

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Centro de Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estudo do desenvolvimento *in vitro* de *Mesocestoides corti*
(Platyhelminthes:Cestoda)

- 1. Análise do efeito de drogas anti-helmínticas**
- 2. Estabelecimento de linhagens celulares**

Melissa Medeiros Markoski

Orientação: Prof. Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

**Tese submetida ao
Programa de Pós-
Graduação em Biologia
Celular e Molecular como
um dos requisitos para a
obtenção do título de
doutor.**

Porto Alegre, 8 de junho de 2006.

Este trabalho foi realizado em sua maior parte no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Uma parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, sob financiamento do CNPq, Red de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Parasitarias del Cono Sur de America Latina (RTPD Network SIDA/SAREK) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob orientação da Dra. Helena Nader. Outra parte do trabalho foi realizada no Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile, sob financiamento do CNPq e RTPD Network e orientação do Prof. Norbel Galanti

**Aos melhores modelos:
meus pais....**

AGRADECIMENTOS

Ao Henrique, meu orientador, pela dedicação, amizade e por ter proporcionado os diversos estágios em outros laboratórios, fundamentais para o desenvolvimento da tese e para minha formação.

Ao Arnaldo, pelo acompanhamento do trabalho através de constantes contribuições e discussões. E também pelo carinho e por ter-me “adotado” no seu grupo.

Ao Prof. Norbel Galanti, por sua constante colaboração no trabalho e contribuição para minha formação. Também agradeço muitíssimo por ter me recebido em seu laboratório, pelo carinho e amizade.

A Dra. Helena Nader, que através de seu amor pela pesquisa recebeu-me em seu laboratório e proporcionou o desenvolvimento de grande parte do trabalho, sempre com muita motivação e dedicação.

Às Dras. Aoi Masuda e Vera Gayeski, membros da minha comissão de acompanhamento, por terem dado idéias pertinentes, apoiado e colaborado com o trabalho. Também agradeço pela amizade e dedicação.

Aos Profs. Célia Carlini, Carlos Termignoni, Giancarlo Pasquali e ao amigo Dr. Gustavo Chemale, pela colaboração com o trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos: Karina, Veridiana, Newton, Adriane, Patrícia, Larissa, Alessandra, Gustavo, Tanise e Cristiano por toda a amizade, carinho e colaboração. Também agradeço aos amigos e colegas do Laboratório de Expressão de Proteínas e Antígenos, em especial ao Paulo, Marcos, Desirée, Eliana e Taise. Aos demais amigos e colegas de outros laboratórios do Centro de Biotecnologia da UFRGS, em especial ao Hugo, Antônio, Adriana, Ana Beatriz, Irina, Josiane, Lenise, Charley, Alexandre, Daniela, pela colaboração e amizade.

Aos amigos do Laboratorio de Biologia Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, em especial ao Gonzalo, Rodolfo, Verônica, Carolina e Javier pelo carinho e colaboração durante meu estágio no Chile.

Aos amigos Edvaldo, Isabel, Elza, Aline, Marie, Carol, pela dedicação e contribuição durante os estágios realizados na Escola Paulista de Medicina.

À Profa. Marilene Vainstein, Prof. Augusto Schrank e Dra. Walquíria Arruda, pela contribuição nos trabalhos de microscopia.

À Profa. Nívea Lothhammer (UFRGS) e Dr. Manuel Simões, pela contribuição nos trabalhos de cito e histoquímica.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, em especial à Profa. Maria Cristina Heuser e às técnicas Moema e Cristiane, pela contribuição nos trabalhos de microscopia.

Aos laboratórios de Imunogenética e Drosophila, do Dep de Genética da UFRGS, em especial à Profa. Nanci Nardi e Dr. Andréas Canedo, e Marisa Santos-Collares, pela contribuição no trabalho.

À minha família e amigos por todo o apoio, amor e carinho durante a realização do trabalho.

E, por fim, e mais do que especial, à Alice, minha "filhota" de iniciação científica, por toda a ajuda no trabalho. É um grande orgulho para mim que eu tenha podido contribuir um pouquinho para sua formação científica. E agradeço muitíssimo por tudo que ela, por sua vez, retornou em contribuição: interesse, dedicação, carinho, e principalmente amizade.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO	12
O Filo Platyhelminthes.....	12
Platelmintos de importância veterinária, médica e econômica	14
O modelo <i>Mesocestoides corti</i>	16
Cultivo in vitro de <i>Mesocestoides corti</i>.....	24
Sistemas de cultivo celular para platelmintos.....	28
Drogas anti-helmínticas e ação sobre platelmintos	31
OBJETIVOS.....	33
CAPÍTULO I. EFEITO DA AÇÃO DE ANTI-HELMÍNTICOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>MESOCESTOIDES CORTI</i>....	34
CAPÍTULO II. ESTABELECIMENTO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS DE <i>MESOCESTOIDES CORTI</i>	47
DISCUSSÃO	89
PERSPECTIVAS.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

ABREVIATURAS

A	ampliação
ABZ	albendazol (<i>albendazole</i>)
ATP	adenosina tri-fosfato
BAEE	benzoiil-arginina-etil-éster
°C	grau (s) Celsius
Ca ²⁺	cálcio, íon
CO ₂	dióxido de carbono
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro (s)
DMEM	<i>Dulbeccos' Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
GAG(s)	glicosaminoglicana(s)
h	hora (s)
kb	quilobase
kDa	quiloDalton (s)
l	litro (s)
M	molar
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MET	microscopia eletrônica de transmissão
µg	micrograma (s)
µl	microlitro (s)
µM	micromolar
µm	micrômetro (s)
min	minuto (s)
ml	mililitro (s)
mm	milímetro (s)
N	normal
N ₂	nitrogênio molecular
ng	nanograma (s)
nM	nanomolar
nm	nanômetro (s)
nt	nucleotídeo (s)
pb	par (es) de base (s)
PBS	tampão salina-fosfato
PCR	reação de polimerização em cadeia (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potencial de hidrogênio
PZQ	praziquantel
rDNA 18S	gene de RNA ribossômico de 18S
RNA	ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	segundo (s)
SFB	soro fetal bovino
<i>sp</i>	espécie
<i>spp</i>	espécies
UV	radiação ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Filogenia de *M. corti*. p. 13

Figura 2. Ciclo vital de *M. corti*. p. 18

Figura 3. O estágio adulto de *M. corti*. p. 22

Figura 4. Representação esquemática do tegumento dos cestódeos. P.25

Figura 5. Diferentes fases do desenvolvimento geradas durante o cultivo *in vitro* de *M. corti*. p. 27

RESUMO

Mesocestoides corti é um platelminto endoparasita pertencente à classe Cestoda. Devido a sua capacidade de reprodução assexuada *in vivo*, em hospedeiros experimentais, e *in vitro*, em condições apropriadas de cultura, é considerado um bom modelo para diversos estudos sobre a biologia de cestódeos. O desenvolvimento da fase larval na forma adulta de *M. corti* foi previamente padronizado *in vitro* pelo nosso grupo. Assim, este trabalho tem como objetivos principais o estudo, em nível morfológico, das modificações teciduais, que ocorrem durante o desenvolvimento de tetratirídeo a adulto *in vitro*, e a análise do efeito da exposição destes tecidos e fases a drogas anti-helmínticas de amplo espectro. Visando, futuramente, estudar o efeito de drogas anti-helmínticas sobre morfologia e mecanismos celulares, o trabalho também aborda o estabelecimento de culturas celulares primárias a partir de diferentes fases do desenvolvimento *in vitro* de *M. corti*.

Foi verificado por microscopia confocal que, durante o processo de estrobilização (desenvolvimento da larva na fase adulta) *in vitro*, houve grande rearranjo da arquitetura corporal principalmente no tegumento, sistema muscular e formação dos órgãos sexuais. Estes tecidos são severamente atingidos pela ação de praziquantel e albendazol. Foi observado que vermes estrobilados foram os mais afetados por ação das drogas.

Culturas celulares foram estabelecidas a partir da fase adulta e larval do parasito, cujas células dispõem-se em diferentes subpopulações com tamanhos variando de 2 a 7 μ m, proliferativas e metabolicamente ativas sintetizando matriz extracelular. Parte da matriz extracelular sintetizada foi caracterizada onde foi constatada a presença de carboidratos neutros e carregados, GAGs e proteínas.

Este trabalho contribuiu para um melhor entendimento da dinâmica das alterações morfológicas de *M. corti*, modelo para platelmintos parasitos, e abre a possibilidade de estudos mais detalhados da

arquitetura corporal frente à exposição a drogas anti-helmínticas e estudos focalizados, do efeito destas drogas em nível celular, através do estabelecimento das culturas celulares.

ABSTRACT

Mesocostoides corti is an endoparasitic flatworm belonging to the Cestoda class. Due to the in vivo asexual reproduction capability, in experimental hosts, and in vitro, in appropriated culture conditions, *M. corti* is considered a good model to many studies of the cestode biology. The *M. corti* in vitro development of larva in adult worm was standardized by our group. Thus, this work has as main objectives the morphologic study of the tissue changes that occur during the tetrathyridium to adult in vitro development and the exposition of these tissues and life phases to broad-spectrum antihelminthic drugs. With the future aim of study antihelminthic drug effect on cell morphology and physiology, the work also shows the establishment of primary cultures of cells from different in vitro developmental stages of *M. corti*.

Using laser-scanning confocal microscopy, we demonstrated that there were body architecture rearrangements during the in vitro development occurring strongly in tegument, muscle system and sexual organs. These tissues are severely damaged by antihelminthic drugs as praziquantel and albendazole. During development, the adult stage is the most damaged by the drug action.

Cell cultures were established from the parasite adult and larval phases, which were distributed in different subpopulations having diameters varying between 2 and 7 μ m. Cultured cells are proliferative and metabolic actives, with synthesis of extracellular matrix. The extracellular matrix composition was preliminarily determined and it was shown that neutral and charged carbohydrates, GAGs and proteins were present.

Thus, this work contributed to a better comprehension about the morphological rearrangement dynamics of *M. corti*, a flatworm model, and makes possible a more detailed study of the body architecture on antihelminthic drug exposition. As well as, this work will allow focused studies of the drug effect at cellular level favoured by cell culture establishment from a parasite.

INTRODUÇÃO

O Filo Platyhelminthes

Platelmintos são organismos bilatérios, protostômicos, triploblásticos, achatados dorso-ventralmente e os primeiros animais na escala evolutiva a apresentarem segmentação corporal. Entretanto, dados moleculares recentes apontam para algumas modificações no filo Platyhelminthes (Baguna & Riutort, 2004). Estas modificações implicam, entre outras, na caracterização deste grupo como polifilético e na transferência de Acoelomorpha, constituindo um novo filo, o mais basal entre os animais bilatérios.

De acordo com dados moleculares e morfológicos, os animais bilatérios estariam divididos em três grandes clados: Deuterostomia, Lophotrochozoa e Ecdysozoa (Halanych, 2004). O grupo Lophotrochozoa foi caracterizado por seus filos mais representativos possuírem um lofóforo, um aparato para alimentação (filos Brachipoda, Bryzoa e Phoronida); ou larvas trocóforas (anelídeos e moluscos). Entretanto, o grupo também engloba outros filos, como Platyhelminthes, Sipunculata, Nemertinea, constituindo novos grupos taxonômicos como Platyzoa e Neodermata (Zrzavy, 2001). Os dados moleculares, baseados em seqüências de rDNA 18S, que caracterizam platelmintos como pertencentes ao grupo Lophotrochozoa divide o filo em outros dois táxons: Catenulida e Rhabditophora (Telford *et al.*, 2003). Dados de genômica mitocondrial também apontam para a exclusão de Acoelomorpha e da polifilia do filo Platyhelminthes (Ruiz-Trillo *et al.*, 2004). Estes dados recentes, sugerindo a polifilia, apontam que Catenulida e Rhabditophora, que englobam a maioria das classes dos platelmintos, estariam mais relacionados a animais celomados, como os moluscos (Telford *et al.*, 2003). O filo Plathelminthes é formado por quatro classes: Turbellaria, Monogenea, Trematoda e Cestoda (Figura 1). Destas, somente a primeira é constituída por animais de vida livre, como as planárias. As outras

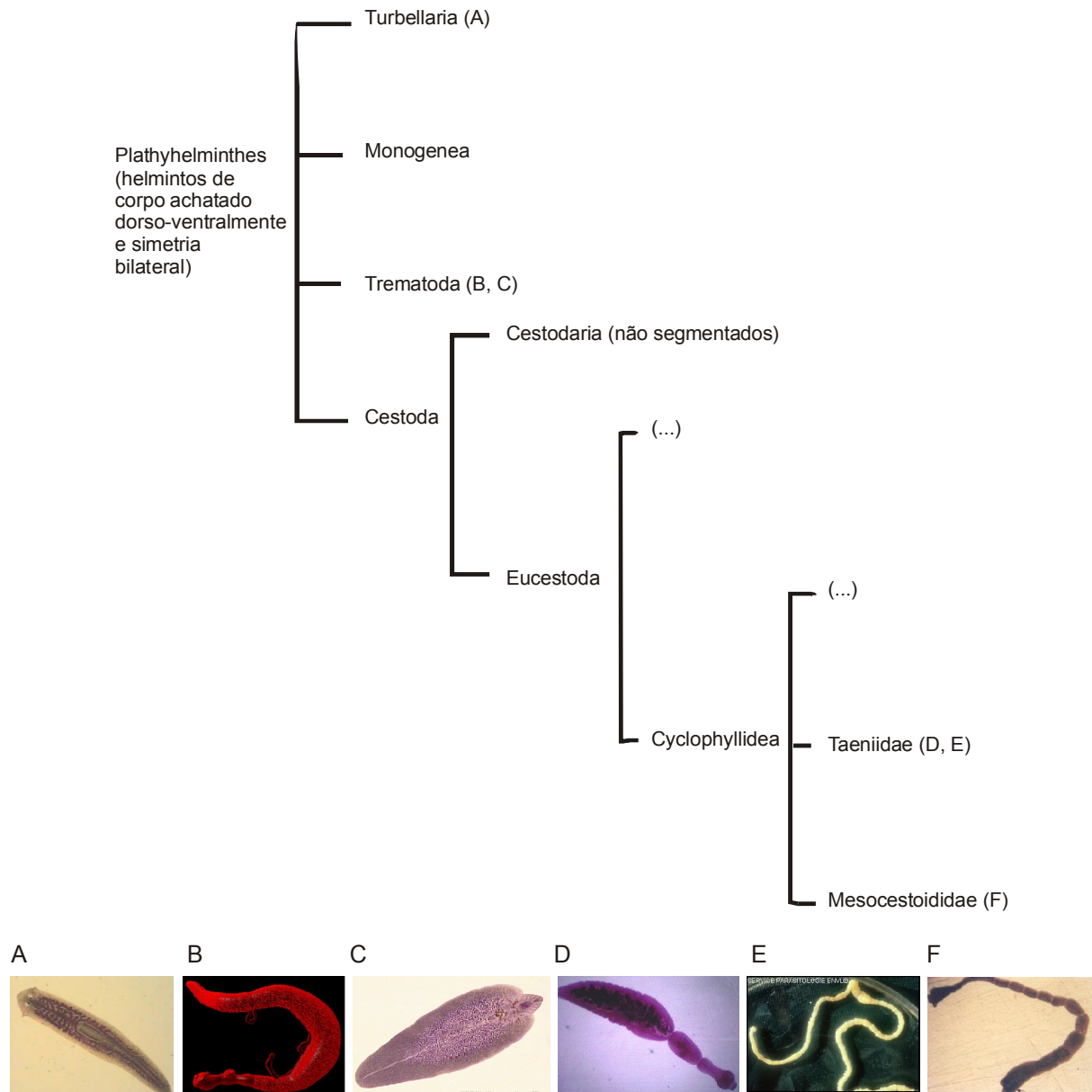


Figura 1. Filogenia de *Mesocestoides corti*. Representação esquemática da classificação evolutiva do filo Platyhelminthes. O filo possui 4 classes: Turbellaria, representada por vermes de vida livre como a planária (A); Monogenea; Trematoda, representada por vermes ecto e endoparasitas, como *Schistosoma mansoni* (B) e *Fasciola hepatica* (C); e Cestoda, que agrupa vermes de importância médica e veterinária como *Echinococcus granulosus* (D) e *Taenia* spp (E). À classe Cestoda pertence a família Mesocestoididae, que engloba parasitos do gênero *Mesocestoides*, como *Mesocestoides corti* (F).

incluem exclusivamente vermes ecto ou endoparasitas, tornando o filo o mais representativo em número de animais parasitas. As relações de parasitismo entre os animais deste filo estão entre as mais estudadas. O parasito é metabolicamente dependente do hospedeiro, o que pode causar a geração de toxinas, danos a tecidos e consumo de nutrientes, resultando em doenças severas e morte (Khurana *et al.*, 2005). Por outro lado, a sobrevivência dos hospedeiros é vital para a transmissão e propagação das espécies de vermes parasitas. Assim, tendo-se como base as relações parasito-hospedeiro, muitos estudos vem sendo feitos na busca de controlar doenças, desenvolver vacinas e drogas anti-helmínticas, conhecer a morfologia e funcionalidade do organismo parasita, determinar seqüências gênicas e suas respectivas funções, esclarecer processos evolutivos e filogenéticos.

Platelmintos de importância veterinária, médica e econômica

Cestoda e Trematoda são classes de platelmintos ecto e endoparasitos que infectam, em geral, diferentes animais vertebrados. Para completar seus ciclos de vida, estes vermes infectam hospedeiros intermediários e definitivos em sucessão, através da ingestão oral de ovos ou larvas, respectivamente. Um grande número de doenças em seres humanos ou outros hospedeiros mamíferos é causado pela infecção com formas larvais destes organismos. Entre os platelmintos, *Echinococcus* spp, *Taenia* spp, *Fasciola* spp e *Schistosoma* spp têm sido bastante investigados em laboratório (por exemplo, McManus *et al.*, 2004; Jeon *et al.*, 2005). Estes vermes causam infecções e infestações que representam problemas de alto nível econômico humano e veterinário (Craig & Craig, 2005; Hartgers *et al.*, 2006).

Os trematódeos dos gêneros *Schistosoma* e *Fasciola* são vermes de estrutura corporal e fisiologia semelhantes às dos turbelários. A presença de órgãos adesivos, orais e ventrais, proporciona a fixação aos hospedeiros. Estes vermes estão entre os que causam as helmintíases

mais severas em seres humanos. A esquistossomose, causada por espécies de *Schistosoma*, causa mais de 200 mil mortes por ano (http://www.who.int/wormcontrol/documents/fact_sheets/schistosomiasis/en/). A fasciolose é uma doença caracterizada pelo alojamento dos parasitos (por exemplo, *Fasciola hepatica*) nos canais biliares e fígado (Gulsen *et al.*, 2006). Por estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS, <http://www.who.int/zoonoses/diseases/trematodosis/en/>), há mais de 2 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo.

Cestódeos são platelmintos endoparasitas que não possuem um trato digestivo, alimentando-se graças à alta capacidade de absorção de nutrientes proporcionada pelo sincício que constitui seu tegumento. A forma e tamanho alongados dos adultos não permitem que vivam em habitats não-tubulares. Desta forma, cestódeos adultos ocorrem apenas em habitats como o tubo digestivo e os ductos pancreáticos e biliares. Além disso, esses habitats apresentam níveis nutricionais elevados, fato associado à alta taxa de crescimento destes parasitos. A cisticercose e a hidatidose, causadas, respectivamente, por espécies dos gêneros *Taenia* e *Echinococcus*, são doenças que causam grandes perdas na produtividade pecuária, atingindo também, populações humanas e causando doenças de alto impacto em áreas endêmicas (Carabin *et al.*, 2005). Na hidatidose cística, causada por *Echinococcus granulosus*, mamíferos ungulados domésticos são os hospedeiros intermediários mais representativos (Vuitton *et al.*, 2003). Seres humanos são hospedeiros acidentais e se contaminam através do contato com hospedeiros definitivos, como o cão doméstico. A manutenção dos ciclos de vida ocorre, em geral, por influência humana.

Entretanto, existem espécies de cestódeos, relativamente raras em infectarem seres humanos, que têm sido bastante estudadas porque alguns de seus estágios dos ciclos de vida podem ser cultivados *in vitro* e também podem ser convenientemente mantidos em hospedeiros experimentais *in vivo*. Estes parasitos, experimentalmente acessíveis, surgem como importantes modelos para investigação de vários aspectos

da biologia dos cestódeos. Este é o caso do platelminto parasito *Mesocestoides corti*.

O modelo *Mesocestoides corti*

Através da descoberta de larvas (tetratirídeos) que se reproduzem assexualmente na cavidade peritoneal de hospedeiros vertebrados, a pesquisa com platelmintos parasitas ganhou um novo modelo na década de 50: *Mesocestoides corti* (Hoepli, 1925). Este parasito, alvo de pesquisas principalmente nas áreas farmacológica e imunológica, é capaz de reproduzir-se assexualmente *in vitro* e *in vivo*, em hospedeiros experimentais, e capaz de desenvolver-se na forma adulta, através de estrobilização (segmentação e proglotização) corporal em condições apropriadas no cultivo *in vitro* (Markoski *et al.*, 2003). Estas características, que enfatizam a posição de "modelo", diferenciam a espécie dos demais representantes do gênero.

Ao gênero *Mesocestoides* pertencem endoparasitas que possuem um escólex com quatro ventosas, sem a presença de rostelo ou ganchos. Estes vermes possuem, como característica principal, um verdadeiro órgão pára-uterino (ou cápsula uterina). Este órgão é um saco enrijecido formado pelo parênquima da proglótide, que armazena e protege os delicados ovos (oncosferas) que se desenvolvem no seu interior (Smyth, 1987).

As espécies de *Mesocestoides* encontram-se distribuídas de forma global, sendo mais incidentes no Hemisfério Norte, principalmente na América do Norte e Ásia (Min, 1990; Crosbie *et al.*, 2000). Alguns autores consideram que as espécies encontradas na Europa, Ásia e África são todas variantes de *Mesocestoides lineatus*, uma espécie de interesse veterinário, geralmente encontrada no intestino delgado do cão e do gato domésticos e de carnívoros selvagens, como a raposa e o lobo (Soulsby, 1965). Na América do Norte existem as espécies *Mesocestoides kirbyi*, *Mesocestoides latus* e *Mesocestoides manteri*, encontradas em coiotes,

gambás e linceas, respectivamente. *M. paucitesticulus* e *M. leptothylacus* foram descritas como sendo isoladas no Japão e na Alemanha, respectivamente (Sawada e Kugi, 1973; Loos-Frank, 1987). A espécie *M. variabilis*, isolada por Mueller (1927) é considerada por Voge (1955) como sinônima de *M. corti*. A forma adulta de *M. corti* foi inicialmente descrita a partir de animais encontrados no intestino de camundongos (Hoepli, 1925). A forma larval de metacestóide, denominada tetratrídeo, foi inicialmente isolada do celoma de indivíduos de uma população de lagartos californianos da espécie *Sceloporus occidentalis biseriatus* (Voge, 1955). Animais adultos imaturos foram obtidos de gatos domésticos alimentados com fígados infectados com tetratrídeos isolados de lagarto. Mais tarde, estes vermes foram identificados como *M. corti* com base no tamanho e aparência dos escólices e na morfologia do útero e da cápsula uterina (Specht & Voge, 1965). Entretanto, a partir deste isolado, cultivado em laboratórios, muitos autores atribuíram a este a nomenclatura *Mesocestoides vogae* (Etges, 1991). Segundo Schmidt & Todd (1978), a diferenciação entre as espécies é baseada somente em relações de tamanho e estruturas de vermes adultos, sendo provável que os dados da história de vida e características de desenvolvimento sejam os únicos traços que delimitem as espécies do gênero *Mesocestoides*.

O ciclo vital de *M. corti*, assim como de outras espécies do mesmo gênero, provavelmente inclui três hospedeiros (Figura 2). Entretanto, esta espécie possui um ciclo único entre os demais cestódeos, por ser capaz de reprodução assexuada não somente no hospedeiro intermediário, mas também no hospedeiro definitivo carnívoro (Eckert *et al.* 1969). As oncosferas, com pouco mais de 20µm de diâmetro (Ogreen, 1956; Barret *et al.*, 1982) estão presentes em um número que varia de algumas centenas a quase 2000 no órgão pára-uterino (Loos-Frank, 1991). Através

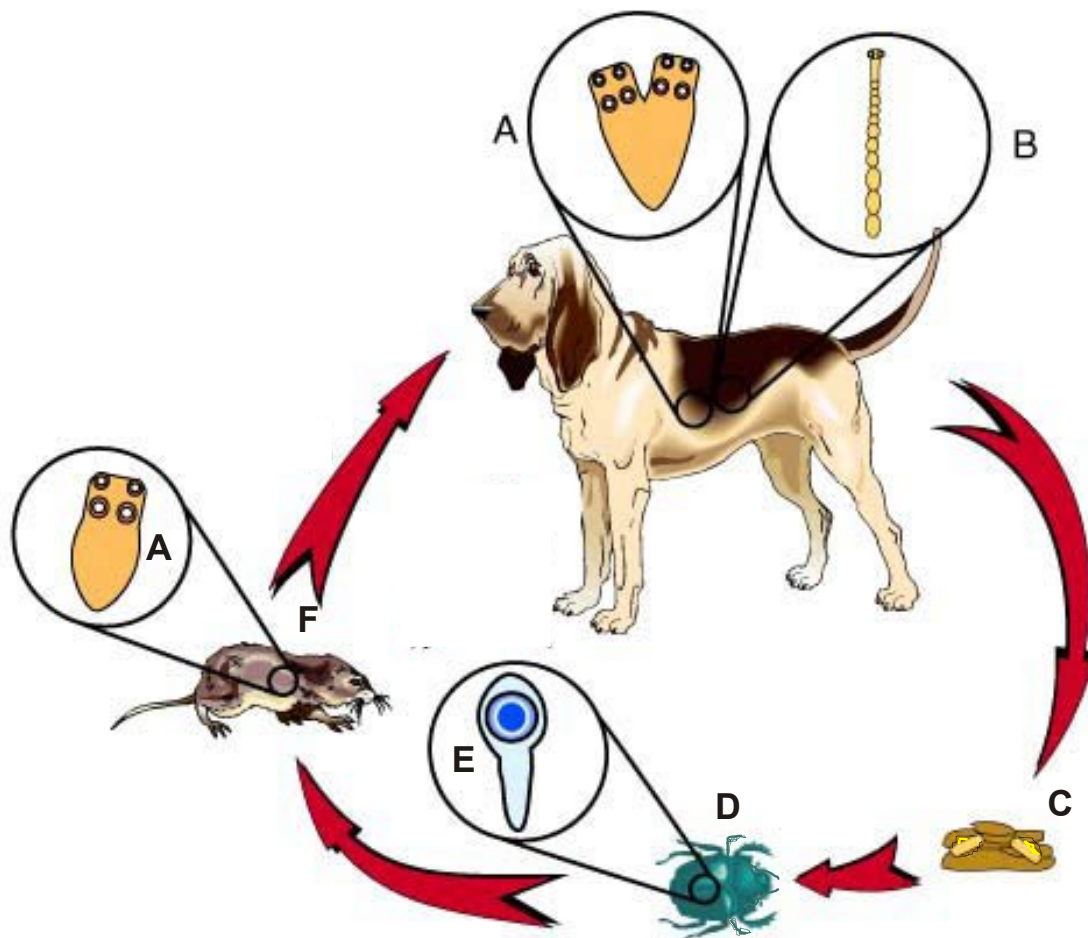


Figura 2. Ciclo vital de *M. corti*. Tetratirídeos (A) sofrem reprodução assexuado e/ou processo de proglotização (ou estrobilização) e desenvolvem-se na forma adulta (B) no intestino e cavidade peritoneal de carnívoros, como o cachorro. Os adultos, após fecundação, sofrem degenração e destacamento das proglótides. A última proglótide, contendo oncosferas, é liberada através das fezes do hospedeiro (C) e, se ingerida por um primeiro hospedeiro intermediário, possivelmente um ácaro (D), desenvolve-se na forma de larva procercóide (E). Uma vez ingerida por um segundo hospedeiro intermediário (mamíferos roedores (F), anfíbios, répteis ou aves), a procercóide diferencia-se no tetratirídeo, que migra até a cavidade peritoneal ou glândula, como o fígado, e é capaz de reprodução assexuado. Quando o hospedeiro definitivo alimenta-se dos pequenos cordados, o ciclo se completa com o tetratirídeo desenvolvendo-se na forma adulta.

do processo de apólise, a proglótide grávida, contendo o órgão pára-uterino cheio de oncosferas, é liberada pelo verme adulto no intestino delgado do hospedeiro definitivo, que a elimina com suas fezes. A continuidade do ciclo seria garantida através da ingestão da proglótide grávida, contendo as oncosferas, pelo primeiro hospedeiro intermediário. Após a eclosão, o embrião hexacanto penetraria na cavidade corpórea deste primeiro hospedeiro intermediário, onde se desenvolveria, presumidamente, numa larva procercóide (ou cisticercóide, Padgett & Boyce, 2005).

A identidade do primeiro hospedeiro intermediário de parasitos do gênero *Mesocestoides* é incerta. Existe registro de apenas uma infecção bem sucedida de ácaros oribatídeos do gênero *Trichoribates* com ovos de *M. lineatus* (Soldatova, 1944). Tentativas posteriores de infecção experimental dos mesmos ácaros e de outros invertebrados com ovos de diferentes espécies do gênero *Mesocestoides* não tiveram sucesso, sendo sugerido que os cisticercóides encontrados por Soldatova (1944) seriam resultado de uma infecção natural (Loos-Frank, 1991). Recentemente foi sugerido que formigas da Ilha São Miguel, Estados Unidos (espécies *Lasius niger* e *Tapinoma sessile*, Formicidae) funcionariam como prováveis primeiro hospedeiros intermediários para *Mesocestoides spp* (Padgett & Boyce, 2005). Entretanto, embora a formiga se infecte com ovos do hospedeiro definitivo, não foi possível o desenvolvimento de tetratirídeos a partir de ratos alimentados com as formigas. Desta forma, a discussão sobre a identidade do primeiro hospedeiro intermediário, bem como, a presença de um ou mais hospedeiros intermediários no ciclo de vida de espécies do gênero *Mesocestoides* ainda persiste.

A larva procercóide, com quatro ventosas, quando ingerida por um segundo hospedeiro intermediário, se transformaria no segundo estágio larval, denominado tetratirídeo. O segundo hospedeiro intermediário é, presumivelmente, representado por espécies de anfíbios, répteis, aves ou mamíferos (Smyth, 1987).

O tetratrídeo tem tamanho e forma mais variáveis do que a procercóide, medindo de 0,5 a 2mm de comprimento. É opaco, irregularmente pregueado e, na região anterior, possui um escólex bem desenvolvido, com quatro ventosas elípticas e musculares. Em infecções naturais, os tetratrídeos são encontrados livres nas cavidades peritoneal e/ou pleural; em massas císticas fixadas aos mesentérios; e em vísceras, principalmente no fígado, onde estão, individualmente ou em grupos de vários indivíduos, envolvidos por tecidos fibrosos do hospedeiro (Specht & Voge, 1965; Todd *et al.*, 1978).

Em camundongos ou ratos infectados experimentalmente, os tetratrídeos multiplicam-se assexualmente, por fissiparidade ântero-posterior (Specht & Voge, 1965; Etges & Marinakis, 1991). A fissiparidade envolve o desenvolvimento de ventosas supranumerárias, seguido de fissão do corpo a partir de sua extremidade anterior. A possível multiplicação assexual por brotamento é discutida para esta espécie, ainda não sendo bem esclarecido se os brotos desprendidos seriam capazes de originar tetratrídeos e/ou outra fase do desenvolvimento nos hospedeiros ou no cultivo *in vitro* (Whitfield & Evans, 1983; Markoski *et al.*, 2003). No brotamento, seriam gerados protuberâncias laterais, ou brotos, na região estrobilar posterior ao escólex.

Os tetratrídeos podem também penetrar no fígado, nos pulmões ou em outras vísceras de camundongos infectados experimentalmente, sendo igualmente encapsulados por fibrócitos do hospedeiro, em situação idêntica à observada em infecções naturais (Specht & Voge, 1965; Todd *et al.* 1978). Ratos são menos suscetíveis que camundongos à infecção experimental, enquanto cobaios parecem ser resistentes à mesma (Specht & Voge, 1965).

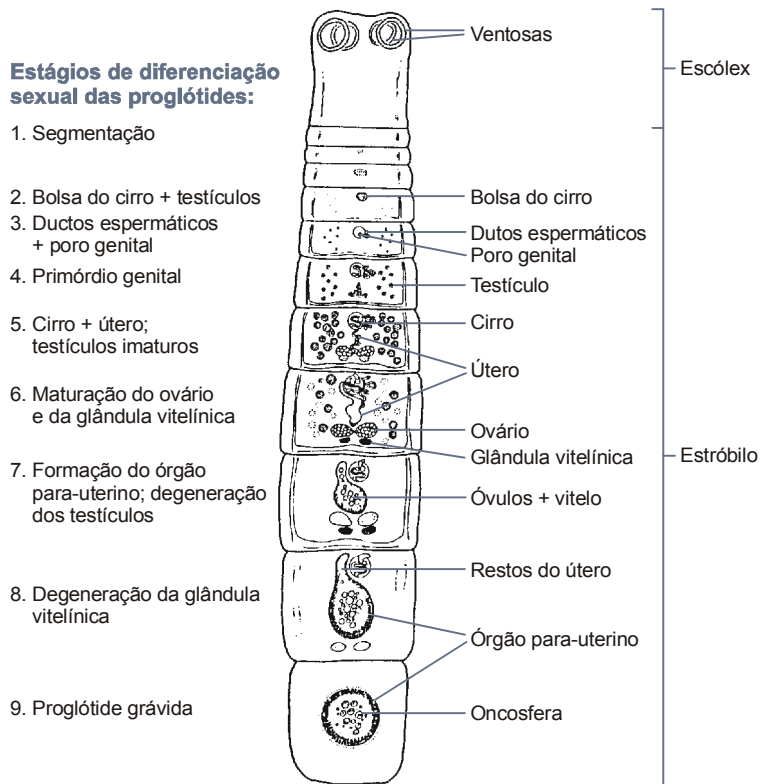
Os tetratrídeos, uma vez ingeridos por camundongos, chegam até o fígado numa trajetória que passa pela parede do intestino delgado e pela cavidade corporal (Specht & Voge, 1965). As larvas são invasivas, principalmente no fígado (Khalil *et al.*, 1997) e penetram ativamente na mucosa intestinal, projetando-se através dela, num processo que

possivelmente envolve proteólise. O processo de penetração na cavidade peritoneal, onde a larva tem acesso direto à víscera, ocorre em um período de 24 h.

Mamíferos carnívoros e aves de rapina foram descritos como hospedeiros definitivos para espécies do gênero *Mesocestoides* (Williams & Conn, 1985). Dentre os mamíferos, cães, gatos, gambás e raposas estão destacados como os hospedeiros definitivos mais recorrentes (Torres, 2001), infectando-se quando se alimentam de animais contendo tetratirídeos. Quando ingerida por um hospedeiro definitivo adequado, a larva pode penetrar na cavidade peritoneal e lá permanecer como tetratirídeo, ou, no intestino delgado, desenvolver-se como verme adulto (Specht & Vogé, 1965). As raposas foram descritas como os principais hospedeiros definitivos para as espécies de *Mesocestoides* na Europa (Torres *et al.*, 1996).

Foi sugerido que a diferenciação do tetratirídeo no verme adulto ocorre de maneira indireta: ao chegar ao intestino delgado do hospedeiro definitivo, a larva primeiro passaria por um ciclo de divisão assexual, para, depois, desenvolver-se no adulto (Smyth, 1987). Entretanto, também é possível que o tetratirídeo possa desenvolver-se diretamente na forma adulta. O processo de desenvolvimento do tetratirídeo para verme adulto envolve crescimento, segmentação e proglotização do estróbilo. Durante a formação das proglótides, ocorre o processo de diferenciação sexual (Figura 3). O desenvolvimento das proglótides e órgãos sexuais ocorre no sentido ântero-posterior. O verme adulto, hermafrodita, é capaz de autofecundação, com a cópula ocorrendo nas proglótides maduras (Barret *et al.*, 1982). Após a fecundação, as genitálias masculina e feminina degeneram e são reabsorvidas, restando, no segmento grávido, o órgão pára-uterino contendo oncosferas (ver Figura 3). Como em todos os membros da ordem Cyclophyllidea, não há abertura uterina, com as proglótides grávidas desprendendo-se do estróbilo à medida que completam o seu amadurecimento.

A



B

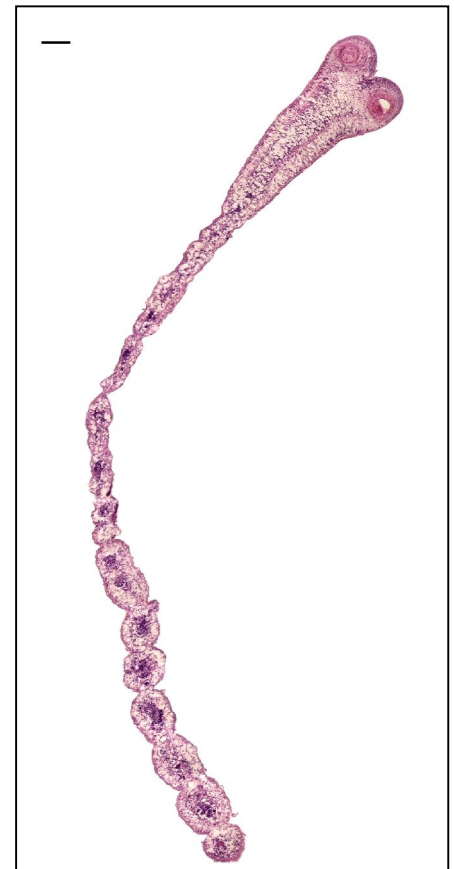


Figura 3. O estágio adulto de *M. corti*. (A) Representação esquemática dos estágios de diferenciação das proglótides e formação dos órgãos sexuais (modificado de Barret *et al.*, 1982). (B) Secção histológica corada com hematoxilina-eosina (barra=100 μ m). Imagem gentilmente cedida por G. Cabrera.

A reprodução assexuada do adulto supostamente ocorre por divis3o longitudinal do esc3lex ou por brotamento lateral do estr3bilo (Smyth, 1987).

Foi demonstrado que diferentes fases do desenvolvimento de *Mesocestoides spp* poderiam infectar e infestar diferentes classes de cordados. Recentemente, as infec33es causadas por esp3cies de *Mesocestoides* ganharam nova relev4ncia cient3fica na 4rea da parasitologia porque tais infec33es e infesta33es estariam caracterizando parasitoses. Entretanto, em 1974, um tipo de bronquite causada por tetratr3rdeos foi descoberta em galinhas (Kaliner, 1974). Na Alemanha, uma pesquisa realizada com base em an4lise fecal de cachorros e gatos entre os anos de 1999 e 2002 revelou que em c4es, onde menos de 2% consistiam de infesta33es causadas por cest3deos, 0,2% de parasitemia fora causada por *Mesocestoides spp* (Barutzki & Schaper, 2003). A parasitose, uma peritonite, foi denominada como cestod3ase peritoneal (Locatelli *et al.*, 1984, in Bonfanti *et al.*, 2004) e seus sintomas incluem febre, anorexia e letargia (Caruso *et al.*, 2003). A ascite produzida durante a cestod3ase pode levar 4 morte dos c4es (Crosbie *et al.*, 1998) e a an4lise molecular, atrav3s de PCR tem sido utilizada no diagn3stico da doen3a (Crosbie *et al.*, 1998, 2000).

Algumas esp3cies do g4nero podem ser infectivas para o homem, como *M. lineatus* e *M. variabilis*, embora tenham sido registrados pouco mais de 20 casos de infec33o por *Mesocestoides spp* em humanos (Rey, 1991; Soulsby, 1965; Garcia & Bruckner, 1997). Infec33es acidentais tamb3m foram registradas em crian3as nos Estados Unidos, 4frica e Jap3o, onde tanto tetratr3rdeos como vermes adultos foram encontrados nos intestinos (Gutierrez *et al.*, 1978). A infec33o ocorre por ingest3o da fase larval, presente na carne de algum animal que serve como hospedeiro intermedi4rio, e os sintomas consistem de diarr3ias acompanhadas de c3licas abdominais, falta de apetite, irritabilidade e anemia (Garcia & Bruckner, 1997).

Sobre a morfologia do parasito, como os demais representantes do gênero, *M. corti* possui o corpo segmentado em proglótides, com um escólex evidente desprovido de ganchos ou rostelo (Figura 3). O estróbilo do adulto mede, em média, 30 mm de comprimento e é segmentado em mais de 25 proglótides. Um espesso tegumento (Figura 4), cobrindo toda a região corporal, é recoberto por microtríquias e corpúsculos calcáreos (Hess, 1980). O tegumento é constituído de um epitélio sincicial dividido em uma zona citoplasmática superficial e uma zona nuclear profunda (Sobhon & Apinhasmit, 1995). A presença de organelas citoplasmáticas, como mitocôndrias, ribossomos e retículo endoplasmático, sugerem que o tegumento desempenha um papel de biossíntese e secreção ativos (Noble *et al.*, 1989).

Logo abaixo do tegumento, um parênquima mesenquimático forma o tecido de sustentação do verme. O parênquima é constituído de miócitos rodeados por uma extensa matriz extracelular, fibras musculares longitudinais internas e circulares externas, corpúsculos calcáreos, células armazenadoras de glicogênio, células germinativas, gânglios e cordões nervosos, sistema excretor contendo células flama e órgãos genitais femininos e masculinos (Hess, 1980; Barriga, 1997; Jones, 1998). Entre as funções, o parênquima destaca-se por proporcionar o suporte esquelético e motilidade, armazenar nutrientes, gerar células regeneradoras, realizar transporte de nutrientes e produtos de excreção, osmorregulação e histogênese (Hart, 1968; Coon, 1993).

Cultivo *in vitro* de *Mesocestoides corti*

Specht & Voge (1965) foram os primeiros a realizar o cultivo *in vitro* de tetratirídeos e analisaram a sua multiplicação assexual tanto *in vitro* como *in vivo*. Após a infestação em hospedeiros experimentais, as larvas foram coletadas e cultivadas *in vitro* por 4 a 5 meses, mantendo a capacidade infectiva e reprodutiva quando reinjetadas em camundongos.

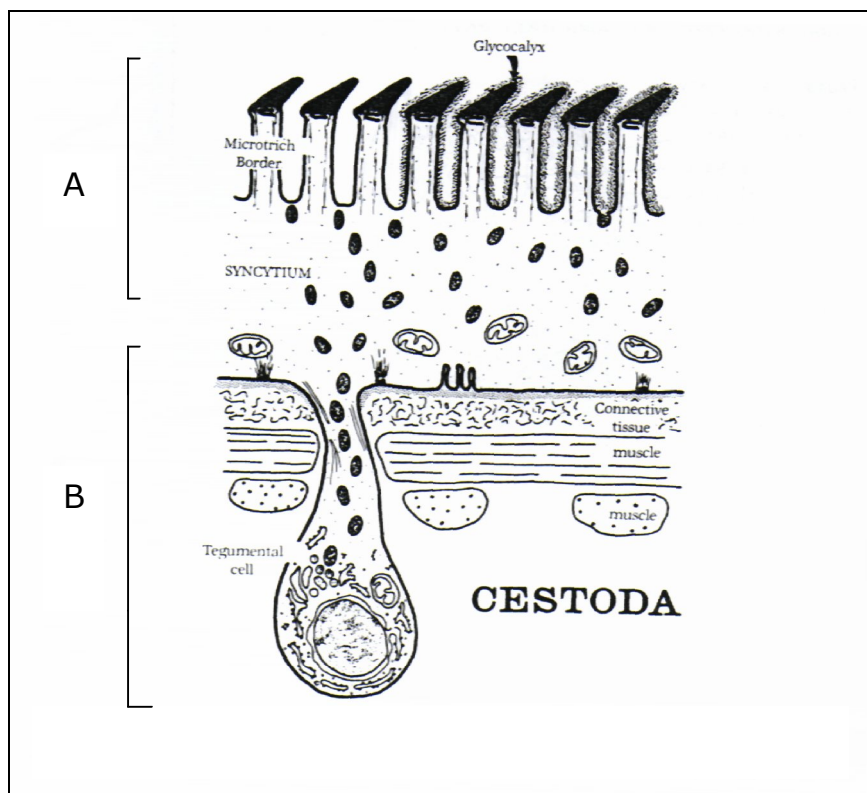


Figura 4. Representação esquemática do tegumento dos cestódeos. (A) A zona superficial contém as microtríquias e o glicocálice, estruturas de função absorptiva. (B) A zona nuclear profunda contém as organelas que nutrem o tecido. Modificado de Noble *et al.* (1989). *Glycocalyx*, glicocálice; *Tegumental cell*, célula do tegumento; *syncythium*, sincício; *microtrich border*, camada de microtríqueas.

Vermes adultos foram obtidos através da ingestão de larvas, presentes em porções de fígado de camundongos infectados.

Na tentativa de estabelecer o ciclo vital completo de *M. corti in vitro*, Ogreen (1956) e Voge & Seidel (1968) estudaram e cultivaram oncosferas de *M. corti*. Através de cultivo em meio TEM, suplementado com ágar-sangue durante 4 meses de incubação *in vitro*, foram obtidos tetratirídeos de *M. corti* com ventosas completas e capazes de reprodução assexual. Embora fosse verificado que o sangue e seus componentes tenham influência sobre oncosferas e tetratirídeos, os autores não obtiveram vermes adultos naquelas condições.

Com as observações de que a larva normalmente amadurece no intestino de carnívoros e é capaz de reprodução assexual tanto *in vivo* como *in vitro*, alguns pesquisadores buscaram, também, a diferenciação sexual *in vitro*. Entretanto, vermes adultos somente eram obtidos esporadicamente após, pelo menos, 15 dias de incubação nas condições descritas (Barret *et al.* 1982; Thompson *et al.* 1982; Chernin *et al.*, 2002). Uma investigação mais crítica de possíveis fatores que promoveriam a diferenciação sexual foi feita por Kawamoto *et al.* (1986) e Ong & Smyth (1986). Um pré-tratamento de 24 h com proteases digestivas, como a tripsina e a quimotripsina, seria necessário à indução da diferenciação sexual e obtenção de oncosferas férteis (Kawamoto *et al.*, 1986). Adicionalmente, a otimização das condições físicas da cultura, como pH, temperatura e condição de anaerobiose relativa, proporcionaram uma taxa de 95% de segmentação de tetratirídeos, iniciando no quinto dia de cultivo (Ong & Smyth, 1986). A utilização simultânea de tratamento com tripsina, condições de atmosfera relativamente anaerobiótica e elevação de temperatura (37 para 39°C) permitiu a obtenção de taxas de segmentação entre 60 e 100% até o 6º dia de cultivo para tetratirídeos provenientes, respectivamente de ratos (Espinoza *et al.*, 2005) e camundongos (Markoski *et al.*, 2003).

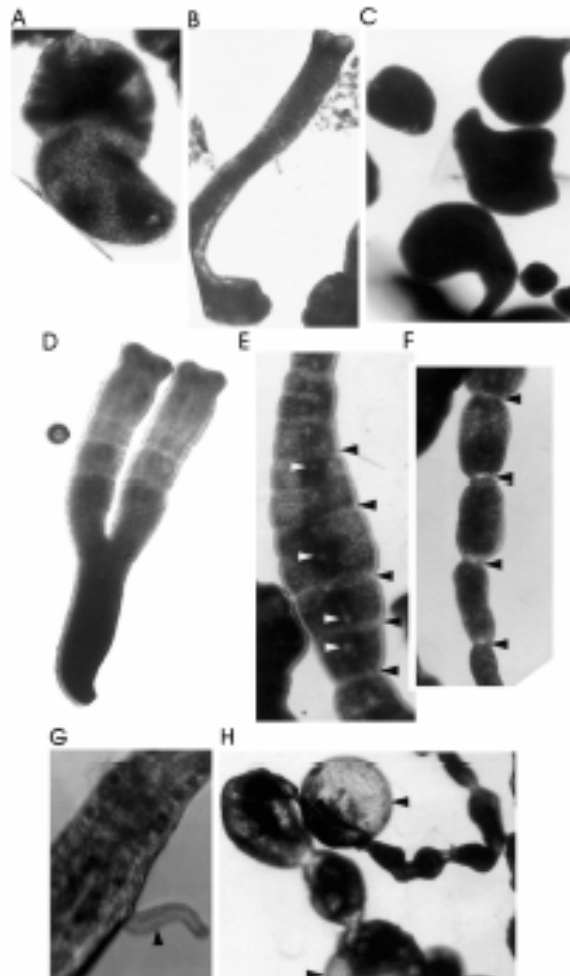


Figura 5. Diferentes fases do desenvolvimento geradas durante o cultivo *in vitro* de *M. corti*. Após indução de diferenciação, através de pré-tratamento com tripsina, elevação de temperatura e atmosfera anaerobiótica, o tetrartirídeo (A) alonga-se, passando à fase de "adulto jovem" (B). Esta forma alongada segmenta-se (E), sendo capaz de reprodução assexual (D), assim como o tetrartirídeo, por divisão antero-posterior do corpo. Uma vez que as proglótides estão sexualmente desenvolvidas (F), os vermes são capazes de fecundação cruzada através de projeção do cirro, a estrutura copulatória masculina (G). Após o 11^o dia, possivelmente depois da fecundação, o estóbilo entra em processo de degeneração (H). Brotos e estruturas acéfalas também são liberados no cultivo *in vitro* (C). A=100x. (Markoski *et al.*, 2003)

A obtenção de diferentes fases do parasito *in vitro* (Figura 5), a segurança da manipulação para o experimentador e a geração de quantidade considerável de material biológico em hospedeiros experimentais fazem de *M. corti* um bom modelo experimental. Assim, o parasito é utilizado como modelo em variados estudos, envolvendo desde morfologia e fisiologia de vermes parasitos até testes de drogas anti-helmínticas e quimioterapia (Hrckova & Valebny, 1997; Terenina *et al.*, 1999; Britos *et al.*, 2000; Kemmerling *et al.*, 2005).

Estudos moleculares também têm sido realizados com a finalidade de identificar genes envolvidos no desenvolvimento ou de melhor caracterizar a posição evolutiva da espécie e do gênero e sua relação com outros filós (Crosbie *et al.*, 2000; Lalanne *et al.*, 2004; Bizarro *et al.*, 2005). Estudos utilizando o modelo *M. corti* também serviram na comparação de estruturas e organizações celulares de platelmintos parasitos, especialmente cetódeos de importância econômica, como espécies dos gêneros *Echinococcus* e *Taenia*. Tais estudos poderiam ser abordados tendo-se como ferramentas linhagens ou culturas celulares bem estabelecidas.

Sistemas de cultivo celular para platelmintos

Platelmintos parasitas são estudados não só do ponto de vista de isolamento e caracterização de genes, como da funcionalidade destes. Neste contexto, linhagens celulares ou culturas primárias bem estabelecidas seriam importantes, não só para a análise da função gênica, como para a busca de alvos e efeito de drogas anti-helmínticas, descoberta e estudo de vias metabólicas e de sinalização celular, produção de antígenos de interesse médico e veterinário, estudo de mecanismos celulares mediadores de citotoxicidade, apoptose, envelhecimento e evolução (Bayne, 1998). Por isso, alguns trabalhos foram descritos relativos ao estabelecimento de linhagens celulares para invertebrados. Estes trabalhos geraram o estabelecimento de muitas linhagens para

espécies de insetos e outros artrópodos (Chen & Wang, 1999; Nasr & Fallon, 2003). Entretanto, platelmintos e outros invertebrados evolutivamente menos complexos, como cnidários e poríferos, ainda carecem de sistemas celulares melhor estabelecidos.

Algumas espécies de platelmintos parasitas, pertencentes aos gêneros *Taenia* e *Echinococcus*, tiveram culturas celulares estabelecidas (Fiori, 1988; Hobbs *et al.*, 1993; Toledo *et al.*, 1997). Entretanto, o estabelecimento e manutenção das linhagens apontaram para alguns problemas experimentais. Um destes problemas está relacionado à obtenção de material biológico. Isto ocorre porque parasitos dos gêneros citados não são mantidos em hospedeiros experimentais, sendo necessária a coleta de espécimes a campo ou em matadouros.

Um segundo problema refere-se ao risco de contaminação das células isoladas dos vermes com células do organismo hospedeiro. Por se tratarem de vermes endoparasitos, o contato com o sistema imune do hospedeiro é íntimo, aumentando a probabilidade do isolamento e cultivo de outras células, por exemplo, tais como macrófagos. Isto ocorreu durante o estabelecimento de uma linhagem isolada de *E. granulosus* que, após experimentos de cariotipagem, mostraram-se ser células bovinas (Howell & Matthaei, 1988).

Em culturas celulares, é necessário que as células sejam viáveis e, preferencialmente que proliferem durante, pelo menos, o período necessário aos experimentos. As linhagens celulares estabelecidas de *E. granulosus* e *E. multilocularis*, descritas por Fiori (1988) e Furuya (1991), respectivamente, não foram capazes de proliferar *in vitro*. Existem também algumas linhagens, obtidas a partir de diferentes fases do desenvolvimento do trematódeo *S. mansoni* (Hobbs *et al.*, 1993; Bayne *et al.*, 1994), que também não foram capazes de proliferação *in vitro*, mesmo na presença de fatores indutores de mitose.

A problemática que envolve o estabelecimento de linhagens para vermes parasitos, causada por diversos fatores, faz com que sejam consideradas e efetuadas algumas otimizações (Bayne, 1998).

Primeiramente, quanto aos métodos de desprendimento celular, os tratamentos enzimáticos, como proteólise, utilizando colagenase e tripsina, bem como, maceração mecânica, devem ser bem padronizados para a efetiva liberação das células dos tecidos sem comprometer a integridade das membranas celulares. Também foi sugerido que o sucesso de estabelecimento de linhagens para helmintos parasitas seria mais garantido se as culturas primárias contivessem fragmentos multicelulares ou tecidos do organismo de origem (Toledo *et al.*, 1997). Estes fragmentos disponibilizariam metabólitos, como proteínas e GAGs, necessários à manutenção das células recentemente desprendidas e para a síntese de matriz extracelular. O controle da temperatura e condições atmosféricas, simulando o ambiente do parasito no hospedeiro natural também é de grande importância para a otimização das culturas celulares correspondentes (Bayne, 1998). Meios de cultura com formulações que contêm compostos como vitaminas e aminoácidos, bem como, fatores de crescimento presentes nos soros de suplementação, também devem ser considerados. O mesmo ocorre para outros aditivos presentes nas culturas: por exemplo, culturas primárias de *T. crassiceps* necessitam da adição de gonadotrofina do hospedeiro (camundongo) ao meio de cultivo (Toledo *et al.*, 1997). As trocas de meio devem ser feitas para retirada e reposição de 50 ou 70% do volume a cada 2 ou 3 dias. Isto proporcionaria a manutenção constante de moléculas necessárias à nutrição celular.

Conforme previamente descrito, platelmintos parasitos carecem de sistemas celulares melhor estabelecidos, sendo necessária a padronização desde o desprendimento celular até a caracterização de compostos, sintetizados pelas células, que podem influenciar sua viabilidade e proliferação. Como mencionado, culturas bem estabelecidas são ferramentas úteis para muitos estudos, como, por exemplo, no entendimento dos mecanismos de ação de drogas anti-helmínticas.

Drogas anti-helmínticas e ação sobre platelmintos

As doenças causadas por helmintos atingem mais de dois bilhões de pessoas por ano ao redor do mundo. As principais zoonoses causadas por platelmintos são a esquistossomose, teníase, cisticercose, hidatidose cística, a fasciolose, dipilidiose, e muitas outras. Estas doenças ocorrem atingindo diferentes níveis patológicos nos hospedeiros podendo causar danos severos e/ou fatais (<http://www.who.int/>).

Tratamentos efetivos contra as zoonoses são, em geral, indisponíveis. Além de problemas sócio-econômicos, a erradicação das doenças depende, além de outros fatores, da sensibilização das populações humanas envolvidas em atividade pecuária. Devido a isto, na busca do controle e tratamento dos danos causados por essas doenças, são realizadas campanhas educacionais e, por outro lado, grande número de drogas anti-helmínticas é lançado no mercado a cada ano. Tais drogas são principalmente derivadas de benzimidazóis, como, por exemplo, triclabendazol, imidazol e mebendazol (Fairweather & Boray, 1999; El-on, 2003). Sabe-se que o mecanismo de ação destas drogas está relacionado à perda de contratilidade e paralisia muscular, em geral associados à despolarização da membrana do tegumento e à conseqüente vacuolização (Jiraungkoorskul *et al.*, 2005). A despolarização de canais iônicos neurocinérgicos e glutâmicos também ocorre, por exemplo, em função da administração de drogas como a ivermectina (Perez-Serrano *et al.*, 2001).

Praziquantel (PZQ) e albendazol (ABZ), drogas que vêm sendo utilizadas há bastante tempo para tratamento de infecções causadas por platelmintos parasitas, apresentam grande eficácia no controle de muitas parasitoses (Fan *et al.*, 2005; Infanger *et al.*, 2005). Assim como ocorre para as demais drogas anti-helmínticas, PZQ e ABZ também têm sua ação mais drástica sobre tegumento e músculos. O PZQ atua especificamente sobre os canais de Ca^{+2} das células musculares subtegumentares, alterando a homeostasia e levando à contração muscular imediata (Redman *et al.*, 1996; Urrea-Paris *et al.*, 2000). O ABZ, também um

derivado de benzimidazol-carbamato, liga-se à β -tubulina e bloqueia a formação dos microtúbulos, o que causa paralisia (Hoti *et al.*, 2003).

Embora com mecanismos de ação bem determinados, pouco se sabe sobre a ação destas duas drogas nos diferentes estágios do ciclo de vida de platelmintos parasitas. Desta forma, o estudo do efeito destas drogas durante o desenvolvimento de um parasito pode contribuir para um melhor direcionamento dos tratamentos contra helmintíases.

Objetivos

Os objetivos gerais do trabalho são os de estudar a dinâmica das alterações morfológicas em tegumento e músculo que ocorrem durante o processo de estrobilização *in vitro*; analisar o efeito de drogas anti-helmínticas de amplo espectro durante o desenvolvimento *in vitro* do parasito; e, considerando-se a falta de sistemas celulares para platelmintos parasitos que viabilizem estudos, entre outros, relacionados à análise mais focalizada do efeito de drogas, buscou-se estabelecer culturas celulares de diferentes fases do desenvolvimento de *M. corti*.

Desta forma, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Estudar modificações morfológicas da dinâmica dos rearranjos corporais globais durante o desenvolvimento do tetratirídeo à fase adulta.
2. Estudar o efeito de drogas de amplo espectro de ação, PZQ e ABZ, testando diferentes tempos de exposição, para verificar quais são as fases e tecidos mais suscetíveis ao dano.
3. Otimizar e estabelecer as condições para o cultivo *in vitro* de culturas células isoladas a partir de diferentes fases do desenvolvimento de *M. corti*.
4. Caracterizar a morfologia das células cultivadas *in vitro*.
5. Caracterizar os componentes da matriz extracelular sintetizada *in vitro* pelas células.

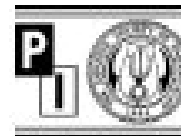
O trabalho está dividido em dois capítulos. O primeiro, no formato do manuscrito publicado, reporta o estudo da dinâmica dos rearranjos corporais durante o processo de estrobilização *in vitro* e a ação de anti-helmínticos atuando durante esta etapa do desenvolvimento. O segundo capítulo refere-se ao trabalho desenvolvido para o estabelecimento de culturas celulares primárias de *M. corti*.

CAPÍTULO I. EFEITO DA AÇÃO DE ANTI-HELMÍNTICOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *MESOCESTOIDES CORTI*

Esta etapa do trabalho teve, por objetivo principal, estudar a dinâmica da arquitetura corporal durante a estrobilização *in vitro* de *M. corti*. O efeito dos anti-helmínticos de amplo espectro, PZQ e ABZ, durante as diferentes etapas do desenvolvimento foi avaliado.

O processo de segmentação é induzido através de um pré-tratamento com tripsina em condições de elevação de temperatura (37 para 39°C) e anaerobiose relativa (incubação de frascos de cultura em mistura gasosa de CO₂5%/N₂95%) (Markoski *et al.*, 2003). Primeiramente, foram estabelecidos os dias em que ocorrem os rearranjos corporais mais evidentes (ver Figura 5). Ao primeiro dia, o verme alonga e projeta o escólex, que está, em geral, invaginado no tetratirídeo (*dia 1*). Esta forma, alongada, foi denominada "adulto jovem" (Thompson *et al.*, 1982). Ao terceiro dia, foram observadas algumas modificações morfológicas, tais como formação de brotos ao longo do estróbilo (*dia 3*). Em geral, ao quinto dia de cultivo após indução de estrobilização, os rudimentos seminais, e ou, poros sexuais, evidenciam o início do processo de proglotização, com a delimitação externa e interna entre as proglótides, caracterizando a segmentação (*dia 5*). No sexto dia, o escólex, bastante desenvolvido, torna-se bem evidenciado e as proglótides estão bem definidas caracterizando o estróbilo na estrutura de "colar de contas" (*dia 6*). Após o sexto dia, com os órgãos sexuais bem desenvolvidos, os vermes em cultivo possivelmente realizam fecundação cruzada, devido à observação da projeção do cirro (estrutura copulatória masculina). A partir do 11^o dia, se inicia o processo de degeneração. Neste dia, ocorrem grandes quebras no estróbilo, separando porções anteriores de posteriores, bem como, ocorre a separação da última proglótide, possivelmente contendo as oncosferas (*dia 11*). De acordo com esta caracterização das principais transformações corporais que ocorrem durante a estrobilização *in vitro*, o primeiro objetivo desta parte

do estudo, foi o de observar e caracterizar estas transformações em nível mais tecidual. Para isto, através de marcação fluorescente associada à microscopia confocal, foi possível observar os rearranjos no tegumento, no sistema muscular e o desenvolvimento de órgãos internos. O segundo objetivo, foi o de analisar o efeito das drogas anti-helmínticas PZQ e ABZ, sobre estes tecidos durante o desenvolvimento *in vitro* do verme. Pôde-se estabelecer as concentrações de drogas efetivas *in vitro* onde foi demonstrado que o adulto é muito mais suscetível às drogas, sendo o tegumento o principal tecido atingido. A seguir, é anexado o manuscrito publicado no periódico *Parasitology International*, descrevendo os resultados resumidos acima.



Praziquantel and albendazole damaging action on in vitro developing *Mesocostoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda)

Melissa M. Markoski^a, Edvaldo S. Trindade^b, Gonzalo Cabrera^c, Alice Laschnak^a, Norbel Galanti^c, Arnaldo Zaha^a, Helena B. Nader^b, Henrique B. Ferreira^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Molecular de Curitiba, Centro de Neurociência, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FURG) Porto Alegre, Brazil

^b Departamento de Biologia Molecular, Departamento de Anestésia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, São Paulo, Brazil

^c Laboratório de Biologia Molecular (CRM), Faculdade de Medicina, Universidade de Chile, Santiago, Chile

Received 1 June 2007; accepted 23 September 2007

Available online 1 December 2007

Abstract

Parasitic flatworms present several steps of body architecture rearrangement during their life transition from one developmental stage to another, which are, at least in part, responsible for their evasion from host immune response. Besides, different developmental stages present different degrees of susceptibility to drug action, and the identification of more susceptible stages is of importance for the definition of therapeutic approaches. *Mesocostoides corti* (syn. *Mesocostoides tegae*) is considered a good model to study cestode biology because it can be easily manipulated both in vivo and in vitro and due to its relatively close relationship to cestodes of medical relevance, such as those from genera *Echinococcus* or *Taenia*. We have analyzed the damaging action of two broad spectrum anthelmintic drugs (praziquantel and albendazole) throughout the in vitro maturation process of *M. corti* in order to identify developmental stages or body structures more susceptible to these drugs. Tetrahyridia (larval stage) and segment-induced worms were cultivated and treated with praziquantel and albendazole. Whole mounted samples, taken from different developmental stages, were fixed and stained with fluorescein-labeled WGA lectin and phalloidin for the analysis of tegument and muscles, respectively. Confocal laser scanning microscopy was used to identify anatomical changes and lesions caused by such anthelmintic drug in a 3D view. We demonstrated that both praziquantel and albendazole cause extensive tissue damage, especially on tegument, and that adult forms were the most susceptible to drug exposure.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Mesocostoides corti*; Tetrahyridia; Anthelmintic drug; Confocal microscopy; In vitro development

1. Introduction

The knowledge of helminth parasite muscle and tegument anatomy is important for the understanding of host–parasite interactions, the design of anthelmintic drugs, and the comprehension of drug delivery [1,2]. The mechanisms of drug action are better understood from the genetic and biochemical points of view. However, drug effects on parasite body architecture are not very clear [3].

The body surface topography was well examined by scanning microscopy in the platyhelminth parasites [4–6].

However, the examination of surface structures is not sufficient to analyze the inner complexity of tegument or muscle tissues. A confocal laser scanning microscopy (CLSM) allows the study of gross anatomy in a three-dimensional view, and the use of different fluorescein-stained ligands allows the simultaneous analysis of different tissues, structures, and organs [7–9]. Fluorescent-labeled phalloidin, often used for in vitro studies of actin polymerization, can be used as muscular marker to show muscle fiber organization, and, in tapeworms, to stain flame cells [8,9]. *Triticum vulgare* wheat germ agglutinin (WGA) lectin-conjugated markers bind specifically to *N*-acetylglucosamine, an abundant carbohydrate in the tegument glycoalyx of platyhelminthes [10,11]. This and other carbohydrate moieties on parasite glycoalyx play important roles in the host–parasite relationship, and form some of the major epitopes that elicit host immune responses [11].

* Corresponding author. E-mail: hbf@furg.br (H.B. Ferreira).
Centro de Neurociência, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FURG), Av. Itália, 91201-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3316 6070; fax: +55 51 3316 0973.

E-mail address: hbf@furg.br (H.B. Ferreira).

Praiquantel (PZQ) and albendazole (ABZ) are largely used to treat human and animal cestode infections, and tegument and muscle tissues are major targets to these anthelmintic drugs. PZQ acts specifically on tegument and muscle cells ion channels, altering Ca^{2+} flux and leading to immediate muscle contraction [12–14]. ABZ, a benzimidazole carbamate derived drug, binds to β -tubulin and blocks microtubule formation, which causes a late paralysis [15,16].

Meanwhile, cercaria, belonging to the Cestoda class [17], represents a good model for the study of several aspects of cestode biology, from drug action effects to parasite interactions with the host immune system [18–21]. Its larval stage (tetrahyridium) is capable of asexual reproduction both *in vivo* (including in experimental hosts) and *in vitro*, and its strobilization (segmentation and sexual differentiation) can be induced in controlled culture conditions [22].

The analysis of the three-dimensional rearrangement of *M. coxi* tissues and cells under the effect of anthelmintic drugs throughout the *in vitro* strobilization process is important for the identification of drug targets for future drug delivery studies. In the present work, we have used CLSM to follow muscle and tegument development during strobilization and to assess the effects of PZQ and ABZ on these tissues in different developmental stages.

2. Material and methods

2.1. Collection of parasites and culture conditions

The collection and culture procedures were performed as previously described [22]. Briefly, after 5 months of intraperitoneal infection, tetrahyridia were collected from an euthanized mouse using sterile Pasteur pipette and washed prior to culture. Around 15,000 tetrahyridia were collected from an infected mouse. Tetrahyridia were individually selected (to separate from buds and accephalic structures) and initially cultured in starvation McRPM1 medium (Life Technologies, USA), in 25 cm² culture flasks incubated in 5% CO₂ at 37 °C, for to 2 days prior to segmentation induction.

2.2. Segmentation induction

Tetrahyridia segmentation was induced by incubation of starved cultured larvae in McRPM1 medium containing 0.662% (*w/v*) trypsin (Sigma-Aldrich, USA), equivalent to 10⁷ N_α-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) units/ml, at 39 °C for 24 h [22]. After induction, cultures were transferred to 24 well plates (Corning, USA) supplied with 2 ml/well of McRPM1 medium supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS, CultiLab, Brazil) and maintained at 39 °C under 5% CO₂ for up to 11 days.

In order to follow the major changes during strobilization, worms were fixed after established culture intervals according to their different developmental stages, following evagination of scolex (day 1), neck shaping (day 3), strobila elongation and genital pore formation (day 5), segmentation and sexual

maturation (day 6) and body necrosis (day 11). For each culture interval (tetrahyridia and developing worms at days 1, 3, 5, 6 or 11) four replicates of 50 individuals/well were analyzed.

2.3. Drug treatment

Tetrahyridia and cultured worms, after strobilization induction at days 1, 3, 5, 6 and 11 were submitted to ABZ or PZQ treatment. The treatments consisted of culture in medium containing 200 ng/ml of PZQ active principle (Sigma-Aldrich) or 200 ng/ml of ABZ (Sigma-Aldrich) for 1, 3, 6 or 24 h. ABZ and PZQ were solubilized in 50 μ l of methanol (Merck) or ethanol (Merck), respectively, prior to addition to culture medium. The same volume of vehicle (methanol or ethanol), without PZQ or ABZ, was added to untreated control cultures. Four replicates of 50 individuals/well were treated or not (controls) with PZQ or ABZ for each drug exposure time. After drug exposure, the worms were washed to remove medium and food.

2.4. Whole mount fixation and permeabilization

Cultured worms (strobilization-induced or not, and treated or not with PZQ or ABZ) were collected at different culture/drug exposure time intervals as indicated, and washed 5 times in 0.1 M PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 15.22 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). Samples were fixed in 2% (*w/v*) paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences)/PBS for 24 h. After fixation, samples were rinsed twice in PBS, once in PBS/0.1 M glycine, and twice in PBS, and permeabilized to fluorophores by incubation in 0.1% (*w/v*) saponin (Sigma-Aldrich) for 24 h.

2.5. Sectioning and eosin (HE) staining and analysis

Prior to sectioning, tetrahyridia and segmented worms were fixed in 1% (*w/v*) paraformaldehyde in PBS pH 7.4 at 4 °C for 24 h, and then embedded in paraffin (all reagents from Merck). Blocks were cut in 5- μ m-thick sections and HE stained following standard methods.

2.6. Lectin WGA, phalloidin, and DAPI staining

After permeabilization, whole mounted worms were incubated in blocking solution (1% BSA in PBS containing 0.1% saponin) for 10 min. Staining was performed in the same solution with the addition of 4 μ g/ml FITC-conjugated WGA lectin (Sigma-Aldrich), 13.2 nM/ml Phalloidin Alexa Fluor 594 (Molecular Probes), and 10 nM/ml 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Molecular Probes) for 60 min at room temperature. After staining, worms were washed once in PBS, and suspended in 100 μ l of Fluoromount (Molecular Probes)/PBS (2:1) prior to slide assembly. As negative controls, worm samples were incubated with the fluorophores and taken to the microscope to analyze autofluorescence background.

2.7. Microscopic analysis

Differential interference contrast (DIC) imaging and fluorescence CLSM analyses were made in LSM-510 NLO laser scanning microscope (Carl Zeiss). Inverted and light microscopy analyses were made in Axiovert 25 and AxioLab HBO SA/nc microscopes (Carl Zeiss), respectively.

3. Results

As previously shown [22], dramatic changes take place during the *M. corvi* strobilation process, which were evidenced by HE staining and light microscopy (Fig. 1). The significant morphological alterations led us to investigate the damaging action of two broad spectrum anthelmintic drugs

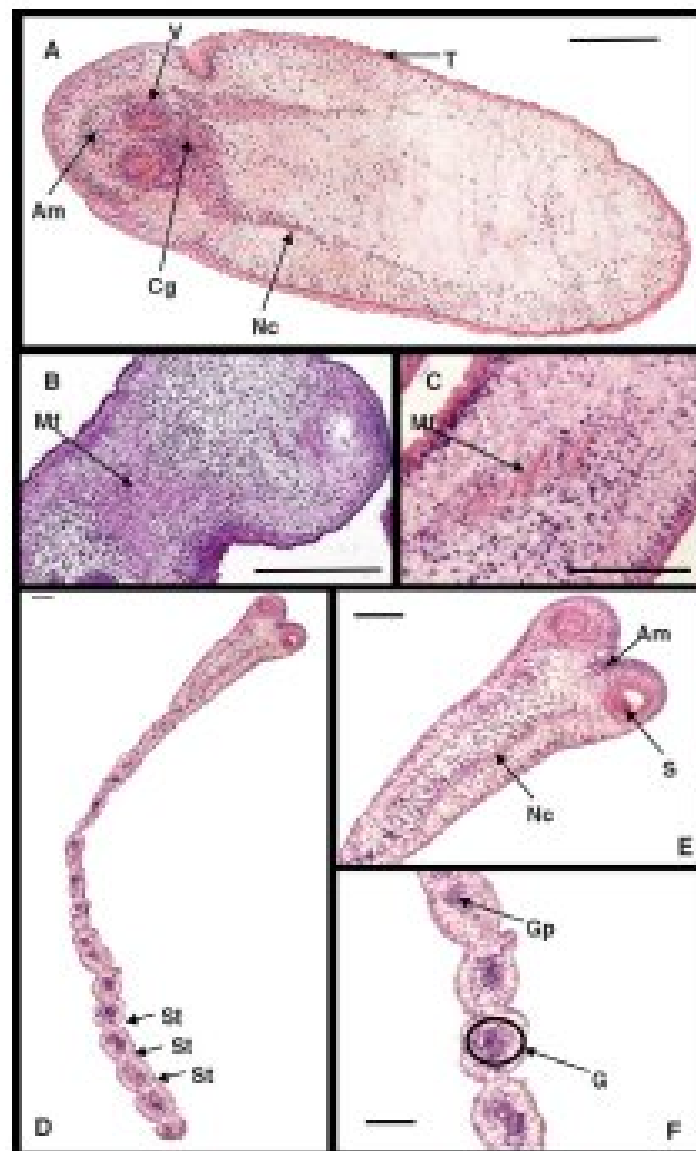


Fig. 1. Photomicrography of *M. corvi* at different developmental stages. Histological sections were stained with hematoxylin-eosin. (A) Cultured tetrahyridium. (B) Young adult worms (days 1–3 after strobilation induction) scolex. (C) Young adult worms (days 6–11 after strobilation induction) proximal body. (D) Adult worms. (E) Adult worms scolex. (F) Adult worms distal proglottides. Am, apical mass; Cg, central ganglion; Mf, muscle fibers; Nc, nervous cord; T, segment; St, strobila; G, genital; Gp, genital pore; St, strobilation. Bars, 100 μ m.

(PZQ or ABZ) throughout the *in vitro* sporozoite process of *M. coxi*, in order to identify more susceptible stages or body structures. Cultured worms were then exposed to PZQ or ABZ in different developmental stages, to comparatively assess the drug effects upon tegument structures, muscle fibers, and cell organization after drug action. Light microscopy, and WGA lectin, phalloidin and DAPI staining analyses by CLSM and DIC imaging revealed that exposure to both PZQ and ABZ caused progressive damages. Such damages were better evidenced when comparing worms exposed for 1 or 24 h to each drug, with differences being not very significant when comparing samples taken at shorter time intervals. In all stages

and exposure times, worm motility, usually characterized by rhythmic longitudinal contractions, was severely impaired immediately after the exposure to PZQ, which also caused paralysis and formation of surface vesicles. Eventually, ABZ also led to a paralysis state, but it occurred only after 72 h of drug treatment. Real time images of cultured *M. coxi* tetrahyridia exposed to PZQ can be viewed at <http://www.cb.it/it/figs.html/~www.filmc/miacchi/it/coal>.

WGA lectin analysis confirmed that the *M. coxi* tegument is very rich in carbohydrates. The tegument covers the body parenchyma in all its extension, with its glycocalyx layer thinner in the posterior region. Muscle tissue, evidenced under

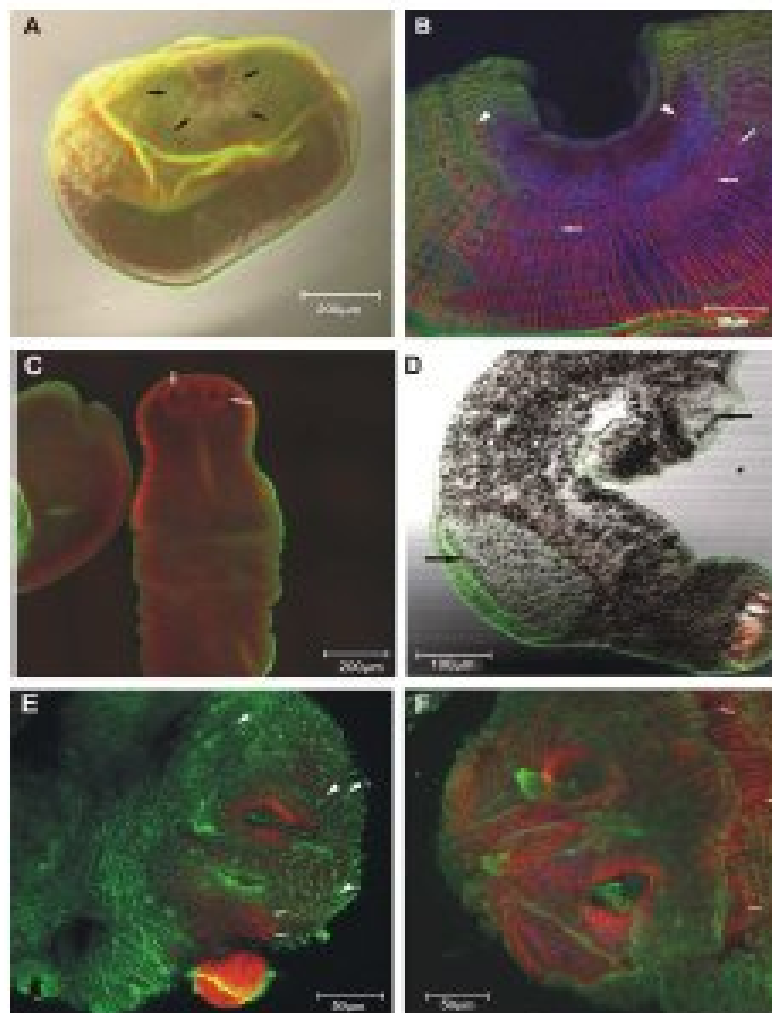


Fig. 2. CLSM images of *M. coxi* tetrahyridia cultured in the presence or absence of PZQ or ABZ stained with phalloidin (red), lectin (green) and DAPI (blue). (A) Overlay of images after DIC and CLSM analyses of standard cultured invaginated tetrahyridia. Arrows indicate internal suckers. (B) CLSM analysis of the sucker cluster of a standard cultured invaginated tetrahyridia. Arrow indicates longitudinal fibers and arrowheads circular fibers. (C) CLSM analysis of a worm at day 1 after sporozoite induction. Arrows indicate evaginated suckers. (D) DIC and confocal analysis of a 24 h PZQ treated tetrahyridia. Arrow points to forming vesicle. (E) Sides of a 24 h PZQ treated tetrahyridia. Arrows point to fibers; arrowheads point to holes in the tegument. (F) Sides of a 24 h ABZ treated tetrahyridia. Arrows point to longitudinal fibers. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the tegument by phalloidin staining, appeared as an outer layer of circular fibers enclosing inner longitudinal fibers, which extend from the suckers to the posterior end. In segmented worms, muscle fibers were constricted but not interrupted in proglottid boundaries. Interrupted longitudinal fibers appeared only in the genital pore region of sexually mature proglottides. A comparative analysis between drug damaged and normal tissues at different developmental stages is provided below.

3.1. *Tetrahymita* before and after strobilation induction at day 1

Cultured tetrahymida presented the scolex usually in an invaginated state (Fig. 2A, B). Opening of the scolex chamber for scolex and neck emergence occurred within 24 h after induction (Fig. 2C). The physiological mechanism involved is unknown, but there was significant muscle fiber reorganization

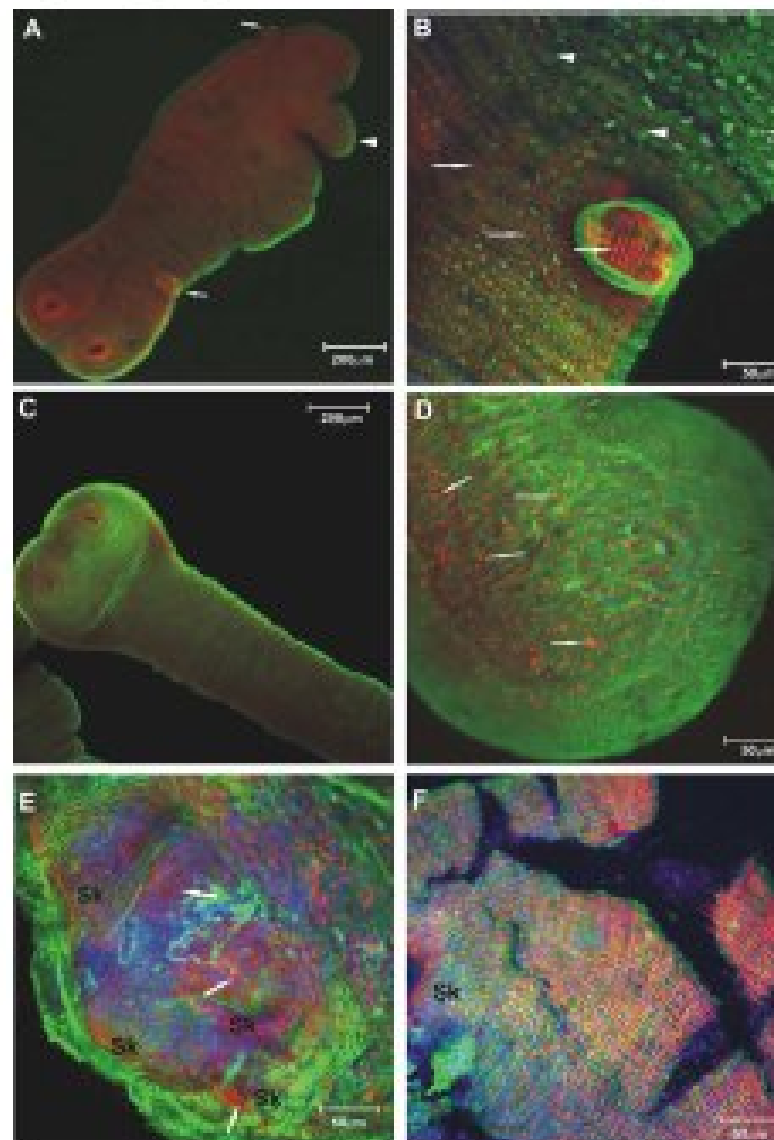


Fig. 3. CLSM images of *M. cord* young adult worms cultured in the presence or absence of PZQ or ABZ stained with phalloidin (red) lectin (green) and DAPI (blue). (A, B) Day 1 strobilation induced worms: view of the whole body (A, arrow point to body, arrowhead points to a stump resulting of an asexual daughter splitting) and detail of the detaching segment and an attached head (B, arrows point to longitudinal fibers; arrowheads show expelled calcareous bodies). (C–E) Day 1 strobilation induced worms. Detail of the anterior (C) and posterior (D) regions (arrows point to flame cells). (E) Scolex of a worm after 24 h of PZQ exposure (arrows point to sucker (Sk) fibers). (F) Anterior region with suckers (Sk) of a worm after 24 h of ABZ exposure. After integration of the information to colour in this figure legend the reader is referred to the web version of this article.

in the scolex chamber (Fig. 2B,C). A great number of cells corresponding to suckers could be distinguished in this cavity. PZQ and ABZ treatment did not lead to death of the tetrahryda, either before or after strobilization induction (Fig. 2D–F). Once PZQ was added to cultures, scolex emergence occurred even

without the strobilization induction treatment (Fig. 2D). PZQ exposure induced tegument perforations and detachment (Fig. 2E) and the formation of body vesicles (Fig. 2D) in tetrahryda and also in later developmental stages. The standard arrangement of outer circular and inner longitudinal muscle fibers was

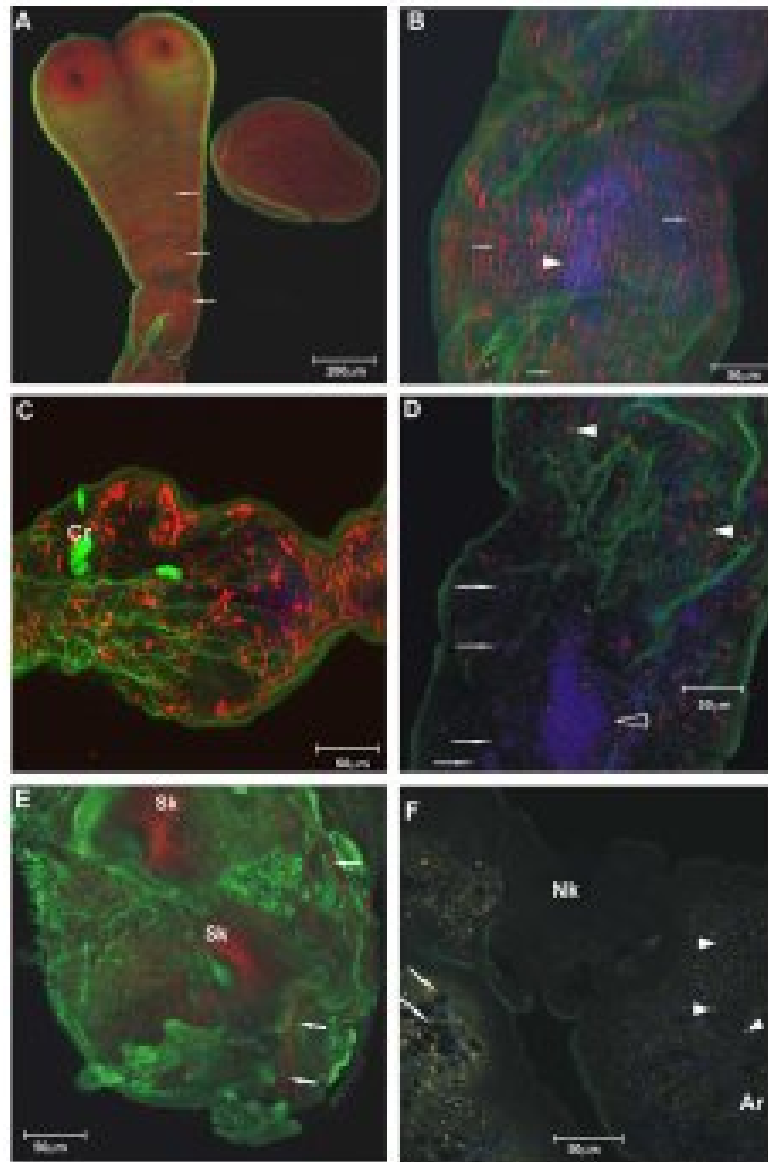


Fig. 4. CLSM images of *M. novae* adult worms cultured in the presence or absence of PZQ or ABZ stained with phalloidin (red), lectin (green) and DAPI (blue). (A–E) Adult at day 6 of strobilization induction. (A) Scolex of a standard cultured induced worm. Arrows point to longitudinal fibers (also visible, but not indicated) in B–E). (B) Standard developing proglottid. Arrowhead points to the central group of cells. (C) Detail of a proglottid cell linked to its proximal segment in an adult of day 11 after strobilization induction. Strong WGA staining may be indicating the cilia. (D) PZQ damaged proglottid. An open arrowhead points to the central mass of cells, arrows point to cells separated from that mass; arrowheads show same cells. (E) ABZ damaged scolex; fibers are only visible in the suckers (Sk). (F) Strangled neck (Nk) after ABZ treatment of day 11 strobilization-induced worms. Arrows indicate tegument holes; arrowheads point to lectin and phalloidin co-localization, which is related to flame cells. The worms anterior region (Ar) is indicated. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

partially lost after PZQ treatment (Fig. 2E). ABZ exposure presented less obvious effects (Fig. 2F), but it eventually induced tegument perforations.

3.2. Young adults at culture days 3 and 5 after sterilization induction

Worms at day 3 after sterilization induction were characterized by a better definition of the scolex due to shaping of the neck (Fig. 3A). After strobila elongation, which became more evident at day 5, there was a progressive loss of muscle staining in the posterior region, associated with increased staining of flame cells and muscle fiber rearrangements (Fig. 3C,D). Budding occurred preferentially at day 3 after sterilization induction and the forming buds presented internal muscle fibers in an orientation that followed their external contour and were discontinued and distinct from those in the adjacent body tissue (Fig. 3B).

Interestingly, at day 3 of culture, there was a small degree of tegument detachment even in worms not exposed to drugs (Fig. 3B), although these alterations were quite different from

perforations caused by PZQ or ABZ action (Fig. 3E,F). Overall, damages caused by both drugs in day 3 worms were not significantly different from those previously described for tetrahyridia (Fig. 2D–F). However, in a few cases, longer ABZ exposure times caused body rupture and increased tegument perforations (Fig. 3F). The longer and thinner worms at day 5 were more sensitive to both drugs. PZQ often induced muscle fibers disruption (Fig. 3E), and, in 24 h exposed worms, both PZQ and ABZ caused the detachment of body segments.

3.3. Adult worms in culture days 6 and 11 after sterilization induction

In standard cultures, worms at day 6 were fully segmented, with clearly defined scolex and proglottides (Fig. 4A,B). Longitudinal muscle fibers follow the entire strobila length, but became constricted, although not interrupted, between proglottides. The tegument became thinner and, within each proglottid, cells corresponding to the forming sexual organs became apparent, as a central, dense mass of nuclei (Fig. 4B). At days 6 and 11 worms were typically segmented in 22–25

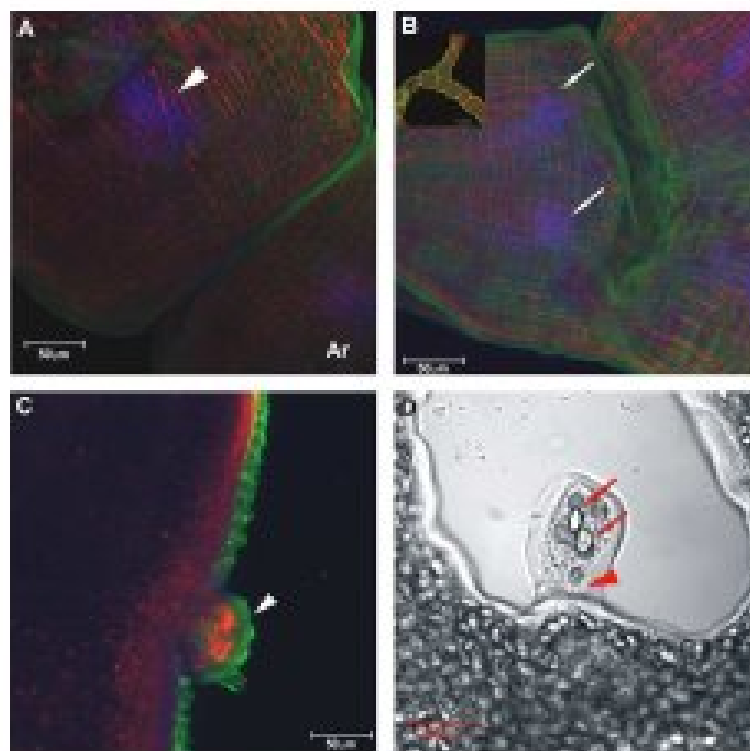


Fig. 4. CLSM images of *Ac. coeca* unid worms stained with phalloidin (red), lectin (green) and DAPI (blue) showing morphological aspects and structures related to reproduction. (A) Adult worms at day 6 after sterilization induction. The worms anterior region (Ar) is indicated; the arrowhead points to the central mass of nuclei in the last proglottid, corresponding to the egg pouch. (B) Adult at day 6 after sterilization induction carrying out the pairing (visible in the small inset). The main enlarged image shows two different masses of nuclei (arrows) in a single proglottid (anastomosis). (C) Worm at day 11 after sterilization induction. Arrowheads show an attached bud. (D) DIC of worms at day 3 after sterilization induction after 1 h exposure to PZQ. Arrows point to calcareous bodies inside the strobila; arrowhead indicates the paracymbal hook base on stump and the worm body. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

proglottides. Starting at day 11, worms underwent a progressive degeneration, characterized by overall tegument disintegration, muscle fibers fragmentation and necrosis (Fig. 4C). Up to 90% of these worms presented segment detachment upon both PZQ and ABZ exposure, showing significant decrease in the number of proglottides. Fully segmented worms were readily and thoroughly damaged by PZQ and ABZ treatment even after 1 h exposure, showing both tegument and muscle fibers disruption (Fig. 4D–F). PZQ also affected the architecture of the central mass of cells in each proglottid, which became diffuse and suggestive of inner organs disruption (Fig. 4D).

As any other developmental stage (data not shown), adult worms often underwent asexual reproduction by antero-posterior binary fission. The putative parasitium organ usually became apparent in the last proglottid around day 6 (Fig. 5A). Interestingly, asexual reproduction involving sexually differentiated proglottides occurred with duplication of internal sexual organs prior to longitudinal splitting (Fig. 5B). Buds were clearly distinguishable from tegument folds, whose muscle fibers and parenchyma organization were contiguous to those from adjacent tissues and included calcareous corpuscles (Fig. 5C). No budding was observed after drug exposure, while tegument folds were still present in these worms (Fig. 5D).

4. Discussion

The *M. cori* stabilization process involves rearrangements in body architecture, with evident modifications on tegument and inner structures. *N*-acetyl- β -D-glucosamine staining using WGA lectin showed that carbohydrate networks in the tegument vary during stabilization, stretching and becoming thinner as the worm progresses from tetrahyridium to adult stage. Tegument detachments might have been consequence of calcareous corpuscles excretion [23], in addition to a trypsin treatment effect, as recently described by Espinoza et al. [24]. This *in vitro* situation may represent, at least in part, what happens *in vivo*, upon ingestion of *M. cori* larvae by a definitive carnivore host, when glycoconjugates would play an important role to insulate parasite from proteases and lipases in the host gut lumen [25]. In early infection steps, the thicker larval tegument would help to survive the passage through the stomach, and, later, a thinner tegument would be enough to endure the relatively less hostile gut environment.

Muscle arrangement of longitudinal and circular fiber follows body contour all over development, which is characteristic of the Cyclophyllidae order [8,19]. However, fiber rearrangement, possibly representing some degree of muscle specialization, was observed in the suckers, as well as in tetrahyridia [19]. In this work, we observed general muscle fiber reorganization within the buds and in the genital pore formation. Neck formation and proglottid definition was followed only by localized fiber constriction.

The existence of actual buds, as described by Specht and Vogt [26], is a controversial matter. Hirt [27] and Novak [28] proposed that buds would be merely stumps, remaining on the parental body after the separation of split off tetrahyridia. Although stumps also occur in our culture conditions, in the

form of lateral outgrowths that may eventually bud off, we were able to clearly distinguish them from what we believe are actual buds, with a differentiated inner structure, at least in what concerns to muscle fibers. Budding was observed in all body portions, which supports the idea [29,30] of localized developmental signals that activate stem cells spread all over the body. As previously reported [22,27,28], there was no evidence of further bud development into tetrahyridia *in vitro*. However, *in vivo*, this might occur, accounting for the huge number of asexually generated worms in oral dog infections, not explainable only by feciparity [31].

Binary fission starts from the anterior region, probably in the apical suckers, with the generation of daughter suckers [30]. In later stages (from days 5 to 11), it involves three sequential steps: (i) lateral duplication of inner structures (e.g. sexual organs); (ii) proglottid definition by constriction; and (iii) lateral splitting. This suggests that antero-posterior and lateral developmental signals act in concert to define the worm longitudinal fission. The nature of these signals, however, remains to be elucidated.

There is a general lack of knowledge about anthelmintic drug effects upon different developmental stages of cestode parasites, especially due to difficulties to deal with sexually maturing stages from species infective to humans. *M. cori* tetrahyridia have been commonly used for the evaluation of anthelmintic effects [20,21,32,33], but the recent establishment of an inducible *in vitro* stabilization system [22] now allowed the study of the differential drug susceptibility of distinct developmental forms. As far as we know, this is the first time that anthelmintic drug effects upon *M. cori* are assessed from tetrahyridia to adult worms.

Two commonly used anthelmintic drugs, PZQ and ABZ, were used in doses equivalent or below those recommended for humans or animals by the World Health Organization for Tropical Diseases Research [34]. Drug dosages were defined empirically, as those allowing the follow up of their progressive effects for up to 24 h; death eventually occurred, usually after 48 h. Both drugs caused severe damages to all developmental stages analyzed. However, damages were more significant in fully segmented worms, usually not addressed *in situ* due to evaluate their effects on cestodes of medical or veterinary importance, such as those from genera *Taenia* and *Echinococcus*. The observed effects are probably, at least in part, representative of those happening to intestine living adult cestode worms upon host oral treatment with PZQ or ABZ. This assumption, however, should be experimentally addressed, applying the same confocal microscopy-based approach to evaluate, for instance, *Echinococcus granulosus* adults obtained from PZQ-treated dogs.

Although qualitatively similar in all developmental stages analyzed, damages caused by exposure to PZQ or ABZ were progressively more severe in the later ones. Basically, PZQ caused strong vacuolization, rupture of muscle fibers and disorganization of inner cell masses corresponding to developing organs. ABZ caused less severe damage than PZQ, with its effects restricted to tegument perforations and muscle fiber ruptures.

In *Schistosoma mansoni*, PZQ-sensitive sites are present in the tegument as well as in muscle cells [35,36]. Probably, this

is also the case for *M. cori*, since these tissues were severely, although locally, affected by this drug. The rapid PZQ-induced Ca^{2+} influx [13] could account for both the body contraction observed immediately after drug exposure and the vacuolization [37,38].

The mechanisms of PZQ action upon the plathyelminth tegument barrier have been studied [8,13,39,40]. As demonstrated for *S. muroni*, PZQ deregulates voltage depending gates activation or inactivation [41]. The drug interferes with a key protein kinase C (PKC)-mediated phosphorylation event, necessary for the regulatory interaction between α and β channel subunits domains and therefore activity inhibition [40,42]. PZQ activates a glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D (GPIPLD) pathway, which produces phorbol esters or diacylglycerol that activate PKC [43]. The PKC-mediated phosphorylation of proteins destabilizes tegument structure, also resulting in vacuolization [37]. The occurrence of such PZQ-induced and PKC-mediated effect leading to vacuolization in *M. cori*, however, remains to be confirmed.

PZQ-induced Ca^{2+} entry through the tegument also interferes with the electrically coupled muscle cells [13]. Upon reaching the sarcoplasmic reticulum of subtegumental muscle cells Ca^{2+} would induce the observed contraction, and, later, progressive muscle fibers disruption. These effects were more prominent in segmented worms, which is consistent with their thinner and more vulnerable tegument.

Muscle actin fibers are also targets for PZQ action. Upon PZQ exposure, fibers were progressively shattered, which could be easily followed through phalloidin staining. This effect would be accounted for PZQ activation of gelsolin, an actin filament fragmenting protein [44]. Furthermore, Apin-hamit and Sobhon [39] described that, in *Opisthorchis viverrini*, PZQ-induced Ca^{2+} influx could cause depolymerization of the microtubular network, which would lead to vacuolization, swelling, bloating, disruption and detachment of the tegument, and microfilaments breakdown in muscle cells, effects at least in part observed for *M. cori*.

Phalloidin and lectin staining of flame cells was already shown in *M. cori* and other plathyelminthes, due to the presence of both actin and carbohydrate residues within these cells [8,19,45]. Intact muscle fibers preferentially stained with phalloidin, in detriment of the corresponding staining in flame cells. However, upon PZQ exposure, the fluorescence was progressively transferred to the excretory cells. This may be interpreted as a greater susceptibility of muscle cells to PZQ in comparison to flame cells. Furthermore, PZQ-induced tegument damage could make flame cells more accessible to WGA.

Besides the damaging effect on tegument and muscle fibers, PZQ caused ungrouping of cells corresponding to sexual organs within proglottides. Effects of *in vitro* exposure to PZQ on internal organs, such as severe drug concentration-dependent vacuolization in intestine, ovary, testis, Mehlis' gland and excretory bladder and disintegration of reproductive organs, was described for *Paragonimus westermani* [12].

The ABZ mode of action is through its binding to β tubulin and blocking of microtubule formation, leading to parasite

paralysis and death [46]. ABZ exhibits low water solubility, but once orally administered to a host, it is metabolized into the slightly soluble sulfoxide (SOABZ) and sulfone [34]. Both ABZ and SOABZ induce tubulin alterations in *E. granulosus* protozoosomes [47]. Although fully soluble in the concentration used, ABZ did not significantly damage muscle fibers in exposure times of up to 24 h. However, for adult worms, longer exposure times caused limited disruption of muscle fibers. Worms of day 11 had muscle fibers affected even after 1 h of drug exposure, possibly due to their increased body fragility in comparison to tetrahyridia and youngsters. Paralysis followed by death was only observed after 72 h of incubation (data not shown). In contrast, ABZ was markedly harmful to the tegument in longer (24 h) exposure times. This is probably consequence of the loss of cytoplasmic tubules of tegument cells caused by benzimidazoles [48].

In this work, we have used an *in vitro M. cori* stratification inducible system developed by our group [22] to assess drug effects upon different developmental stages of a parasite cestode. We were able to show that fully segmented worms are more susceptible to the cestode broad-spectrum drugs PZQ and ABZ and opened the possibility to study, at the molecular level, the parasite mechanisms of drug response. It will be important to know when and why the parasite is more susceptible to drug action, identifying specific drug receptors and understanding mechanisms of drug delivery. These are fundamental aspects to be considered when defining effective therapeutic protocols. Our model system can also be useful to investigate such aspects, as well as to the study of differentially expressed genes during development [49] or in response to drugs.

Acknowledgements

We would like to thank Prof. Nives Lothhammer, for the help with histological procedures, Caroline Zito Ramera and Elizabeth Natori, for microscopy technical support, and Prof. Dr. Carl von Dostreich, Dr. Cristiano Vilim Bazzani, and Prof. Dr. Giancarlo Pasquati for the critical reading of this manuscript. This work was supported by grants from FAPERGS, FAPESP, FONDECYT Chile 1010817 and RITPD Network (SIDA/SAREC). M.M.M. and E.S.T. are recipients of predoctoral fellowships from CNPq and FAPESP, respectively. A.L. is a recipient of an undergraduate fellowship from CNPq.

References

- Patrick A, Savold L, Engels D, Bergquist NR, Todd ML. