células apresentavam grânulos

que foram associados à uma função secretora, como seria esperado de células de uma glândula.

A participação da glândula digestiva no ciclo evolutivo do *S. mansoni* se dá a partir do 18º dia após a penetração da larva miracídio, quando os esporocistos secundários migram para os espaços intertubulares da glândula digestiva (PAN, 1965). Para o sucesso da infecção no hospedeiro invertebrado, uma das formas de evasão e sobrevivência do parasito é através da modulação da resposta do sistema interno de defesa dos caramujos, para que a larva continue sendo compatível com seu hospedeiro (VAN DER KNAAP e LOKER, 1991). Assim, toda a análise de literatura nos levou a considerar a glândula digestiva como uma potencial cultura controle para a não atividade contra os esporocistos primários de *S. mansoni*.

Entretanto, ao ser submetida aos testes de interação *in vitro* com esporocistos de *S. mansoni*, em condições livres de soro fetal bovino, as células derivadas da glândula digestiva, oriundas da linhagem resistente Taim, mostraram-se reativas, e capazes de destruir os esporocistos de *S. mansoni* (Figura 12). A reatividade da cultura foi estatisticamente diferente se comparada à cultura homóloga obtida dos caramujos *B. glabrata*, sabidamente susceptíveis ao *S. mansoni*. Tal fato é um indicio de que a destruição dos esporocistos é possivelmente uma ação do sistema interno de defesa e não uma lise digestiva causada pela liberação de enzimas proteolíticas no meio de cultura por essas células. Esse ponto é reforçado pelo resultado aparentemente semelhante obtido quando foi utilizado um coquetel antiproteases no meio de cultura para proteção dos esporocistos.

A partir dos resultados de reatividade das células em culturas primárias derivadas da glândula digestiva contra os esporocistos primários de *S. mansoni*, reanalisamos os perfis ultraestruturais obtidos anteriormente (SILVA-NETO et al, 2014). Foi identificado um tipo celular (Figura 5C – artigo anexo) de características semelhantes a eosinófilos de vertebrados. Em análises morfológicas prévias, já havíamos identificado um perfil acidófilo em células retiradas de culturas derivadas da glândula digestiva, compatível com os grânulos eosinofílicos de hemócitos descritos em moluscos (CUETO et al, 2015).

Tendo em vista a presença de células com perfis de hemócitos nas culturas primárias de células derivadas da glândula digestiva, a identificação de moléculas associadas a ação de hemócitos poderiam corroborar com os resultados encontrados. Nesse ponto, Larson et al (2014) apontaram que, um dos transcritos superexpressos em hemócitos provenientes de caramujos resistentes à infecção por *S. mansoni*, é o *aif*, responsável pela síntese de uma

proteína com função de ativação e proliferação tanto de macrófagos de vertebrados quanto de hemócitos, incluindo exemplos no filo dos moluscos (ZHANG et al, 2013; LARSON et al, 2014).

Em nosso trabalho, a expressão de *aif*, em resposta ao desafio com esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro*, foi maior em células de culturas primárias derivadas da glândula digestiva de *B. tenagophila* Taim, do que nas culturas do tubo renal sacular de caramujos da mesma espécie, e que as culturas desafiadas derivadas do tubo renal sacular e glândula digestiva de *B. glabrata*. Se *aif* tem papel importante na ativação dos hemócitos, e são estes os principais efetores da resistência e resposta contra *S. mansoni* nos hospedeiros invertebrados (BAYNE, 2009), a superexpressão deste gene nos caramujos *B. tenagophila* Taim reforça a diferença dos fenótipos resistente e susceptível, no caso representados pelos caramujos *B. glabrata*. Diferente de outras variedades de caramujos resistentes à infecção por *S. mansoni* utilizadas em estudos da interação parasito hospedeiro invertebrado em esquistossomose, *B. tenagophila* Taim constitui um modelo único de resistência absoluta em uma espécie não refratária à infecção por *S. mansoni* (NEGRÃO-CÔRREA et al, 2012).

Quando comparamos a expressão relativa de *aif* nas culturas celulares primárias derivadas da glândula digestiva e do tubo renal sacular de *B. tenagophila* Taim, antes e após o desafio com esporocistos de *S. mansoni* transformados *in vitro* observamos que não há diferença significativa no nível de expressão antes da interação; mas após, as células derivadas da glândula digestiva, que apresentam a capacidade de destruir os esporocistos nos ensaios *in vitro*, apresentam um nível de expressão muito acima da observada para células derivadas do tubo renal sacular. Este resultado corrobora com nossas observações que apontam a presença de hemócitos granulócitos, com perfil tipo-eosinófilo, nas culturas derivadas da glândula digestiva.

Nas culturas derivadas do tubo renal sacular, não foi encontrada qualquer célula com perfil ultraestrutural semelhante a um hemócito; as culturas não foram reativas nos ensaios de interação com o parasito. O perfil de expressão de *aif*, que aponta atividade e proliferação de hemócitos, desta cultura corrobora com o perfil morfológico encontrado, sendo mais uma evidência da ausência de hemócitos nessa região.

As semelhanças encontradas entre as células das culturas primárias derivadas do tubo renal sacular com as células obtidas por Barbosa et al (2006b) em culturas primárias da região do APO, nos conduziram a realizar os experimentos de imortalização com esta cultura. Além

da semelhança com as células da região do APO, pesaram a favor a baixa incidência de contaminações e a capacidade em estender o cultivo a um prazo maior do que as demais culturas testadas. Entretanto, as tentativas de imortalização química e natural mostraram-se infrutíferas e, à luz dos novos conhecimentos obtidos neste trabalho, passam a ser infundadas, uma vez que as culturas celulares derivadas do tubo renal sacular são inertes à presença do parasito.

As culturas celulares primárias derivadas da glândula digestiva surgem como novas candidatas ao processo de imortalização. Nossos primeiros resultados compartilham as dificuldades já demonstrada em outros estudos para a imortalização de linhagens celulares de moluscos adultos (YOSHINO et al, 2013). Assim, não foi possível o estabelecimento de culturas viáveis com tempo de cultivo prolongado, uma vez que as culturas tornam-se contaminadas ao longo do tempo. A viabilidade dessa cultura em prazos mais curtos, até 36 horas, mostra-se bastante satisfatória, mas há a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para garantir a esterilidade das culturas em longos períodos. À luz dos novos conhecimentos obtidos no presente trabalho, a cultura de células derivadas da glândula digestiva mostra alto potencial para o desenvolvimento de uma linhagem celular imortalizada capaz de interagir com *S. mansoni in vitro*.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo teve como meta caracterizar e explorar modelos *in vitro* para se estudar a interação *Biomphalaria/S. mansoni*, gerando um modelo de cultivo celular de resistência ao parasito, baseado em um caramujo de resistência absoluta contra o *S. mansoni*, linhagem geográfica Taim de *B. tenagophila*.

Inicialmente, era proposta deste trabalho o emprego de caramujos da espécie *B. tenagophila*, sendo a linhagem geográfica Taim a representante do fenótipo resistente e a linhagem geográfica Joinville, de mesma espécie, representante do fenótipo susceptível, seguindo o que fora descrito por Rosa et al, (2005). Entretanto, ao longo dos experimentos realizados, foi constatada que a linhagem geográfica Joinville apresentava uma baixa susceptibilidade à infecção pela cepa LE de *S. mansoni* (inferior a 10%), sendo por esta razão, substituída a linhagem Joinville de *B. tenagophila* pela espécie *B. glabrata*, altamente susceptível.

Das culturas celulares primárias estabelecidas e estudadas neste trabalho, as células derivadas da glândula digestiva apresentaram melhores perspectivas para o desenvolvimento de novos modelos. As células dessas culturas foram capazes de eliminar esporocistos primários de *S. mansoni* em interações *in vitro*. As análises de expressão de AIF após os ensaios de interação com o parasito também demonstraram uma significativa superexpressão deste alvo nas células derivadas da glândula digestiva, o que pode significar algum envolvimento do sistema interno de defesa. Entretanto há um longo caminho a ser percorrido até o completo desenvolvimento deste modelo celular, uma vez que são comuns problemas com contaminação e deficiência na proliferação celular, que demandam o estabelecimento de melhores condições de cultivo.

Apesar das semelhanças morfológicas encontradas entre as células em culturas primárias derivadas do tubo renal sacular e as células em culturas primárias da região do APO, obtidas por Barbosa et al (2006b), as mesmas se diferenciaram quanto ao perfil de atividade. As células derivadas do tubo renal sacular não foram efetivas na destruição de esporocistos de *S. mansoni* como visto anteriormente com as células da região do APO (NACIF-PIMENTA et al, 2012), além de não apresentarem, em nenhum momento, o perfil ultraestrutural típico de um hemócito circulante (CAVALCANTI et al, 2011). Diferente das culturas do tubo renal sacular, as culturas derivadas da glândula digestiva apresentaram atividade letal contra os esporocistos e, feita uma reanálise dos dados de ultraestrutura,

ficaram evidenciadas células com perfil idêntico à granulócitos, já descritos em outras espécies de moluscos. Pela pesquisa na literatura científica sobre o tema, este é o primeiro relato da presença de hemócitos na glândula digestiva de caramujos *Biomphalaria* com atividade letal contra esporocistos primários de *S. mansoni*.

Os modelos celulares deverão ser usados intensivamente para transcriptoma e proteoma em estudos já em curso pelo nosso grupo. Por outro lado serão feitas tentativas visando estabelecer uma linhagem celular imortal a partir de células capazes de interagir com *S. mansoni in vitro*, principalmente oriundas da glândula digestiva. Novos testes de atividade contra esporocistos primários serão conduzidos nas demais culturas já caracterizadas.

REFERÊNCIAS

- Adema CM, Hertel LA, Miller RD, Loker ES. **A family of fibrinogen-related protein that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94 (16): 8691-8696
- Azevedo CM, Borges CMC, Andrade ZA. **Changes induced in *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) following trials for artificial stimulation of its internal defense system.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 199-203.
- Barbosa CS, Favre TC, Amaral RS, Pieri OS. **Epidemiologia e Controle da Esquistossomose Mansoni** . In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. (Org.). *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ 2008; 965-1008.
- Barbosa L, Caldeira RL, Carvalho OL, Vidigal TH, Jannotti-Passos LK, Coelho PMZ. **Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*.** *Parasite Immunol* 2006a; 28(5): 209-212.
- Barbosa L, Silva LM, Coelho PMZ, Santos SR, Fortes-Dias CL. **Primary culture of the region of the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006b; 101(6): 639-643.
- Barbosa L. **Cultivo primário do órgão hematopoiético de moluscos do gênero *Biomphalaria*: caracterização morfológica e funcional das células (tese de doutorado).** Belo Horizonte (MG): UFMG; 2007.
- Barracco MA, Steil AA, Gargioni R. **Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 88(1): 73-83.
- Bayne CJ, Owczarzak A, Noonan WE. **In vitro cultivation of cells and a microsporidian parasite of *biomphalaria glabrata* (pulmonata: basommatophora).** *Ann N Y Acad Sci* 1975; 266: 513-527.

