

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Exploração de sistemas *in vitro* para desenvolvimento larval de  
*Angiostrongylus costaricensis* e de *A. cantonensis*  
(Nematelminthes, Angiostrongylidae)

Letícia Fonseca da Silva

2010

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Exploração de sistemas *in vitro* para desenvolvimento larval de  
*Angiostrongylus costaricensis* e de *A. cantonensis*  
(Nematelminthes, Angiostrongylidae)

Autora: Letícia Fonseca da Silva

Orientador: Dr. Carlos Graeff-Teixeira

Tese de doutorado  
Porto Alegre - Brasil  
2010

## RESUMO

Dentre os angiostrongilídeos, há duas espécies que têm sido extensamente estudadas por constituírem problemas de saúde humana: *Angiostrongylus costaricensis* e *A. cantonensis*. Enquanto existem numerosos estudos sobre a manutenção e desenvolvimento *in vitro* de trematódeos, são poucas as tentativas registradas na literatura do mesmo esforço em relação aos nematódeos. Através do desenvolvimento de cultivos e co-cultivos com células embrionárias de *B. glabrata* buscou-se encontrar a forma mais adequada para a produção de larvas nas fases intramolusco dos dois parasitos em estudo. Em um trabalho anterior foi utilizada a axenização das larvas de primeiro estágio, este método foi adaptado especialmente quanto à concentração de hipoclorito de sódio que foi utilizado a 0,25% de modo eficiente. Verificou-se que nos cultivos enriquecidos com extrato protéico do corpo de *B. glabrata*, houve uma maior recuperação de larvas de segundo estágio. A fim de se investigar a possibilidade de uma diferença quanto à expressão de proteínas entre caramujos infectados e não infectados, foi realizada a eletroforese bidimensional. Uma proteína de 37 kDa no ponto isoelétrico de 4,2 foi expressa apenas nos tecidos dos caramujos infectados. Para se ter um estoque de larvas de primeiro estágio, testou-se formas de criopreservá-las com diferentes concentrações de dimetil-sulfóxido (DMSO) e de soro fetal bovino (SFB). Para ambos nematódeos, o uso de 1% de DMSO em meio enriquecido com 5% de SFB, incubação prévia de 60 minutos com o criopreservante em temperatura ambiente, seguido pelo congelamento rápido em nitrogênio líquido, apresentou os melhores índices de larvas ativas recuperadas. Embora os experimentos não tenham tido êxito para produzir *in vitro* larvas de terceiro estágio (L3), vários aspectos foram analisados e todo o conhecimento resultante representa o início do caminho para, com esforço contínuo, se estabelecer um sistema *in vitro* capaz de produzir em grande quantidade e regularmente essas formas parasitárias. Os resultados apresentados contribuem para uma melhor compreensão da complexa tarefa de manipulação *in vitro* desses nemátodeos e dos desafios para o melhor entendimento de sua biologia.

## ABSTRACT

Among the angiostrongylid worms there are two extensively studied species because of their importance as causes of human health problems, *Angiostrongylus costaricensis* and *A. cantonensis*. While there are numerous *in vitro* studies on maintenance and evolution of trematodes, the literature is short of reports on similar trials with nematodes. Through cultivation and co-cultivation with *Biomphalaria glabrata* embryonic cells, the best conditions were searched for the production of intra-mollusk larval stages from both parasites under study. A previous reported protocol for axenization of first stage larvae was adjusted especially concerning the concentration of sodium hypochlorite and a 0,25 % preparation was found effective. It was demonstrated that cultivation enriched with crude body proteic extract of *B. glabrata* resulted in a higher recovery of second stage larvae. In order to investigate the possibility of a differential expression of proteins after infection, bidimensional electrophoresis was performed. A 37 kDa protein with isoelectric point 4,2 was expressed exclusively at tissues of the infected snails. In order to guarantee the supply of first stage larvae for a future *in vitro* production of L3, several conditions for cryopreservation were assayed and the best larvae yield was achieved with a 1% dimethyl-sulphoxide and 5% bovine fetal serum, and incubation time of 60 minutes before quick introduction into liquid nitrogen. In conclusion, although the unsuccessful trial to produce *in vitro* large amounts of L3, several aspects were assayed and the resulting knowledge may pave the way for the ongoing effort to establish an *in vitro* system that enables regular large production of parasitic forms. The results now reported have contributed to a better understanding of the complex task of *in vitro* manipulation of nematodes and the challenges standing ahead for the better understanding of their biology.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Histórico das angiostrongilíases.....	1
1.2 Distribuição geográfica das angiostrongilíases.....	3
1.3 Ciclo evolutivo dos parasitos.....	3
1.4 Os parasitos: <i>Angiostrongylus costaricensis</i> e <i>A. cantonensis</i> .....	5
1.5 Hospedeiros intermediários.....	6
1.6 Hospedeiros definitivos.....	8
1.7 Cultivo <i>in vitro</i> de nematódeos.....	9
1.8 Co-cultivo entre parasitos e células Bge.....	11
1.9 Cultivo de células de moluscos.....	13
1.10 Criopreservação de espécies de <i>Angiostrongylus</i> .....	14
1.11 Justificativa .....	15
1.12 Objetivos .....	16
1.12.1 Objetivo geral .....	16
1.12.2 Objetivos específicos .....	16
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.1 Obtenção do material biológico.....	18
2.1.1 Larvas e caramujos.....	18
2.1.2 Lesmas.....	19
2.2 Cultivo das células Bge.....	20
2.2.1 Manutenção das células Bge.....	20
2.2.2 Subcultivo das células Bge.....	21
2.2.3 Congelamento e descongelamento das células Bge.....	22
2.3 Cultura primária de veronicelídeo.....	23
2.3.1 Cultura primária a partir de blocos de tecidos.....	23
2.3.2 Cultura primária a partir das células embrionárias.....	25
2.4 Cultivos e co-cultivos.....	27
2.4.1 Filtração e axenização das larvas.....	27
2.4.2 Extrato protéico da hemolinfa.....	30
2.4.3 Extrato protéico do corpo.....	31
2.4.4 Cultivo das larvas.....	32
2.4.5 Co-cultivo entre células Bge e larvas.....	35
2.5 Eletroforese bidimensional (2D) .....	36
2.6 Criopreservação.....	37
3 RESULTADOS.....	39
3.1 Cultivo das células Bge.....	39
3.2 Cultura primária de células de veronicelídeos.....	41
3.2.1 Cultura primária a partir de blocos de tecidos.....	41
3.2.2 Cultura primária a partir de células embrionárias.....	42
3.3 Axenização das larvas.....	44
3.4 Cultivo das larvas.....	45
3.5 Co-cultivo entre células Bge e larvas .....	50
3.6 Eletroforese bidimensional (2D) .....	53
3.7 Criopreservação.....	54
4 DISCUSSÃO.....	56
5 CONCLUSÕES .....	64
6 PERSPECTIVAS .....	65
7 REFERÊNCIAS.....	66
8 APÊNDICES.....	74

## AGRADECIMENTOS

Iniciei o meu doutorado no segundo semestre de 2006. Como na maioria das teses, o meu trabalho seria um aprofundamento sobre a dissertação que apresentei em 2005, referente ao estudo sistemático embasado na observação anatômica, na conquiliomorfometria e na distribuição geográfica de um gênero de micromoluscos terrestres: *Simpulopsis* Beck, 1837. Como a proposta seria fazer uma revisão deste gênero, empenhei-me em obter todos os materiais tipo disponíveis em diversos museus do mundo. Com muito esforço consegui reunir quase todos os holótipos e parátipos no primeiro, dos oito semestres de meu estudo. Tratei de iniciar o estudo da filogenia. Reuni artigos antigos de descrições originais. Busquei revisões recentes sobre *Simpulopsis* ou táxons que acreditasse serem filogeneticamente próximos. Comecei a refletir sobre quais os caracteres válidos e sobre qual seria o melhor grupo externo. Solicitei autorizações, aos museus responsáveis, para dissecar materiais tipo. Pensava em desvendar a filogenia molecular desse gênero, caso houvesse tempo hábil. E com certeza haveria!

Mas, em abril de 2007, o meu então orientador, prof. Dr José Willibaldo Thomé, renomado malacólogo, conhecido e respeitado dentro e fora do Brasil, foi aposentado pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e foi impossibilitado de seguir orientando-me na execução do meu doutorado vinculado ao Programa de Pós Graduação em Zoologia da PUCRS

Fiquei “órfã”. E não era filha única! “Como isso aconteceu?” “Ainda falta muito tempo para eu terminar minha tese sob a orientação dele!” “Será que essa aposentadoria foi *surpresa*?” Para nós dois certamente. Mas para os demais? Ainda não compreendi. Não por dificuldade de aprendizagem, mas pela total ausência de explicação.

Não entendi como foi admitido o meu ingresso para uma tese (de quatro anos) sob a orientação de tão distinta pessoa para depois ocorrer esse desligamento abrupto de forma absurdamente desrespeitosa.

Como seguir adiante? Impossível expressar em palavras. Busquei seguir com o mesmo projeto. Procurei outros professores para serem meus orientadores. Não consegui confiar no apoio que, após eu solicitar, me foi oferecido. Sem confiança... Como continuar?

O Dr. Carlos Graeff-Teixeira, em uma conversa ocasional, de corredor, ofereceu ao prof. Thomé, orientar alguma das suas alunas. Uma mão estendida. Mas qual a relação entre o meu projeto e a parasitologia? Nenhuma. Havia conhecido o Dr. Carlos meses antes disso, quando cursei sua disciplina sobre “Ética e Atitude em Ciências”. Isto combinava muito com o meu maior interesse: e, também maior carência, no momento. Continuar tendo alguém que pensasse em ética por perto me trazia certo conforto. Fui conversar com ele. Percebi o acolhimento e a confiança. Água no deserto: preciosidades. Decidi recomeçar. Do mais absoluto zero.

Geralmente, o primeiro semestre de um doutorado serve para se fazer testes piloto, re-organizar o projeto, ajustar algumas questões e, concluir os créditos. Usei o meu quarto semestre para criar um novo projeto sobre um assunto totalmente novo, em um novo grupo de trabalho, em uma equipe multidisciplinar. Isto tudo me devolveu o ânimo!

Defendi o meu novo projeto em outubro de 2007 e consegui concluir minha nova tese no tempo que restava: dois anos.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Biologia Parasitária e Parasitologia Molecular. Em especial, agradeço a Alessandra Morassuti, Camila Krug, Carolina Veríssimo e Silvana Alves. Especial gratidão aos colegas que atualmente seguem seus caminhos em outros laboratórios: Caren Oliveira e Juliano Romanzini.

Obrigada especial à minha família e à família Bemfica.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico das angiostrongilíases

O contágio acidental em humanos ocorre do mesmo modo com os nematódeos *A. costaricensis* Morera e Céspedes, 1971 e *A. cantonensis* (Chen, 1935) causando a angiostrongilíase abdominal ou cerebral, respectivamente. A contaminação acontece pelo contato direto com o molusco, ou de forma indireta, ou seja, pela ingestão de alimentos contaminados pelo muco desses invertebrados infectados (Morera, 1988; Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a, 1991b, 2005, 2009).

A angiostrongilíase abdominal é causada pelo nematódeo *Angiostrongylus costaricensis*, um parasito intra-arterial de roedores, tendo o homem como hospedeiro acidental. Inicialmente, foi diagnosticada em crianças na Costa Rica. No entanto, ocorre também em adultos (Morera e Bontempo, 1985; Morera, 1988; Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a, 1991b, 2005).

As alterações anatomo-patológicas desta enfermidade são: eosinofilia, reação granulomatosa perivascular e vasculite eosinofílica (Morera, 1988; Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a). No homem, causa intensa reação inflamatória na parede intestinal pela retenção dos ovos que não são eliminados junto às fezes (Morera e Bontempo, *op cit.*; Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a), podendo ocorrer também a oviposição no fígado (Morera *et al.*, 1982). Ainda não há tratamentos específicos e os anti-helmínticos como tiabendazole, dietilcarbamazina e levamisole são contra-indicados, pois podem induzir

migração errática dos vermes e agravamento das lesões (Morera e Bontempo *op cit.*; Carvalho *et al.*, 2005).

*Angiostrongylus cantonensis* causa a angiostrongilíase cerebral quando humanos, acidentalmente, participam do ciclo como hospedeiro definitivo; o primeiro caso desta infecção foi descrito em 1945 em Taiwan, no entanto, apenas em 1960 a angiostrongilíase cerebral passou a ser considerado um problema de saúde pública (Graeff-Teixeira *et al.*, 2009).

A angiostrongilíase cerebral geralmente causa, inicialmente, uma dor de cabeça aguda cuja origem provê do aumento da pressão intracraniana (Kuberski *et al.*, 1979; Tsai *et al.*, 2001). A presença de jovens adultos nas meninges e no parênquima da medula, ponte e cerebelo produz esta reação inflamatória cujo alívio pode ser obtido através de repetidas punções lombares visando diminuir a pressão intracraniana (Graeff-Teixeira *et al.*, 2009).

Com relação ao tratamento, estudos com infecções experimentais e também registros de casos isolados indicam que a morte dos vermes de *A. cantonensis*, provavelmente, induz ao aumento da inflamação, levando ao agravamento da doença (Wang *et al.*, 2006; Leone *et al.*, 2007). No entanto, vem sendo testados, em modelos animais, o uso conjunto de anti-helmínticos e antiinflamatórios apresentando resultados positivos (Lai, 2006; Chen e Lai, 2007).

## **1.2 Distribuição geográfica das angiostrongilíases**

Existem casos de angiostrongilíase abdominal registrados na maioria dos países americanos. A doença distribuiu-se dos EUA ao norte da Argentina (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a). No Brasil, há casos registrados nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Distrito Federal, Minas Gerais e Espírito Santo (Morera e Céspedes, 1971a; Malek, 1981; Kamisky *et al.*, 1987, 1995).

A angiostrongilíase cerebral ocorre na Ásia, na Austrália, nas Ilhas do Pacífico, na África e nas Américas (Aguiar *et al.*, 1981; Campbell e Little 1988; Lindo *et al.*, 2002; Caldeira *et al.*, 2007; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009). Um foco de transmissão autóctone foi detectado, pela primeira vez no Brasil, na cidade de Cariacica, no estado do Espírito Santo (Caldeira *et al.* 2007). Recentemente, outro foco foi registrado no nosso país, no estado de Pernambuco (Lima *et al.*, 2009).

## **1.3 Ciclo evolutivo dos parasitos**

Tanto *A. costaricensis* como *A. cantonensis* possuem um ciclo evolutivo heteroxeno, ou seja, precisam de dois hospedeiros para completar o seu desenvolvimento. Como hospedeiro intermediário, esses parasitos necessitam de um molusco e como hospedeiro definitivo utilizam um roedor.

O ciclo evolutivo das duas espécies em estudo pode ser resumido assim: as larvas de primeiro estágio (L1) são eliminadas pelas fezes do

roedor, sendo infectantes ao molusco coprófago ou que simplesmente rasteje sobre essas fezes. Dentro do invertebrado, o verme passa por duas mudas. Em torno de 30 dias, após a infecção, surgem larvas de terceiro estágio (L3), forma infectante ao vertebrado, sendo liberadas através do muco do molusco. O hospedeiro definitivo se infecta pela ingestão das L3. Dentro do roedor, essas larvas evoluem sucessivamente como: larvas de quarto estágio (L4), larvas de quinto estágio (L5), adultos jovens e adultos, quando passam a ovipor.

No ciclo de *A. costaricensis*, quando as L3 chegam ao intestino do roedor, elas invadem a parede da região ileocecal, atingindo as vias linfáticas mesentéricas, sofrendo ali a terceira muda. As L4 podem atingir as artérias mesentéricas da região ileocecal após passarem pela circulação geral ou pelo fígado. Cerca de uma semana depois se transformam em L5, retornando ao intestino; alojam-se nas artérias mesentéricas convertendo-se em vermes adultos. Após, aproximadamente, 24 dias depois da infecção no roedor, ele passa a eliminar larvas junto as suas fezes (Morera e Céspedes, 1971b; Morera, 1973; Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a).

O ciclo evolutivo de *A. cantonensis* se difere um pouco da outra espécie. As principais diferenças são: (1) as L5 passam pelas meninges, causando meningoencefalites em humanos, (2) seus vermes adultos vivem nas ramificações das artérias pulmonares dos hospedeiros definitivos e (3) os ovos são levados aos capilares dos pulmões podendo ocasionar embolia (Graeff-Teixeira *et al.*, 2009).

#### **1.4 Os parasitos: *Angiostrongylus costaricensis* e *A. cantonensis***

Segundo Ubelaker (1986), os agentes etiológicos da angiostrongilíase abdominal e da angiostrongilíase cerebral situam-se, sistematicamente, em: Metastrongyloidea, Angiostrongylidae, Angiostrongylinae, ordem Strongylida. As duas espécies estudadas no presente trabalho, acidentalmente, podem causar patologias aos seres humanos. Ambas situam-se no gênero *Angiostrongylus* (Kamensky, 1905) que reúne 23 espécies de parasitos intra-arteriais de roedores, de felinos, de canídeos e, ocasionalmente, de primatas (Robles *et al.*, 2008).

A larva de primeiro estágio de *A. costaricensis* tem cerca de 0,27 mm de comprimento e 14-15 µm de largura, possui cauda pontiaguda e entalhe na extremidade sob o lado dorsal; entre o 3º e o 4º dia de vida intramolusco, transforma-se em L2, tendo 0,37 mm de comprimento e 36 µm de largura; pelo 11º até o 14º dia, converte-se a L3, forma infectante ao vertebrado, apresentando 0,47 mm de comprimento e 28 µm de largura, mantendo as duas bainhas e tendo a região anterior arredondada contendo duas proeminentes hastes quitinosas; no 3º ou no 4º dia, após penetrar no roedor, sofre a terceira muda; a L4 possui dimorfismo sexual, tendo a fêmea 0,92 mm e o macho 0,87 mm de comprimento; no 7º dia evolui a adulto jovem (L5); no 10º dia, situa-se nas artérias mesentéricas, habitat definitivo; a fêmea e o macho adulto têm 3,75 mm e 4,4 mm de comprimento, respectivamente (Morera, 1973).

A partir das figuras do estudo sobre culturas *in vitro* de *A. cantonensis* realizado por Hata e Kojima (1990) foi possível observar que as larvas de primeiro estágio usadas para iniciar o cultivo possuíam 0,28 mm de comprimento e 15 µm de largura; as larvas de segundo estágio apresentavam 0,5 mm de comprimento e 45 µm de largura. Nas discussões deste mesmo artigo, os autores informaram que o comprimento médio das L3 de *A. cantonensis* obtidas *in vitro* foi de 0,46 mm, sendo semelhante ao obtido *in vivo*. Diferentemente, as L3 recuperadas *in vitro* por Chen *et al.* (1981) tinham 0,35 mm de comprimento e 27 µm de largura; as L2 que eles obtiveram no cultivo apresentavam 0,3 mm de comprimento e 22 µm de largura. As L4 obtidas *in vitro* por Hata (1993) tinham 1,76 mm ( $\pm$  0,39 mm) de comprimento.

### **1.5 Hospedeiros intermediários**

Diversos moluscos terrestres já tiveram a sua suscetibilidade natural ao nematódeo *A. costaricensis* comprovada. Tais como: *Belocaulus angustipes* (Heynemann, 1885), *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821), *Deroceras laeve* (Müller, 1774), *Helix aspersa* Müller, 1774, *Limax flavus* (Linnaeus, 1758), *Limax maximus* (Linnaeus, 1758), *Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948), *Phyllocaulis soleiformis* (d'Orbigny, 1835), *P. variegatus* (Semper, 1888), *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885), *S. plebeia* (Fischer, 1868) (Graeff-Teixeira *et al.*, 1989; Duarte *et al.*, 1992; Rambo *et al.*, 1997; Laitano *et al.*, 2001; Maurer *et al.*, 2002).

No entanto, as lesmas terrestres americanas, ou seja, os veronicelídeos são os mais importantes hospedeiros intermediários de *A. costaricensis*. Sendo representados especialmente por *Sarasinula plebeia* na Costa Rica, Equador, Honduras e Nicarágua e por *Phyllocaulis variegatus* e *S. linguaeformis* no Brasil (Carvalho *et al.*, 2005).

Dentre as 200 espécies pantropicais de Veronicellidae, apenas seis ocorrem no Rio Grande do Sul. Graeff-Teixeira *et al.* (1989) apontaram *P. variegatus* como o principal hospedeiro intermediário natural deste nematódeo para este estado. O supramencionado molusco distribui-se pelo alto Uruguai, planalto médio (norte do RS), serra do sudeste, depressão central, encosta inferior do nordeste, campos de cima da serra, encosta superior do nordeste e litoral (Thomé *et al.*, 1999).

As diferenciações quanto às características externas dos veronicelídeos, sobretudo o padrão de coloração são conhecidas (Thomé *et al.*, 1999; Thomé *et al.*, 2006). O fato deste grupo de moluscos possuírem uma ampla variação de coloração reforça a importância do conhecimento da sua anatomia principalmente do sistema reprodutor, para determinar com exatidão as diferentes espécies. Santos e Thomé (1999) divulgaram as diferenças entre a anatomia interna dos seis veronicelídeos presentes no Rio Grande do Sul.

Os hospedeiros intermediários naturais de *A. cantonensis* são, principalmente, caramujos ampularídeos como: *Pila* spp. e *Ampullarium canaliculatus* Lamarck, 1819; os caracóis terrestres: *Bradybaena similares* (Férrussac, 1821), *Subulina octona* (Brugüière, 1789) e *Achatina fulica*

Bowdich, 1822; as lesmas terrestres: *Veronicella* spp., *Limax* spp. e *Deroceras* spp. (Malek e Cheng, 1974; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009).

Inicialmente, em estudos experimentais, *A. fulica* Bowdich, 1822 apresentou-se como um importante hospedeiro intermediário de *A. cantonensis*, pois a produção de L1 nesse caracol foi superior a dos demais moluscos tidos como hospedeiros intermediários (Wang *et al.*, 2008). O registro de *A. fulica* no Brasil foi em 1997 no estado de São Paulo; em 2001 a presença deste molusco foi registrada no estado do Rio de Janeiro e hoje pode ser encontrado em inúmeros estados, desde o Amazonas até Santa Catarina (Teles *et al.*, 1997; Vasconcelos e Pile, 2001). Em Pernambuco, um caso de angiostrongilíase cerebral foi relacionado à presença deste caracol exótico, infectado por *A. cantonensis*, nos arredores da casa da paciente (Lima *et al.*, 2009).

## **1.6 Hospedeiros definitivos**

O principal hospedeiro definitivo do *A. costaricensis* é vulgarmente conhecido como “rato do algodão”, *Sigmodon hispidus* (Say e Ord, 1825) (Morera, 1985, 1988). Ele não ocorre na América do Sul, exceto no norte do Peru, Colômbia e Venezuela (Graeff-Teixeira *et al.*, 1991a). Roedores como: *Rattus rattus*, *Zigodontomys microtinus*, *Liomys adspersus*, *Oligoryzomys fulvescens* também são mencionados no ciclo de *A. costaricensis* (Morera, 1973).

Graeff-Teixeira *et al.* (1990) registraram a infecção em *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818) e *O. ratticeps* (Hensel, 1837) no sul do Brasil; citaram que o primeiro parece ser o principal hospedeiro definitivo deste nematódeo na região serrana do Rio Grande do Sul.

Espécies de roedores como o *Rattus rattus* e *R. norvegicus* são os hospedeiros definitivos de *A. cantonensis*, porém outros mamíferos como gatos, macacos e camundongos podem se infectar (Alicata, 1965).

### **1.7 Cultivo *in vitro* de nematódeos**

Com relação às pesquisas de métodos de cultura *in vitro* de *A. costaricensis*, cabem ressaltar os seguintes trabalhos: Hata (1996a) realizou o cultivo *in vitro* de ovos até larvas de primeiro estágio (L1). Ele testou sete meios e dez diferentes composições de soro. O maior êxito foi alcançado usando uma mistura de nutrientes F-12 de Ham (GIBCO) sem suplementação de soro, resultando em 34% de L1. Hata e Kojima (1991) obtiveram 77% de jovens adultos em uma cultura de 28 dias semeada com L3 em meio de Waymouth (GIBCO). Estudos visando à detecção de aminoácidos e de outros elementos essenciais, assim como as respectivas concentrações necessárias ao desenvolvimento da larva de terceiro estágio até a fase de jovem adulto foram efetuados por Hata (1994, 1996b).

Destacam-se, dentre os trabalhos realizados sobre *Angiostrongylus cantonensis*: Chen *et al.* (1981) testaram diferentes sistemas de cultura para a manutenção *in vitro* das larvas de primeiro estágio (L1), terceiro estágio (L2) e

de vermes adultos de *A. cantonensis*, mas não houve evolução de larva tanto de L1 à L2 quanto de L2 à verme adulto. Eles alcançaram os melhores resultados para a manutenção de L1, usando o meio de cultura de tecidos 199 sem suplementação de soro, com 20% de soro de bezerro recém-nascido ou com 20% de soro fetal bovino. Nessas três composições, as L1 sobreviveram por 29 dias; Uga e Matsumura (1982) cultivaram *in vitro* os ovos deste nematódeo e obtiveram cerca de 60% de ovos embrionados utilizando o meio NCTC 109 (Difco) suplementado com 50% de soro de ratazana, mas nessa composição, apenas 8,7% dos ovos eclodiram. A melhor taxa de eclosão foi observada quando o meio era suplementado com 50% de soro fetal bovino (SFB), aonde 57% dos ovos embrionavam; o único desenvolvimento *in vitro* realizado com nematódeo na fase intramolusco foi feito por Hata e Kojima (1990). Eles testaram onze meios para o cultivo de larvas de primeiro estágio de *A. cantonensis*. Esses pesquisadores obtiveram larvas de terceiro estágio (L3) somente em dois meios, mas ambos resultaram em baixíssima quantidade de L3. No meio composto por uma combinação de solução salina de Chernin (CBSS), meio L-15 (Difco), solução de triptose fosfatada (TPB) (Difco) e soro fetal bovino (GIBCO), 5% das larvas evoluíram para L3; já no outro meio, formulado da mesma maneira, porém omitindo a CBSS, somente 1% das larvas evoluíram ao terceiro estágio. Estas percentagens de evolução foram extremamente baixas para sustentar a produção de larvas necessárias a estudos parasitológicos. Hata (1993) observou que o meio de cultivo ideal varia conforme a etapa de desenvolvimento do nematódeo, ou seja, de acordo com as necessidades fisiológicas e/ou nutricionais do parasito, refletindo a migração realizada no hospedeiro final.

## 1.8 Co-cultivo entre parasitos e células Bge

O caramujo dulceaquícola *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) foi muito eficiente para a manutenção do ciclo de *Angiostrongylus costaricensis* em laboratório, sendo comumente utilizado como hospedeiro intermediário experimental. Diversos trabalhos empregaram *B. glabrata* desta forma (Arroyo e Morera, 1978; Monge *et al.*, 1978; Oku *et al.*, 1984; Lima *et al.*, 1992; Mentz e Graeff-Teixeira, 2005). Este caramujo foi utilizado na manutenção do ciclo *in vivo* de *A. costaricensis* e de *A. cantonensis* no Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS.

Até o momento, havia apenas uma cultura celular permanente de molusco. Esta foi estabelecida por Hansen (1976a) a partir de células embrionárias de *Biomphalaria glabrata* (Bge) cuja comercialização era realizada pela *American Type Culture Collection* (ATCC CL 1494). Estas células têm constituído modelos experimentais para estudos dos mecanismos de comunicação química entre o hospedeiro e trematódeos (Yoshino *et al.*, 1999; Castillo e Yoshino, 2002; Castillo *et al.*, 2007; Yoshino *et al.*, 2008; Taft *et al.*, 2009).

Co-cultivo entre o parasito *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 e as células Bge já foram realizados inúmeras vezes para subsidiar estudos imunológicos, moleculares e celulares a partir da relação parasito-hospedeiro (Yoshino e Laursen, 1995; Ivanchenko, 1999; Coppin *et al.*, 2003; Coustau *et al.*, 2003).

Co-cultivos entre outros trematódeos, como *Echinostoma caproni*, *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904) e *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) com células Bge, ou seja, com uma linhagem celular proveniente de um molusco diferente do seu hospedeiro intermediário natural, foram realizados com sucesso (Coustau *et al.*, 1997; Laursen e Yoshino, 1999; Coustau *et al.*, 2003).

Todas estas pesquisas vêm estimulando questionamentos quanto à existência de fatores de desenvolvimento compartilhados entre moluscos e quanto ao grau de especificidade existente entre o parasito e o seu hospedeiro (Coustau *et al.*, 1997; Laursen e Yoshino, 1999; Coustau e Yoshino, 2000; Lewis *et al.*, 2001; Yoshino *et al.*, 2001; Humphries e Yoshino, 2003).

Buscando formas de possibilitar a evolução *in vitro* das fases intramolusco das larvas de *A. costaricensis* e de *A. cantonensis*, também foram testados cultivos e co-cultivos em meios enriquecidos com diferentes suplementos provenientes de *B. glabrata*. Estudos referentes ao co-cultivo de células embrionárias de *Biomphalaria glabrata* e nematódeos foram inéditos até o presente trabalho.

## 1.9 Cultivo de células de moluscos

Apenas uma linhagem celular permanente de molusco existe até hoje. Esta foi obtida por Hansen (1976a) através da manipulação de embriões de *Biomphalaria glabrata*.

Culturas primárias, ou seja, cultivos cujas células sejam incapazes de proliferarem indefinidamente (Peres e Curi, 2005), foram realizados com lesmas terrestres pela primeira vez por Bailey (1973) que estabeleceu uma cultura a partir do órgão hermafrodita de *Agriolimax reticulatus*. Manaka *et al.* (1980) estabeleceram por dois ou três meses, culturas primárias a partir de pequeníssimos pedaços de tecido do pé da lesma terrestre *Incilaria bilineata*. Furuta e Shimoszawa (1983) realizaram culturas primárias a partir de fragmentos do pé e, também, do manto de *I. fruhstorferi*.

Existem poucos trabalhos sobre cultivo celular realizados com moluscos marinhos. A maioria deles refere-se a *Mytilus* spp que são bivalves. Destacam-se os seguintes estudos: Cornet (2006) estabeleceu uma cultura primária a partir de células do manto de *M. galloprovincialis* Lamarck, 1819; Plotnikov *et al.* (2003) realizaram estudos comparativos entre as células musculares *in vivo* das mantidas *in vitro* de *Mytilus* sp.; Lin e Glanzman (1994) elaboraram estudos sobre o sistema nervoso de *Aplysia* sp. a partir do cultivo celular iniciado com fragmentos de tecido; Robledo e Cajaraville (1997) caracterizaram as células da glândula digestiva de *M. galloprovincialis* a partir do cultivo *in vitro*. Lim *et al.* (1997) realizaram estudos com células nervosas de *Aplysia kurodai* Baba, 1937, espécie de lesma marinha, a partir do cultivo de pequeníssimos blocos de tecido.

Ainda menos trabalhos existem sobre caramujos dulceaquícolas exceto de *B. glabrata*. Griffond e Gomot (1974) realizaram o cultivo *in vitro* de diferentes órgãos de *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1758).

Para suprir a carência quanto as linhagens celulares de moluscos, foram realizados experimentos para se estabelecer uma cultura primária a partir de células do tegumento de *Sarasinula linguaeformis* e também a partir das suas células embrionárias.

### **1.10 Criopreservação de espécies de *Angiostrongylus***

A técnica de criopreservação de parasitos tem por objetivo possibilitar o congelamento dos espécimes sob condições específicas, de maneira que eles continuem viáveis após o seu descongelamento.

A criopreservação pode reduzir consideravelmente o número de animais experimentais em laboratório usualmente utilizados para a manutenção do ciclo de parasitos; este procedimento facilita o estudo de parasitos isolados com características de interesse (Eckert, 1988). Esta técnica serve para a criação de bancos de parasitos, também facilita o estoque e transporte entre laboratórios (James, 1985; Eckert, 1987).

Ainda não existem estudos sobre a criopreservação de *A. costaricensis*. Com relação a *A. cantonensis*, foram realizados estudos sobre a criopreservação de seus ovos em meio NCTC 109 (GIBCO) e o criopreservante dimetil-sulfóxido (DMSO) (Uga *et al.*, 1983). A criopreservação de larvas de terceiro estágio de *A. cantonensis* foi efetuada por Mahajan e

Renapurkar (1993). Esses pesquisadores testaram diferentes concentrações de DMSO, de soro fetal bovino (SFB) e distintas temperaturas para fazer o descongelamento. Eles encontraram as melhores condições usando 4,8% de DMSO em meio composto por 40% de SFB e realizando o descongelamento a 43°C, assim recuperaram 56% de L3 ativas.

Estudos sobre criopreservação de larvas de primeiro estágio (L1) foram feitos para outras espécies de nematódeos. Nolan *et al.* (1988) realizaram testes em L1 e, também em L3, de *Strongyloides stercoralis*. Estes pesquisadores utilizaram o rápido congelamento, diretamente em nitrogênio líquido, após um longo período de incubação com o criopreservante. Eles concluíram que o sucesso da criopreservação depende da incubação durante 30 a 90 minutos com o criopreservante antes do congelamento. Gill e Redwin (1995) utilizaram com sucesso esse método proposto por Nolan *op. cit* ao criopreservarem L1 de três diferentes espécies de nematódeos.

### **1.11 Justificativa**

Dentre os nematódeos, poucos estudos sobre cultivos *in vitro* foram feitos até o momento. Nenhum destes estudos proporcionou a geração de larvas em grande quantidade e com regularidade, itens de grande relevância para estudos parasitológicos. Com o atual trabalho buscou-se formas de obter *in vitro* larvas dos estágios iniciais, ou seja, das fases intramolusco, de *Angiostrongylus costaricensis* e de *A. cantonensis*, para subsidiar futuros estudos parasitológicos.

Acredita-se que as etapas intramolusco do desenvolvimento larval possam ser concretizadas com êxito quando as larvas de primeiro estágio forem co-cultivadas com as linhagens celulares de moluscos. Os modelos de co-cultivo, tanto com as células embrionárias do caramujo dulceaquícola *Biomphalaria glabrata* quanto com a linhagem celular a ser criada da lesma terrestre *Sarasinula linguaeformis* fornecerão larvas de terceiro estágio de *A. costaricensis* em grande quantidade, com regularidade e qualidade – tríade essencial para estudos parasitológicos.

## **1.12 Objetivos**

### **1.12.1 Objetivos gerais**

- Obter larvas dos estágios iniciais de *Angiostrongylus costaricensis* e de *A. cantonensis* com alta pureza, em grande quantidade, com regularidade e qualidade a partir dos cultivos *in vitro* das larvas em primeiro estágio, ou dos co-cultivos destas com linhagens celulares de molusco.

