

CRIAÇÃO DE CARAMUJOS INFECTADOS PARA OBTENÇÃO EM MASSA DE CERCÁRIAS E ESQUISTOSSÔMULOS

CECÍLIA PEREIRA DE SOUZA, GIOVANNI GAZZINELLI, NEUSA ARAUJO,
OTÁVIO FRANCISCO ROSA CRUZ & CARLOS RUBENS TEIXEIRA DA SILVA

O sistema por nós utilizado para manutenção de moluscos infectados, Biomphalaria glabrata, capaz de produzir de 1-2 milhões de cercárias por semana, foi analisado quantitativamente. A produção média foi da ordem de 3.500 cercárias/molusco, com diminuição acentuada nos meses de novembro e dezembro de 1982 e 1983, relacionada com picos de elevação de temperatura e com a presença de rotíferos nos aquários. Para uma produção mensal em 1982 e 1983 de 5,3 e 6,5 milhões de cercárias, respectivamente, foram expostos à luz mensalmente cerca de 1.557 e 1.957 moluscos infectados. Esta produção exigiu uma infecção mensal de cerca de 2.000 moluscos com uma taxa de positividade de cerca de 60%. A produção por molusco foi máxima (mais de 6.000 cercárias/molusco) no período entre 56-70 dias após infecção pelo miracídio, quando, entretanto, a mortalidade já atingia cerca de 90% dos caramujos. As cercárias produzidas, quando transformadas in vitro, renderam cerca de 55% de esquistossômulos com uma contaminação por caudas da ordem de 7%. Quando liofilizadas produziram $50.9 \pm 6.3 \mu\text{g}$, de peso seco por 1.000 cercárias.

O crescente interesse pela pesquisa multidisciplinar na área de parasitos tem aumentado a demanda de material básico em vários laboratórios. Por exemplo, no Centro de Pesquisas René Rachou, onde são desenvolvidos projetos na área de biologia, imunologia e bioquímica do *Schistosoma mansoni*, estão sendo utilizados, no momento, de 1 a 2 milhões de cercárias por semana. Em se tratando de ciclo biológico complexo, esta demanda requer recursos substanciais para mantê-lo em laboratório, daí a necessidade de se racionalizar o processo visando a aumentar sua eficiência, isto é, maior produção de cercárias e menor custo. A literatura é escassa com relação à criação de moluscos para obtenção de cercárias em massa. Os poucos trabalhos existentes (Sandt, Bruce & Radke, 1965; Pellegrino & Katz, 1968; Stirewalt & Lewis, 1981; Stirewalt, 1981) estudaram apenas algumas das variáveis que podem afetar o sistema.

No presente trabalho procuramos analisar nosso sistema de criação de caramujos infectados para produção em massa de cercárias, visando a identificar variáveis que afetam seu rendimento para futuro aperfeiçoamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Criação, infecção e manutenção de caramujos: foram utilizados caramujos *Biomphalaria glabrata*, criados em laboratório há mais de quinze anos, com 2-3 anos de idade, originários de exemplares coletados em Barreiro de Cima, na zona periférica de Belo Horizonte, Minas Gerais. Essa população se caracteriza por possuir 5% de exemplares albinos.

A cepa de *S. mansoni* utilizada foi a "LE", de origem local também mantida em laboratório há mais de quinze anos.

As técnicas utilizadas para criação e infecção de caramujos foram as mesmas descritas em trabalho anterior (Souza et al., 1979).

Procedeu-se à infecção em massa (Standen, 1952) de grupos de 400 a 600 moluscos, em 1.500-2.000 ml de água por 6-15 horas de exposição à luz artificial à temperatura ambiente, com reinfeção após 48 horas nas mesmas condições. O número de exemplares expostos por mês e a relação miracídio/molusco variou de 1.000 a 2.200 e de 27 a 176, respectivamente. Após exposição aos miracídios, os moluscos eram mantidos em aquários de plástico medindo 60 x 40 x 18 cm com sistema de água corrente durante 8 horas, aeração constante e temperatura entre 27-28°C (Stirewalt, 1954). A água para os aquários, mantida em um depósito de 500 litros, era previamente desclorada pelo tratamento com tiosulfato de sódio a 2%, quando necessário, escoando através de tubulação de PVS. Decorridos trinta dias após a infecção, os moluscos eram examinados individualmente, em microscópio estereoscópico, após 30 min de exposição à luz artificial. Os exemplares eliminando cercárias eram contados e distribuídos em aquários de vidro com capacidade para cerca de 38 litros, com tampa de plástico preto, aeração constante e sistema de água corrente durante 8 horas. Os aquários, que continham no máximo 250 exemplares, eram mantidos em sala própria, na semi-obscuridade e em temperatura ambiente. Em ficha anexa a cada aquário, eram registrados a data de infecção, a temperatura da água, o número de caramujos positivos e a mortalidade, retirando-se os exemplares mortos. Diariamente, contavam-se as cercárias de cinco alíquotas de 1 ml de água, de cada aquário. A partir de novembro de 1983, passou-se a contar também o número de microrganismos (paramecio e rotíferos) encontrados na água.