Bayne CJ, Buckley PM, Dewan PC. **Macrophagelike hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* in vitro.** *J Parasitol* 1980a; 66(3): 413-419.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments**. *Clin Chem*. 2009; 55(4): 611-22.

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

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

Castillo MG, Yoshino TP. **Carbohydrate inhibition of *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell adhesion to primary sporocysts of *Schistosoma mansoni***. *Parasitology*. 2002; 125(Pt 6): 513–525.

Castillo MG, Wu XJ, Dinguirard N, Nyame AK, Cummings RD, Yoshino TP. **Surface membrane proteins of *Biomphalaria glabrata* embryonic cells bind fucosyl determinants on the tegumental surface of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts**. *J. Parasitol*. 2007; 93: 832–840.

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

Chernin E. **Behavioral responses of miracidia of *Schistosoma mansoni* and other trematodes to substances emitted by snail**. *J Parasitol* 1970; 56: 287-296.

Chernin E. **Penetrative activity of *Schistosoma mansoni* miracidia stimulated by exposure to snail-conditioned water**. *J Parasitol* 1972; 58: 209-212.

Chernin E. **Some host-finding attributes of *Schistosoma mansoni* miracidia.** *Am J Trop Med Hyg* 1974; 23: 320.

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

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

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

Cox MM, Hollister JR. **FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells.** *Biologicals* 2009; 37(3): 182–189.

Cueto JA, Rodriguez C, Vega IA, Castro-Vazquez A. **Immune Defenses of the Invasive Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): Phagocytic Hemocytes in the Circulation and the Kidney.** *PLoS One* 2015; 10(4): e0123964.

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

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

Fallon AM, Gerenday A. **Ecdysone and the cell cycle: investigations in a mosquito cell line.** *J Insect Physiol.* 2010; 56(10): 1396-1401.

- Faucet J, Maurice M, Gagnaire B, Renault T, Burgeot T. **Isolation and primary culture of gill and digestive gland cells from the common mussel *Mytilus edulis***. *Meth Cell Sci*. 2003; 25(3-4): 177-184.
- Fernandez MA. **Compatibilidade entre *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 e *Biomphalaria* Preston, 1910**. *Tópicos em Malacologia – Ecos do XVIII EBRAM*. 2007; 259-266.
- Fryer SE, Bayne CJ. **Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components**. *Dev Comp Immunol* 1996; 20(1): 23-37.
- Freshney RI. **Culture of Animal Cells: A manual of basic technique**. Hoboken: John Wiley & Sons. 5^a edição 2005: 642p.
- Granath WO JR, Yoshino TP. ***Schistosoma mansoni*: passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata***. *Exp Parasitol* 1984; 58(2): 188-193.
- Gunsalus KC, Piano F. **RNAi as a tool to study cell biology: building the genome-phenome bridge**. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17(1): 3-8.
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. **Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation**. *Dev Comp Immunol* 2000; 24(6-7): 531-541.
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. **Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species**. *J Parasitol* 2001a; 87(2): 292-299.
- Hahn UK, Bender RC, Bayne CJ. **Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata***. *J Parasitol* 2001b; 87(4): 778-785.

- Hanington PC, Forsys MA, Dragoo JW, Zhang SM, Adema CM, Loker ES. **Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection.** *PNAS* 2010; 49(107): 21087-21092.
- Hansen E. **A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): Establishment and characteristics.** In: K. Maramorosch (ed.). *Invertebrate tissue culture: Research applications*. New York: New York Academic Press 1976; 75–99.
- Harris KR. **The fine structure of encapsulation in *Biomphalaria glabrata*.** *Ann N Y Acad Sci* 1975; 266: 446-464.
- Humphries JE, Yoshino TP. **Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*.** *Dev Comp Immunol*. 2008; 32(5): 554–562.
- Iwanaga Y. **In vitro Cultivation of Cells from Ovotestis Tissue of Pigmented *Biomphalaria glabrata*.** *Zoolog Sci* 2002; 19(3): 271-274.
- Jeong KH, Lie KJ, Heyneman D. **The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*.** *Dev Comp Immunol* 1983; 7(2): 217-228.
- Johnston LA, Yoshino TP. **Analysis of lectin and snail plasma binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*.** *Parasitology* 1996; 112: 469-479.
- Johnston LA, Yoshino TP. **Larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors.** *J Parasitol* 2001; 87(4): 786-793.
- Kechemir N, Combes C. **Up to what point are cercariogenesis and sporocystogenesis reversible in schistosomes.** *J Helminthol* 1988; 62(3): 261-264.
- Larson MK, Bender RC, Bayne CJ. **Resistance of *Biomphalaria glabrata* 13-16-R1 snails to *Schistosoma mansoni* PR1 is a function of haemocyte abundance and constitutive levels of specific transcripts in haemocytes.** *Int J Parasitol* 2014; 44: 343-353.

- Le Pennec G, Le Pennec M. **Acinar primary cell culture from the digestive gland of *Pecten maximus* (L.): an original model for ecotoxicological purposes.** *J Exp Mar Biol Ecol.* 2001; 259(2): 171–187.
- Lenzi HL, Jurberg AD, Coelho PMZ, Lenzi JA. **Migração e desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo.** In: CARVALHO OS, COELHO PMZ, LENZI HL. (Org.). *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ 2008; 147-160.
- Lie KJ, Heyneman D, Yau P. **The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*: fine structure.** *J Parasitol* 1975; 61: 574-576.
- Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods.* 2001; 25(4): 402-8.
- Lockyer AE, Spinks J, Kane RA, Hoffmann KF, Fitzpatrick JM, Rollinson D, Noble LR, Jones CS. ***Biomphalaria glabrata* transcriptome: cDNA microarray profiling identifies resistant- and susceptible-specific gene expression in haemocytes from snail strains exposed to *Schistosoma mansoni*.** *BMC Genomics* 2008; 9(634): 17.
- Loker ES, Bayne CJ. ***In vitro* encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*.** *Am J Trop Med Hyg* 1982; 31: 999-1005.
- Loverde PT, Gherson J, Richards CS. **Ameboytic accumulations in *Biomphalaria glabrata*: fine structure.** *Dev Comp Immunol* 1982; 6(3): 441-449.
- Mathur G, Sanchez-Vargas I, Alvarez D, Olson KE, Marinotti O, James AA. **Transgene-mediated suppression of dengue viruses in the salivary glands of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*.** *Insect Mol Biol.* 2010; 19(6): 753–763.
- Martins-Souza RL, Pereira CA, Coelho PM, Negrão-Corrêa D. **Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain.** *Parasitol Res* 2003; 91(6): 500-507.

Martins-Souza RL, Pereira CA, Martins-Filho OA, Coelho PMZ, Corrêa A JR, Negrão-Corrêa D. **Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 37-44.

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

Mattos ACA, Kusel JR, Pimenta PFP, Coelho PMZ. **Activity of praziquantel on in vitro transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006. 101: 283-287.

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

McAteer JA, Davis JM. **Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines.** In: Davis JM. **Basic cell culture: a practical approach.** *Oxford University Press.* Oxford: 1994; capítulo 4: 93-148.

Mitchelmore CL, Birmelin C, Livingstone DR, Chipman JK. **Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the “Comet” assay.** *Ecotoxicol Environ Saf.* 1998; 41(1): 51–58. □

Moraes AM, Jorge SA, Astray RM, Suazo CA, Calderón Riquelme CE, Augusto EF, Tonso A, Pamboukian MM, Piccoli RA, Barral MF, Pereira CA. ***Drosophila melanogaster* S2 cells for expression of heterologous genes: From gene cloning to bioprocess development.** *Biotechnol Adv.* 2012; 30(3): 613–628.

Nacif-Pimenta R, Mattos ACA, Orfanó AS, Barbosa L, Pimenta PFP, Coelho PMZ. ***Schistosoma mansoni* in susceptible and resistant snail strains *Biomphalaria tenagophila*: in vivo tissue response and in vitro hemocyte interactions.** *PLOS one.* 2012; 7(9) [on line]: 1-12.

Negrão-Corrêa D, Mattos ACA, Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Coelho PMZ. **Interaction of *Schistosoma mansoni* Sporocysts Hemocytes of *Biomphalaria***. *J Parasitol Res* [on line]. 2012; 1-6.

Odoemlam E, Raghavan N, Miller A, Bridger JM, Knight M. **Revised karyotyping and gene mapping of the *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line**. *Int J Parasitol*. 2009; 39 (6): 675–681.

Oliver L, Mao CP. **The early larval stages of *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) in the snail host, *Australorbis glabratus* (Say, 1918)**. *J Parasitol* 1949; 35: 267-275.

Organização Mundial Da Saúde (OMS). **Schistosomiasis**. In: *Fact sheet*. Fevereiro 2016. Acesso em: 07/07/2016. Disponível: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>.

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

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

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

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

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

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

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

Pereira CAJ, Martins-Souza RL, Corrêa Jr A, Coelho PMZ, Negrão-Corrêa D. **Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts**. *Parasit Immunol*. 2008; 30: 610-619.

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

Gómez-Mendikute A, Elizondo M, Venier P, Cajaraville MP. **Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro**. *Cell Tiss Res*. 2005; 321(1): 131–140.

Y, Cajaraville MP. **Isolation and morphofunctional characterization of mussel digestive gland cells in vitro**. *Eur J Cell Biol*. 1997; 72(4): 362–369.

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

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

Salamat Z, Sullivan JT. **In vitro mitotic responses of the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* to extracts of *Schistosoma mansoni***. *J Parasitol* 2008; 94(5): 1170-1173.

Salamat Z, Sullivan JT. **Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca)**. *Dev Comp Immunol* 2009; 33(6): 725-727.

- Silva TM, Souza SS, Almeida TF, Andrade ZA. **Ki-67 is expressed in multiplying forms of *Schistosoma mansoni*, but not in snail host tissues.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102(5): 651-653.
- Silva-Neto A. **Cultivo primário e caracterização de células derivadas de diferentes tecidos de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835).** Dissertação de Mestrado. Belo Horizonte (MG): CPqRR; 2012.
- Sminia T. **Haematopoiesis in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and autoradiography.** *Cell Tissue Res* 1974; 150(4): 443-454.
- Sminia T. **Blood cell types and blood cell formation I gastropod molluscs.** *Dev Comp Immunol* 1983; 7: 665-668.
- Souza SS, Andrade ZA. **On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(1): 213-218.
- Souza SS, Andrade ZA. **The significance of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(5): 598-603.
- Standen OD. **The effect of temperature, light, and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1951; 45(2): 225-241.
- Sullivan JT. **Long-term survival of heterotopic allografts of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata).** *Trans Am Microsc Soc* 1990; 109: 52-60.
- Sullivan JT, Spence JV. **Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte-producing organ.** *J Parasitol* 1994; 80(3): 449-453.
- Sullivan JT, Spence JV. **Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*.** *J Parasitol* 1999; 85(6): 1065-1071.

- Sullivan JT, Pikios SS, Alonzo AQ. **Mitotic responses to extracts of miracidia and cercáriae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*.** *J Parasitol* 2004; 90(1): 92-96.
- Sullivan JT, Castro L. **Mitotic arrest and toxicity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) exposed to colchicine.** *J Invertebr Pathol* 2005; 90(1): 32-38.
- Sullivan JT. **Mitotic responses to injected extracts of larval and adult *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*: effects of dose and colchicine treatment.** *J Parasitol* 2007; 93(1): 213-215.
- Théron A, Coustau C. **Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*?** *J Helminthol* 2005; 79(3): 187-191.
- van der Knaap WP, Loker ES. **Immune mechanisms in trematode-snail interactions.** *Parasitol Today* 1990; 6(6): 175-182.
- Vasquez RE, Sullivan JT. **Effect of miracidial dose on adoptively transferred resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*.** *J Parasitol* 2001a; 87(2): 460-462.
- Vasquez RE, Sullivan JT. **Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*.** *Dev Comp Immunol* 2001b; 25(7): 561-564.
- Vidigal THDA, Caldeira RL, Simpson AJG, Carvalho OS. **Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(1): 57-66.
- Yoshino TP, Dinguirard N, Kunert J, Hokke CH. **Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*.** *Gene*. 2008; 411(1-2): 46-58.

Yoshino TP, Bickham U, Bayne CJ. **Molluscan cells in culture: primary cell cultures and cell lines.** *Can J Zool* 2013; 91(6): 391-404.

Yoshino, TP.; Coustau, C. **Immunobiology of *Biomphalaria*-Trematode Interactions.** In: TOLEDO, R.; FRIED, B., editors. *Biomphalaria snails and larval trematodes*. Springer; New York: 2011; 159-189.

Zhang Y, Li J, Yu F, He X, Yu Z. **Allograft inflammatory factor-1 stimulates hemocyte immune activation by enhancing phagocytosis and expression of inflammatory cytokines in *Crassostrea gigas*.** *Fish Shellfish Immunol.* 2013; 34: 1071– 1077.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Artigo publicado no periódico *Micron* (2014).

Micron 67 (2014) 37–49



Contents lists available at ScienceDirect

Micron

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micron

Ultrastructural characterization of cells in primary cultures from different adult tissues of *Biomphalaria tenagophila* TAIM, a strain that is absolutely resistant to *Schistosoma mansoni* infection



Aristeu Silva-Neto^{a,b}, Luciana Maria Silva^b, Luiz Carlos Alves^c, Fábio André Brayner^c, Consuelo Latorre Fortes-Dias^{b,*}, Paulo Marcos Zech Coelho^a

^a Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (CPqRR/FIOCRUZ), Avenida Augusto de Lima 1715, Barro Preto, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Rua Conde Pereira Carneiro 80, Gameleira, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ), Avenida Professor Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2013

Received in revised form 29 May 2014

Accepted 30 May 2014

Available online 25 June 2014

Keywords:

Biomphalaria

Cell culture

Ultra structure

Schistosomiasis

Invertebrate models

ABSTRACT

The etiological agent of schistosomiasis in Brazil, *Schistosoma mansoni*, requires an obligatory passage through *Biomphalaria* snails to complete its life cycle. In these intermediate hosts, interaction with the parasite is mediated by humoral factors and hemocytes by mechanisms that are not yet fully understood. Extant studies exploring these processes are usually conducted through experimental infection of *Biomphalaria* with *S. mansoni* miracidia. Thus, tissue-derived cultures of *Biomphalaria* may be useful in increasing the understanding of that interaction at cellular level. However, in the absence of morphological characterization of those cells in culture, the application of such models is delayed. In the present work, we cultured different tissues of *B. tenagophila*, the second most important host of *S. mansoni* in Brazil, using a strain that is naturally and absolutely resistant to *S. mansoni* infection. This decision was driven by the view that this strain might be provided with the most effective response against parasite infection. Primary cultures were successfully established from nine *Biomphalaria* tissues and the respective cells in culture were ultra structurally described. Attention was particularly devoted to cells derived from mantle cavity and kidney tissues. Although they have been considered important centers for hemocyte production in *Biomphalaria*, no detailed cell characterization is available in the pertinent literature. Herein, kidney-derived cells partially shared hematoblast characteristics. Moreover, under optical microscopy, kidney cells in culture were very similar to those derived from amebocyte-producing organ (APO) cultures, which have been recently shown to be capable of eliminating *S. mansoni* sporocysts *in vitro*. Based on the close resemblance of those cultures and their anatomical proximity inside the mantle cavity, we suggest the effective participation of *Biomphalaria* kidney cells in hematopoiesis and in host response to *S. mansoni* infection.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Schistosomiasis is a chronic, parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma* Weiland 1858 that is present in 77 countries world-wide. The World Health Organization estimates

that 230 million people require treatment every year. In Americas, schistosomiasis is caused by *Schistosoma mansoni* parasites, which have a passage through *Biomphalaria* snails as their intermediate hosts. Among the eleven species of *Biomphalaria* described in Brazil, only three have been found infected by *S. mansoni* in nature: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) and *Biomphalaria straminea* (Dunker, 1848). *B. tenagophila* is the second most important for schistosomiasis transmission in the country, especially in the South and Southeast regions [Paraense, 2001; Caldeira et al., 2009; Negrão-Corrêa et al., 2012].

The success or failure of *S. mansoni* infection depends on many factors, including environmental conditions, and genetic and physiological compatibility between the parasite and the invertebrate

* Corresponding author. Tel.: +55 31 33144774.

E-mail addresses: aristeu@cpqrr.fiocruz.br (A. Silva-Neto), luciana.silva@funed.mg.gov.br (L.M. Silva), icalves@cpqam.fiocruz.br (L.C. Alves), brayner@cpqam.fiocruz.br (F.A. Brayner), consuelo.latorre@funed.mg.gov.br, consuelo.latorre@yahoo.com.br (C.L. Fortes-Dias), coelhohpm@cpqrr.fiocruz.br (P.M.Z. Coelho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2014.05.011>

0968-4328/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

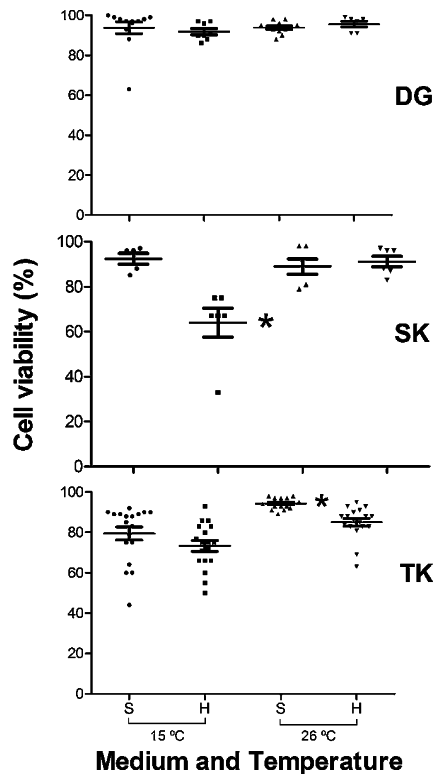


Fig. 1. Viability of tissue-derived cells from *B. tenagophila* Taim cultured with Hansen's (H) and Schneider's (S) media after 36 h in culture, at two different temperatures. The digestive gland (DG) exemplifies the results obtained for all other tissues, with the exception of saccular (SK) and tubular kidney (TK). * indicates statistical difference ($p < 0.05$).

host. The infection is more successful when both the parasite and the host come from the same location [Paraense and Correa, 1963a,1963b]. The match (compatibility) or mismatch (incompatibility) in host–parasite interactions is a result of two complex processes: (i) the ability of the internal defense system (IDS) of the host to recognize self and non-self, and to destroy non-self; and (ii) the ability of the parasite to evade from the host response [Théron and Coustau, 2005; van der Knaap and Loker, 1990; Bayne, 2009]. On susceptible snails, there is a weak hemocyte reaction around the sporocysts that does not interfere with the parasite development [Nacif-Pimenta et al., 2012]. In contrast, in resistant strains, the hemocytes recognize, encapsulate and destroy the invading parasites in a few hours, impairing the completion of their life cycle in the host [Nacif-Pimenta et al., 2012].

The IDS, which plays a central role in the parasite–host interaction, is composed of two elements—humoral factors and cells. Humoral factors are lectins, proteins and reactive molecules, which are able to enhance cellular activity, as well as recognize or destroy pathogens. The cells, also known as hemocytes, are able to phagocytose, encapsulate and produce humoral factors [Hahn et al., 2001a,2001b; Bayne et al., 1980a, 1980b; Loker and Bayne, 1982]. Findings of several previous studies suggest that a special organ, known as APO (Amebocyte Producing Organ) is responsible for the production of hemocytes in *Biomphalaria*, akin to the bone marrow

in vertebrates [Lie et al., 1975; Jeong et al., 1983; Sullivan, 1990; Sullivan and Spence, 1994, 1999; Sullivan et al., 2004; Vasquez and Sullivan, 2001]. The APO region is a tiny agglomerate of cells localized in the reno-pericardial complex in the mantle cavity of *Biomphalaria* sp. that is hard to identify and dissect, even under microtome [Souza and Andrade, 2006, 2012]. The suggestion that the APO participates in IDS has been corroborated by descriptions of cell proliferation in APOs from infected *Biomphalaria* [Sullivan et al., 2004] and by an increased resistance to *S. mansoni* in susceptible snails after transplantation of APOs from resistant ones [Sullivan, 1990; Sullivan and Spence, 1994, 1999; Barbosa et al., 2006a]. Ultrastructural studies revealed that APO cells from *B. glabrata* share the same characteristics with hemoblasts from the bone marrow of vertebrates, namely abundant polyribosomes, prominent nucleolus, cytoplasmic organelles limited to mitochondria, and absence of cytoplasmic granules and lysosomal bodies [Jeong et al., 1983]. Cells from primary APO-derived cultures from the Taim strain of *B. tenagophila* were able to eliminate *S. mansoni* sporocysts in vitro, whereas those from a susceptible strain reacted weakly against *S. mansoni* sporocysts and failed to recognize the parasite as non-self [Nacif-Pimenta et al., 2012]. Primary cell cultures from other *Biomphalaria* organs—such as kidney, heart, digestive gland and ovotestis—were previously obtained, but were examined by optical microscopy only, and have thus not been fully characterized, except for cell shape and substrate adherence [Bayne et al., 1975; Benex and Gantier, 1975; Benex and Jacobelli, 1980; Hansen, 1976; Iwanaga, 2002; Barbosa et al., 2006b]. A more comprehensive characterization of *Biomphalaria* sp. cells is unavailable in the literature and, thus far, a single cell line (Bge) has been established from *B. glabrata* embryos only [Hansen, 1976].

In the present study, we characterized the ultra structure of cells from different tissues of *B. tenagophila* using the previously described primary tissue culturing approach [Nacif-Pimenta et al., 2012; Barbosa et al., 2006b]. The availability of those cells in culture discloses potential models to search for hemocytes or their precursors in those tissues, as well as for studies of host–parasite interactions. However, before any functional application, those cells must be characterized using current and powerful morphological methods. We started with *B. tenagophila*, due to the availability of a strain that is absolutely resistant to *S. mansoni* infection, named Taim. This strain typifies the most effective reaction that may cause the failure of parasite infection and will be used as reference in future studies with susceptible strains. The tissues were removed from adult specimens, since embryo-based models are unlikely to reflect the behavior and functionality of adult cells.

2. Material and methods

2.1. Reagents and solutions

All the chemicals used in this work were obtained from Sigma (Sigma–Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) unless otherwise stated. We used the following antibiotics in every media and antibiotic-containing solutions: 10 µg/ml of amphotericin B, 125 µg/ml of primocin, 25 µg/ml of gentamicin and 25 µg/ml of streptomycin. Metronidazol was produced by Fundação Ezequiel Dias (MS 1.1209.0029). The SSS (Saline Sterile Snail) solution was used according to [Sminia et al., 1979]. The Hansen medium was supplemented according to the author [Hansen, 1976] and the Schneider medium was supplemented with 10% of fetal bovine serum, 11 µg/ml of bovine insulin, 296 µg/ml of glutamine and 0.0001 µg/ml of endothelial growth factor. Fixation was performed by immersion in Karnovsky's fixative solution containing

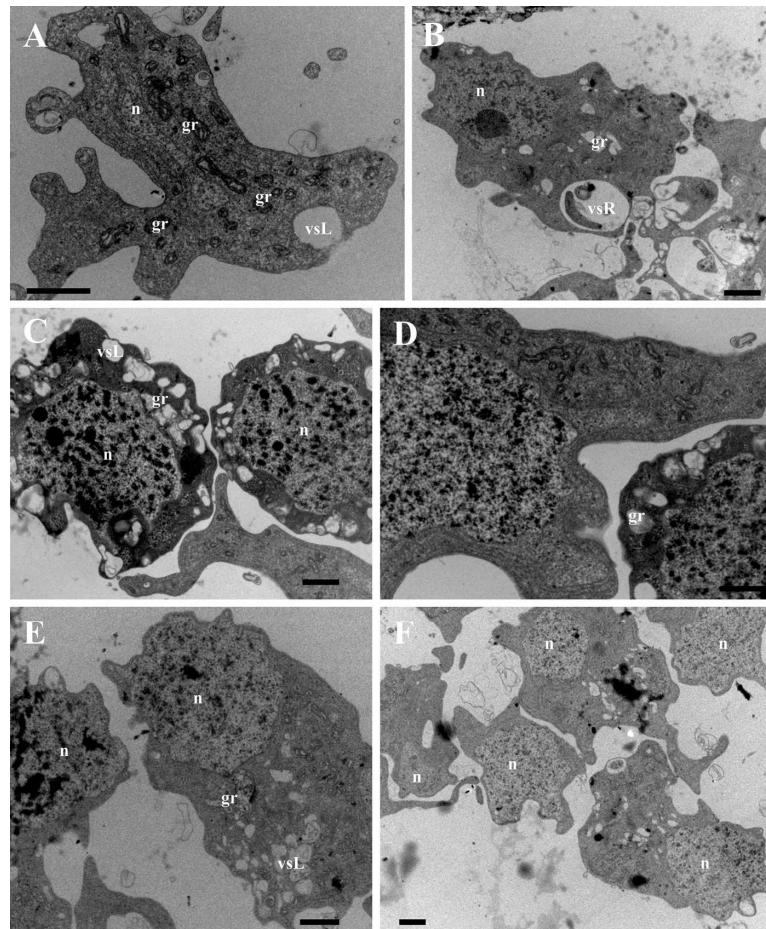


Fig. 2. Ultrastructure of ovotestis-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36 h in culture, under TEM. (A) Amoeboid-shaped cell with an amorphous nucleus (*n*). The cytoplasm is poor in organelles with granules (*gr*) and electron-lucent vesicles (*vsL*); (B) cell of undefined shape, with spherical and peripheral nucleus, few granules in a cytoplasm poor in organelles, and rough vesicles (*vsR*); (C) spherical cells with huge central nucleus, a thin layer of cytoplasm filled with both granules and vesicles. It is possible to identify a cytoplasm extension from another cell; (D) detailed representation of two different cells (spherical and amoeboid), both with huge nucleus and few organelles in cytoplasm, except for the presence of granules in the spherical cell; (E and F) cells with huge nucleus, vesicles and few organelles in the cytoplasm. Bars represent 1 μm .

glutaraldehyde 2.5%, formaldehyde 4% and sodium cacodylate 0.1 M [Cavalcanti et al., 2011].

2.2. Mollusk dissection

B. tenagophila Taim snails with shell sizes ranging from 10 to 18 mm were maintained in metronidazol-treated water (250 mg/l) for 2 days. After anesthetizing the snails with sodium pentobarbital (0.4 mg/ml) solution for 6 h, the shells were washed in ethanol 70% and gently crashed against two glass slides. The soft tissues were separated from the broken shell with tweezers, washed in SSS solution supplemented by antibiotics (SSSA) and placed in a plate dish under light microscope for dissection with ophthalmological tweezers. The columelar muscles and the ligaments of mantle necklace were removed from the left side of the bodies. The mantle was carefully pushed over the snail body in order to expose the kidney and heart structures attached to the mantle. The dissection was performed according to the methodology previously described for fixed specimens [Carvalho et al., 2008].

After identification, the tissues were extirpated using scalpels, placed in different microtubes and thoroughly washed with SSSA solution.

2.3. Morphological tissue identification

B. tenagophila body mapping was performed by comparing the observed structures with those described by Pan (1958,1963, 1965). To ensure maximum fidelity in tissue identification, we used Paraense's description (1972).

2.4. Primary cultures

The cultures were performed according to Barbosa et al. (2006b) with the following modifications: snail tissues were sliced into 1 mm fragments and placed in 24-well culture plates (25820 – Corning, NY, USA) containing 300 μl of culture medium per well. Two culture media with different osmolalities were tested: Hansen's with 140 and Schneider's with 320 mOsm, both at pH 7.2.

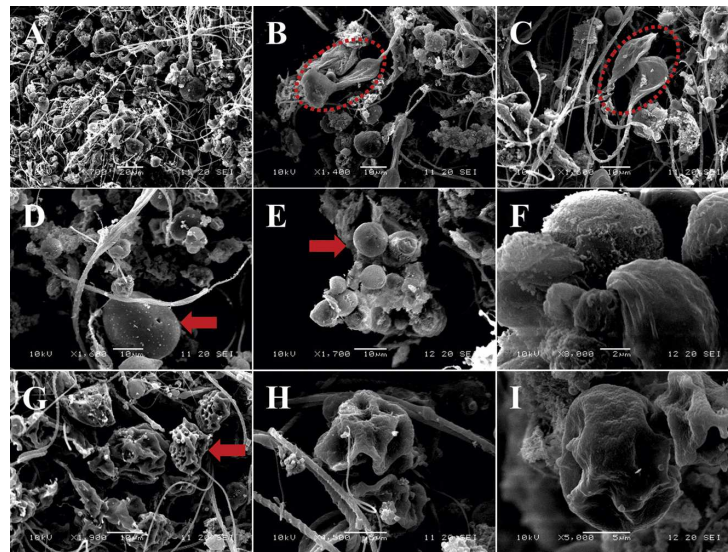


Fig. 3. Ovotestis-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36 h in culture, under SEM. (A) Overview of ovotestis-derived cells revealing flagellated and spherical cells; (B and C) Flagellated, spermatozoid shaped cells (into circle). Spherical cells with smooth (D and F, pointed by arrows) and spherical (G–I) cells with rough surface.

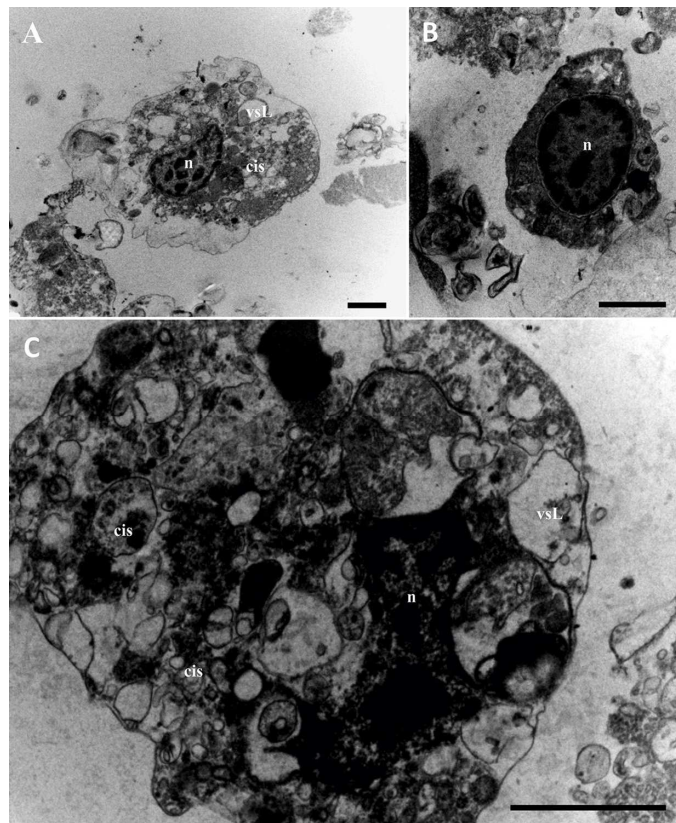


Fig. 4. Ultrastructure of albumen gland-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36 h in culture, under TEM. (A) Cell with small and central nucleus, few electron-lucent vesicles (vsL) and cisterns (cis) from Golgi complex or reticulum. No other cytoplasm organelles are visible; (B) small cell with huge central nucleus, and thin cytoplasm with no evident organelles; (C) cells presenting many cisterns and vesicles and an amorphous nucleus (n). Bars represent 1 µm.

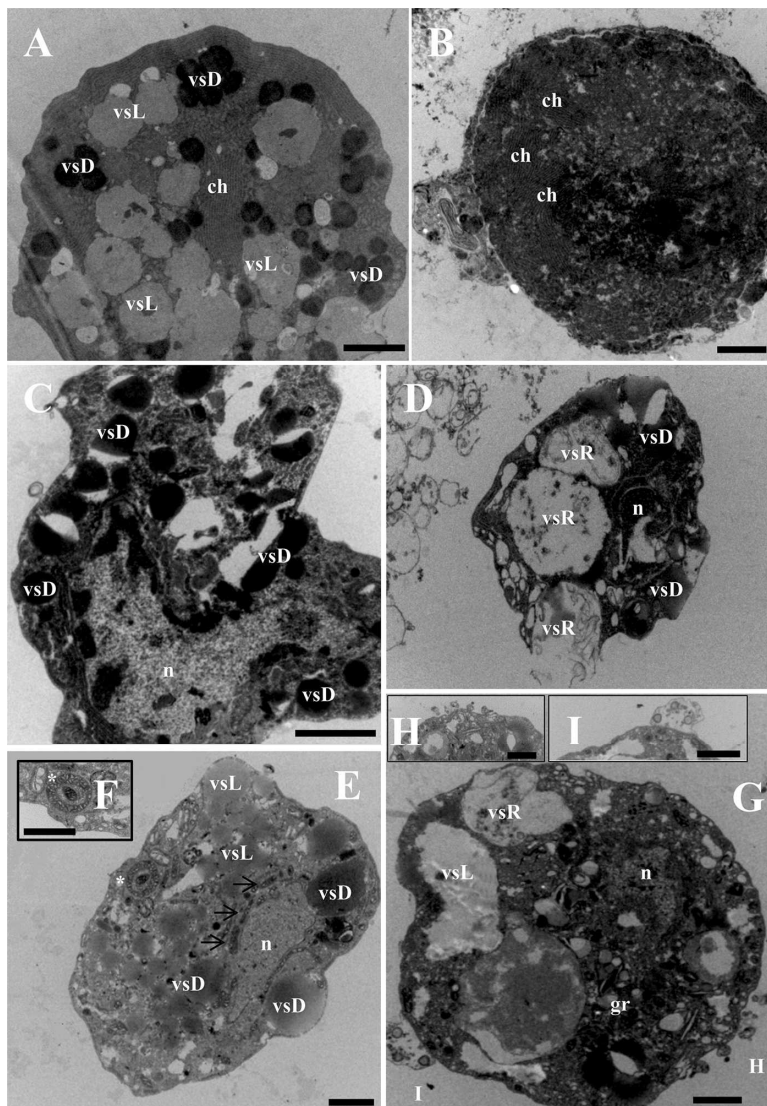


Fig. 5. Ultrastructure of digestive gland-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36 h in culture, under TEM. (A) Spherical cell with several electron-lucent (vsL) and electron-dense (vsD) vesicles and a canaliculated structure (ch); (B) spherical cell without apparent organelles in the cytoplasm and presence of a canaliculated structure; (C) cell with amorphous nucleus (n) and many vesicles in the cytoplasm; (D) cell with huge rough vesicles (vsR) and a small amorphous nucleus; (E) cell presenting amorphous nucleus, many vesicles, and unusually shaped structures (arrows) forming encircled structures (* detailed representation given in (F)); (G) cell with small and amorphous nucleus, few vesicles and granule-releasing vesicles (gr); (H) detailed representation of vesicles released by cells; (I) detail of an unknown attached structure, external to the cell. Bars represent 1 µm.

Two incubation temperatures, 15 °C and 26 °C, were also tested for both media. The plates were incubated in humid chamber and the medium was replaced three times per week. The culture development was followed by inverted optical microscopy (Axiovert 280, Carl Zeiss, Germany) examination. Cultures showing any signs of contamination were immediately discarded.

2.5. Cell viability

Cell viability was determined by Trypan Blue method after 36 h and 192 h in culture. Cells from six different wells (n=6) were

manually counted twice using a Neubauer chamber and their number was expressed as mean of duplicates. Statistical analyses consisted of conducting *T* tests for unpaired samples.

2.6. Electron microscopy

After 36 h in culture, cells from five different wells were pooled (1.0–1.5 ml) and centrifuged at 1000 × g for 5 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was washed three times with 1.0–1.5 ml of PBS each. After resuspension and a new centrifugation step, the pellet was fixed in 1 ml of Karnovsky's fixative for

42

A. Silva-Neto et al. / Micron 67 (2014) 37–49

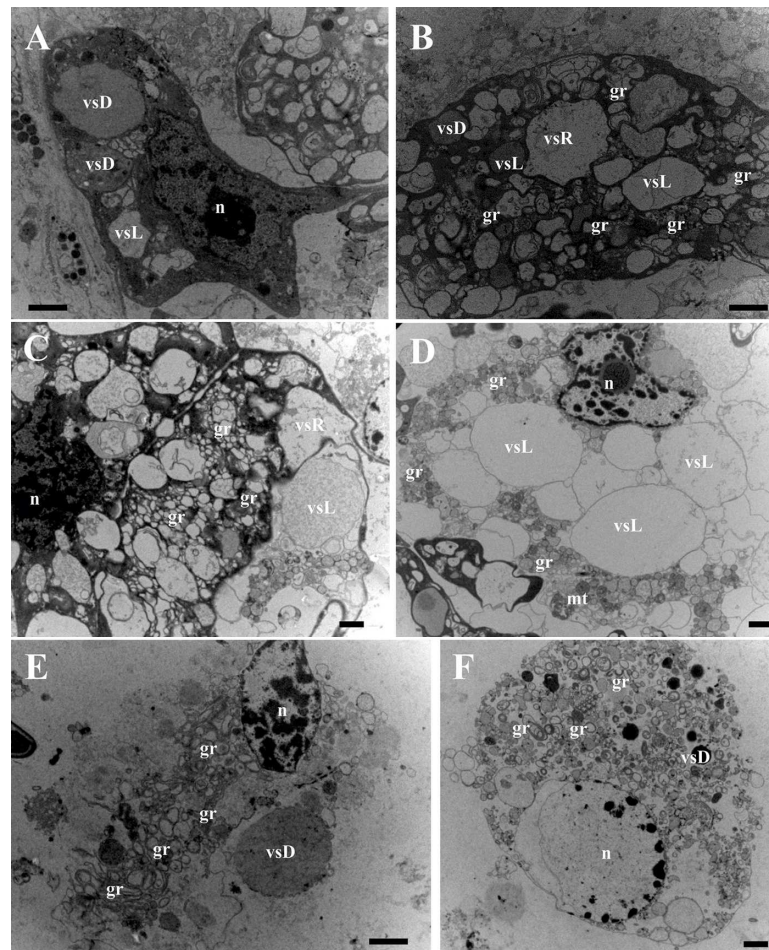


Fig. 6. Ultrastructure of nidamental and prostatic gland region-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36 h in culture, under TEM. (A) big electron-dense (vsD) and electron-lucent (vsL) vesicles are visible in cell cytoplasm. Amorphous and peripheral nucleus (n); (B) the cytoplasm filled with many granules (gr) and vesicles of different sizes; (C) cell with amorphous and central nucleus, many vesicles and granules in the cytoplasm; (D) cell with amorphous nucleus, huge electron-lucent and rough vesicles (vsR) and few granules in the cytoplasm; (E) cell with few vesicles, some granules and without the cytoplasmic membrane; (F) cell with small vesicles and granules, and an encircled nucleus with no surrounding membrane. Bars represent 1 µm.

24 h at 4°C. The fixed cells were centrifuged and the pellet was washed with 0.1 M sodium cacodylate buffer. Prior to performing the transmission electron microscopy (TEM) measurements, the samples were dehydrated by treatment with increasing acetone concentrations (30–100%) and blocked in Epon resin. Ultra-thin sections were obtained by an ultra-microtome and the material was double stained with uranyl acetate and lead citrate. For conducting scanning electron microscopy (SEM) observations, the sample was gradually dehydrated in serial ethanol and impregnated with gold particles.

3. Results and discussion

3.1. Primary tissue cultures

The following tissues of *B. tenagophila* Taim snails were selected for primary culturing: saccular (SK) and tubular (TK) kidney;

heart (Ht); mantle (Mt); crop (Cr), gizzard (Gz) and pylorus (Py) stomach sections; digestive (DG) and albumen (AG) glands; ovotestis (Ov); head-foot portion (HF); and nidamental/prostatic (NP) glands. Those tissues included glands (NP, GA, GD), muscles (Ht, HF, Gz) and soft structures (SK, TK, Ov, Py, Cr and Mt). All cultures were successful, with the exception of the muscle tissues. These last cultures would require an enzymatic treatment for cell detachment and we decided not to try, therefore avoiding any possible damage of the cells [Hansen, 1976; McAteer and Davis, 1994].

The APO region could not be identified, possibly due to the use of uninfected specimens, since a hyperplasia of that region may be expected upon trematode infection. This explanation is, however, only speculative, as consensus on that matter is lacking on the pertinent literature [Sullivan et al., 2004; Vasquez and Sullivan, 2001; Souza and Andrade, 2006, 2012]. We examined *B. tenagophila* TAIM from 12 to 768 h after exposure to *S. mansoni* (10–15 miracidia per

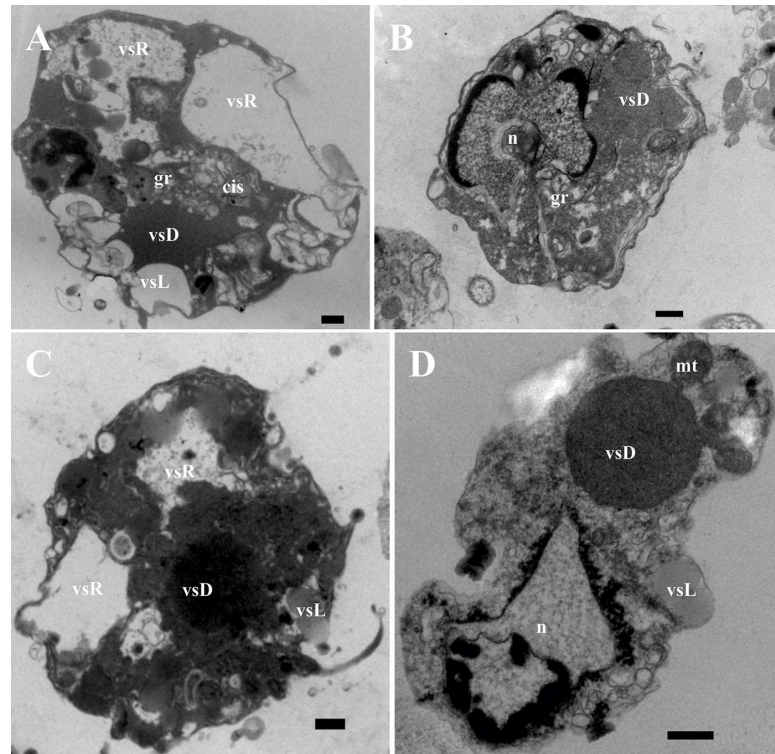


Fig. 7. Ultrastructure of crop-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36 h in culture, under TEM. (A) Cell with many rough (vsR), electron-dense (vsD) and electron-lucent (vsL) vesicles, and some granules (gr); (B) cell revealing and a huge amorphous nucleus and some vesicles and granules in the cytoplasm; (C) cell cytoplasm containing many vesicles of different sizes and shapes. (D) Cell presenting an amorphous nucleus, as well as few vesicles and organelles in the cytoplasm. Bars represent 1 μm .

specimen) and the APO region still remained unidentified. Since this *B. tenagophila* strain is resistant to *S. mansoni* infection and the resistance mechanism is not yet fully understood, it was not possible to predict the outcome of the parasite exposition for this strain.

3.2. Viability of cells in culture

Snail cells have been cultured in different media and have been shown to be tolerant to wide ranges of osmolality [Bayne et al., 1975; Benex and Gantier, 1975; Benex and Jacobelli, 1980; Hansen, 1976; Iwanaga, 2002; Barbosa et al., 2006b]. Nevertheless, the *Bge* cell line was established under low osmolality conditions [Hansen, 1976]. We tested two culture media with different osmolalities for the adult tissues: Hansen's with 140 mOsm and Schneider's with 320 mOsm. In both cases, cell viabilities of 80–90% were obtained for almost every tissue after 36 h in culture (as exemplified in Fig. 1 for DG). For TK and SK, a slightly different profile was observed (Fig. 1). For SK, the only condition that resulted in lower viabilities was Hansen's at 15 °C. For TK, significantly better viabilities were obtained with Schneider's at 26 °C. Those cultures were followed for 192 h, after which Schneider's at 15 °C resulted in higher cell viabilities (data not shown).

Considering that we will need longer culturing times for future immortalization attempts, we adopted Schneider's and 15 °C as the standard for all subsequent culturing conditions. Moreover, the period of 36 h in culture was adopted herein, in order to guarantee that sufficient number of cells with a minimum of notable

morphological changes would be obtained [McAteer and Davis, 1994].

3.3. Cell types in culture

Most cells derived from adult *B. tenagophila* tissues were spherical and non-adherent under optical microscopy, their sizes ranging from 10 to 20 μm and their surfaces either smooth or rough. Ovotestis (sexual gland) contained flagellated spermatozoid cells, which is in accordance with its reproductive function. The spherical ovotestis cells possessed a huge central nucleus with granules and surrounding vesicles (Fig. 2C). A fraction of those cells displayed membrane invaginations under SEM (Fig. 3G–I).

The overall number of cell types varied according to the tissue of origin. For gland-derived tissues, three distinct cell types were observed for AG, six for DG and five for NP (Figs. 4–6). All cell types displayed many cytoplasmic vesicles with different shapes, sizes and electron densities. The stomach-derived cells shared those characteristics with four types of cells in Cr and six in Py cultures, respectively (Figs. 7 and 8). We observed an additional cell type in Py with many mitochondria in the cytoplasm, and no visible vesicles or cilia (Fig. 8G–I). In addition, NP cultures had two different cells with no visible cytoplasmic membrane (Fig. 6). The absence of any hemoblast- or hemocyte-like cells in gland tissue cultures is in accordance with the previously reported findings [Benex and Jacobelli, 1980]. Cells derived from gland tissues would be expected to contain many vesicles related to their secretory function, while hemoblasts are characterized by few cytoplasmic organelles [Jeong et al., 1983].

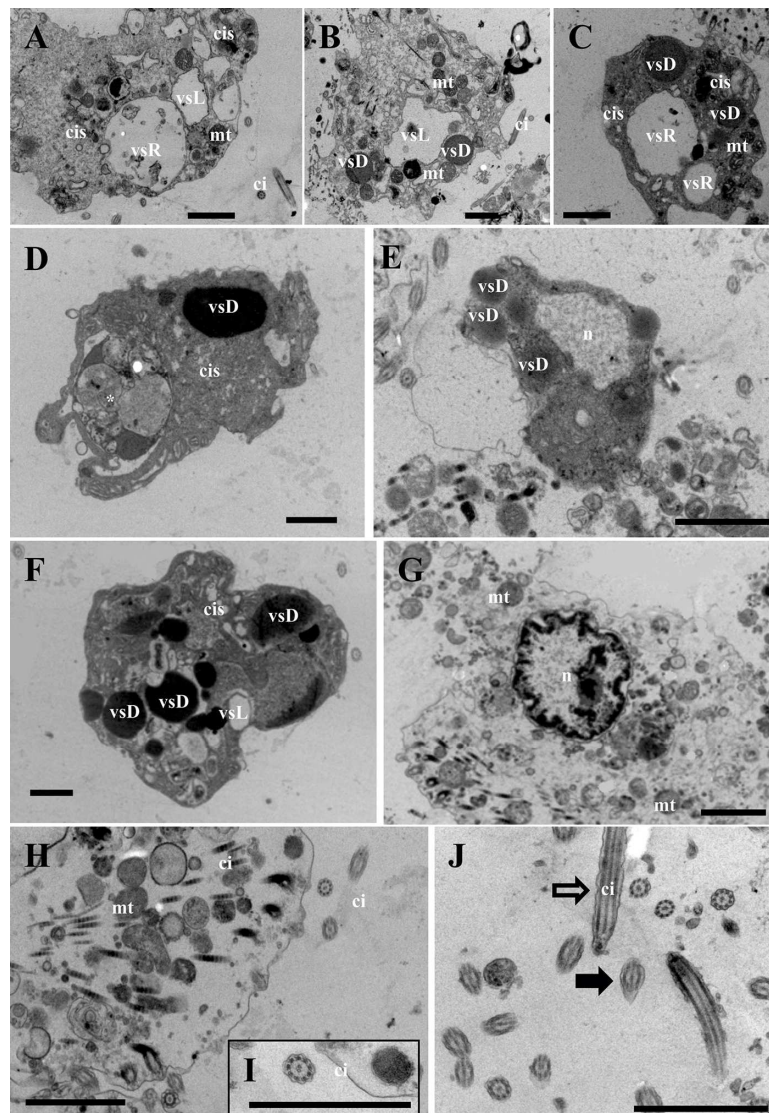


Fig. 8. Ultrastructure of pylorus-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36 h in culture, under TEM. (A) Cell displaying some cisterns (cis), rough (vsR) and electron-lucent (vsL) vesicles, few mitochondria and cilia; (B) cell with some vesicles and few mitochondria (mt) in the cytoplasm; (C) cell characterized by the presence of huge vesicles; (D) cell presenting a composite structure possibly derived from phagocytic body (*); (E) cell showing an amorphous peripheral nucleus (n) and electron-dense vesicles (vsD); (F) many vesicles in the cytoplasm with Golgi complex or reticulum cisterns. (G) Cell with many mitochondria in the cytoplasm, and a peripheral and spherical nucleus; (H) cell with mitochondria and cilia (detailed structure given in (I)). (J) Cilia structure on transversal section (black arrow) and longitudinal section (open arrow). Bars represent 1 μ m.

In the mantle cultures, we observed ten different cell types, five of which were pigmented, with granule-filled cytoplasm (Fig. 9). Structures resembling cilia were found in a particular cell type (Fig. 9D). Those ciliated cells may play a role in the respiratory system of the snail through guidance of the water influx into mantle cavity [Pan, 1958]. In all other cell types found in the Mt culture, only a few organelles were present in cytoplasm. In addition to taking part in the respiratory system, the mantle has been considered an important region for hemocyte production [Pan, 1958]. Transplantation assays, however, demonstrated that mantle tegument

did not promote resistance in susceptible snails [Sullivan, 1990; Sullivan and Spence, 1994, 1999; Barbosa et al., 2006a]. In addition, although anatomically close to APO and saccular kidney regions, the cells obtained here from the mantle cavity did not exhibit any hemocyte characteristics. Thus, there is no evidence of any Mt participation in hemocyte production.

Kidney cultures were the most diversified in terms of cell types, with a total of thirteen distinct cells in SK and TK regions as a whole. Most of these were spherical with or without apparent nuclei, based on the examination under bright field microscopy. Nonetheless,

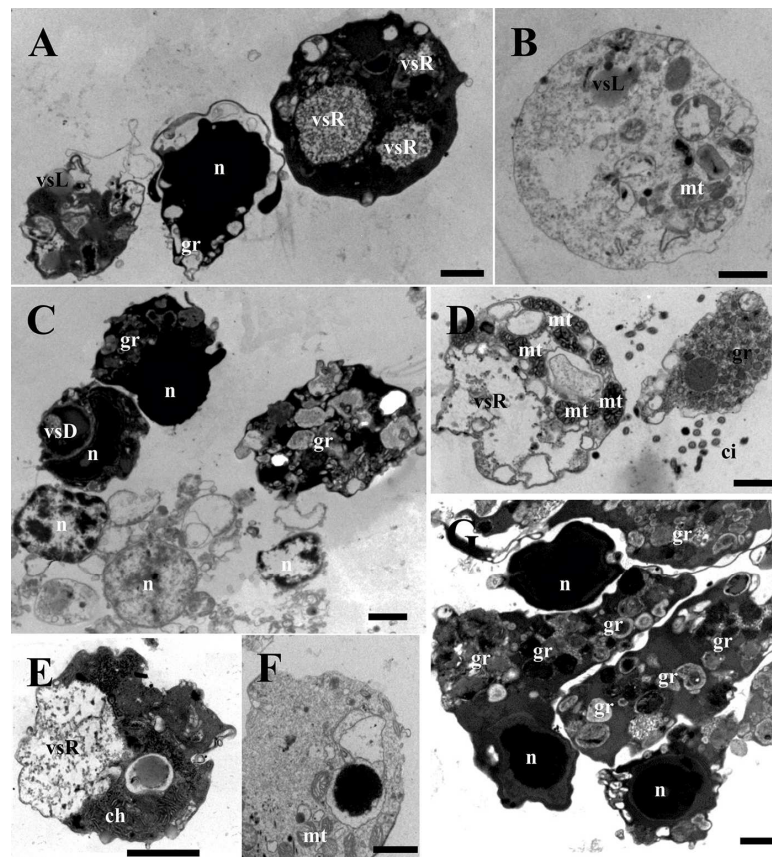


Fig. 9. Ultrastructure of mantle-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36h in culture, under TEM. (A) Three different cells with electron-lucent vesicles (vsL) on the left, granules in the center, and rough vesicles (vsR) on the right; (B) cell with few organelles in the cytoplasm, showing mitochondria (mt) and vesicles; (C) different cells containing granules (gr) and vesicles. It is possible to identify nuclei from lysed cells; (D) cell with mitochondria and huge vesicles. Another cell showing granules and cilia (ci); (E) huge vesicles and canaliculated structures in a small cell; (F) cell cytoplasm with few mitochondria and a small number of organelles; (G) cells presenting many granules in the cytoplasm. Bars represent 1 μm .

the probable mesenchymatous origin of the SK [Pan, 1958] may point to its role in hemocyte production. However, SK transplantation from resistant to susceptible *B. glabrata* failed to confirm that hypothesis [Sullivan and Spence, 1994, 1999]. In this work, five of the six cell types in the SK, as well as four of the seven cell types in the TK cultures (Figs. 10 and 11), displayed prominent nucleolus and cytoplasmic organelles limited to mitochondria, such as those described for *B. glabrata* hemoblasts in the ultra structure of APO [Jeong et al., 1983]. However, other hemoblast characteristics, such as abundant presence of polyribosomes and absence of cytoplasmic granules and lysosomal bodies, were not apparent in those kidney-derived cultures. Previous histological sections of tubular kidney (TK) showed somewhat variable cells unrelated to hemocyte production [Pan, 1958]. According to our observations, TK cultures shared the hemoblast-like characteristics of the SK cells. Moreover, cells in culture from SK (Fig. 12) were undistinguishable from those obtained in APO culture [Barbosa et al., 2006b]. Taking into account the close anatomical position of the APO and the SK within the reno-pericardial region, and difficulties inherent to APO dissection [Souza and Andrade, 2006], we cannot discard the possibility of contamination of previous APO cultures with SK tissue.

3.4. Cell interaction with the parasite

Cells obtained from primary culture of the APO region have been employed in *in vitro* interactions with *S. mansoni* and were able to eliminate sporocysts [Nacif-Pimenta et al., 2012]. Unfortunately, as morphological data on these particular cells are not available, comparison with those obtained herein was not possible. Indeed, the similarities between APO and SK cultures, their anatomical proximity in the *Biomphalaria* body, and partial hemoblast characteristics presented by SK cells suggest that the SK tissue may participate in hemocyte production [Souza and Andrade, 2012; Pan, 1958]. Despite the previously reported differences between SK and APO cells [Sullivan and Spence, 1999; Souza and Andrade, 2006, 2012], bright field microscopy performed here revealed that they are very similar in organ-derived cultures [Barbosa et al., 2006b]. Functional experiments will be necessary to clarify the role played by SK in hemocyte production, as its transplantation previously failed to protect *Biomphalaria* snails against *S. mansoni* infection [Sullivan and Spence, 1999].

Hemocytes from *Biomphalaria* sp. are typically classified as either hyalinocytes or granulocytes. Hyalinocytes are smaller spherical cells, unable to adhere to substrates or to emit

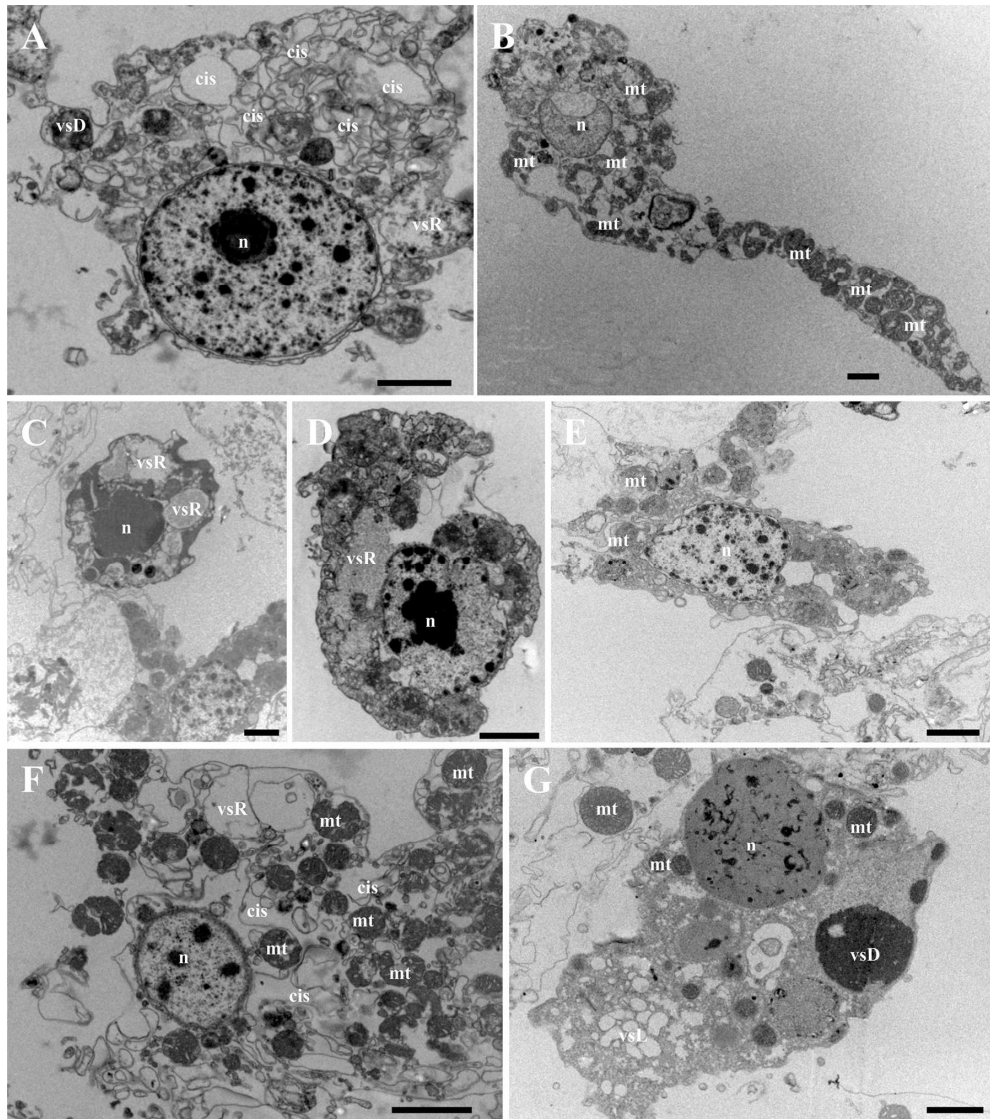


Fig. 10. Ultrastructure of sacculus kidney-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36 h in culture, under TEM. (A) Cell with prominent nucleolus (arrow head), huge spherical nucleus (n), the cytoplasm with many cisterns from endoplasmic reticulum and Golgi complex (cis), some rough vesicles (vsR) and electron-dense vesicles (vsD); (B) presence of a cytoplasmic extension containing mainly mitochondria (mt); (C) Small cell with some vesicles and a central nucleus; (D) cell with few vesicles in the cytoplasm, and a huge nucleus with prominent nucleolus; (E) cell of amoeboid shape, with a huge central nucleus, and cytoplasmic organelles mostly composed of mitochondria; (F) cell presenting many huge mitochondria in the cytoplasm, some vesicles, and cisterns from RE and Golgi; (G) cell characterized by few mitochondria in the cytoplasm, some electron-lucent vesicles (vsL) and a huge circular nucleus. Bars represent 1 μm .

pseudopods. On the other hand, granulocytes are large amorphous cells presenting granules in cytoplasm, which easily adhere to substrates and emit pseudopods [Barracco et al., 1993; Bezerra et al., 1997]. Granulocytes have been considered the effector cells in snail's IDS. A recent pioneering study on the ultrastructure of hemocytes from *B. glabrata* and *B. straminea* [Cavalcanti et al., 2011] revealed five morphologically different types of cells, three of which were named hyalinocytes and the most abundant ones were able to emit pseudopods.

Cells resembling hemocytes were previously described in cultures from heart, sacculus kidney and APO of *B. glabrata*,

mainly based on the amorphous shape of those cells under optical microscopy [Bayne et al., 1975; Benex and Gantier, 1975; Benex and Jacobelli, 1980; Hansen, 1976; Iwanaga, 2002; Barbosa et al., 2006b]. However, we preferred not to classify the cells in culture according to any shape-based criteria. We did not find any apparent similarity between the tissue-derived cells in culture and the five different hemocytes described in the hemolymph of *B. glabrata* and *B. straminea* [Cavalcanti et al., 2011] and it is possible that they are at different developmental stages in hemolymph and tissues.

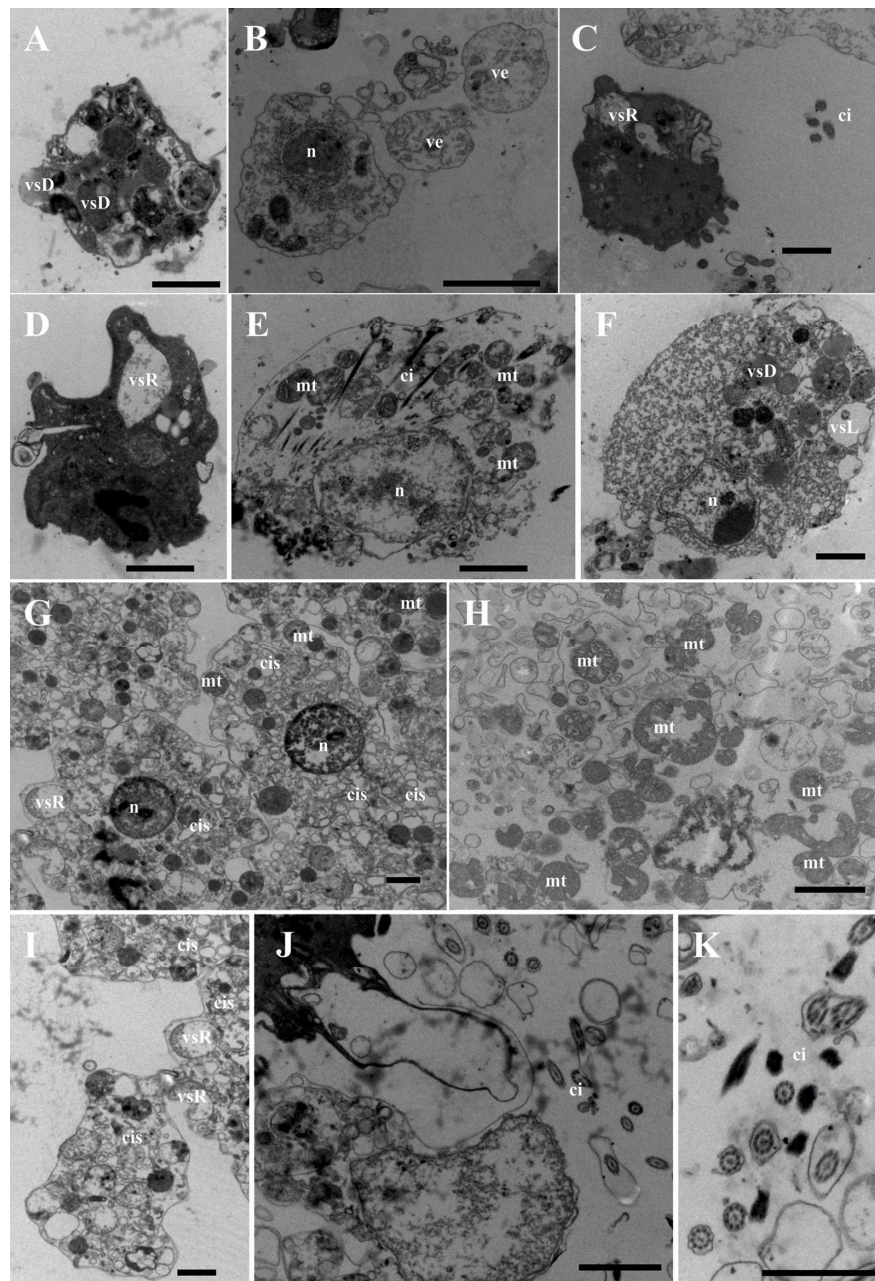


Fig. 11. Ultrastructure of tubular kidney-derived cells from *B. tenagophila* Taim, after 36 h in culture, under TEM. (A) Small cell presenting many different electron-dense vesicles (vsD); (B) two vesicles (ve) in close proximity to a small cell with few organelles in the cytoplasm; (C) a rough vesicle (vsR) visible in a cell with many cilia (ci); (D) small cell presenting a rough vesicle and few organelles in the cytoplasm; (E) cell with a spherical nucleus (n), cytoplasmic organelles limited to mitochondria, and presence of internal structures of cilia; (F) cell with electron-lucent (vsL) and electron-dense vesicles (vsD), few organelles and a small nucleus; (G) cells with many cisterns (cis) from reticulum and Golgi apparatus, some mitochondria (mt) and a spherical central nucleus; (H) detailed representation of previous cells [G], showing huge mitochondria; (I) further detail from a portion of previous cells [G], revealing some rough vesicles and cisterns; (J) Detailed representation of a part of a ciliated cell and cilia (ci) structure (K). Bars represent 1 μ m.

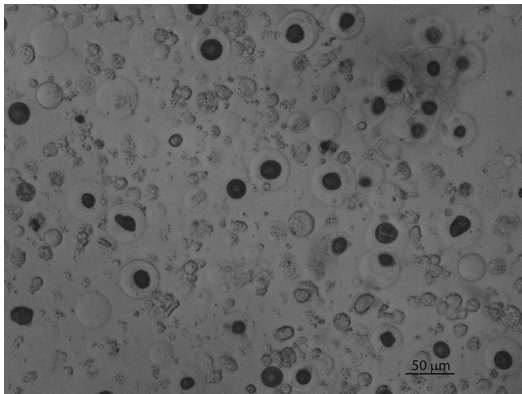


Fig. 12. SK-derived cells from *B. tenagophila* Taim, under optical microscopy. The cells were examined after 36 h in culture.

4. Conclusion

The main purpose of this work was to characterize the ultrastructure of adult *B. tenagophila* cells from the Taim strain obtained in primary tissue cultures. Successful primary cultures were obtained from nine of twelve tissues. Special attention was devoted to mantle cavity and kidney tissues. Although considered important centers of hemocyte production in *Biomphalaria* [Pan, 1958, 1963, 1965], no detailed cell characterization is currently available in the pertinent literature. Kidney-derived cells were the only ones partially sharing hematoblast characteristics. The cells in culture were very similar to those previously obtained from APO cultures [Barbosa et al., 2006b]. Based on the close resemblance of APO and SK cells and their anatomical proximity inside the mantle cavity, it seems reasonable to hypothesize that the saccular kidney may be participating in hemocyte production.

Our next step will be to challenge SK-derived cells from resistant and susceptible *B. tenagophila* strains with *in vitro* transformed *S. mansoni* sporocysts, aiming to gain a better understanding of the particular role of that region in the response to infection. Immortalization experiments will also be attempted with SK-derived cells.

Acknowledgements

We wish to express our gratitude to R Padilha, JP Batista and AC Valentim for their excellent technical assistance, as well as to Dr. R Caldeira for dissection instructions. In particular, we acknowledge the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPEMIG for providing financial support for this work.

References

- Barbosa, L., Caldeira, R.L., Carvalho, O.L., Vidigal, T.H., Jannotti-Passos, L.K., Coelho, P.M.Z., 2006a. Resistance to *Schistosoma mansoni* by transplantation of APO *Biomphalaria tenagophila*. *Parasite Immunol.* 28 (5), 209–212.
- Barbosa, L., Silva, L.M., Coelho, P.M.Z., Santos, S.R., Fortes-Dias, C.L., 2006b. Primary culture of the region of the amebocyte-producing organ of the snail *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (6), 639–643.
- 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 (1), 73–83.
- Bayne, C.J., Owczarzak, A., Noonan, W.E., 1975. *In vitro* cultivation of cells and a microsporidian parasite of *Biomphalaria glabrata* (pulmonata: basomatophora). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 266, 513–527.
- Bayne, C.J., Buckley, P.M., Dewan, P.C., 1980a. Macrophage-like hemocytes of resistant *Biomphalaria glabrata* are cytotoxic for sporocysts of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *J. Parasitol.* 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*. *Exp. Parasitol.* 50 (3), 409–416.
- Bayne, C.J., 2009. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. *Mol. Biochem. Parasitol.* 165 (1), 8–18.
- Benex, J., Gantier, J.C., 1975. Culture de cellules de planorbis. Leur utilisation dans l'étude des relations immunologiques hôte-parasite dans la schistosomose (Cell culture of snails. Their use in the study of immunologic host-parasite relationships in schistosomiasis). *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 68 (5), 474–482.
- Benex, J., Jacobelli, G., 1980. Exploration de l'immunité cellulaire chez les mollusques hôtes des schistosomes. Premiers résultats relatifs à *Biomphalaria glabrata* (Cellular immunity in mollusk hosts of schistosomes. Primary results regarding *Biomphalaria glabrata*). *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* 73 (2), 206–213.
- Bezerra, F.S., 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. Sao Paulo* 39 (4), 197–201.
- Caldeira, R.L., Jannotti-Passos, L.K., Carvalho, O.S., 2009. Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: a review of the identification of species and the detection of infected snails. *Acta Trop.* 111, 1–6.
- Carvalho, O.S., Janotti-Passos, L.K., Mendonça, C.L.G.F., Cardoso, P.C.M., Caldeira, R.L., 2008. *Moluscos Brasileiros de Importância Médica* (Brazilian mollusks with medical importance). Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, Belo Horizonte, pp. 1–86.
- Cavalcanti, M.G.S., Filho, F.C., Mendonça, A.M.B., Duarte, G.R., Barbosa, C.C.G.S., Castro, C.M.M.B., Alves, L.C., Brayner, F.A., 2011. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. *Micron* 43 (2–3), 285–291.
- Hahn, U.K., Bender, R.C., Bayne, C.J., 2001a. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. *J. Parasitol.* 87 (2), 292–299.
- Hahn, U.K., Bender, R.C., Bayne, C.J., 2001b. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 87 (4), 778–785.
- Hansen, E., 1976. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics. In: Maramorosch, K. (Ed.), *Invertebrate Tissue Culture: Research Applications*. New York Academic Press, New York, pp. 75–99.
- Iwanaga, Y., 2002. *In vitro* cultivation of cells from ovotestis tissue of pigmented *Biomphalaria glabrata*. *Zool. Sci.* 19 (3), 271–274.
- 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.
- Lie, K.J., Heyneman, D., Yau, P., 1975. The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*: fine structure. *J. Parasitol.* 61, 574–576.
- Loker, E.S., Bayne, C.J., 1982. *In vitro* encounters between *Schistosoma mansoni* primary sporocysts and hemolymph components of susceptible and resistant strains of *Biomphalaria glabrata*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 999–1005.
- McAteer, J.A., Davis, J.M., 1994. Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: Davis, J.M. (Ed.), *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, pp. 93–148.
- Nacif-Pimenta, R., Mattos, A.C.A., Orfanó, A.S., Barbosa, L., Pimenta, P.F.P., Coelho, P.M.Z., 2012. *Schistosoma mansoni* in susceptible and resistant snail strains *Biomphalaria tenagophila*: *in vivo* tissue response and *in vitro* hemocyte interactions. *PLoS One* 7 (9), 1–12 [online].
- Negrão-Corrêa, D., Mattos, A.C.A., Pereira, C.A.J., Martins-Souza, R.L., Coelho, P.M.Z., 2012. Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts hemocytes of *Biomphalaria glabrata*. *Res.* 2012, 743920.
- Pan, C.T., 1958. The general histology and topographic microanatomy of *Australorbis glabratus*. *Bull. Mus. Comp. Zool.* 119, 235–299.
- Pan, C.T., 1963. Generalized and focal tissue responses in the snail, *Australorbis glabratus*, infected with *Schistosoma mansoni*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 113, 475–485.
- Pan, C.T., 1965. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14 (6), 931–976.
- Paraense, W.L., Correa, L.R., 1963a. Susceptibility of *Australorbis tenagophilus* to infection with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 5, 22–29.
- Paraense, W.L., Correa, L.R., 1963b. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 5, 15–22.
- Paraense, W.L., 1972. Fauna planorbílica do Brasil. In: Lacaz, C.S., Baruzzi, R.G., Siqueira, W. (Eds.), *Introdução à Geografia Médica do Brasil*. Edgard Blücher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 213–239.
- Paraense, W.L., 2001. The schistosome vectors in the Americas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 7–16.
- Sminia, T., van der Knaap, W.P.W., Edelenbosch, P., 1979. The role of serum factors in phagocytosis of foreign particles by blood cells of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Dev. Comp. Immunol.* 3, 37–44.
- Souza, S.S., Andrade, Z.A., 2006. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (1), 213–218.
- Souza, S.S., Andrade, Z.A., 2012. The significance of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107 (5), 598–603.
- Sullivan, J.T., Pikiros, S.S., Alonzo, A.Q., 2004. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 90 (1), 92–96.

- Sullivan, J.T., Spence, J.V., 1994. Transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* by allografts of amoebocyte-producing organ. *J. Parasitol.* 80 (3), 449–453.
- Sullivan, J.T., Spence, J.V., 1999. Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.* 85 (6), 1065–1071.
- Sullivan, J.T., 1990. Long-term survival of heterotopic allografts of the amoebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 109, 52–60.
- Théron, A., Coustau, C., 2005. Are *Biomphalaria* snails resistant to *Schistosoma mansoni*? *J. Helminthol.* 79 (3), 187–191.
- van der Knaap, W.P.W., Loker, E.S., 1990. Immune mechanisms in trematode-snail interactions. *Parasitol. Today* 6 (6), 175–182.
- Vasquez, R.E., Sullivan, J.T., 2001. Hematopoietic tissue allografts in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) induce humoral immunity to *Schistosoma mansoni*. *Dev. Comp. Immunol.* 25 (7), 561–564.