### **1.12.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver o cultivo *in vitro* de larvas nos estágios intramolusco de *Angiostrongylus costaricensis* e de *A. cantonensis*;

- Realizar os primeiros o co-cultivos entre nematódeos e células embrionárias de *Biomphalaria glabrata*;
- Averiguar as necessidades nutricionais deste nematódeo em seus diferentes estágios larvais na fase intramolusco, a partir dos estudos *in vitro*;
- Desenvolver uma linhagem celular de *Sarasinula linguaeformis*, espécie pertencente à família que inclui os principais hospedeiros intermediários de *A. costaricensis* para, posterior realizar co-cultivos;
- Testar a infectibilidade das larvas de terceiro estágio, obtidas em co-cultivo, em roedores.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do material biológico

#### 2.1.1 Larvas e caramujos

As larvas dos nematódeos em estudo assim como exemplares de caramujos do táxon *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) foram cotidianamente obtidos através dos ciclos de vida de *Angiostrongylus costaricensis* Morera e Céspedes, 1971 e de *A. cantonensis* (Chen, 1935) mantidos rotineiramente no Laboratório de Biologia Parasitária da PUCRS. O isolado da primeira espécie proveio de moluscos coletados em Santa Rosa (RS) e em Nova Itaberaba (SC); já o da outra espécie foi obtido a partir do Departamento de Parasitologia da Escola Médica da Universidade de Akita (Japão). O ciclo de *A. costaricensis* foi mantido com a infecção de *Oligoryzomys* spp e o de *A. cantonensis*, com *Rattus norvegicus* variedade Wistar.

Pelo método de Baermann (Rey, 2001), as larvas de primeiro estágio (L1) foram obtidas a partir das fezes desses roedores. Após a centrifugação da suspensão resultante por 15 minutos a 1048 x g, o número de L1 foi estimado sob microscópio óptico (Olympus BX40). Usou-se cerca de 10.000 L1 para expor à infecção cada *Biomphalaria glabrata*. Esta exposição foi realizada colocando as larvas de primeiro estágio em um recipiente com água declorada junto com o caramujo *overnight*. Depois, os moluscos foram transferidos para grandes potes e mantidos no vivário da PUCRS localizado

no prédio 12 desta instituição, em uma sala com temperatura e luminosidade controlada. Esses caramujos receberam alface como alimento duas vezes por semana e tiveram a água do seu recipiente trocada semanalmente. Para se obter as larvas de terceiro estágio (L3), os moluscos passaram por um processo de digestão artificial que incluía uma etapa de dissociação mecânica dos seus tecidos e uma etapa química com imersão em ácido clorídrico 0,7% (Vetec) e pepsina 0,03% (Sigma), a 37°C por uma hora. Em seguida, pelo método de Baermann, as L3 dos tecidos digeridos foram isoladas. As larvas obtidas foram inoculadas nos roedores por uma cânula gástrica, após os mesmos serem anestesiados através de injeção intraperitoneal de 5% de xilasina (Sigma) e 10% de ketamina (Sigma). Os animais foram mantidos em uma sala com controle de luminosidade pertencente ao vivário da PUCRS. Os roedores ficaram em caixas de polipropileno (Tecniplast) com controle de temperatura, umidade e filtragem do ar, tendo água e alimento à disposição e sendo a maravalha trocada duas vezes por semana.

### **2.1.2 Lesmas**

Para realizar experimentos com a finalidade de estabelecer uma nova linhagem celular de moluscos a partir de culturas primárias de veronicelídeos, lesmas dessa família foram coletadas em Porto Alegre (RS). Esses moluscos terrestres foram mantidos no vivário da PUCRS em cubas de vidro apropriadas, com tampa ventilada, terra no fundo, tendo alimento e água à disposição conforme Thomé *et al.* (2006) (Figura 1).

*Figura 1.* Cuba de vidro utilizada para a manutenção de até cinco espécimes de veronicelídeos.

## **2.2 Cultivo das células Bge**

### **2.2.1 Manutenção das células Bge**

As células embrionárias de *Biomphalaria glabrata* (Bge) utilizadas nos experimentos foram adquiridas a partir da proliferação de células Bge cedidas pelo Dr. Timothy Yoshino da Universidade de Wisconsin-Madison (EUA).

Inicialmente, elas foram cultivadas em frascos de cultura com 25 cm<sup>2</sup> (TPP). Cada recipiente recebeu 3 mL do meio de crescimento completo (mCC) (Tabela 1). O meio era renovado semanalmente. As culturas foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> (SANYO, MCO-17A), com 5% de CO<sub>2</sub> e sob temperatura de 26°C.

Os meios recuperados, ou seja, aqueles que já haviam sido utilizados no cultivo foram armazenados em criotubos (Nalgene, 1,5 mL) e congelados, ao invés de serem descartados. Estes meios recuperados suplementaram, posteriormente, alguns dos cultivos testados.

*Tabela 1.* Meio de crescimento completo (mCC) adaptado a partir do protocolo da *American Type Culture Collection* (ATCC) para células Bge (Apêndice 1).

Componentes do mCC	Quantidades
meio <i>Drosophila</i> de Schneider (Sigma)	22%
água de injeção	58%
soro fetal bovino (GIBCO)	20%
lactalbumina hidrolisada (Sigma)	4,5 g/L
galactose (Vetec)	1,3 g/L
pH 7,0 – 7,6	

### 2.2.2 Subcultivo das células Bge

O subcultivo foi realizado a cada 15 dias, quando a confluência celular chegava a cerca de 90% da área disponível. Esse processo era feito sem o uso de enzimas como a tripsina, pois a aderência dessas células caracterizou-se por ser muito suave. Assim o subcultivo foi realizado por separação mecânica utilizando pipeta pauster de plástico (T. Yoshino, comunicação pessoal; F. Bezerra, comunicação pessoal). As células obtidas de cada frasco eram transferidas para um tubo (Falcon, 15 mL) e homogeneizadas com 3 mL de mCC fresco, e igualmente distribuídas, em 3 novas garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (TPP), assim, a taxa de subcultivo era 3:1. Cada um desses novos frascos recebia 3 mL do meio.

Para verificar a reação das células em contato com o soro fetal bovino (SFB), diferentes lotes foram testados. Cada lote foi testado após ser, ou não, re-inativado. A re-inativação do SFB foi feita colocando-se os lotes em banho Maria a 60°C por 1 hora, agitando-o continuamente ( T. Yoshino, comunicação

peçoal). Depois foram aliquotados em tubos (Falcon) contendo 10 mL de SFB e congelados.

Os experimentos referentes ao SFB foram realizados em placas de 24 posições (TPP), em triplicata, aonde uma pequena quantidade de células Bge foi semeada em cada poço cujo meio (mCC) possuía SFB de diferentes lotes (Tabela 2). As placas foram mantidas *overnight* em incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% e a 26°C. Depois, foram feitas observações em microscópio invertido para verificar a aderência ou não das células.

*Tabela 2.* Organização dos testes realizados com o soro fetal bovino (SFB) em cultivo de células Bge. Em todos os poços foram colocados 1 mL de meio de crescimento completo composto por 20% de SFB.

Marca do SFB	Lote	Re-inativado
GIBCO	200089M	Sim
		Não
	210088K	Sim
		Não
	210090K	Sim
		Não
Cripion	20540 f53	Sim
		Não
	20540 f55	Sim
		Não
LGC	38.32203	Sim
		Não

### 2.2.3 Congelamento e descongelamento das células Bge

Para o congelamento das células Bge, 45 amostras foram preparados no total. Cada uma destas possuía 1 ml de mCC com 5% de dimetil-sulfóxido

(DMSO) (Nuclear) (conforme protocolo da ATCC para células Bge). O congelamento foi feito lentamente. Durante as primeiras 24 horas, as amostras ficaram a  $-18^{\circ}\text{C}$ , depois permaneceram este mesmo período a  $-80^{\circ}\text{C}$ , por último, foram transferidas para um tambor de nitrogênio líquido (T. Yoshino, comunicação pessoal). Em cada criotubo (Nalgene, 1,5 mL) foram congeladas  $20 \times 10^6$  células/mL (conforme protocolo da ATCC para células Bge).

O descongelamento foi realizado de modo rápido, em banho Maria a  $26^{\circ}\text{C}$ . Em seguida foram adicionados 0,5 mL de mCC e centrifugou-se por 5 minutos a  $1048 \times g$ . Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de mCC a centrifugação foi repetida do mesmo modo, sendo seguida pelo descarte do sobrenadante. Este procedimento de enxágüe foi repetido duas vezes. Por último, as células presentes no sedimento foram transferidas para uma garrafa de cultura de  $25 \text{ cm}^2$  (TPP) com 1 mL de mCC. O frasco de cultivo foi mantido com o mesmo meio até ser verificada a aderência das células. A partir disso, se passava a fazer a troca semanal do meio, adicionando 3 mL de meio fresco. A cultura foi mantida em incubadora a 5% de  $\text{CO}_2$  e em temperatura de  $26^{\circ}\text{C}$ .

## 2.3 Cultura primária de veronicelídeo

### 2.3.1 Cultura primária a partir de blocos de tecidos

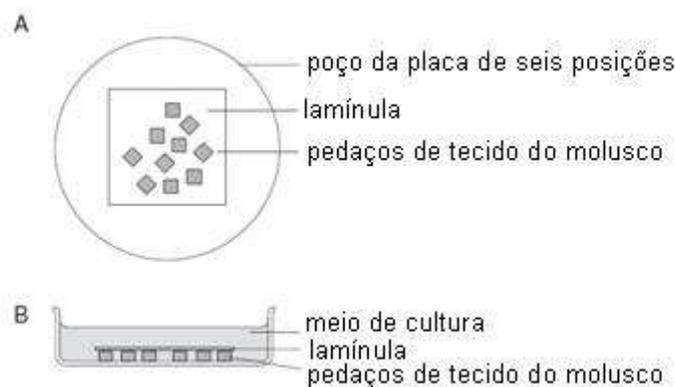
Para realizar a cultura primária a partir do tecido do pé e, separadamente, do manto do molusco, o animal foi anestesiado com gelo conforme adaptação de Furuta e Shimozawa (1983). Cada veronicelídeo foi colocado em um pote de isopor, repleto de gelos em escamas, permanecendo assim por 30 minutos. Após averiguar a baixa do metabolismo do animal, através do reflexo extremamente lento ao toque, a superfície externa do veronicelídeo foi limpa mecanicamente, em solução salina balanceada de Chernin (CBSS) (Chernin, 1963) (Tabela 3) contendo 10 µg/mL de anfotericina B (Cristália), 500 U/mL de penicilina (GIBCO) e 500 µg/mL de estreptomicina (GIBCO).

*Tabela 3.* Solução salina balanceada de Chernin (CBSS) conforme Chernin (1963), utilizada nos cultivos, co-cultivos, filtração e axenização.

Componentes da CBSS	Quantidade (g/L)
NaCl (Dinâmica)	2,80
KCl (Vetec)	0,15
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	0,07
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck)	0,45
CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O (Merck)	0,53
NaHCO <sub>3</sub> (Reagen)	0,05
Glicose (Merck)	1,00
Trealose (Global)	1,00
pH 7,0 – 7,6	

A lesma foi dissecada e seus tecidos foram preparados para os testes de culturas primárias conforme uma adaptação dos métodos apresentados por Manaka *et al.* (1980), Furuta e Shimozawa (1983) e Furuta *et al.* (1986). O manto que corresponde à região dorsal foi separado do pé situado na região ventral. O manto e o pé foram tratados da mesma forma, mas separadamente. Eles ficaram imersos em CBSS contendo 100 U/mL de penicilina (GIBCO) e 100 µg/mL de estreptomicina (GIBCO), por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período os tecidos foram cortados em pedaços de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> e colocados em um novo recipiente contendo CBSS com 500 U/mL de penicilina e 500 µg/mL de estreptomicina, por 10 minutos a temperatura ambiente.

Para o cultivo, foram usadas placas de 6 posições (TPP). Em cada poço foram colocados 10 pedaços de tecido, lamínulas de microscopia, previamente esterilizadas, foram usadas para manter os fragmentos imersos (Figura 2). Cada poço recebeu 2 mL de mCC que foi renovado a cada três dias. O cultivo foi mantido em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 26°C. Cada experimento foi repetido 12 vezes. Foram realizados testes quanto à viabilidade celular através do experimento com azul de tripan.



**Figura 2.** Desenho esquemático sobre a cultura primária de tecidos do molusco: (A) vista superior; (B) vista lateral.

### **2.3.2 Cultura primária a partir das células embrionárias**

As células embrionárias dos veronicelídeos foram utilizadas para a cultura primária. Os ovos provenientes da postura destas lesmas foram preparados entre o 3º e o 5º dia após a oviposição, conforme adaptação do método de Hansen (1976a, 1976b) e dos trabalhos sobre cultura primária de lesmas (Manaka *et al.*, 1980; Furuta e Shimosawa, 1983; Furuta *et al.*, 1986).

A superfície externa dos ovos foi limpa mecanicamente usando-se solução salina balanceada de Chernin (CBSS) contendo 10 µg/mL de anfotericina B (Cristália), 500 U/mL de penicilina (GIBCO) e 500 µg/mL de estreptomicina (GIBCO). Depois, os ovos foram abertos em um recipiente com CBSS contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Após as células embrionárias serem separadas do vitelo, elas foram transferidas para um microtubo contendo 1 mL de solução de tripsina-EDTA (Tabela 4) ficando em temperatura ambiente por 10 minutos.

Depois foi centrifugado a 168 x g por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante e se incluiu 1 mL de CBSS com 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Repetiu-se esse processo de centrifugação por 3 vezes. Depois, transferiram-se as células provenientes de 20 embriões, para uma garrafa de cultura de 25 cm<sup>2</sup> com 3 mL de meio de crescimento completo (mCC) contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. O meio foi trocado a cada 3 dias. As culturas foram mantidas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 26°C de temperatura. Esse experimento foi repetido 10

vezes. A viabilidade das células foi averiguada através do teste com azul de tripan.

*Tabela 4.* Composição da solução de tripsina-EDTA utilizada na cultura primária de células embrionárias de veronicelídeos.

Solução de tripsina-EDTA	Quantidades (gm/L)
Na gluconato (Vetec)	1,5
NaCl (Dinâmica)	2,8
KCl (Vetec)	0,15
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	0,07

(Continuação da tabela 4)

NaHCO <sub>3</sub> (Reagen)	0,05
glicose (Merck)	0,5
trealose (Global)	0,5
galactose (Vetec)	0,5
tripsina (Sigma)	2,5
EDTA (GIBCO)	0,038
pH 7,0 – 7,6	

## 2.4 Cultivos e co-cultivos

### 2.4.1 Filtração e axenização das larvas

A suspensão resultante do método de Baermann foi tratada conforme uma adaptação do método de filtração e, posterior, axenização das larvas proposto por Barçante *et al.* (2003) então as larvas foram usadas nos cultivos e co-cultivos. Essa suspensão contendo as larvas de primeiro estágio (L1) foi centrifugada a 1048 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o

sedimento foi homogeneizado no 1 mL restante. Adicionou-se 9 mL de CBSS, homogeneizou, foi realizada a centrifugação a 1048 x g por 15 minutos, os 9 mL do sobrenadante foram desprezados. Estes passos foram repetidos duas vezes.

Então, a suspensão, foi transferida para um tubo menor (Falcon, 15 mL) contendo 9 mL de CBSS. Sua abertura foi fechada com papel usado para limpeza de lentes de microscópio (Olympus M97) sendo preso pelas laterais com o uso de uma tampa original do frasco adaptada (Figura 3A). Em um tubo (Falcon 50 mL) adicionou-se 40 mL da mesma solução salina e o tubo, contendo as larvas, foi colocado dentro do tubo maior, com a abertura ocluída com o papel, ficando em contato com a superfície líquida (Figura 3B). Este tubo maior foi colocado dentro de um frasco de vidro cuja abertura possuía o diâmetro levemente maior do que o seu, para que ficasse mantido na posição vertical (Figura 3C). Todo esse aparato ficou em banho Maria a 37°C, *overnight*. O tubo maior foi centrifugado por 15 minutos a 1048 x g e se desprezou o sobrenadante. Os 5 mL restantes foram homogeneizados com o sedimento e transferidos para um tubo (Falcon, 15 mL) contendo 5 mL de CBSS, sendo centrifugado por 1048 x g por 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante.

Conforme uma adaptação do método apresentado por Barçante *et al.* (2003), o sedimento resultante da filtração, passou pelo processo de axenização para que todos os microorganismos contaminantes fossem eliminados.

*Figura 3.* Imagens referentes ao processo de filtração: **(A)** detalhe mostrando a tampa adaptada; **(B)** detalhe mostrando o contato sutil entre os líquidos dos dois frascos usados; **(C)** aparato de filtração completamente montado.

Com o objetivo de se verificar qual a melhor concentração de hipoclorito de sódio a ser usada com as espécies em estudo, 100 L1 foram colocadas em cada poço de uma placa de 36 posições (TPP) e, em seguida se adicionou a solução com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações. Este teste foi feito diluindo-se o hipoclorito de sódio em água deionada, a fim de se verificar o comportamento das larvas sob as diferentes concentrações desse reagente e o potencial de axenização da solução. A observação foi feita durante os primeiros 10 minutos de contato das larvas com a solução. Os testes foram realizados em triplicata e, separadamente, com as duas espécies em estudo. Analisando esses resultados, estabeleceu-se o uso de hipoclorito de sódio a 0,25%.

A eficácia da axenização foi testada pelo plaqueamento de todas as suspensões tratadas com diferentes concentrações do reagente, e também o controle, em Ágar sangue (Oxoid) sendo as amostras mantidas por 24 horas em estufa a 37°C e, depois, observadas quanto à presença de unidades formadoras de colônias (UFCs).

