

CULTURA IN VITRO DE LARVAS DE ASCARIS SUUM: SIMPLIFICAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Jorge GUERRERO **
M. L. P. MERCADANTE ***

RFMV-A/30

GUERRERO, J. & MERCADANTE, M. L. P. *Cultura "in vitro" de larvas de Ascaris suum: simplificação do meio de cultura.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 13(2):391-9, 1976.

RESUMO: A simplificação do meio de cultivo para larvas de *Ascaris suum* foi tentada. Dos suplementos utilizados para tentar substituir o soro de feto bovino, a hemina utilizada juntamente a outro suplemento proteico, aumentou consideravelmente tanto a sobrevivência como a taxa de desenvolvimento das larvas. A ovalbumina usada com hemina ou glicogênio deu excelentes resultados como suplemento ao meio mínimo essencial de EAGLE utilizado na cultura de larvas de *A. suum*.

UNITERMOS: *Ascaris suum**; Cultura in vitro*; Cromatografia em coluna*; Eletroforese, suplementos*.

INTRODUÇÃO

Demonstrou-se que antígenos somáticos e metabólicos, provenientes de larvas de terceiro e quarto estágios, coletados de larvas obtidas de pulmões de camundongos infectados as quais eram cultivadas "in vitro" por cinco dias induziam resistência em camundongos submetidos a um desafio homólogo (GUERRERO & SILVERMAN, 1969; e SOULSBY, 1963).

Antígenos somáticos e metabólicos, principalmente os últimos, de larvas de segundo e terceiro estágios de *A. suum*, cultivadas inteiramente "in vitro" por 12 a 16 dias foram efetivos na indução de proteção contra desafio homólogo em camundongos (GUERRERO, 1971; GUERRERO & SILVERMAN, 1971 e GUERRERO & SILVERMAN 1973), e protegeram mesmo contra dose letal mínima de ovos de *A. suum* (GUERREIRO & SILVERMAN, 1972). Entretanto, uma posterior

* Investigação realizada com auxílio parcial do grant AI 05910 do National Institute of Allergy and Infectious Diseases, USA, e da FAPESP (bolsa de aperfeiçoamento a M.L.P. Mercadante).

** Professor Assistente Doutor.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.
Gerente de Pesquisas do Instituto de Pesquisas Johnson & Johnson de Doenças Endêmicas — São José dos Campos — São Paulo.

*** Auxiliar de Ensino.
Faculdade de Medicina do ABC, Santo André - São Paulo.

caracterização e purificação dos antígenos não tem sido possível, devido a complexidade do suplemento utilizado (soro suíno) no meio de cultivo (GUERRERO & SILVERMAN, 1973).

O objetivo do presente experimento foi tentar a simplificação do meio de cultivo através da utilização de vários suplementos menos complexos que soro.

MATERIAL E MÉTODO

Preparação e Cultura de ovos de A. suum

Ovos não embrionados foram removidos do útero de fêmeas adultas de *A. suum* coletadas em matadouro local. Esses ovos foram embrionados de acordo com método descrito por GUERRERO & SILVERMAN (1969). Os ovos embrionados foram descascados utilizando o método de HASKINS & WEINSTEIN (1957), eclodidos pelo método de JASKOSKI & COLUCCI (1964) e cultivados em Meio Mínimo Essencial de EAGLE (MEM) com atmosfera de CO₂, mantidos sob agitação por 12 dias a 38.°C, de acordo com a técnica descrita por LEVINE & SILVERMAN (1969) e com mistura antibiótica antimicótica (AB).

O número de larvas vivas inoculadas em cada cultura não foi determinado, porém, o número aproximado e a porcentagem de sobrevivência foram determinados após o término utilizando-se uma Câmara "Mc Master" para fazer a contagem. O número total de larvas vivas e mortas na câmara era multiplicado pelo fator 6.6 para obter-se a concentração por ml e o total multiplicado pelo volume de meio, dando o número aproximado de Equivalente Larval na cultura.