Trabalho parcialmente financiado pelo CNPq e pela FINEP.

Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Caixa Postal 1743, 30000 Belo Horizonte, MG, Brasil.

Recebido para publicação em 9 de maio e aceito em 18 de dezembro de 1984.

Obtenção de cercárias: duas vezes por semana, grupos de 100 a 250 moluscos positivos eram retirados dos aquários, lavados em água corrente e distribuídos em frascos de vidro contendo cerca de 5 ml de tampão fosfato 0,001 M, pH 6, por molusco. Os frascos eram colocados em estufa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ sob luz fluorescente para eliminação de cercárias. Após 4 horas os moluscos eram retirados e recolocados nos aquários. A suspensão de cercárias era filtrada em tela de nylon fina para eliminação das fezes e outros detritos e as cercárias contadas, em 2-5 alíquotas de 1 ml.

Para obtenção do peso seco, as cercárias eram contadas, distribuídas em tubos de centrífuga de 15 ml, colocadas em banho de gelo por 10 min e centrifugadas por 1 min em centrífuga clínica a baixa rotação. O sedimento era lavado duas vezes em água destilada, transferido para frascos de penicilina e liofilizado.

Para dosagem de proteínas pelo método de Lowry et al. (1951) o material liofilizado era pesado e homogeneizado em salina.

Preparação de esquistossômulos: a suspensão de cercárias era distribuída em tubos de vidro de centrífuga de 50 ml e deixada no banho de gelo por 20 min para imobilização das cercárias. Os tubos eram centrifugados a $300 \text{ g} \times 2 \text{ min}$, os sobrenadantes descartados imediatamente e as cercárias suspensas em 2 ml de Elac (salina de Earle com 0,5% de hidrolisado de lactalbumina, 0,178% de glicose, 200 unidades de Penicilina/ml e 200/g de Streptomina/ml). As cercárias de cada dois tubos eram reunidas em tubos de centrífuga de 15 ml, sedimentadas por centrifugação na marca 1 da centrífuga clínica FANEM por 30 segundos e res-suspensas em 2 ml de Elac gelado. A fim de desconectar a cauda do corpo da cercária, essencial para o seu desenvolvimento em esquistossômulo (Howells et al., 1975), procedia-se de acordo com Pijkeren, Tavares & Gazzinelli (1982). A larva resultante possuía todas as características de esquistossômulo como descrito na técnica original (Ramalho-Pinto et al., 1974).

Análise estatística: para o cálculo estatístico da Fig. 2 utilizou-se análise de variância.

RESULTADOS

A eliminação média mensal de cercárias no período compreendido entre junho de 1982 a dezembro de 1983 consta da Fig. 1. Além das pequenas oscilações mensais inerentes ao sistema, observou-se decréscimo de produção especialmente em novembro e dezembro de 1982, que se repetiu no ano seguinte. Este período coincidiu com elevação da temperatura. A eliminação média mensal no período estudado foi de 3.375 ± 830 cercárias/molusco.

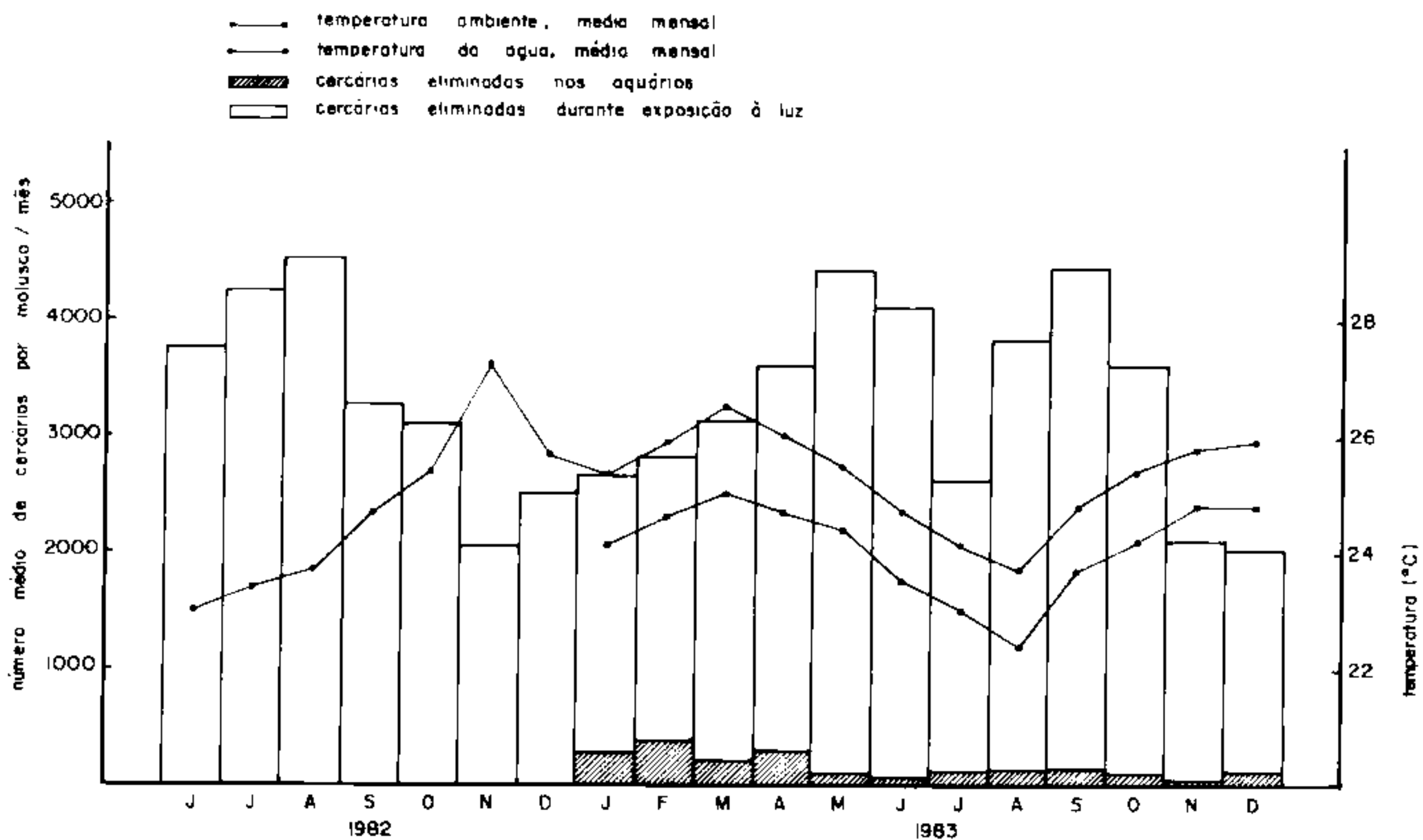


Fig. 1: eliminação média mensal de cercárias por *B. glabrata*, em duas exposições semanais de 4 horas, de grupos de 100-250 moluscos, no período de junho de 1982 a dezembro de 1983.

O levantamento total da produção de cercárias/molusco durante os sete últimos meses de 1982 e todo o ano de 1983 consta da Tabela I. Considerando o número de moluscos utilizados verificou-se uma produção média por molusco para 1982 e 1983 de 3.410 e 3.341, respectivamente. Com relação a 1983, constatou-se ainda que cerca de 13% das cercárias eram eliminadas nos aquários nos intervalos das exposições. Computando-se esta perda, teríamos para 1983 um total de 90.516.217 cercárias, com uma eliminação média por caramujo de 3.853.

TABELA I

Produção mensal de cercárias de *Schistosoma mansoni* por *Biomphalaria glabrata*

Meses	1982		1983		
	Moluscos expostos à luz	Cercárias recuperadas	Moluscos expostos à luz	Cercárias eliminadas recuperadas	perdidas*
Janeiro	—	—	1.400	3.763.475	562.398
Fevereiro	—	—	1.450	4.060.599	934.800
Março	—	—	1.850	5.822.155	1.074.800
Abril	—	—	2.050	7.455.735	1.497.215
Mai	—	—	2.105	9.335.745	745.200
Junho	1.400	5.299.290	1.882	7.698.085	490.300
Julho	1.700	7.225.150	1.933	5.107.115	1.141.360
Agosto	1.800	8.157.600	2.250	8.599.370	1.510.000
Setembro	1.600	5.161.400	2.250	10.079.390	1.656.800
Outubro	1.400	4.422.350	2.250	8.101.305	1.127.400
Novembro	1.400	2.890.525	2.000	4.263.615	388.380
Dezembro	1.600	4.018.217	2.071	4.201.275	899.700
Total	10.900	37.174.532	23.491	78.487.864	12.028.353

* Eliminadas nos aquários nos intervalos das exposições. Duas exposições semanais.

Para manter o sistema com a eficiência descrita, foram infectados em 1982 cerca de 1.300 caramujos/mês em duas exposições, e em 1983, 1.800 caramujos/mês em exposições semanais. Foram utilizados em média e em cada exposição, cerca de 30 miracídios/molusco em 1982 e 68 miracídios/molusco em 1983. Nestas condições, a taxa média de infecção foi de $51,4 \pm 10,9$ em 1982 e $59,5 \pm 11,2$ em 1983. A Tabela II mostra o balanço geral de 1983, podendo-se deduzir a relação moluscos infectados/moluscos eliminando cercárias. Como houve uma mortalidade média de 22,6% no período prepatente, a taxa de infecção real é provavelmente superior à apresentada na Tabela II, uma vez que alguns dos moluscos mortos poderiam estar infectados. A aparente discrepância entre caramujos infectados e caramujos expostos (Tabelas I e II) foi devida ao fato de que os mesmos caramujos eram expostos repetidamente.

TABELA II

Proporção de moluscos infectados que eliminaram cercária após período prepatente, em 1983

Meses	Moluscos infectados	% Mortalidade período prepatente	Caramujos positivos restantes	Taxa de infecção (%)
Janeiro	1.200	33	444	37
Fevereiro	1.600	26	719	61
Março	1.600	19	1.160	64
Abril	1.800	24	1.146	64
Mai	1.600	29	615	38
Junho	2.200	22	1.399	64
Julho	1.000	17	601	60
Agosto	2.200	20	1.577	74
Setembro	2.200	27	1.218	55
Outubro	2.000	18	1.379	69
Novembro	2.100	21	1.291	62
Dezembro	2.150	16	1.424	66
Média \pm DP*	1.804 \pm 410	22,6	1.081 \pm 368	59,5

* DP = Desvio padrão.

A eliminação média de cercárias/molusco apresentada por vários grupos, após o período prepatente, consta da Fig. 2. A análise dos grupos mostra que há uma diferença significativa ao nível de 0,05 entre a média de cercárias dos grupos no período de 61-65 dias após a infecção e as dos três primeiros grupos compreendendo o período de 30 a 45 dias; os grupos de 56-60 e 66-70 também diferem significativamente dos grupos de 30-35 e 41-45 dias. Estes dados indicam que a maior produção de cercárias ocorre quando o caramujo se encontra no período entre 56-70 dias após a infecção, com um pico no período 61-65. Nesta fase, entretanto, a mortalidade já atingiu 85-95% dos animais em oposição a do grupo controle que não alcançou os 35% (Fig. 3).

A fim de facilitar a comparação de dados analíticos, procurou-se relacionar o número de cercárias com seu peso seco e seu conteúdo em proteínas. Conforme consta da Tabela III, 1 mg de pó liofilizado corresponde, aproximadamente, a 20.000 cercárias, que por sua vez contém cerca de 0,55 mg de proteínas. O elevado desvio padrão encontrado deve-se à dificuldade de se retirar amostras homogêneas de uma suspensão de cercárias.

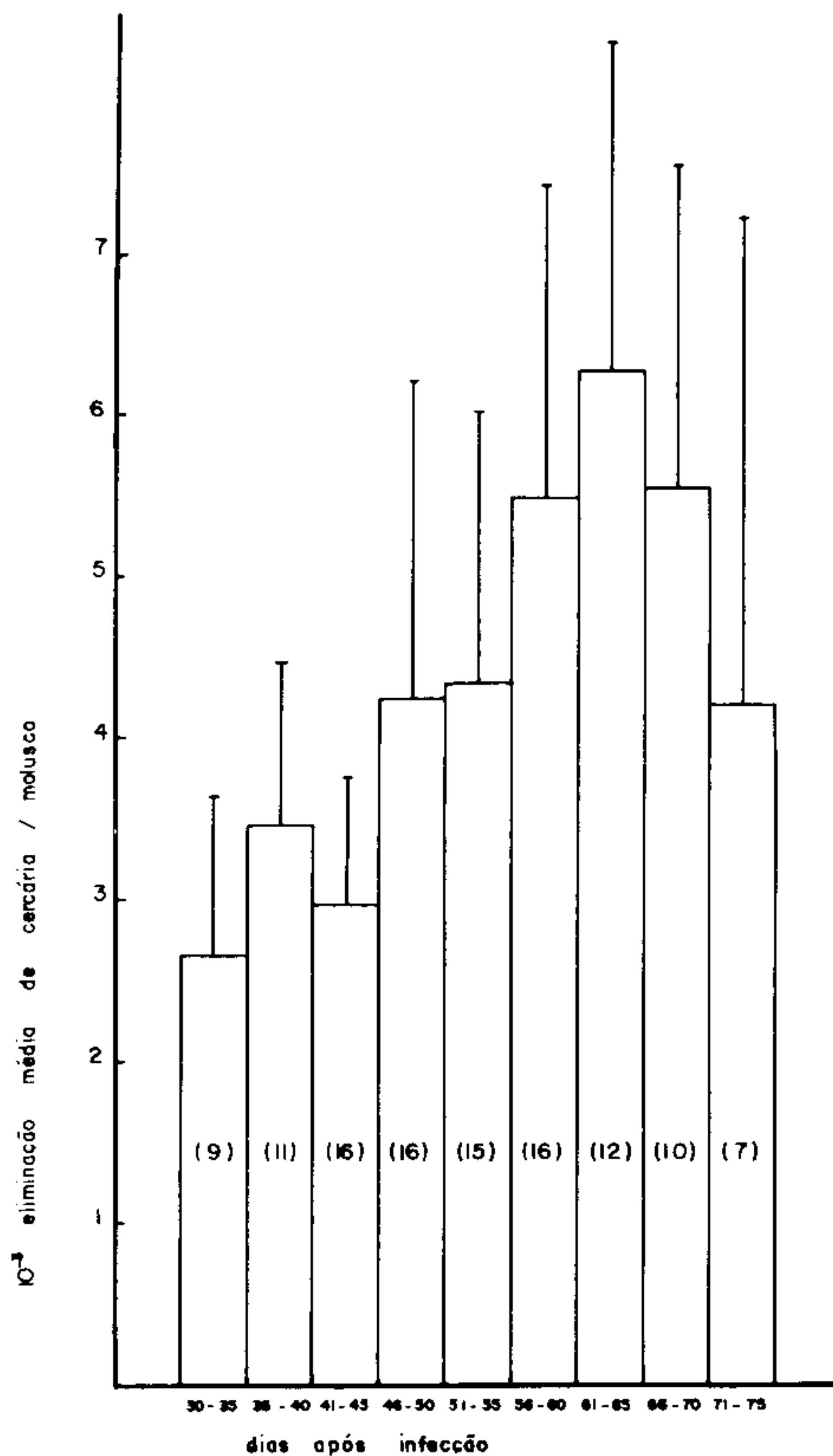


Fig. 2: distribuição média de cercárias por molusco no período patente. Grupos de 100 a 250 caramujos foram distribuídos por idade de infecção (abscissa) e expostos à luz para eliminação de cercárias duas vezes por semana. Entre parênteses, o número de experiências que contribuíram para a média.

TABELA III

Relação entre número de cercárias, seu peso seco e conteúdo em proteínas

Amostras	Nº cercárias	Peso seco (g)	Proteína total (g)	Peso (g) 1.000 cercárias	Proteína (g) 1.000 cercárias
1	231.000	11.000	5.730	47.6	24.8
2	200.000	11.500	7.060	57.5	35.3
3	206.000	11.300	(.)	54.9	(.)
4	328.000	14.400	8.150	43.9	24.9
Média ± DP	241.250 ± 59.370	12.050 ± 1.580	6.980 ± 1.212	50.9 ± 6.3	28.3 ± 6.0

(.) Perdido acidentalmente.
DP = Desvio padrão.

Grande parte das cercárias produzidas foi utilizada para preparação *in vitro* de esquistossômulos. Conforme mostra a Tabela IV, obteve-se um rendimento médio de esquistossômulos da ordem de 55% com uma contaminação por caudas inferior a 7%.

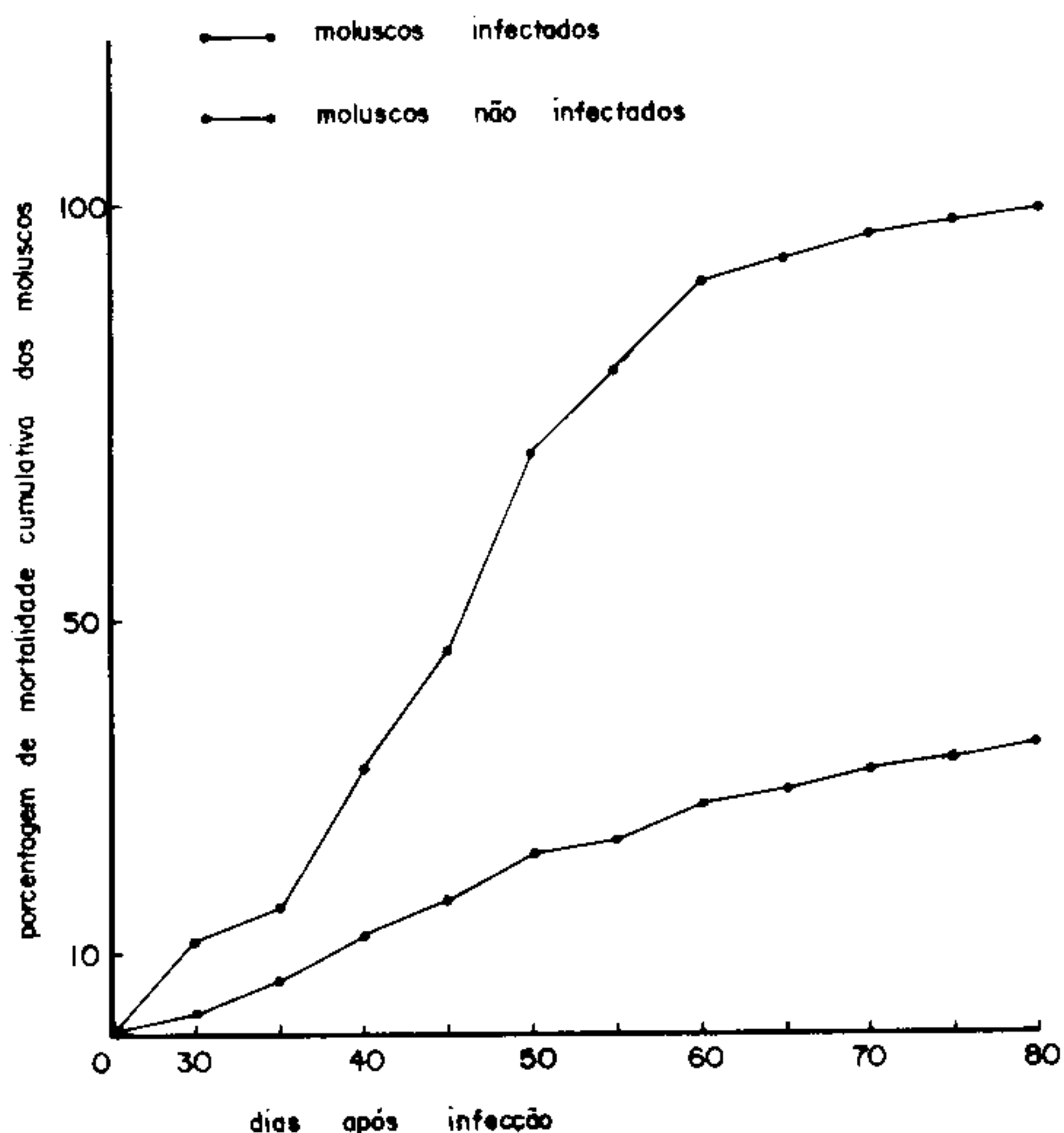


Fig. 3: mortalidade de moluscos (*B. glabrata*), infectados e não infectados mantidos em temperatura média de 24,7°C e expostos à luz duas vezes por semana. Número de moluscos no início da experiência: 600 infectados e 200 não infectados.

TABELA IV

Obtenção mensal *in vitro* de esquistossômulos, a partir de cercárias da cepa "LE"

Mês/Ano	Nº de cercárias	Nº de esquistossômulos	% de rendimento	% de contaminação por caudas
Agosto/82	5.614.000	3.380.920	60,2	10,4
Setembro/82	4.200.200	2.403.400	57,2	4,3
Outubro/82	3.307.400	2.248.400	67,9	4,1
Novembro/82	2.211.775	1.345.200	60,8	9,5
Dezembro/82	2.569.500	997.600	38,8	6,9
Janeiro/83	2.641.361	858.900	32,5	5,3
Fevereiro/83	3.751.714	1.778.400	48,4	3,4
Março/83	3.999.118	1.777.600	44,4	5,8
Abril/83	4.995.852	3.387.200	68,6	4,1
Setembro/83	4.003.450	2.026.600	48,6	—
Outubro/83	7.098.340	4.259.600	52,7	8,8
Novembro/83	4.263.615	2.736.000	64,1	10,9
Dezembro/83	4.201.275	2.566.000	60,3	8,7
Médias	4.063.892	2.288.986	54,2	6,85

DISCUSSÃO

No presente trabalho procurou-se descrever analiticamente o sistema utilizado para produção de cercárias em massa, a fim de, detectadas deficiências, introduzir correções visando a um aumento da eficiência na produção. A quantificação mensal mostrou uma produção média da ordem de 3.400 cercárias/molusco por exposição com picos de elevação de até 4.500 cercárias e uma fase de decréscimo registrada no verão de 1982 e que se repetiu em 1983, quando a produção caiu para cerca de 2.000 cercárias/molusco por exposição. O número médio por nós obtido já é bastante satisfatório, quando comparado com o resultado de outros autores (Stirewalt, 1981).

Embora haja uma coincidência entre as fases de diminuição na produção e picos de elevação de temperatura, não constatamos maior eliminação nos aquários nos intervalos das exposições (Fig. 1). Dois outros fatores que poderiam influenciar negativamente a produção estão sendo investigados. O primeiro diz

respeito ao aumento da taxa de microrganismos nos aquários. Stirewalt & Lewis (1981) relataram um decréscimo de cinco vezes na eliminação de cercárias por moluscos de aquários contaminados com rotíferos. Em novembro e dezembro de 1983 constatamos a presença destes microrganismos em nossos aquários; contudo, ainda não possuímos dados que nos permitam responsabilizá-los pelo decréscimo de produção em nosso sistema. O segundo seria a presença de metais pesados na água em níveis tóxicos, uma vez que a diminuição da produção coincidiu com um aumento na taxa de mortalidade dos moluscos. Pela Fig. 2, pode-se observar que os moluscos mais produtivos são os que alcançaram os 56-70 dias após a infecção (Barbosa, 1975) e estes constituem no máximo 10% do total infectado inicialmente, uma vez que a maioria morre antes deste período (Fig. 3). Assim, uma alteração na taxa de mortalidade poderia influenciar definitivamente na produção por caramujo. É possível estimar-se, baseado em nossos dados, que uma diminuição de 10% no índice de mortalidade possibilitaria uma recuperação adicional de mais de 1 milhão de cercárias/mês.

A fim de facilitar a comparação de resultados, procuramos estabelecer a relação entre número de cercárias-peso seco-dosagem de proteínas. O elevado valor de proteínas encontrado com relação ao peso seco pode ser explicado por se tratar de dosagem efetuada em extrato não dialisado e é sabido que várias substâncias de baixo peso molecular, comum em material biológico, produzem cor com o reagente de fenol elevando o teor de proteína.

A transformação da cercária em esquistossômulo *in vitro* (Ramalho-Pinto et al., 1974; Colley & Wikel, 1974) proporcionou a utilização de grande quantidade do parasita transformado, isento de contaminantes do hospedeiro. Os nossos dados, obtidos no curso de um ano, mostram que é possível obter grande quantidade de esquistossômulos, com um rendimento superior a 50% e uma contaminação por caudas inferior a 10%, quando um elevado número de cercárias é utilizado na transformação *in vitro*.

Acredita-se que conhecidas algumas das variáveis críticas do sistema, será possível no futuro, através de experiências bem controladas, introduzir alterações que aumentem sua eficácia.

SUMMARY

A routine to maintain infected snails *Biomphalaria glabrata* able to produce 1-2 million cercariae per week and a mean shedding of about 3,500 cercariae per snail was quantitatively described. To a monthly production of about 5.3 and 6.5 million cercariae during the years of 1982 and 1983 it was necessary to expose an average of 1,557 and 1,957 snails, respectively. The efficiency described was maintained by infecting 2,000 snails per month (infectivity index of about 60%). A maximal production of 6,000 cercariae/snail was obtained in the period between 56-70 days after the snail infection by miracidia. By this period, however, 90% of the infected snails were dead. In the summer of 1982-1983 it was observed an impairment on the daily cercarial harvests which was related to ambient temperature increase, and the presence of rotifers in the aquaria water. When the cercariae were transformed into schistosomula *in vitro*, a yield of 55% schistosomula was obtained, with 7% of tail contamination. Lyophilization of cercariae produced 50.9 ± 63 g dry weight per 1,000 cercariae.

AGRADECIMENTOS

A Srta. Sueleny Silva Ferreira pela eficiência nos serviços técnicos e a Srta. Maureen Rodarte pelos serviços datilográficos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, F.S., 1975. Survival and cercaria production of Brazilian *Biomphalaria glabrata* and *B. straminea* infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 61 :151-152.
- COLLEY, D.G. & WIKEL, S.K., 1974. *Schistosoma mansoni*: simplified method for the production of schistosomules. *Exp. Parasitol.*, 35 :44-51.
- HOWELLS, R.E.; GERKEN, S.E.; RAMALHO-PINTO, F.J.; KAWAZOE, U.; GAZZINELLI, G. & PELLEGRINO, J., 1975. *Schistosoma mansoni*: tail loss in relation to permeability changes during cercaria schistosomulum transformation. *Parasitol.*, 71 :9-18.
- LOWRY, O.H.; ROSENBOUGH, W.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 :265-275.
- PELLEGRINO, J. & KATZ, N., 1968. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. In: "Advances in Parasitology" B. Dawes (Ed.) Academic Press, London and New York, 233-290.
- PIJKEREN, T.A.; TAVARES, C.A.P. & GAZZINELLI, G., 1982. *Schistosoma mansoni*: ability of Con A to protect *in vitro* mechanically transformed schistosomula against the lethal effect of immune serum plus complement. *Parasitol.*, 84 :239-252.
- RAMALHO-PINTO, F.J.; GAZZINELLI, G.; HOWELLS, R.E.; MOTA-SANTOS, T.A.; FIGUEIREDO, E.A. & PELLEGRINO, J., 1974. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 36 :360-372.

- SANDT, D.G.; BRUCE, J.I. & RADKE, M.G., 1965. A system for mass producing the snail *Australorbis glabratus* and cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.*, 51 :1012-1013.
- SOUZA, C.P.; DIAS, E.P.; AZEVEDO, M.L.L. & PAULINI, E., 1979. Observações sobre alguns fatores que influem na manutenção do *Schistosoma mansoni* em laboratório. *Rev. Brasil. Pesq. Med. Biol.*, 12 :411-419.
- STANDEN, O.D., 1952. Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *Schistosoma mansoni*. Individual and mass infection of snails, and the relationship of infection to temperature and season. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 46 :48-53.
- STIREWALT, M., 1954. Effect of snail maintenance temperature on development of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.*, 3 :504-516.
- STIREWALT, M., 1981. *Schistosoma mansoni*: conditions contributing to maximal cercarial harvests. *J. Parasitol.*, 67 :582-583.
- STIREWALT, M. & LEWIS, F.A., 1981. *Schistosoma mansoni*: effect of rotifers on cercarial output, motility and infectivity. *Int. J. Parasitol.*, 11 :301-303.