Posteriormente, houve a corroboração dos resultados através de um método ainda mais sensível, o da análise radiométrica do crescimento bacteriano, através do equipamento Bact/ALERT (bioMérieux) realizado pela equipe do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Apêndice 2).

As larvas recuperadas após a filtração foram levadas para o fluxo laminar, adicionou-se 5 mL de hipoclorito de sódio a 0,25%, homogeneizado e centrifugado por 6 minutos a 168 x g.

Em seguida, foi efetuada uma adaptação da axenização usada por Hata e Kojima (1990), aonde, em condições estéreis, o sobrenadante contendo hipoclorito de sódio foi descartado, adicionou-se 5 mL de CBSS contendo 2 µg/mL de anfotericina B (Cristália), 200 U/mL de penicilina (GIBCO) e 200 µg/mL de estreptomicina (GIBCO), homogeneizou-se, fez-se a centrifugação por 1 minuto a 168 x g, descartou-se o sobrenadante e se repetiu o processo 5 vezes. As larvas foram re-suspendidas em 1 mL de CBSS e a suspensão foi homogeneizada. Três alíquotas de 10 µL obtidas do fundo, do meio e da superfície foram retiradas e colocadas em uma lâmina para contar, sob microscópio, a quantidade de L1 vivas recuperadas. Assim, estimou-se a quantidade de larvas presentes no volume final.

#### **2.4.2 Extrato protéico da hemolinfa**

Para preparar o extrato protéico da hemolinfa, a concha de *Biomphalaria glabrata* foi limpa com álcool 70° GL e a umidade retirada com papel toalha. O pericárdio foi puncionado com uma pinça de ponta fina e, à

medida que a hemolinfa extravasava, ela foi aspirada através de uma pipeta e transferida para um microtubo (Axygen, 1,5 mL). Este material foi congelado e, em seguida, descongelado, para romper as células, liberando as suas proteínas. O extrato protéico de hemolinfa de *B. glabrata* usada para os cultivos e co-cultivos constituíram-se a partir de um *pool* de 10 espécimes com diâmetro maior da concha superior a 1,0 cm (Figura 4).

Este *pool* de hemolinfa recebeu igual volume de solução salina balanceada de Chernin (sem glicose e sem trealose) e foi esterilizada por filtração com filtro de seringa (TPP), depois foi aliquoteada e armazenada no congelador. A quantificação de proteínas foi feita conforme o método de Bradford (1976).



Figura 4. Imagem de *B. glabrata*: (A) vista dorsal; (B) vista ventral, tendo o local de punção da hemolinfa em destaque. Escala = 0,5 cm.

#### 2.4.3 Extrato protéico do corpo

Após retirar a hemolinfa, o corpo da *B. glabrata* foi removido da concha usando uma pinça de ponta fina. Os tecidos foram homogeneizados mecanicamente, imersos em nitrogênio líquido e re-suspensos em CBSS. Os extratos protéicos de um *pool* de dez espécimes não infectados de *B. glabrata*, foram usados para compor e enriquecer o meio de cultura após

serem esterilizados por filtração utilizando filtro de seringa (TPP), aliquotados e armazenados no congelador. A quantificação de proteínas foi feita conforme o método de Bradford (1976).

#### 2.4.4 Cultivo das larvas

Os cultivos das larvas de primeiro estágio (L1) das duas espécies em estudo foram elaborados separadamente. Os mesmos foram realizados em placas de 24 posições (TPP) tendo cada poço a capacidade total de 3 mL. Diferentes suplementos foram testados a partir de três meios principais: o meio de crescimento completo (mCC) elaborado de acordo com o protocolo da *American Type Culture Collection* (ATCC), o meio cujos resultados foram mais satisfatórios para o cultivo de L1 a L3 de *A. cantonensis* conforme Hata e Kojima (1990) sendo no presente trabalho chamado de meio HK (mHK) e o gel de Chernin (Chernin *et al.*, 2002; S. Hall, comunicação pessoal) (Tabelas 1, 4 e 5).

Tabela 4. Composição do meio proposto por Hata e Kojima em (1990).

Componentes do mHK	Quantidades (%)
CBSS*	50
soro fetal bovino (GIBCO)	20
meio L-15 (GIBCO)	10
água de injeção	10
solução de triptose fosfatada (Difco)	10
pH 7,0-7,8	(*) omitindo a glicose e a trealose

Tabela 5. Composição do gel de Chernin (S. Hall, comunicação pessoal).

Componentes do gel de Chernin	Quantidade (g/L)
extrato de levedo (Acumedia)	2,25
peptona (Himedia)	6,70
NaCl (Dinâmica)	5,60
ágar (GIBCO)	2,00
goma xantana (Sigma)	2,45
caragenina (Sigma)	12,50
pH 7,0 – 7,6	

Cada diferente experimento de cultivo foi repetido 64 vezes com *A. costaricensis* e 72 vezes com *A. cantonensis*. As culturas foram mantidas por 40 e 45 dias, respectivamente.

Em cada poço, nas linhas A, B e C foram incluídos 1 mL do meio de cultura (Tabela 6). Depois, foi colocado um volume da suspensão de L1 correspondendo a 100 larvas por poço, calculado por estimativa, após a filtração e axenização das mesmas. Os poços presentes na linha D da placa serviram para analisar a qualidade da esterilização dos meios e suplementos utilizados. O meio de cultura e seus suplementos foram trocados a cada três dias.

Tabela 6. Composição de cada meio testado no cultivo das larvas.

Composição dos meios testados	
Meio	Suplemento
1 mL de meio HK	---
990 µL de meio HK	10 µL do extrato protéico do corpo de <i>B. glabrata</i>
990 µL de meio HK	10 µL do extrato da hemolinfa de <i>B. glabrata</i>
500 µL do gel de Chernin	500 µL de meio HK
500 µL do gel de Chernin	500 µL de mCC
990 µL de mCC	10 µL do extrato protéico do corpo de <i>B. glabrata</i>
990 µL de mCC	10 µL do extrato da hemolinfa de <i>B. glabrata</i>
1 mL de mCC	---
990 µL de mCC	10 µL de mCC recuperado

Conforme uma adaptação de Hata e Kojima (1990) as larvas foram caracterizadas a partir do seu comportamento (Tabela 7), como por exemplo, a sua mobilidade e pelo seu tamanho através da medição da sua largura e comprimento. Para cada experimento, 10 larvas foram usadas para realizar as medições a partir de fotografias digitais obtidas sob microscópio invertido (Zeiss Axiovert 25 HBO 50). Após a larva ser fotografada, a imagem foi impressa; para medir o comprimento, uma linha maleável foi utilizada; esta linha foi colocada ao longo do comprimento, sempre junto a sua porção mediana; para medir a largura, esta medida foi obtida sempre a partir de 100 micrômetros de sua extremidade anterior; medindo os valores dessas linhas, os mesmos foram transformados nos valores reais, conforme a escala da imagem (Figura 5).

Tabela 7. Esquema sobre as características das larvas conforme adaptação de Hata e Kojima (1990).

---

<b>Larva de primeiro estágio (L1)</b>
<i>Inicial:</i> movimentação ativa; estômago não expandido.
<i>Mediana:</i> movimentação lenta; estômago expandido; largura corporal aumenta sutilmente.
<i>Tardio:</i> aumenta em comprimento; movimento somente na parte antero-final; forma de C, tendo lenta motilidade em sua extremidade anterior; massas granulosas de alimento aumentam.

---

<b>Larva no segundo estágio (L2):</b> possui uma bainha resultante da primeira muda.
--

---



Figura 5. Método de medição das larvas, sendo a largura em azul e o comprimento em vermelho. Escala = 100  $\mu$ m.

#### 2.4.5 Co-cultivo entre células Bge e larvas

As larvas axênicas de primeiro estágio de *A. costaricensis* e de *A. cantonensis* foram co-cultivadas, separadamente, com células embrionárias de *Biomphalaria glabrata* (Bge) em placas de 24 posições (TPP).

As larvas de primeiro estágio (L1), após serem filtradas e axenizadas, foram ressuspensas em 1 mL de solução salina balanceada de Chernin (CBSS) e os espécimes presentes foram estimados. Colocou-se um volume dessa suspensão correspondendo a 100 L1 em cada poço. Com relação à quantidade de células Bge utilizadas, foram formados dois grupos: Bge pouco

confluyente, com as células cobrindo até 30% da superfície do poço e Bge confluyente, aonde as mesmas cobriram de 60% a 80% da área. Usou-se nos experimentos: o meio de crescimento completo (mCC), o extrato protéico da hemolinfa e o extrato protéico do corpo de *Biomphalaria glabrata*. Em cada placa, foi repetido o mesmo experimento nos quatro poços da mesma coluna (Tabela 8). Os experimentos foram repetidos 12 vezes com cada espécie.

Observações quanto o comportamento e o tamanho das larvas, assim como o grau de confluência das células Bge, foram efetuadas quatro vezes por semana sob microscópio invertido. O meio de cultura e seus suplementos foram renovados a cada três dias.

No dia anterior a cada experimento, as soluções utilizadas foram testadas em duplicata numa placa de 6 posições (TPP) da seguinte maneira: em dois poços eram colocados 1 mL do mCC; nos outros dois, 10 µL do extrato protéico do corpo de *B. glabrata*; e nos poços restantes, 10 µL do extrato protéico da hemolinfa de *B. glabrata*.

**Tabela 8.** Composição dos meios testados nos do co-cultivo de células Bge e larvas. Sendo *mCC*, meio de crescimento completo.

Composição dos meios testados		
Bge	Meio	Suplemento
	1 mL de mCC	---
pouco	990 µL de mCC	10 µL de extrato protéico do corpo de <i>B. glabrata</i>
confluyente	990 µL de mCC	10 µL do extrato protéico da hemolinfa de <i>B. glabrata</i>
	1 mL de mCC	---
confluyente	990 µL de mCC	10 µL de extrato protéico do corpo de <i>B. glabrata</i>
	990 µL de mCC	10 µL do extrato protéico da hemolinfa de <i>B. glabrata</i>

## 2.5 Eletroforese bidimensional (2D)

Os extratos protéicos do corpo de caramujos infectados por *A. cantonensis* ou por *A. costaricensis* foram utilizados para estudos sobre a expressão de proteínas a partir de eletroforese bidimensional. Os extratos protéicos de exemplares *B. glabrata* não infectados foram usados como controle.

A extração de proteínas do corpo foi realizada pela homogeneização mecânica dos tecidos imersos em nitrogênio líquido. O material resultante foi re-suspendido em um tampão contendo uréia 7M e thiuréia 2M. Em temperatura de 4 °C, a preparação foi centrifugada por 1 hora a 10.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo recipiente e congelado. A quantificação de proteínas foi feita conforme o método de Bradford (1976).

A fração solúvel dos extratos protéicos foi separada por eletroforese bidimensional. Inicialmente, foi realizada a separação por ponto isoelétrico, sendo a focalização realizada sob as seguintes condições: 40V 60 min., 150V 60 min., 1000V 30 min., 2000V 30 min. e 3500V 150 min. Foi efetuada em tiras de gradiente imobilizado de pH 3 a 7, com 7 cm de comprimento (GE Healthcare). Em uma segunda etapa, as tiras da primeira dimensão foram inseridas no topo dos géis de poliacrilamida 12% para separação por peso molecular. Os géis obtidos a partir dos caramujos sem infecção ou aqueles infectados por *A. cantonensis*, ou por *A. costaricensis* foram corados com azul de Comassie e, posteriormente, analisados por comparação através do software PDQuest 8.0.1 (BIORAD).

## 2.6 Criopreservação

As larvas de primeiro estágio (L1) foram separadas em grupos de 100 espécimes por criotubo (Nalgene, 1,5 mL) em um volume total de 200 µL após serem recuperadas das fezes dos roedores através do método de Baermann. Os testes foram realizados com *A. costaricensis* e *A. cantonensis*, separadamente.

Foram testadas 13 diferentes concentrações de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Nuclear); com a concentração do criopreservante em que se obteve a maior quantidade de larvas ativas recuperadas, se testou seis concentrações de soro fetal bovino conforme Mahajan e Renapurkar (1993). Nos experimentos sobre a concentração de DMSO foi utilizado o meio HK (mHK) formulado com 5% de soro fetal bovino.

Em todos os testes, após 60 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram congeladas em um tambor de nitrogênio líquido a partir de uma adaptação do método de Nolan *et al.* (1988).

Depois de sete dias congeladas, as amostras foram descongeladas em banho Maria a 40 °C. Em seguida, foi adicionado em cada criotubo 1 mL de mHK composto com 20% de SFB e mantido em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, usando um microscópio óptico, realizou-se a observação e contagem das larvas recuperadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

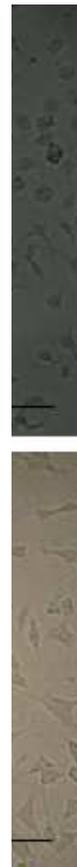
As larvas recuperadas após a criopreservação, no melhor modelo testado, ou seja, com as melhores concentrações de DMSO e de SFB,

tiveram a viabilidade das larvas testada através da infecção destas em *B. glabrata*. Foram usadas 10.000 L1 recuperadas para infectar cada *B. glabrata*. Após 40 dias da infecção os caramujos, individualmente, passaram pelo processo de digestão artificial que incluía uma etapa de dissociação mecânica dos seus tecidos e uma etapa química com imersão em ácido clorídrico 0,7% (Vetec) e pepsina 0,03% (Sigma), a 37°C por uma hora. Em seguida, foi realizado o método de Baermann para averiguar a presença de larvas de terceiro estágio.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Cultivo das células Bge

Primeiramente, apenas o cultivo das células embrionárias de *Biomphalaria glabrata* (Bge) foi mantido com a finalidade de se obter uma maior quantidade de material para os demais estudos, a partir da proliferação delas. Os cultivos caracterizaram-se por ter células aderidas, com prolongamentos e, também, por apresentar certa variabilidade quanto a sua morfologia celular (Figura 6).



*Figura 6.* Cultivos de células Bge mostrando a variabilidade celular das mesmas. Escala de 50 µm em **A** e de 10 µm para as demais.

A cada duas semanas era realizado o repique em uma taxa de 3:1, pois se percebeu que neste período a confluência chegava a, aproximadamente, 90% (Figura 7).



*Figura 7.* Imagens do cultivo de células Bge: **(A)** com alta confluência; **(B)** frasco original, logo após o repique; **(C)** recém semeada. Escalas de 10, 50 e 100  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

Dentre as 45 amostras de células Bge congeladas, em apenas 20 delas observou-se a proliferação celular após realizar o descongelamento.

Com relação aos testes quanto à qualidade dos diferentes lotes de soro fetal bovino utilizados, observou-se que as células Bge aderiram apenas nos poços aonde três diferentes lotes da marca GIBCO foram re-inativados antes de serem usados (Tabela 9). Desse modo, apenas esta marca de soro fetal bovino foi utilizada e cada lote foi re-inativado e testado antes de ser adicionado ao meio de cultura.

Verificou-se que as culturas de células Bge não se mantinham por muito tempo, ou seja, entre a 8ª e a 10ª passagem, as células subcultivadas não aderiam mais. Caracterizando a morte das mesmas.

**Tabela 9.** Resultado dos testes feitos quanto à qualidade do soro fetal bovino utilizado no cultivo de células Bge.

Marca do SFB	Lote	Re-inativado	Comportamento das células Bge
GIBCO	200089M	Sim	<b>Aderiram</b>
		Não	Não aderiram
	210088K	Sim	<b>Aderiram</b>
		Não	Não aderiram
	210090K	Sim	<b>Aderiram</b>
		Não	Não aderiram
Cripion	20540 f53	Sim	Não aderiram
		Não	Não aderiram
	20540 f55	Sim	Não aderiram
		Não	Não aderiram
LGC	38.32203	Sim	Não aderiram
		Não	Não aderiram

## 3.2 Cultura primária de células de veronicelídeo

### 3.2.1 Cultura primária a partir de blocos de tecidos

Exemplares de *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) pertencentes à família Veronicelidae foram coletados em Porto Alegre (RS) e mantidos no biotério da PUCRS.

Os experimentos foram realizados com fragmentos de tecidos provenientes do manto a partir de partes do dorso, ou do pé localizado na região ventral de *S. linguaeformis* (Figura 8).

As culturas foram mantidas por duas semanas, e as observações diárias apresentavam células não diferenciadas e não aderentes, ou seja, não possibilitaram o desenvolvimento de células *in vitro* (Figura 9).



Figura 8. Espécimes de *S. linguaeformis*, mostrando região dorsal e ventral. Escala = 1 cm.

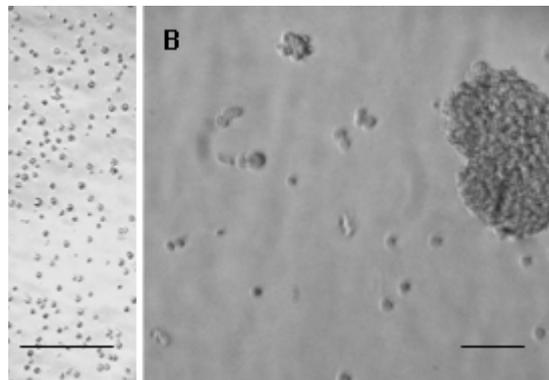


Figura 9. Imagem de cultivos das células de *Sarasinula linguaeformis*: (A) cultivo do manto; (B) cultivo do pé. Escala = 100  $\mu$ m.

### 3.2.2 Cultura primária a partir de células embrionárias

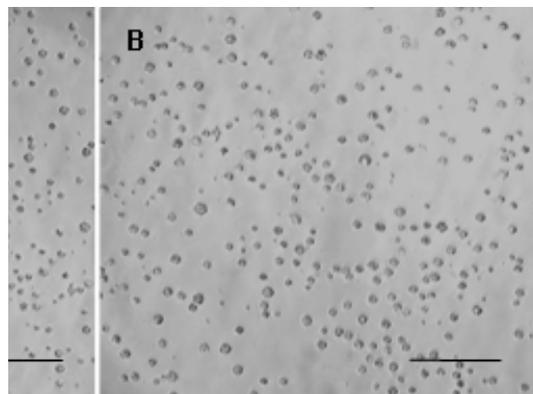
Os testes feitos com células de embriões de veronicelídeos foram realizados a partir das posturas de *Sarasinula linguaeformis* obtidas no vivário (Figura 10).

Os experimentos não possibilitaram o desenvolvimento de uma cultura primária a partir das células embrionárias de *S. linguaeformis*. As culturas

foram mantidas por duas semanas, e as observações diárias identificaram somente células não diferenciadas e não aderentes (Figura 11).



*Figura 10.* Imagens de exemplares de *S. linguaeformis*: **(A)** cópula; **(B)** cópula, destacando a vagina; **(C)** e **(D)** final da cópula, com o pênis em evidencia; **(E)** e **(F)** posturas. Escala = 1 cm.



*Figura 11.* Células embrionárias de *Sarsinula linguaeformis*. Escala = 100  $\mu$ m.

### 3.3 Axenização das larvas

A concentração de 0,25% de hipoclorito de sódio apresentou os melhores resultados para as duas espécies em estudo. Sob esta concentração, recuperou-se 60% de larvas vivas, considerando as *ativas* e *enroladas* de *A. costaricensis* (Tabela 10). Cabe ressaltar que a forma “enrolada” refere-se a espécimes avistados enrolados e com baixa motilidade, diferentemente da “forma em C” com ausência total de movimentos que indica a morte destes. Após os enxágües, os parasitos enrolados voltam a apresentar grande motilidade. Nos testes realizados em *A. cantonensis* com essa mesma concentração 70% das larvas foram recuperadas com vida (Tabela 11).

Nos testes de eficácia da axenização somente nas placas de Agar sangue (Oxoid) plaqueadas com suspensões controle (sem axenização), UFC (unidade formadora de colônia) foram detectadas.

*Tabela 10.* Testes para determinar a concentração ideal de hipoclorito de sódio a ser usado na axenização de larvas de primeiro estágio de *A. costaricensis*.

Concentração de hipoclorito de sódio (%)	Porcentagem de L1 recuperadas após 10 minutos de exposição			
	Vivas			Mortas
	Enroladas	Ativas	Total	Em forma de C
0,10	26	0	26	74
0,05	34	0	34	66
<b>0,25</b>	<b>21</b>	<b>39</b>	60	<b>40</b>
0,12	15	43	58	42
0,06	08	47	55	45
0,03	07	50	57	43
0,05	06	51	57	43

As suspensões tratadas com hipoclorito de sódio 0,25% também foram testadas quanto ao seu potencial de axenização por um processo ainda mais sensível. Foi utilizado do método da análise radiométrica do crescimento bacteriano através do equipamento Bact/ALERT (bioMérieux). Os resultados obtidos corroboraram com àqueles já apresentados pelo plaqueamento, ou seja, apenas no controle houve a presença de contaminação por enterobactérias (Apêndice 2).

*Tabela 11.* Testes para determinar a concentração ideal de hipoclorito de sódio a ser usado na axenização de larvas de primeiro estágio de *A. cantonensis*.

Concentração de hipoclorito de sódio (%)	Percentagem de L1 recuperadas após 10 minutos de exposição			
	Vivas			Mortas
	Enroladas	Ativas	Total	Em forma de C
0,10	24	0	24	76
0,05	36	0	36	64
<b>0,25</b>	<b>33</b>	<b>37</b>	70	<b>30</b>
0,12	23	40	63	37
0,06	24	40	64	36
0,03	15	44	59	41
0,05	12	47	59	41

### 3. 4 Cultivo das larvas

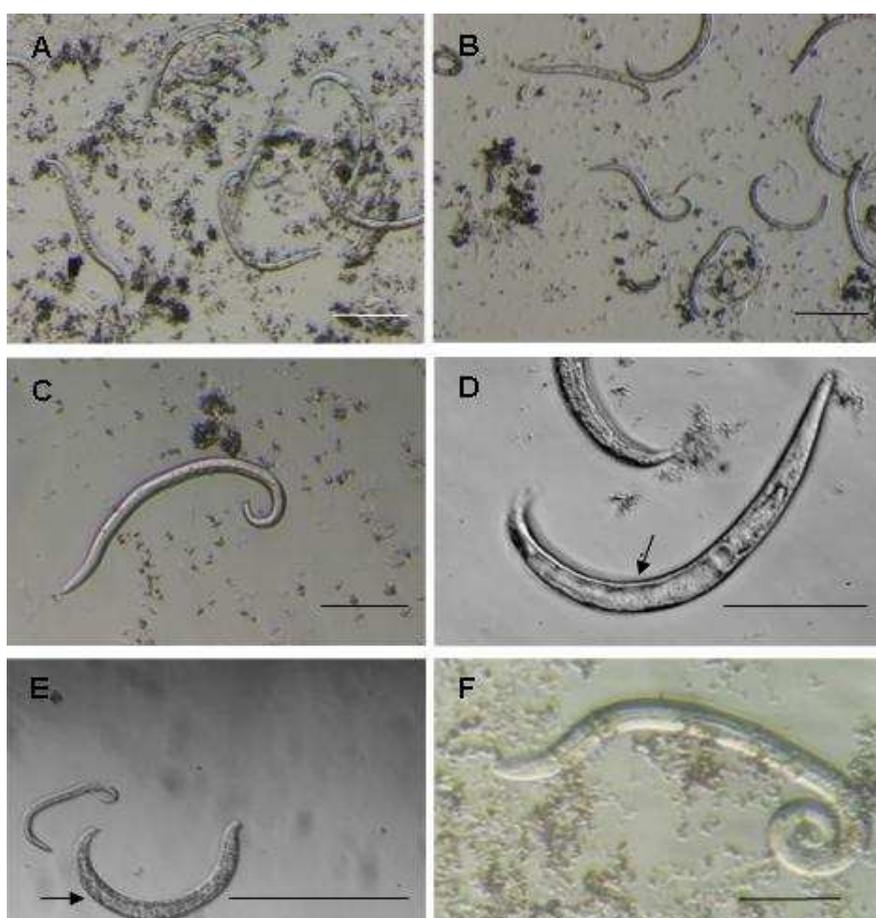
Dentre as nove diferentes composições de meio testadas, sete possibilitaram a observação das larvas cultivadas. Nos dois meios compostos por géis de Chernin não foi possível visualizar as larvas de forma suficiente para distinguir em que estágio elas se encontravam devido à opacidade do meio.

Nos experimentos de cultivos *in vitro* de *A. costaricensis* (Tabela 12) no meio HK (mHK) obteve-se pequena quantidade de larvas no segundo estágio (L2) ( $6\% \pm 2$ ) e mais da metade das larvas morreram ( $55\% \pm 8$ ). Quando este mesmo meio foi suplementado com extrato protéico do corpo de *Biomphalaria glabrata* (4,9 mg/ml) foram encontrados os melhores resultados, ou seja, se recuperou uma maior quantidade de larvas de segundo estágio ( $19\% \pm 4$ ). Usando-se mHK suplementado com extrato protéico da hemolinfa de *B. glabrata* (1,3 mg/ml) observou-se menor quantidade de larvas mortas ( $21\% \pm 4$ ), tendo grande número de L1 inicial ( $39\% \pm 7$ ) e mediana ( $40\% \pm 6$ ). Com mCC enriquecido com extrato protéico do corpo de *B. glabrata* também se obteve L2 ( $9\% \pm 3$ ). Com o mCC suplementado com extrato protéico da hemolinfa de *B. glabrata* conseguiu-se manter grande quantidade de L1 em estágio inicial ( $44\% \pm 8$ ) e L1 mediana ( $22\% \pm 5$ ). Nos experimentos em que se usou somente mCC houve a maior concentração de larvas mortas ( $71\% \pm 4$ ) e as larvas vivas permaneceram na fase inicial ( $29\% \pm 4$ ). Quando o mCC foi suplementado com mCC recuperado também ocorreu grande mortalidade ( $65\% \pm 7$ ), a maioria das L1 ficou na fase inicial ( $33\% \pm 6$ ) e poucas evoluíram à etapa mediana ( $10\% \pm 4$ ).

Com relação ao tamanho das larvas de *A. costaricensis* obtidas em cultivo *in vitro*, foram obtidos os seguintes valores, em média: L1 inicial apresentou 0,26 mm de comprimento e 14  $\mu\text{m}$  de largura; L1 mediana possuía 0,35 mm de comprimento e 20  $\mu\text{m}$  de largura; L1 final tinha 0,4 mm de comprimento e 35  $\mu\text{m}$  de largura e L2 apresentou 0,4 mm de comprimento e 40  $\mu\text{m}$  de largura. São apresentadas imagens de *A. costaricensis* em cultura *in vitro* na Figura 11.

**Tabela 12.** Desenvolvimento larval de *A. costaricensis* após 40 dias de cultivo. Valores em porcentagem, seguido pelo desvio padrão. Sendo: *BG* *B. glabrata*.

Composição do meio	L1			L2	larvas mortas
	inicial	median	final		
mHK	19 ± 4	13 ± 4	13 ± 6	6 ± 2	55 ± 8
mHK + extrato protéico do corpo de BG	15 ± 4	17 ± 4	19 ± 4	19 ± 5	30 ± 9
mHK + extrato protéico da hemolinfa de BG	39 ± 7	40 ± 6	0	0	21 ± 4
mCC + extrato protéico do corpo de BG	23 ± 4	17 ± 4	15 ± 4	9 ± 3	36 ± 12
mCC + extrato protéico da hemolinfa de BG	44 ± 8	22 ± 5	0	0	34 ± 10
mCC	29 ± 4	0	0	0	71 ± 4
mCC + mCC recuperado	33 ± 6	10 ± 4	0	0	65 ± 7



**Figura 11:** Imagens dos cultivos de *A. costaricensis* em mHK suplementado com extrato protéico do corpo de *B. glabrata*: **(A)** e **(B)** visão geral; **(C)** L1 inicial; **(D)** L1 mediana, com estômago expandido em evidência; **(E)** L1 tardia em destaque; **(F)** L2. Escala = 100 µm.

Nos experimentos de cultivo de *A. cantonensis* (Tabela 13), se pôde observar que mais da metade das larvas semeadas no meio HK morreram ( $52\% \pm 6$ ) e uma pequena quantidade de espécimes evoluiu ao segundo estágio (L2) ( $7\% \pm 3$ ). Quando este meio recebeu a suplementação de extrato protéico do corpo oriundo de *B. glabrata* verificou-se uma maior quantidade de L2 ( $21\% \pm 4$ ). Nas culturas compostas por mHK enriquecido com extrato protéico da hemolinfa de *B. glabrata* observou-se a menor quantidade de larvas mortas ( $25\% \pm 5$ ), a maior quantidade de L1 mediana ( $44\% \pm 5$ ) e também muitas L1 na fase inicial ( $32 \pm 4$ ). Quando o mCC foi suplementado com extrato protéico do corpo de *B. glabrata*  $10\% (\pm 3)$  das larvas evoluíram às L2. Usando o mCC com extrato protéico da hemolinfa de *B. glabrata* grande quantidade de larvas de primeiro estágio foi mantida na fase inicial ( $46\% \pm 4$ ) e mediana ( $23\% \pm 4$ ). Ao utilizar apenas o mCC  $73\% (\pm 4)$  das larvas morreram, as que restaram, permaneceram como L1 iniciais ( $27\% \pm 4$ ). Nos cultivos compostos por mCC enriquecidos por mCC recuperado  $35\% (\pm 6)$  das larvas de primeiro estágio ficaram na fase inicial,  $4\% (\pm 6)$  evoluíram à fase mediana e muitas larvas morreram ( $61\% \pm 9$ ). Algumas imagens do cultivo *in vitro* de *A. cantonensis* encontram-se na Figura 12.

Com relação ao tamanho das larvas de *A. cantonensis* obtidas nos cultivos *in vitro* foram encontradas as seguintes medidas, em média: L1 inicial possuía 0,29 mm de comprimento e 15  $\mu\text{m}$  de largura; L1 mediana apresentava 0,35 mm de comprimento e 20  $\mu\text{m}$  de largura; L1 final tinha 0,50 mm de comprimento e 45  $\mu\text{m}$  de largura; L2 possuía 0,50 mm de comprimento e 50  $\mu\text{m}$  de largura.

**Tabela 13.** Desenvolvimento larval de *A. cantonensis* em diferentes composições de meios após 45 dias de cultivo. Os valores foram expressos em porcentagem, seguidos por seu desvio padrão. Sendo *BG B. glabrata*.

Composição do meio	L1			L2	larvas mortas
	inicial	median a	final		
mHK	18 ± 3	15 ± 4	13 ± 5	7 ± 3	52 ± 6
mHK + extrato protéico do corpo de BG	15 ± 3	17 ± 3	18 ± 3	21 ± 4	29 ± 8
mHK + extrato protéico da hemolinfa de BG	32 ± 4	44 ± 5	0	0	25 ± 5
mCC + extrato protéico do corpo de BG	24 ± 4	20 ± 4	17 ± 4	10 ± 3	29 ± 8
mCC + extrato protéico da hemolinfa de BG	46 ± 4	23 ± 4	0	0	31 ± 5
mCC	27 ± 4	0	0	0	73 ± 4
mCC + mCC recuperado	35 ± 6	4 ± 6	0	0	61 ± 9



**Figura 12:** Imagens dos cultivos de *A. cantonensis* em mHK suplementado com extrato protéico de *B. glabrata*: **(A)** visão geral; **(B)** L1 inicial; **(C)** e **(D)** L1 mediana, com estômago expandido em destaque; **(E)** L1 tardia; **(F)** L2. Escala = 100 µm.

### 3.5 Co-cultivo entre células Bge e larvas

Nos experimentos de co-cultivo entre células Bge e *A. costaricensis* obteve-se os melhores resultados quando as larvas foram semeadas em poços com células pouco confluentes e meio de crescimento completo enriquecido com extrato protéico do corpo de *B. glabrata*. Com esta composição, foram recuperadas 10% ( $\pm 1$ ) das larvas como L2 e menos da metade das larvas morreram ( $44\% \pm 8$ ). Nos testes feitos usando-se células Bge confluentes, mCC e extrato protéico do corpo de *B. glabrata* também se recuperou L2, mas em menor quantidade ( $6\% \pm 2$ ). Na Tabela 14 apresenta-se uma síntese dos resultados obtidos, após 35 dias, nos experimentos de co-cultivo.

**Tabela 14.** Desenvolvimento larval de *A. costaricensis* em diferentes composições de meios após 35 dias em co-cultivo com células Bge. Sendo: *pc*, pouco confluentes, *c* confluentes e *BG* *B. glabrata*. Valores em percentagem, seguidos por seu desvio padrão.

Composição	L1			L2	larvas mortas
	inicial	median	final		
Bge pc + mCC	16 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3	0	0	62 $\pm$ 2
Bge pc + mCC + extrato protéico do corpo de BG	16 $\pm$ 4	17 $\pm$ 3	21 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1	44 $\pm$ 8
Bge pc + mCC + extrato protéico da hemolinfa de BG	17 $\pm$ 2	20 $\pm$ 2	19 $\pm$ 2	0	44 $\pm$ 4
Bge c + mCC	14 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	0	0	72 $\pm$ 2
Bge c + mCC + extrato protéico do corpo de BG	18 $\pm$ 2	17 $\pm$ 3	20 $\pm$ 3	6 $\pm$ 2	44 $\pm$ 6
Bge c + mCC + extrato protéico da hemolinfa de BG	19 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2	0	0	67 $\pm$ 4

Com relação ao tamanho das larvas obtidas no co-cultivo de Bge com larvas de *A. costaricensis* foram obtidos os seguintes valores, em média: L1 inicial apresentava 0,27 mm de comprimento e 15  $\mu\text{m}$  de largura; L1 mediana tinha 0,35 mm de comprimento e 20  $\mu\text{m}$  de largura; L1 final possuía 0,40 mm de comprimento e 35  $\mu\text{m}$  de largura e L2 apresentava 0,40 mm de comprimento e 40  $\mu\text{m}$  de largura. A Figura 14 apresenta imagens do co-cultivo de células Bge pouco confluentes com larvas de *A. costaricensis*.



*Figura 14.* Co-cultivo de células Bge pouco confluentes com *A. costaricensis* em mCC enriquecido por extrato do corpo de *Biomphalaria glabrata*: (A), (B) e (C) L1, destacando L1 mediana; (D) L2. Escala = 100  $\mu\text{m}$ .

Nos experimentos de co-cultivo entre células embrionárias de *B. glabrata* e *A. cantonensis* obteve-se os melhores resultados, ou seja, recuperou-se maior quantidade de L2, quando o meio foi suplementado com extrato protéico do corpo de *B. glabrata*. Isto ocorreu tanto nos testes feitos com células Bge pouco confluentes quanto nos experimentos realizados com as células confluentes, resultando em 20% e 7% de L2, respectivamente. Ao enriquecer o meio com extrato protéico da hemolinfa de *B. glabrata* foi possível obter 21% ( $\pm 3$ ) de L1 na fase final somente no co-cultivo com células pouco confluentes; quando se usou essa mesma composição do meio junto

às células Bge confluentes não se recuperou L1 no estágio final. Um resumo dos resultados obtidos nos co-cultivos de células Bge com *A. cantonensis* encontra-se na Tabela 15.

Sobre os tamanhos das larvas de *A. cantonensis* obtidas nos co-cultivos com células Bge, foram observadas as seguintes medidas (em média): L1 inicial apresentou 0,28 mm de comprimento e 15 µm de largura; L1 mediana com 0,35 mm de comprimento e 20 µm de largura; L1 final tinha 0,4 mm de comprimento e 35 µm de largura; L2 possuía 0,5 mm de comprimento e 45 µm de largura.

**Tabela 15.** Desenvolvimento larval de *A. cantonensis* em diferentes composições de meios após 35 dias em co-cultivo com células Bge. Sendo *pc* pouco confluentes, *c* confluentes e *BG B. glabrata*. As quantidades de larvas recuperadas foram colocadas em percentagem, seguidas por seu desvio padrão.

Composição	L1			L2	larvas mortas
	inicial	median a	final		
Bge pc + mCC	17 ± 3	19 ± 3	0	0	65 ± 5
Bge pc + mCC + extrato protéico do corpo de BG	16 ± 3	17 ± 3	21 ± 3	20 ± 2	43 ± 7
Bge pc + mCC + extrato protéico da hemolinfa de BG	17 ± 3	19 ± 3	21 ± 3	0	43 ± 4
Bge c + mCC	15 ± 2	15 ± 2	0	0	70 ± 4
Bge c + mCC + extrato protéico do corpo de BG	17 ± 3	17 ± 3	21 ± 4	7 ± 1	44 ± 6
Bge c + mCC + extrato protéico da hemolinfa de BG	17 ± 3	15 ± 3	0	0	68 ± 5

Imagens de co-cultivos entre células Bge pouco confluentes e larvas de *A. cantonensis* em mCC suplementado com extrato protéico de *B. glabrata* encontram-se na Figura 15.

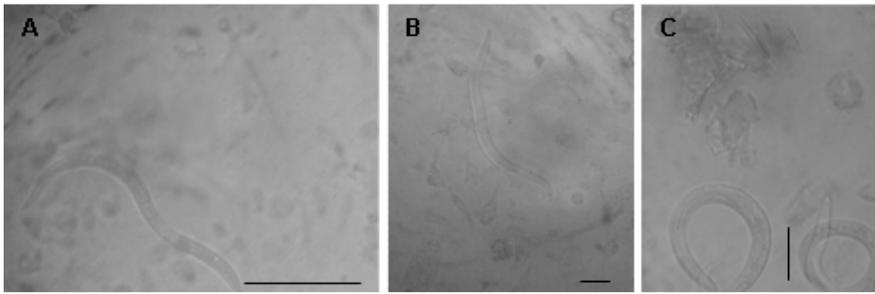


Figura 15: Imagens dos co-cultivos de *A. cantonensis* com células Bge pouco confluentes em mCC com extrato do corpo de *B. glabrata*: (A) L1 inicial; (B) L1 mediana; (C) L2. Escala = 100  $\mu$ m.

### 3.6 Eletroforese bidimensional (2D):

Como os experimentos de cultivo e co-cultivo, cujos meios foram enriquecidos com extrato protéico do corpo de *B. glabrata*, apresentaram os melhores resultados, foi realizada uma análise proteômica dos extratos provenientes de bionfalárias infectadas e não infectadas, com objetivo de tentar identificar a expressão de proteínas que pudessem estar associadas com estímulos para o desenvolvimento das larvas.

A comparação dos mapas proteômicos totais entre hospedeiros infectados com *A. costaricensis* (Bg + *A. costaricensis*) ou com *A. cantonensis* (Bg + *A. cantonensis*) e caramujos não infectados (Bg não infectada), evidenciou respectivamente 9 e 10 componentes expressos com maior intensidade em Bg + *A. costaricensis* e Bg + *A. cantonensis*, muitos deles expressos simultaneamente nas duas preparações.

Um componente de aproximadamente 37 kDa e ponto isoelétrico de 4,2 ocorre exclusivamente nos extratos de moluscos infectados, tanto no extrato de Bg + *A. costaricensis* quanto de Bg + *A. cantonensis*, e destaca-se pela intensidade do ponto (*spot*) na análise de imagens (Figuras 16 e 17)

.. cantonensis



Figura 16: Resultados da separação bidimensional de extratos de *B. glabrata* não infectadas ou infectadas com *A. costaricensis* ou *A. cantonensis*. Componentes de aproximadamente 37 kDa, que aparecem somente nos extratos de animais infectados. Em cada gel estão incluídos marcadores de peso molecular, identificados na margem da imagem à esquerda.

sis

is

Figura 17. Destaque da imagem resultante da comparação das réplicas dos géis de poliacrilamida da eletroforese bidimensional, mostrando o componente de aproximadamente 37 kDa e ponto isoelétrico de 4,2, de maior intensidade e presente em ambos os extratos de moluscos infectados.

### 3.7 Criopreservação

Os testes de criopreservação das larvas de primeiro estágio (L1) realizados com *A. costaricensis* demonstraram que com a concentração de 1% de DMSO ocorreu a maior recuperação de larvas ( $65\% \pm 1,53$ ); esta mesma concentração demonstrou ser a mais eficiente para se recuperar maior quantidade de L1 ativas de *A. cantonensis* ( $87\% \pm 1,53$ ) (Tabela 16).

Tabela 16. Dados referentes a quantidade de larvas recuperados após os testes de criopreservação, com diferentes concentrações de DMSO, feitos com *A. costaricensis* e com *A. cantonensis*.

DMSO (%)	<i>A. costaricensis</i>		<i>A. cantonensis</i>	
	média (%)	D.P.	média (%)	D.P.
Controle	10	1,00	20	1,53
<b>1</b>	<b>65</b>	<b>1,53</b>	<b>87</b>	<b>3,51</b>
2	46	0,58	63	3,06
3	39	0,58	75	2,52
4	28	2,52	72	2,89
4,6	27	0,58	57	2,08
4,8	19	1,00	63	5,03
5	14	0,58	76	1,53
5,2	11	0,58	72	0,58
6	20	1,00	64	1,00
7	9	0,58	66	3,21
8	8	1,15	49	0,58
9	8	1,53	54	1,00
10	8	2,52	42	0,58

Dentre as seis concentrações testadas de soro fetal bovino (SFB), apenas com 10% de SFB foram recuperadas larvas vivas, nos testes feitos com ambas as espécies. Nos experimentos com *A. costaricensis* recuperou-

se cerca de 2% ( $\pm 0,52$ ) de larvas. Nos testes feitos com *A. cantonensis* foram recuperadas, aproximadamente, 4% ( $\pm 0,73$ ) de larvas.

#### 4. DISCUSSÃO

A linhagem de células embrionárias de *Biomphalaria glabrata* (Bge) caracterizou-se por se apresentar como uma monocamada, ou seja, por ser constituída de uma única camada celular; sendo suavemente aderente e possuindo morfologia celular semelhante a fibroblastos. Assim, esses resultados corroboraram com as observações anteriormente realizadas por Hansen (1976a, 1976b).

A dificuldade de manter a cultura por longos períodos, conforme foi evidenciado, a partir da não aderência das células subcultivadas entre o 8° e o 10° repique, possivelmente, refletiu alterações genéticas na linhagem celular. Odoemelam *et al.* (2009) revisaram o cariótipo das células Bge; estes pesquisadores não conseguiram propagar células Bge adquiridas diretamente através da organização responsável pela sua comercialização: *American Type Cell Culture* (ATCC), então utilizaram linhagens de dois diferentes laboratórios para realizar os seus experimentos. Eles encontraram, em ambas as linhagens, significativas diferenças citológicas. Acrescentaram que a “suposta imortalidade” desta linhagem, possivelmente, se deve a seleção realizada por Hansen, ao desenvolvê-las, de células aberrantes cuja transformação ocorreu espontaneamente; isto causou uma vantagem seletiva dessas células sobre as demais no cultivo *in vitro*. Os resultados apresentados por estes pesquisadores, provavelmente, colaborou para a descontinuidade da comercialização desta linhagem pela ATCC no início de 2010.

Como esta era a única cultura celular de molusco comercializada até o momento, tornou-se ainda mais importante o desenvolvimento de uma nova

linhagem proveniente desse grupo de invertebrados com grande importância aos estudos parasitológicos.

O desenvolvimento de uma cultura primária, a partir de fragmentos do tecido ou do embrião de *Sarasinula linguaeformis* não resultou em células viáveis. Devido à dificuldade de se obter posturas desses moluscos no vivário os experimentos foram repetidos 10 vezes. Os testes para desenvolver uma cultura primária a partir de fragmentos de tecido do molusco foram realizados 12 vezes.

Nos trabalhos sobre o desenvolvimento de cultura primária Hansen (1976a, 1976b) mencionou ter realizado mais de 600 repetições dos experimentos para se obter resultados positivos. Manaka *et al.* (1980) testaram diferentes meios de cultura ao estabelecerem a cultura primária de uma espécie de lesma terrestre asiática. Eles observaram uma grande diferença com relação à quantidade de células que migravam a partir dos fragmentos de tecidos cultivados, conforme o meio utilizado. A repetição dos experimentos realizados, utilizando até outros meios, provavelmente, será uma alternativa eficiente para se estabelecer uma cultura primária de veronicelídeo.

Com a adaptação dos processos de filtração e axenização inicialmente utilizados por Barçante *et al.* (2003) no trabalho sobre *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866), angiostrongilídeo parasito das artérias pulmonares de cães, foi possível eliminar totalmente as enterobactérias provenientes das fezes dos roedores, possibilitando cultivos e co-cultivos, livres de contaminação. Barçante *et al.* (2003) utilizaram 0,5% de hipoclorito de sódio por 10 minutos para axenizar as larvas de *A. vasorum*. Com os nematódeos

*A. costaricensis* e *A. cantonensis* foi verificada a necessidade de se reduzir esta concentração, pois a letalidade foi extremamente alta para os valores usados por Barçante *et al.* (2003). Após os testes com diferentes concentrações deste reagente, se verificou ser a concentração de 0,25% a ideal, pois resultou em grande quantidade de larvas ativas após 10 minutos de exposição à solução cujo potencial germicida e fungicida continuou eficaz.

Hata e Kojima (1990) obtiveram *in vitro*, no máximo, 15% de larvas de segundo estágio (L2) de *A. cantonensis*. Nos experimentos de cultivo realizados no presente trabalho, se obteve até 21% de L2 de *A. cantonensis* e 19% de L2 de *A. costaricensis* ao utilizar este mesmo meio (mHK), suplementado com extrato protéico do corpo de *B. glabrata*. Isto, possivelmente, se deve a relação existente de fatores próprios do hospedeiro intermediário que influenciaram na evolução do parasito (Coustau *et al.*, 1997; Laursen e Yoshino, 1999; Coustau e Yoshino, 2000; Lewis *et al.*, 2001; Yoshino *et al.*, 2001; Humphries e Yoshino, 2003).

Nos cultivos enriquecidos com extrato protéico da hemolinfa de *B. glabrata* não houve produção de L2 quanto nos experimentos suplementados por proteínas do corpo desse molusco. Cabe ressaltar, que, inicialmente, a concentração protéica da hemolinfa era de 1,3 mg/mL. Este valor foi reduzido à metade, pois devido o pequeno volume de hemolinfa mesmo fazendo-se um *pool* oriundo de 10 espécimes de *B. glabrata* foi preciso duplicar o seu volume usando a salina CBSS, para se ter uma quantidade mínima de material necessário para realizar a esterilização por filtração com filtro acoplado à seringa. Considerando a concentração protéica, a diferença encontrada entre os cultivos pode ser relacionada à alta concentração presente no extrato

protéico do corpo: 4,9 mg/mL, em contraste com a reduzida concentração do extrato de proteínas da hemolinfa: 0,65 mg/mL. Além da diferença existente na concentração protéica, as proteínas presentes nos tecidos do caramujo, provavelmente, possuem um maior potencial para desencadear o desenvolvimento das larvas. Isto reflete a migração realizada pelos parasitos *in vivo* no hospedeiro intermediário, aonde parece existir uma preferência do parasito pelo tecido fibromuscular: Mendonça *et al.* (1999) ao estudarem as rotas de migração de *A. costaricensis* em um hospedeiro intermediário experimental, concluíram que embora as larvas fossem encontradas em vários órgãos do molusco, provavelmente isto demonstrava apenas a trajetória desses nematódeos, rumo as camadas fibromusculares aonde se evidenciaram as sucessivas mudas das larvas; Mendonça *et al.* (2002) citaram que a camada fibromuscular do veronicelídeo era o habitat final, preferencial, das larvas de *A. costaricensis* durante sua fase intramolusco; Mendonça *et al.* (2003) constataram a presença de *A. costaricensis* em vários órgãos do molusco, em distintos dias após a infecção, no entanto concluíram que os rins e o reto do veronicelídeo pareciam pertencer à rota preferencial das larvas para chegarem até a camada fibromuscular; Montresor *et al.* (2008) após fazerem a infecção experimental de *A. costaricensis* em *Omalonyx* sp. verificaram a presença de larvas em diversos órgãos, principalmente, na camada fibromuscular.

Para ambos os nematódeos, os cultivos também resultaram em L2, mas em uma quantidade menor, ao se enriquecer o meio de crescimento completo (mCC) com extrato protéico do corpo de *B. glabrata*. Possivelmente, a composição do mCC, originalmente formulado para a linhagem de células

embrionárias de *B. glabrata*, não tenha fornecido todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento das larvas.

Os resultados de co-cultivo apresentados foram os primeiros referentes a nematódeos co-cultivados com a linhagem de células embrionárias de *B. glabrata*. Informações sobre meio, suplementação e manutenção destas co-culturas poderão subsidiar estudos posteriores. Assim como nos cultivos, os melhores resultados foram obtidos quando o meio foi enriquecido pelo extrato protéico do corpo de *B. glabrata*. No entanto, nos co-cultivos entre células Bge pouco confluentes e *A. costaricensis* foram recuperadas menos larvas de segundo estágio (L2) do que nos cultivos. Assim como se inferiu nos resultados obtidos nos cultivos, ao se usar este meio, provavelmente, a composição do mCC, não possui todos os componentes necessários ao desenvolvimento das larvas, suprimindo apenas as necessidades das células Bge.

Nos co-cultivos entre estas células, pouco confluentes, e *A. cantonensis*, a quantidade de L2 obtidas com mCC suplementado por extrato protéico do corpo de *B. glabrata* foi muito semelhante àqueles alcançados nos seus cultivos. Comparando os resultados obtidos nos co-cultivos de ambos nematódeos aonde as células Bge foram mantidas de modo confluentes, houve uma redução na quantidade de L2 recuperadas. Provavelmente, isto tenha ocorrido devido à carência de componentes ao desenvolvimento larval concomitantemente com a manutenção desta linhagem.

Para explorar a idéia pioneira de utilização *in vitro* de proteínas presentes no molusco que estimularam a evolução do parasito, foi realizada a

eletroforese bidimensional a partir dos extratos protéicos dos corpos de *B. glabrata* não infectada e infectada por *A. costaricensis* ou *A. cantonensis*.

Os experimentos de eletroforese bidimensional visaram iniciar a investigação de possíveis fatores protéicos solúveis dos moluscos que pudessem estimular *in vitro* a manutenção e a evolução das larvas dos nematódeos.

A busca por fatores protéicos solúveis se deve a dificuldade experimentada neste trabalho e nos demais relatos da literatura, para as tentativas de cultivar e fazer evoluir *in vitro* organismos complexos como os vermes cilíndricos, em sistemas artificiais muito simplificados. Através da análise de réplicas de separação de proteínas de animais infectados e não infectados foi possível detectar algumas proteínas que se expressavam mais nos animais infectados, quando comparados aos caramujos não infectados. Foram 9 e 10 componentes, respectivamente, para moluscos infectados com *A. costaricensis* e *A. cantonensis*. Apenas um *spot* apresentava expressão exclusiva e intensa nos animais infectados, correspondendo a um componente com aproximadamente 37 kDa e ponto isoelétrico de 4,2. Não havia relatos na literatura de tentativas de aportar substâncias purificadas de hospedeiros na tentativa de fazer evoluir formas larvais de nematódeos *in vitro*. Trata-se de uma idéia promissora, pois avança além das tentativas de simplesmente produzir o ambiente artificial com nutrientes e sais, para a idéia de incluir moléculas que estimulem a diferenciação do parasito. Certamente, este estímulo não poderá ser feito com um único tipo de molécula, pretendendo-se que estes resultados iniciais tenham continuidade com

extensa investigação de fatores que tenham utilidade para a produção de larvas *in vitro*.

A fim de garantir o fornecimento de larvas de primeiro estágio (L1), materiais iniciais para todo o estudo aqui apresentado, foram realizados os experimentos de criopreservação. Os melhores resultados de criopreservação de L1 tanto de *A. costaricensis* quanto para *A. cantonensis* foram alcançados utilizando-se o meio HK composto por 5% de soro fetal bovino e 1 % de DMSO. Realizou-se a criopreservação, através do método de congelamento rápido, após um longo período de incubação junto ao criopreservante conforme Nolan *et al.* (1988).

Provavelmente, o longo período de incubação com o DMSO antes do congelamento, favoreceu a recuperação de larvas ativas, assim como ocorreu com os experimentos de criopreservação das larvas de primeiro e de terceiro estágio do nematódeo *Strongyloides stercoralis* realizados por Nolan *et al.* (1988). Este método de criopreservação aonde se mantém os parasitos em contato com o criopreservante por um longo período, antes do seu congelamento, também foi realizado com sucesso por Gill e Redwin (1995) com as larvas de primeiro estágio dos seguintes nematódeos: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus columbriformis* e *Ostertagia circumcincta*. Deste modo, parece haver grandes possibilidades do uso desse método de criopreservação garantir estoques de larvas deste complexo grupo de parasitos cilíndricos.

Embora, os diferentes experimentos de cultivo e também os diversos testes de co-cultivos junto às células de *B. glabrata* não tenham tido êxito para produzir larvas de terceiro estágio, houve um avanço com relação à

quantidade de larvas de segundo estágio produzidas *in vitro* ao se comparar com os resultados obtidos com o único trabalho previamente existente elaborado por Hata e Kojima (1990).

Na busca de se estabelecer todas as condições necessárias à evolução *in vitro* das larvas de primeiro estágio até as de terceiro estágio dos parasitos estudados, vários aspectos foram analisados e o conjunto dos resultados apresentados possibilitará uma melhor compreensão da complexa tarefa de manipular *in vitro* estes parasitos durante suas fases intramolusco.

## 5 CONCLUSÕES

Com relação à axenização, foi utilizada a concentração de 0,25% de hipoclorito de sódio com sucesso nas espécies em estudo, diferentemente da concentração deste reagente utilizada para *Angiostrongylus vasorum* por Barçante e colaboradores (2003). O processo de filtração funcionou com os nematódeos assim como proposto por Barçante *et al.* (2003).

Tanto nos cultivos, quanto nos co-cultivos, os melhores resultados foram obtidos quando o meio de cultura foi suplementado com extrato protéico do corpo de *Biomphalaria glabrata*.

Utilizando a concentração de 1% de DMSO em meio HK enriquecido com 5% de soro fetal bovino e realizando a criopreservação diretamente em nitrogênio líquido logo após uma hora de incubação com o criopreservante, foi possível obter grandes quantidades de larvas de primeiro estágio dos parasitos estudados.

Existem proteínas que são expressas exclusivamente nos espécimes de *B. glabrata* infectados. Provavelmente, estas representam fatores relacionados ao desenvolvimento dos nematódeos em suas fases intramolusco.

## 6 PERSPECTIVAS

Com uma maior quantidade de repetições, assim como o teste de outros meios de cultura, provavelmente será possível estabelecer uma cultura primária de *Sarasinula linguaeformis*.

Devido os ótimos resultados aqui apresentados quanto a criopreservação das larvas de primeiro estágio dos parasitos pesquisados, torna-se extremamente importante estabelecer um estoque de larvas criopreservadas para garantir a manutenção de ambos parasitos no laboratório para garantir o fornecimento de material para experimentos.

Estudos posteriores possibilitarão a identificação de proteínas necessárias ao melhor desenvolvimento de cultivos e co-cultivos dos nematódeos em estudo, promovendo a total evolução dos mesmos nos estágios intramolusco.

Este estudo serviu para estimular o desenvolvimento de pesquisas que busquem abordar, simultaneamente, o estudo do parasito e do seu hospedeiro (experimental ou natural) tanto em sistemas experimentais quanto em observações de campo.

## 7 REFERÊNCIAS

- Aguiar PH, Morera P, Pascual J. First record of *Angiostrongylus cantonensis* in Cuba. *Am J Trop Med Hyg* 30(5):963-5, 1981.
- Alicata, JE. Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals. *Adv Parasitol* 3:223-248, 1965.
- Arroyo R, Morera P. Viability of the first stage larvae of *Angiostrongylus costaricensis* in rat feces. *J Parasitol* 64(1):146, 1978.
- Bailey TG. The *in vitro* culture of reproductive organs of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müll). *Netherlands J Zool* 23:72-85, 1973.
- Barçante JMP, Barçante TA, Dias SRC, Viera LQ, Lima VS, Negrão-Corrêa D. A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. *Parasitol Res* 89:89-93, 2003.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254, 1976.
- Caldeira RL, Mendonça CLGF, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, Mota ES, Pecora IL, Medeiros AMZ, Caldeira OS. First Record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:887-889, 2007.
- Campbell BG, Little MD. The finding of *Angiostrongylus cantonensis* in rats in New Orleans. *Am J Trop Med Hyg* 38(3):568-73, 1988.
- Carvalho O, Passos LKJ, Mendonça CLFG, Cardoso PCM, Caldeira RL. Moluscos de importância médica no Brasil. FIOCRUZ/Centro de Pesquisas René Rachou. Belo Horizonte, 2005.
- Castillo MG, Yoshino TP. Carbohydrate inhibition of *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell adhesion to primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 125:513-525, 2002.
- 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* 93(4):832-40, 2007.
- Chen KM, Lai SC. Biochemical and pathological evaluation of albendazole/thalidomide co-therapy against eosinophilic meningitis or meningoencephalitis induced by *Angiostrongylus cantonensis*. *J Antimicrob Chemother* 59:264-276, 2007.

Chen SN, Tang T, Lee SJ. The *in vitro* cultivation of the first and third stage larvae and adult worms of *Angiostrongylus cantonensis*. *Proceedings of the National Science Council Part B* 5: 375-384, 1981.

Chernin E. Observations on hearts explanted *in vitro* from the snail *Australorbis glabratus*. *The Journal of Parasitology* 49(3):353-364, 1963.

Chernin J, Thompson D, Swaine D. *In vitro* culture of tetrathyridia of *Mesocestoides corti* using a gel based diphasic medium. *Journal of Helminthology* 76:21-25, 2002.

Coppin JF, Lefebvre C, Caby S, Cocquerelle C, Vicogne J, Coustau C, Dissous C. Gene expression changes in *Schistosoma mansoni* sporocysts induced by *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Parasitol Res* 89(2):113-119, 2003.

Cornet M. Primary mantle tissue culture from the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*: investigations on the growth promoting activity of the serum used for medium supplementation. *J Biotechnol* 123(1):78-84, 2006.

Coustau C, Ataev G, Jourdane J, Yoshino TP. *Schistosoma japonicum*: *in vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* cell line. *Experimental Parasitology* 87:77-87, 1997.

Coustau C, Yoshino TP. Flukes without snails: advances in the *in vitro* cultivation of intramolluscan stages of trematodes. *Experimental Parasitology* 94:62-66, 2000.

Coustau C, Mitta G, Dissous C, Guillou F, Galinier R, Allienne JF, Modat S. *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni* excretory-secretory products differentially affect gene expression in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Parasitology* 127(6):533-542, 2003.

Duarte Z, Morera P, Davila P, Gantier JC. *Angiostrongylus costaricensis* natural infection in *Vaginulus plebeius* in Nicaragua. *Ann Parasitol Hum Comp* 67(3):94-96, 1992.

Eckert J. Criopreservation of parasites. *Zbl Bakt Hyg A* 267:298-9, 1987.

Eckert J. Criopreservation of parasites. *Experientia* 44:873-7, 1988.

Furuta E, Shimozawa A. Primary culture of cells from the foot and mantle of the slug *Incilaria fruhstorferi* Collinge. *Zoological Magazine* 92:290-296, 1983.

Furuta E, Kei-Chiro Y, Shimozawa A. The ultrastructure of hemolymph cells of the land slug, *Incilaria fruhstorferi* Collinge (Gastropoda: Pulmonata). *Anat Anz* 162:215-224, 1986.

Gill JH, Redwin JM. Cryopreservation of the first-stage larvae of trichostrongylid nematode parasites. *International Journal for Parasitology* 25(12):1421-26, 1995.

Graeff-Teixeira C, Thomé JW, Pinto SCC, Camillo-Coura L, Lenzi HL. *Phyllocaulis variegatus*: an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in South Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84(1):65-68, 1989.

Graeff-Teixeira C, Ávila-Pires FD, Machado RCC, Camilo-Coura L, Lenzi HL. Identificação de roedores silvestres como hospedeiros do *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 32(3):147-150, 1990.

Graeff-Teixeira C, Camilo-Coura L, Lenzi HL. Histopathological criteria for the diagnosis of abdominal angiostrongylosis. *Parasitology Research* 77:606-611, 1991a.

Graeff-Teixeira C, Camilo-Coura L, Lenzi HL. Clinical and epidemiological aspects of abdominal angiostrongyliasis in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33(5):373-378, 1991b.

Graeff-Teixeira C, Goulart AH, Brum CO, Laitano AC, Siervers-Tostes C, Zanini GM, Bered PL, Morassutti A, Geiger S, Abrahms-Sandi E, Oliveira FTS, Maurer RL, Aguiar LF, Garrido CT, Silva ACA, Rodrigues R, Schulz-Key H, Agostini AA. Longitudinal clinical and serological survey of abdominal angiostrongyliasis in Guaporé, southern Brazil, from 1995 to 1999. *Rev Bras Med Trop* 38(4):310-315, 2005.

Graeff-Teixeira C, Silva ACA, Yoshimura, K. Update on Eosinophilic Meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews* 22(2):322-348, 2009.

Griffond B, Gomot L. Cultivation *in vitro* of organs of the fresh water gastropod prosobranch mollusc *Viviparus viviparus* L. *In Vitro* 10 (3-4):206-215, 1974.

Hansen EL. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characterization. In: Maramorosch K (ed.) *Invertebrate tissue culture: research applications*. Academic Press: New York, pp 75-99, 1976a.

Hansen EL. Application of tissue culture of pulmonate snail to culture of larval *Schistosoma mansoni*. In: Kurstak E, Maramorosch K (eds.) *Invertebrate Tissue Culture: Applications in Medicine, Biology and Agriculture*. Academic Press. New York, pp 87-97, 1976b.

Hata H, Kojima S. *Angiostrongylus cantonensis*: *in vitro* cultivation from the first-stage to infective third-stage larvae. *Experimental Parasitology* 70:476-482, 1990.

Hata H, Kojima S. *Angiostrongylus costaricensis*: culture of third-stage larvae to young adults in a defined medium. *Experimental Parasitology* 73:354-361, 1991.

Hata H. *In vitro* cultivation of the third and fourth stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*. *J Vet Med Sci* 55(2):345-347, 1993.

Hata H. Essential amino acids and other essential components for development of *Angiostrongylus costaricensis* from third-stage larvae to young adults. *J Parasitol* 80(4):518-520, 1994.

Hata H. *In vitro* cultivation of *Angiostrongylus costaricensis* eggs to first stage larvae in chemically defined medium. *International Journal for Parasitology* 26(3):281-286, 1996a.

Hata H. Optimum concentration of essential components for the development of *Angiostrongylus costaricensis in vitro*. *Journal of Helminthology* 70:173-175, 1996b.

Humphries JE, Yoshino TP. Cellular receptors and signal transduction in molluscan hemocytes: connections with the innate immune system of vertebrates. *Integr Comp Biol* 43:305-312, 2003.

Ivanchenko MG, Lerner JP, McCormick RS, Toumadje A, Allen B, Fischer K, Hedstrom O, Helmrich A, Barnes DW, Bayne CJ. Continuous *in vitro* propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4965-4970, 1999.

James ER. Cryopreservation of Helmyths. *Parasit Today* 1:134-9, 1985.

Kamisky RG, Andrews K, Morán R. *Angiostrongylus costaricensis* em babosas em Honduras: estudo preliminar. *Revista Medica Hondur* 55:4-8, 1987.

Kamisky RG, Caballero R, Andrews KL. Presencia de *Angiostrongylus costaricensis* em Honduras y sus relaciones agro-ecologicas y humanas. *Parasitologia al Dia* 19(3-4):81-90, 1995.

Kuberski T, Bart RD, Briley JM, Rosen L. Recovery of *Angiostrongylus cantonensis* from cerebrospinal fluid of child with eosinophilic meningitis. *J Clinical Microbiol* 9:629-631, 1979.

Lai SC. Chinese herbal medicine yin-chen-extract as an adjunct to anthelmintic albendazole used against *Angiostrongylus cantonensis* induced eosinophilic meningitis or meningoencephalitis. *Am J Trop Med Hyg* 75:556-562, 2006.

Laitano AC, Genro JP, Fontoura R, Branco SSL, Maurer RL, Graeff-Teixeira C, Milanez JM, Chiaradia LA, Thomé JW. Report on the occurrence of *Angiostrongylus costaricensis* in southern Brazil, in a new intermediate host from the genus *Sarasinula* (Veronicellidae, Gastropoda). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34(1):95-97, 2001.

Laursen JR, Yoshino TP. *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line supports *in vitro* miracidial transformation and early larval development of deer liver fluke, *Fascioloides magna*. *Parasitology* 118:187-194, 1999.

Leone SMM, Ghirga P, Nicastrì E, Esposito M, Narciso P. Eosinophilic meningitis in a returned traveler from Santo Domingo: case report and review. *J Travel Med* 14:407-410, 2007.

Lewis FA, Patterson CN, Knight M, Richards CS. The relationship between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*: genetic and molecular approaches. *Parasitology* 123:S169-S179, 2001.

Lim CS, Chung DY, Kaang BK. Partial anatomical and physiological characterization and dissociated cell culture of the nervous system of the marine mollusc *Aplysia kurodai*. *Mol Cells* 7(3):399-407, 1997.

Lima ARMC, Mesquita SD, Santos SS, Aquino ERP, Rosa LRS, Duarte FS, Teixeira AO, Costa ZRS, Ferreira MLB. Neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 64(4):1093-1096, 2009.

Lima LC, Massara CL, Souza CP, Vidigal TD, Lenzi HL, Carvalho O dos S. Suscetibilidade de planorbídeos da região metropolitana de Belo Horizonte, MG (Brasil) ao *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda, Angiostrongylidae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 34(5):399-402, 1992.

Lin XY, Glanzman DL. Long-term potentiation of *Aplysia* sensorimotor synapses in cell culture: regulation by postsynaptic voltage. *Proc Biol Sci* 255(1343):113-118, 1994.

Lindo JF, Waugh C, Hall J, Cunningham-Myrie C, Ashley D, Eberhard ML, Sullivan JJ, Bishop HS, Robinson DG, Holtz T, Robinson RD. Enzootic *Angiostrongylus cantonensis* in rats and snails after an outbreak of human eosinophilic meningitis, Jamaica. *Emerg Infect Dis* 8(3):324-6, 2002.

Mahajan RK, Renapurkar DM. Cryopreservation of *Angiostrongylus cantonensis* third-stage larvae. *Journal of Helminthology* 67:233-237, 1993.

Malek EA, Cheng TC. Medical and economic malacology. Academic Press. New York, 1974.

Malek EA. Presence of *Angiostrongylus costaricensis* Morera & Céspedes, 1971 in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 30(1):81-83, 1981.

Manaka K, Furuta E, Shimosawa A. Primary tissue culture of cells in the land slug *Incilaria bilineata*. *Zoological Magazine* 89:252-263, 1980.

Maurer RL, Graeff-Teixeira C, Thomé JW, Chiaradia LA, Sugaya H, Yoshimura K. Natural infection of *Deroceras laeve* (Mollusca: Gastropoda) with Metastrongylid larvae in a transmission focus of abdominal angiostrongyliasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 44(1):53-54, 2002.

Mendonça CLGF, Carvalho OS, Mota EM, Pelajo-Machado M, Caputo LFG, Lenzi HL. Penetration sites and migratory routes of *Angiostrongylus costaricensis* in the experimental intermediate host *Sarasinula marginata*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(4):549-556, 1999.

Mendonça CLGF, Carvalho OS, Lenzi HL. *Angiostrongylus costaricensis* life cycle in the intermediate host *Sarasinula marginata* Semper, 1885 (Mollusca: Soleolifera). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35(2):199-200, 2002.

Mendonça CLGF, Carvalho OS, Mota EM, Pelajo-Machado M, Caputo LFG, Lenzi HL. *Angiostrongylus costaricensis* and Experimental Infection of *Sarasinula marginata* – II. Elimination Routes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(7):893-898, 2003.

Mentz MB, Graeff-Teixeira C. *In vitro* maintenance of *Angiostrongylus costaricensis* does not provide physiological conditions for egg laying. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(2):205-206, 2005.

Monge E, Arroyo R, Solano E. A new definitive natural host of *Angiostrongylus costaricensis* (Morera & Céspedes, 1971). *J Parasit* 64(1):33, 1978.

Montresor LC, Vidigal THDA, CLGF Mendonça, AA Fernandes, Karyne NS, Carvalho OS, Caputo LFG, Mota EM, Lenzi HL. *Angiostrongylus costaricensis* (Nematoda: Protostrongylidae): migration route in experimental infection of *Omalonyx* sp. (Gastropoda: Succineidae). *Parasitol Res* 103:1339–1346, 2008.

Morera P. Life history and redescription of *Angiostrongylus costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *Am J Trop Med and Hyg* 22:613-621, 1973.

Morera P. Abdominal Angiostrongyliasis: a problem of public health. *Parasitology Today* 1(6):173-175, 1985.

Morera P. Angiostrongiliase abdominal – um problema de saúde pública. *Rev Soc Bras Med Trop* 21(2):45-47, 1988.

Morera P, Bontempo I. Accion de algunos antihelminticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*. *Rev Med Hosp Nac Niños Costa Rica* 20(2):165-174, 1985.

Morera P, Céspedes R. Angiostrongilosis abdominal: una nueva parasitosis humana. *Acta Med Costa* 14(3): 159-173, 1971a.

Morera P, Céspedes R. *Angiostrongylus costaricensis* n. sp. (Nematoda: Metastrongyloidea), a new lungworm occurring in man in Costa Rica. *Rev Biol Trop* 18:173-195, 1971b.

Morera P, Perez F, Mora F, Castro L. Visceral larva migrans-like syndrome caused by *Angiostrongylus costaricensis*. *Am J Trop Med Hyg* 31(1):67-70, 1982.

Nolan TJ, Aikens IM, Schad GA. Cryopreservation of first-stage larvae of *Strongyloides stercoralis*. *J Parasit* 74(3):387-391, 1988.

Odoemelam E, Raghavan N, Miller A, Bridger JM, Knight M. Revised karyotyping and gene mapping of the *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line. *Intern J for Parasit* 39:675-681, 2009.

Oku Y, Kamiya M, Ohbayashi M, Kudo N. Hybridization studies of *Angiostrongylus siamensis* Ohbayashi, Kamiya and Bhabulaya, 1979 and *A. costaricensis* Morera and Céspedes, 1971. *J Parasit* 70(5):845-846, 1984.

Peres CM, Curi R. Como cultivar células. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, 2005.

Plotnikov SV, Karpenko AA, Odintsova NA. Comparative characteristic of *Mytilus* muscle cells developed *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 298(2):77-85, 2003.

Rambo PR, Agostini AA, Graeff-Teixeira C. Abdominal angiostrongylosis in southern Brazil – prevalence and parasitic burden in mollusc intermediate hosts from eighteen endemic foci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92(1):9-14, 1997.

Rey L. Parasitologia. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro, 2001.

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

Robles MR, Navone GT, Kinsella JM. A new angiostrongylid (Nematoda) species from the pulmonary arteries of *Akodon azarae* (Rodentia: Cricetidae) in Argentina. *J Parasitol* 94(2):515-519, 2008.

Santos PH, Thomé JW. Chave ilustrada para determinação prática das cinco espécies de Veronicellidae com ocorrência no Rio Grande do Sul (Mollusca, Gastropoda, Soleolifera). EDIPUCRS. Porto Alegre, 1999.

Taft AS, Vermeire JJ, Bernier J, Birkeland SR, Cipriano MJ, Papa AR, McArthur AG, Yoshino TP. Transcriptome analysis of *Schistosoma mansoni* larval development using serial analysis of gene expression (SAGE). *Parasitology* 136(5):469-485, 2009.

Teles HMS, Vaz JF, Fontes LR, Domingos MF. Registro de *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) no Brasil: caramujo hospedeiro intermediário da angiostrongilíase. *Rev Saúde Pública* 31: 310-312, 1997.

Thomé JW, Gomes SR, Silva RS. Ocorrência e distribuição da Família Veronicellidae Gray, 1840 (Mollusca, Gastropoda) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 7(1):157-165, 1999.

Thomé JW, Gomes SR, & Picanço JB. Os caracóis e as lesmas dos nossos bosques e jardins. Useb. Pelotas, 2006.

Tsai HC, Liu YC, Kunin CM, Lee SS, Chen YS, Lin HH, Tsai TH, Lin WR, Huang CK, Yen MY, Yen CM. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. *Am J Med* 111:109-114, 2001.

Ubelaker JE. Systematics of species referred to the genus *Angiostrongylus*. *J Parasit* 72(2):237-244, 1986.

Uga S, Matsumura T. *In vitro* cultivation of *Angiostrongylus cantonensis* eggs. *Jap J Parasit* 31(1):59-66, 1982.

Uga S, Arak K, Matsumura T, Iwamura N. Studies on the cryopreservation of eggs of *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of Helminthology* 57:297-303, 1983.

Vasconcelos MC, Pile E. Ocorrência de *Achatina fulica* no Vale do Paraíba, estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Saúde Pública* 35(6):582-584, 2001.

Yoshino TP, Laursen JR. Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. *J Parasitol* 81(5):714-22, 1995.

Yoshino TP, Coustau C, Modat S, Castillo MG. The *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) molluscan cell line: establishment of an *in vitro* cellular model for the study of snail host-parasite interaction. *Malacologia* 41(2):331-343, 1999.

Yoshino TP, Boyle JP, Humphries JE. Receptor-ligand interactions and cellular signaling at the host-parasite interface. *Parasitology* 123:S143-157, 2001.

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* 411:46-58, 2008.

Wang LC, Jung SM, Chen CC, Wong HF, Wan DP, Wan YL. Pathological changes in the brains of rabbits experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis* after albendazole treatment: histopathological and magnetic resonance imaging studies. *J Antimicrob Chemother* 57:294-300, 2006.

Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. Human angiostrongyliasis. *Lancet Infect Dis* 8:621-30, 2008.

## 8 APÊNDICES

## **Apêndice 1**



**Cell Line Designation: Bge**  
**ATCC® Catalog No. CRL-1494™**

**Table of Contents:**

- Cell Line Description
- Biosafety Level
- Use Restrictions
- Handling Procedure for Frozen Cells
- Handling Procedure for Flask Cultures
- Subculturing Procedure
- Medium Renewal
- Complete Growth Medium
- Cryoprotectant Medium
- References
- Replacement Policy
- Specific Batch Information

**Cell Line Description**

**Organism:** *Biomphalaria glabrata* (snail)

**Tissue:** embryo

**Growth properties:** adherent (see Comments below)

**Depositors:** CJ Bayne

**Comments:** The cells may be used to promote maturation of the obligate invertebrate phase of *Schistosoma mansoni*. Bge cells are very sensitive to the quality of the fetal bovine serum. Several lots may need to be tested in order to find one which will support the growth of these cells. Primaria flasks (Falcon #3824 and #3813) can be used to form a confluent monolayer. These flasks have a net positive charge rather than the usual negatively charged surface of traditional tissue culture flasks. Other types of flasks and collagen coated flasks may be used, but the majority of the cells will grow as large clumps that detach and grow in suspension.

**Biosafety Level: 1**

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the following publication: *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, 4th ed. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Washington DC: U.S. Government Printing Office; 1999. The entire text is available online at [www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bml4/bml4toc.htm](http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bml4/bml4toc.htm).

**Use Restrictions**

**These cells are distributed for research purposes only.** ATCC recommends that individuals contemplating commercial use of any cell line first contact the originating investigator to negotiate an agreement. Third party distribution of this cell line is discouraged, since this practice has resulted in the unintentional spreading of cell lines contaminated with inappropriate animal cells or microbes.

**Handling Procedure for Frozen Cells**

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C. Storage at -70°C will result in loss of viability.

**SAFETY PRECAUTION: ATCC highly recommends that protective gloves and clothing always be used and a full face mask always be worn when handling frozen vials.** It is important to note that some vials leak when submersed in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vessel exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris.

NOTE: Primaria Flasks are recommended for better attachment.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 23°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 ml complete culture medium, and spin at approximately 125 xg for 5 to 7 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio), and dispense into a 25 cm<sup>2</sup> culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 23°C in a suitable incubator. A 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.

**Handling Procedure for Flask Cultures**

The flask was seeded with cells (see specific batch information) grown and completely filled with medium at ATCC to prevent loss of cells during shipping.

1. Upon receipt visually examine the culture for macroscopic evidence of any microbial contamination.



Using an inverted microscope (preferably equipped with phase-contrast optics), carefully check for any evidence of microbial contamination. Also check to determine if the majority of cells are still attached to the bottom of the flask; during shipping the cultures are sometimes handled roughly and many of the cells often detach and become suspended in the culture medium (but are still viable).

2. **If the cells are still attached**, aseptically remove all but 5 to 10 ml of the shipping medium. The shipping medium can be saved for reuse. Incubate the cells at 23°C in a 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere until they are ready to be subcultured.
3. **If the cells are not attached**, aseptically remove the entire contents of the flask and centrifuge at 125 xg for 5 to 10 minutes. Remove shipping medium and save. Resuspend the pelleted cells in 10 ml of this medium and add to 25 cm<sup>2</sup> flask. Incubate at 23°C in a 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere until cells are ready to be subcultured.

#### Subculturing Procedure

Volumes used in this protocol are for 75 cm<sup>2</sup> flask; proportionally reduce or increase amount of dissociation medium for culture vessels of other sizes.

Do the first subculture 2 to 3 weeks after thawing, thereafter every 10 days.

1. Remove and discard culture medium.
2. Rinse with 5 ml Hansen's buffered saline, remove saline and add 3 ml 0.05% trypsin (made with Hansen's saline). Let stand at room temperature for 2 to 5 minutes, remove trypsin.
3. Add 6.0 to 8.0 ml of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
5. Add appropriate aliquots of the cell suspension into new flasks  
**Subcultivation Ratio:** 1:4
6. Incubate cultures at 23°C.

#### Hansen's Buffered Saline

NaCl	2.8 gm/L
Na gluconate	1.5 gm/L
KCl	0.15 gm/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.07 gm/L
NaHCO <sub>3</sub>	0.05 gm/L
D- Glucose	0.5 gm/L
D- Galactose	0.5 gm/L
Trehalose	0.5 gm/L

#### Medium Renewal

6 days after thawing and once a week thereafter

#### Complete Growth Medium

Schneider's Drosophila medium, 22%  
double distilled water, 58%  
heat-inactivated fetal bovine serum, 20%  
lactalbumin hydrolysate (4.5 g/L)  
D-galactose (1.3 g/L)

This medium is formulated for use with a 5% CO<sub>2</sub> in air atmosphere

#### Cryoprotectant Medium

Complete culture medium described above supplemented with 5% (v/v) DMSO.

Cell culture tested DMSO is available as ATCC Catalog No. 4-X.

#### Additional Information

Additional product and technical information can be obtained from the catalog references and the ATCC Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org), or by e-mail at [tech@atcc.org](mailto:tech@atcc.org).

#### References

(additional references may be available in the catalog description at [www.atcc.org](http://www.atcc.org))

Maramorsch, editor. **Invertebrate tissue culture: research applications**. New York: Academic Press; 1976, pp. 75-99.

J. Invertebr. Pathol. 32: 35-39, 1978.

Bayne CJ, et al. **Low-temperature preservation of the *Biomphalaria glabrata* cell line**. J. Invertebr. Pathol. 29: 332-337, 1977. PubMed: [323373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/323373/)

Hay, R. J., Caputo, J. L., and Macy, M. L., Eds. (1992), **ATCC Quality Control Methods for Cell Lines**. 2<sup>nd</sup> edition, Published by ATCC.

Caputo, J. L., **Biosafety procedures in cell culture**. J. Tissue Culture Methods 11:223-227, 1988.

Fleming, D.O., Richardson, J. H., Tulis, J.J. and Vesley, D., (1995) **Laboratory Safety: Principles and Practice**. Second edition, ASM press, Washington, DC.

#### ATCC Warranty

The viability of ATCC products is warranted for 30 days from the date of shipment. If you feel there is a problem with this product, contact Technical Services by phone at 800-638-6597 or 703-365-2700 or by e-mail at [tech@atcc.org](mailto:tech@atcc.org). Or you may contact your local distributor.

#### Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt



## Product Information Sheet for ATCC CRL-1494™

---

and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at [www.atcc.org](http://www.atcc.org).

© ATCC 2006. All rights reserved.

ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

08/06

---

American Type Culture Collection  
P.O. Box 1549  
Manassas, VA 20108 USA  
[www.atcc.org](http://www.atcc.org)

800-638-6597 (U.S., Canada, and Puerto Rico)  
703-365-2700  
Fax: 703-365-2750  
E-mail: [tech@atcc.org](mailto:tech@atcc.org)

## **Apêndice 2**



**HCPA**

**SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA - CRM-RS 57620/1**  
**Chefe de Serviço: Ricardo Machado Xavier CREMERS: 15491**  
**MICROBIOLOGIA**



Paciente : 02/1

Registro :

Emissão do Laudo : 09/08/2007

Médico Dr.(a)

Convênio : LABORATORIO -

**HEMOCULTURA AERÓBICA E FUNGOS (SANGUE)**

Sol.: 3454103

Recebimento material/Paciente: 09/08/2007 17:10

**RESULTADO:**

Ausência de crescimento bacteriano.

Método: Automatizado

*Afonso Luis Barth - CRF:3493*  
Conferência por Vídeo

*"Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico do paciente, sem o qual a interpretação do resultado é apenas relativa."*



SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA - CRM-RS 57620/1  
Chefe de Serviço: Ricardo Machado Xavier CREMERS: 15491  
MICROBIOLOGIA



Paciente : 02/2

Registro :

Emissão do Laudo : 09/08/2007

Médico Dr.(a)

Convênio : LABORATORIO -

**HEMOCULTURA AERÓBICA E FUNGOS (SANGUE)**

Sol.: 3454105

Recebimento material/Paciente: 09/08/2007 17:10

**RESULTADO:**

Ausência de crescimento bacteriano.

Método: Automatizado

Afonso Luis Barth - CRF:3493  
Conferência por Vídeo

*"Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico do paciente, sem o qual a interpretação do resultado é apenas relativa."*



SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA - CRM-RS 57620/1  
Chefe de Serviço: Ricardo Machado Xavier CREMERS: 15491  
MICROBIOLOGIA



Paciente : 02/3

Registro :

Emissão do Laudo : 09/08/2007

Médico Dr.(a)

Convênio : LABORATORIO -

**HEMOCULTURA AERÓBICA E FUNGOS (SANGUE)**

Sol.: 3454110

Recebimento material/Paciente: 09/08/2007 17:10

**RESULTADO:**

Ausência de crescimento bacteriano.

Método: Automatizado

Afonso Luis Barth - CRF:3493  
Conferência por Vídeo

"Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico do paciente, sem o qual a interpretação do resultado é apenas relativa."



SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA - CRM-RS 57620/1  
Chefe de Serviço: Ricardo Machado Xavier CREMERS: 15491  
MICROBIOLOGIA



Paciente : 05/1

Registro :

Emissão do Laudo : 09/08/2007

Médico Dr.(a)

Convênio : LABORATORIO -

**HEMOCULTURA AERÓBICA E FUNGOS (SANGUE)**

Sol.: 3454092

Recebimento material/Paciente: 09/08/2007 17:07

**RESULTADO:**

Ausência de crescimento bacteriano.

Método: Automatizado

Afonso Luis Barth - CRF:3493  
Conferência por Vídeo

*"Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico do paciente, sem o qual a interpretação do resultado é apenas relativa."*



HCPA

SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA - CRM-RS 57620/1  
Chefe de Serviço: Ricardo Machado Xavier CREMERS: 15491  
MICROBIOLOGIA



Paciente : 05/02

Registro :

Médico Dr.(a)

Emissão do Laudo : 09/08/2007

Convênio : LABORATORIO -

**HEMOCULTURA AERÓBICA E FUNGOS (SANGUE)**

Sol.: 3454096

Recebimento material/Paciente: 09/08/2007 17:08

**RESULTADO:**

Ausência de crescimento bacteriano.

Método: Automatizado

Afonso Luis Barth - CRF:3493

Conferência por Vídeo

*"Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico do paciente, sem o qual a interpretação do resultado é apenas relativa."*



HCPA

SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA - CRM-RS 57620/1  
Chefe de Serviço: Ricardo Machado Xavier CREMERS: 15491  
MICROBIOLOGIA



Paciente : 05/3

Registro :

Médico Dr.(a)

Emissão do Laudo : 09/08/2007

Convênio : LABORATORIO -

**HEMOCULTURA AERÓBICA E FUNGOS (SANGUE)**

Sol.: 3454099

Recebimento material/Paciente: 09/08/2007 17:09

**RESULTADO:**

Ausência de crescimento bacteriano.

Método: Automatizado

Afonso Luis Barth - CRF:3493  
Conferência por Vídeo

*"Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico do paciente, sem o qual a interpretação do resultado é apenas relativa."*



SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA - CRM-RS 57620/1  
Chefe de Serviço: Ricardo Machado Xavier CREMERS: 15491  
MICROBIOLOGIA



Paciente : C/1

Registro :

Emissão do Laudo : 09/08/2007

Médico Dr.(a)

Convênio : LABORATORIO -

**HEMOCULTURA AERÓBICA E FUNGOS (SANGUE)**

Sol.: 3454079

Recebimento material/Paciente: 09/08/2007 17:02

RESULTADO:

Método: Automatizado

**OBS.:**

Presença de microbiota múltipla (Enterobactérias).

Afonso Luis Barth - CRF:3493  
Conferência por Vídeo

"Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico do paciente, sem o qual a interpretação do resultado é apenas relativa."



SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA - CRM-RS 57620/1  
Chefe de Serviço: Ricardo Machado Xavier CREMERS: 15491  
MICROBIOLOGIA



Paciente : C/2

Registro :

Emissão do Laudo : 09/08/2007

Médico Dr.(a)

Convênio : LABORATORIO -

**HEMOCULTURA AERÓBICA E FUNGOS (SANGUE)**

Sol.: 3454082

Recebimento material/Paciente: 09/08/2007 17:05

**RESULTADO:**

Método: Automatizado

**OBS.:**

Presença de microbiota múltipla (Enterobactérias).

Afonso Luis Barth - CRF:3493  
Conferência por Vídeo

"Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico do paciente, sem o qual a interpretação do resultado é apenas relativa."



SERVIÇO DE PATOLOGIA CLÍNICA - CRM-RS 57620/1  
Chefe de Serviço: Ricardo Machado Xavier CREMERS: 15491  
MICROBIOLOGIA



Paciente : C/3

Registro :

Emissão do Laudo : 09/08/2007

Médico Dr.(a)

Convênio : LABORATORIO -

**HEMOCULTURA AERÓBICA E FUNGOS (SANGUE)**

Sol.: 3454084

Recebimento material/Paciente: 09/08/2007 17:05

**RESULTADO:**

Método: Automatizado

**OBS.:**

Presença de microbiota múltipla (Enterobactérias).

Afonso Luis Barth - CRF:3493  
Conferência por Vídeo

*"Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico do paciente, sem o qual a interpretação do resultado é apenas relativa."*