Cromatografia em Coluna

Frações de soro de feto bovino (FCS) e de soro de feto bovino-imunoglobulina precipitado (IPT-FCS) livre de

gama globulina) foram obtidas da eluição de 10 ml de soro de ambos os tipos através de uma coluna de cromatografia Pharmacia de 2.5x45 contendo BIO-GEL A 0.5 e usando tampão Tris HCl pH 7.4, 1M. Três frações (I, II e III) foram identificadas após a leitura de suas D.O. a 260 e 280 nm.

Dez ml de soro de feto bovino-imunoglobulina precipitado foi também eluído através de uma coluna contendo DEAE Sephadex G-50, empregando etapas de eluição com tampão fosfato 0,07M, 0,1M. Para evitar empacotamento do gel foi usado um sistema de suporte de contas de vidro siliconizadas na coluna de cromatografia (SEACHS & PAINTER, 1972). Quatro frações foram identificadas pela leitura do valor das D.O. a 260 e 280 nm.

Eletroforese em Gel Vertical

A complexidade de cada suplemento foi determinada em parte por análise eletroforética em gel vertical de poliacrilamida.

Geis poliacrilamida sete por cento foram preparados como descrito por RAYMOND, 1964. A eletroforese correu por duas horas e trinta minutos a 250 volts e 75 miliamperes. Azul de Bromofenol foi utilizado como indicador de migração. Após o término da eletroforese o gel foi fixado numa solução de ácido tricloroacético a 12,5% e corado com Coumassie azul como descrito por CHRAMBACK et al., 1967.

Desenho Experimental e Descrição dos Meios

Cada grupo experimental consistia de quatro garrafas de cultura, contendo 20 ml de meio cada uma, três contendo o meio experimental e uma como controle. Soro de feto bovino (FCS) sugerido por DOUVRES & TROMBA, 1970 e soro de feto bovino livre de imunoglobulina (IPI-FCS) foram ótimos suple-

mentos embora muito complexos. Experimentos realizados previamente em nosso laboratório tinham indicado que IPT-FCS era superior a FCS como suplemento no cultivo de *A suum*.

Seguindo as sugestões de BUECHER et al., 1971 e HANSEN et al., 1971, foram testados glicogênio hemina e colesterol como possíveis suplementos simplificados, todos sózinhos ou em combinação com IPT-FCS.

Outros suplementos utilizados foram: caseína, ovalbumina e albumina de soro bovino. Cada uma das combinações suplemento-meio está demonstrada na Tabela I.

O sucesso relativo de cada suplemento foi determinado de acordo com uma combinação de viabilidade e tamanho das larvas em relação a simplicidade do meio.

Quatro réplicas de cada cultura foram feitas obtendo-se resultados similares, mas para simplificação dos resultados apresentados só os dados relativos a um experimento será aqui relatado, como representativo dos resultados observados.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados obtidos com a mensuração das larvas foi analisado como um experimento completamente ao acaso pelo novo teste de variação múltipla de Duncan com porcentagem de 5% (STEEL & TORRIE, 1960).

R E S U L T A D O S :

As taxas de sobrevivência e o tamanho das larvas conseguidos em cada meio de cultura estão apresentados na Tabela II. Os critérios para identificação dos vários estágios larvários foram baseados naqueles estabelecidos por NICHOLS, 1965 e DOUVRES & TROMBA, 1969,

De acordo com a medida de comprimento e largura as larvas cultivadas em meio E₁ foram as que mais se desenvolveram. A análise estatística mostrou que realmente estas larvas apresentavam uma diferença estatisticamente significativa em relação às larvas cultivadas em outros meios.

A comparação estatística de largura e comprimento médio das larvas cultivadas nos diferentes meios de cultura está apresentada na TABELA III. Por ambos parâmetros as larvas cultivadas em meio E₁ (MEM + 10% IPT - FCS + 1% Hemina + 5% AB) foram as mais desenvolvidas.

A variação de sobrevivência, em porcentagem, foi de 13% (cultura H) a 84% (cultura N). A cultura E₁ a qual teve o maior desenvolvimento das larvas, tanto morfológico como em tamanho, apresentou alta porcentagem de sobrevivência também (71%).

Larvas da cultura E₁ podem ser classificadas, morfológicamente, como de terceiro estágio tardio. Elas apresentavam um corpo reticulado ou vacuolizado (FIG. 1), com uma expansão abrupta do corpo imediatamente posterior à base da cabeça (FIG. 2) e um intestino com lúmen aberto sem grânulos refratários e esféricos (FIG. 3). Com vista ao tamanho estas larvas poderiam ser classificadas como larvas de terceiro estágio intermediário, embora suas características morfológicas correspondessem a um terceiro estágio tardio. A figura 4 mostra uma comparação quanto ao tamanho de um larva de terceiro estágio tardio coletada de uma cultura E₁ e uma larva de segundo estágio, recém eclodida.

D I S C U S S Ã O

Com a finalidade de simplificar o meio, o primeiro método usado foi separar soro de feto bovino total (FCS) e soro de feto bovino imunoglobulina precipitado (IPT - FCS) em seus cons-

T A B E L A I

Composição de meio utilizado para cultivo "in vitro" de larvas de segundo estágio de *A. suum* por doze dias.

<i>Código de identificação</i>	<i>Meios e Suplementos</i>
A	MEM + 10% FCS + 5%AB
A ₁	MEM + 10% FCS + 1% Hemina + 5%AB
B	MEM + 10% I - FCS + 5%AB
B ₁	MEM + 10% I - FCS + 1% Hemina + 5%AB
C	MEM + 10% II - FCS + 5%AB
D	MEM + 10% III - FCS + 5%AB
E	MEM + 10% IPT - FCS + 5%AB
E ₁	MEM + 10% IPT - FCS + 1% Hemina + 5%AB
E ₂	MEM + 10% IPT - FCS + 1% Hemina + 10% Glicogênio + 5%AB
E ₃	MEM + 10% IPT - FCS + 1% Colesterol + 5%AB
E ₄	MEM + 10% IPT - FCS + 1% Colesterol + 5%AB
F	MEM + 10% I - IPT - FCS + 5%AB
G	MEM + 10% II - IPT - FCS + 5%AB
H	MEM + 10% III - IPT - FCS + 5%AB
I	MEM + 10% I - IPT - FCS + 5%AB
J	MEM + 10% II - IPT - FCS + 5%AB
K	MEM + 10% III - IPT - FCS + 5%AB
L	MEM + 10% IV - IPT - FCS + 5%AB
M	MEM + 10% Ovalbumina + 1% Hemina + 5%AB
M ₁	MEM + 10% Ovalbumina + 10% Glicogênio + 5%AB
M ₂	MEM + 10% Ovalbumina + 10% Glicogênio + 1% Hemina + 5%AB
M ₃	MEM + 10% Ovalbumina + 1% Colesterol + 5% AB
N	MEM + 20% Soro Albumina Bovina + 5%AB
N ₁	MEM + 20% Soro Albumina Bovina + 1% Hemina + 5%AB

Frações I, II e III — FCS foram obtidas por eluição de FCS em coluna de BIOGEL A. O. 5 (Culturas B, C e D).

Frações I, II e III — IPT - FCS foram obtidas por eluição de IPT - FCS - em coluna de BIOGEL A. O. 5. (Culturas F, G e H).

Frações I, II, III e IV de IPT — FCS foram obtidas por eluição de IPT - FCS em coluna de DEAE Sephadex G 200 (Culturas I, J, L, K).

tituintes menos complexos usando uma coluna de cromatografia.

Eletroforese das frações obtidas de coluna contendo BIOGEL A 0,5 mostrou que a fração I de FCS era constituída primariamente de macroglobulina de migração lenta. Fração II continha muitas das proteínas e a Fração III era composta de albumina. Frações de IPT-FCS apresentaram resultados similares exceto que a Fração I continha somente uma pequena quantidade de macroglobulina.

Análise eletroforética das quatro frações de IPT-FCS obtidas da eluição através de DEAE Sephadex indicou que as Frações I e II eram similares, produzindo cada uma três bandas. Fração III também era constituída por três componentes e a Fração IV compunha-se de albumina e alguma préalbumina.

Como o resultado mostrou, foi encontrado que essas frações não eram capazes de suportar uma alta taxa de sobrevivência e desenvolvimento de larvas de *A. suum*. Muitas larvas foram incapazes de desenvolver além do segundo estágio e o número de larvas viáveis após 12 dias foi muito baixo. Entretanto, as frações constituídas de albumina promoveram a maior porcentagem de sobrevivência e as larvas mais largas.

Glicogênio foi utilizado nesse experimento devido ter sido provado um suplemento efetivo para o meio de manutenção quimicamente definido de *C. briggsae* na promoção do crescimento e reprodução de *Caenorhabditis briggsae* (HANSEN et al., 1971). Também foi demonstrado que hemina e colesterol tinham sucesso como suplementos quando usados em associação com certas proteínas quimicamente definidas para o crescimento e desenvolvimento de *C. briggsae* e *Turbatrix aceti* (BUECHER et al., 1971).

Os resultados desses experimentos indicam, entretanto, que glicogênio e colesterol, sem um suplemento proteico adicional não são suficientes por si

mesmos para suportar o crescimento e o desenvolvimento de larvas de *A. suum*. Esses achados são consistentes com a evidência apresentada por LEVINE & SILVERMAN (1969) da necessidade de um suplemento proteico a viabilidade foi menor que a observada em cultura utilizando o suplemento sozinho. Isto sugere que o colesterol pode ter um efeito detrimental sobre as larvas.

O uso de hemina, por outro lado, produziu excelentes resultados. Utilizada juntamente a outro suplemento proteico, ela aumentou consideravelmente ambas, a sobrevivência e, particularmente, a taxa de desenvolvimento. Isto sugere que, larvas de *A. suum* podem requerer proteína de uma forma particulada. Muitas das culturas usando hemina e um suplemento ótimo continham muitas larvas de terceiro estágio tardio, frequentemente com bainhas soltas após 12 dias, mas nenhuma larva de quarto estágio foi observada. Culturas que estavam bem após 12 dias, foram mantidas em cultura por um longo período, mas, apesar de um maior número de larvas altamente desenvolvidas ser observado, elas não foram capazes de desenvolver-se além de um certo limite. Assim, embora hemina facilite a taxa de desenvolvimento, parece que algum estímulo posterior é necessário para capacitar as larvas a fim de completarem a terceira ecdisse.

Dos dois suplementos proteicos primários que foram testados, a saber, caseína e ovalbumina, a última provou ser superior. O sucesso da ovalbumina como suplemento era esperado devido aos resultados observados com frações de FCS e IPT-FCS contendo albumina. Parece entretanto, que o sucesso da ovalbumina como suplemento é dependente do uso de um suplemento adicional tal como hemina ou glicogênio. Pode ser notado que o meio contendo ambos, hemina e glicogênio, como suplementos adicionais foi menos efetivo do que aqueles contendo somente um desses suplementos.

Embora, ainda assim, não tenha sido possível caracterizar o antígeno, o objetivo desses experimento foi alcançado em certa extensão, no que diz respeito a simplificação do meio. Meios utilizando ovalbumina e hemina como suplementos são capazes de suportar taxas de desenvolvimento e viabilidade, de larvas de *A. suum*, quase tão altas como o meio ótimo. Eletroforese de ovalbumina produziu seis bandas, embora isto ainda seja complexo, é menos compli-

cado do que soro de feto bovino total. A Hemina, devido ao seu peso molecular pequeno pode ser removida facilmente por diálise.

Albumina de soro bovino foi experimentada várias vezes na esperança de poder ser tão efetiva, mas, menos complexa que a ovalbumina. Porém, até o momento, todas as tentativas para provar esta hipótese tem falhado devido a inabilidade para prevenir a contaminação do meio de cultura.

TABELA II

Porcentagem de sobrevivência, comprimento e largura de larvas de *A. suum*, após 12 dias de cultura "in vitro" em MEM mais diferentes suplementos.

Código do Meio	Comprimento em nm			Largura em nm			Porcentagem de sobrevivência
	Variação	Média	S. D.	Variação	Média	S. D.	
A	280-340	334	16.031	16-20	18	2.000	71
A ₁	296-352	319	14.491	16-24	20	2.872	75
B	220-260	241	11.114	12	12	0000	30
B ₁	220-260	234	10.329	12-20	15	2.272	65
C	256-352	271	17.592	12-20	16	1.049	16
D	252-292	271	11.814	12-24	18	2.514	71
E	284-344	317	21.211	16-24	20	2.191	80
E ₁	340-480	371	33.422	20-32	23	3.059	71
E ₂	280-320	295	13.902	16-24	19	2.425	24
E ₃	256-284	266	8.518	12-20	16	1.609	41
E ₄	244-320	266	16.319	12-20	15	3.048	54
F	252-296	269	8.985	12-20	15	2.015	37
G	240-312	277	14.048	12-20	16	1.459	36
H	240-264	248	15.963	12-20	13	1.844	13
I	280-320	296	13.408	16-20	19	1.959	45
J	252-284	266	9.669	12-20	16	1.049	60
K	240-288	262	12.008	12-20	15	2.015	52
L	264-320	293	16.171	16-28	20	2.473	56
M	280-336	310	19.247	16-24	21	2.795	77
M ₁	280-332	294	12.654	16-20	17	2.117	83
M ₂	280-300	288	7.463	16-24	18	2.252	61
M ₃	272-300	284	7.785	12-20	16	2.969	58
N	272-312	287	32.894	12-16	14	728	84
N ₁	276-324	295	9.430	12-20	16	1.863	68

TABELA III

Comparação estatística da média do comprimento e largura das larvas cultivadas em diferentes meios de cultura utilizando o novo teste de variação múltipla de Duncan.

Código do Meio	Média do comprimento em nm	Significância estatística	Código do Meio	Média da largura em nm	Significância estatística
E ₁	371	a	E ₁	23	a
A ₁	391	b	M ₁	21	b
E	317	b	A ₁	20	b
M ₁	310	b	E	20	b
A	304	b	L	20	b
I	296	c	I	19	bc
E ₂	295	c	E ₂	19	bc
N ₁	295	c	A	18	c
M ₂	294	c	M ₃	18	c
L	293	c	D	18	c
M ₃	288	cd	M ₂	17	c
N	287	cd	N ₁	16	cd
M ₄	284	cd		16	cd
G	277	d	M ₁	16	cd
D	271	de	G	16	cd
C	271	de	C	16	cd
F	269	de	J	16	cd
J	266	e	E ₃	15	d
E ₃	266	e	F	15	d
E ₄	266	e	E ₁	15	d
K	262	e	B ₁	15	d
H	248	f	K	14	d
B	241	f	N	13	de
B ₁	234	g	H	12	e
			B		

* Todas médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes para $\alpha = 5\%$.

GUERRERO, J. & MERCADANTE, M. L. P. In vitro cultivation of *Ascaris suum* larvae: simplification of the culture medium. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 13(2):391-9, 1976.

SUMMARY: Attempts were made to simplify the culture medium utilized for in vitro cultivation of *A. suum* larvae. Of all the supplements utilized to try to replace the fetal calf serum it was found that hemin plus any other protein supplement considerably increased both the larval survival and rate of developments. Egg albumin used with hemin or glicogen gave excellent results as a supplement to EAGLE'S minimum essential medium utilized in the in vitro culture of *A. suum* larvae.

UNITERMS: *Ascaris suum**; In vitro culture, Column chromatography*; Electrophoresis, supplements*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — BUECHER, E. J. & HANSEN, E. L. Mass Culture of axenic nematodes using continuous aeration. *J. Nemat.*, 3: 199-200, 1971.
- 2 — BUECHER, E. J.; HANSEN, E. L.; YARWOOD, E. A. Cultivation of *Caenorhabditis briggsae* and *Turbatrix aceti* with defined proteins. *J. Nemat.* 3: 89-90, 1971.
- 3 — CAMPBELL, D. H.; GARVEY, J. S.; CREMER, N. E. SUSSDORF, D. H. *Methods in immunology*. New York, 1970. p. 104-10.
- 4 — CHRAMBACH, A.; REISFIELD, R. A.; WYCKOFF, M.; ZACCARI, J. Procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 20: 1550-4, 1967.
- 5 — COLE, R. J. & KRUSBERG, L. R. Sterol metabolism in *Turbatrix aceti*. *Life*, 7: 713-4, 1968.
- 6 — DIETER, P.; LIPTON, A.; KLINGER, I. Serum factor requirements of normal and simian virus — 40 — transformed 3T3 mouse fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68: 645-8, 1971.
- 7 — DOUVRES, F. W. & TROMBA, F. G. Influence of the serum and cell cultures on development of *Ascaris suum* to fourth stage, "in vitro". *J. Parasit.*, 55: 238-48, 1970.
- 8 — DOUVRES, F. W.; TROMBA, F. G.; MALAKATIS, G. M. Morphogenesis and migration of *Ascaris suum* larvae developing to fourth stage in swine. *J. Parasit.*, 55: 689-712, 1969.
- *
9 — GUERRERO, J. & SILVERMAN, P. H. *Ascaris suum*: immune reactions in mice. I. Larval metabolic and somatic antigens. *Exp. Parasit.*, 26: 272-81, 1969.
- 10 — GUERRERO, J. & SILVERMAN, P. H. *Ascaris suum*: Immune reactions in mice. II. Metabolic and somatic antigens from "in vitro" cultured larvae. *Exp. Parasit.*, 29: 110-5, 1971.
- **
11 — GUERRERO, J. & SILVERMAN, P. H. *Ascaris suum*: partial fractionation of metabolic antigens from in vitro cultured larvae. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, 7: 319-27, 1973.
- 12 — HANSEN, E. L.; PEREZ-MENDEZ, G.; BUECHER, E. J. Glycogen as a supplement in media for Axenic cultivation of Nematodes. *Proc. Soc. Exper. Biol.*, New York, 137: 1352-4, 1971.
- 13 — HASKINS, W. T. & WEINSTEIN, P. P. The amine constituents from the excretory products of *Ascaris lumbricoides* and *Trichinella spiralis* larvae. *J. Parasit.*, 43: 28-32, 1957.
- 14 — HIEB, W. F. & STOKSTAD, E. L. R. Heme requirements of a free-living nematode. *Science*, 168:143-4, 1970.

- 15 -- HOLLY, R. W. & KETERMAN, J. A. Studies of serum factors required by 3T3 and SV3T3 cells. *Ciba Found. Sympos. on Growth Cont. in Cell Cultures*. 1971. p. 3-15.
- 16 -- JASKOSKI, J. B. & COLUCCI, A. V. *In vitro* hatching of *Ascaris suum* eggs. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, 83: 294-300, 1964.
- 17 -- LEVINE, H. S. & SILVERMAN, P. H. Cultivation of *Ascaris suum* larvae in supplemented and unsupplemented chemically defined media. *J. Parasit.*, 55: 17-21, 1939.
- 18 -- NICHOLS, R. L. The etiology of visceral larva migrans. II. Comparative larval morphology of *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoridis* and *Ancylostoma caninum*. *J. Parasit.*, 42: 333-99, 1956.
- 19 -- RAYMOND, S. Acrylamide Gel Electrophoresis. *Ann N. Y. Acad.*, 121: Article 2, 1964.
- 20 -- SEACHIS, D.H. & PAINTER, E. Improved flow rates with porous sephadex Gels. *Science*, 175: 781-2, 1972.

Recebido para publicação em 27-8-76
Aprovado para publicação em 13-9-76



Fig. 1 — Larva de Terceiro estágio de *A. suum* obtida da cultura E₁.
Note a vacuolização do corpo.



Fig. 2 — Larva de Terceiro estágio de *A. suum* obtida da cultura E₁.
Note extensão abrupta do corpo posterior à base da cabeça.



Fig. 3 — Larva de Terceiro estágio de *A. suum* obtida da cultura E₁. Note intestino com lúmen aberto e sem grânulos refratários.



Fig. 4 — Comparação quanto ao tamanho e características morfológicas, de larva de Terceiro estágio tardio obtida da Cultura E₁ e, larvas de Segundo estágio.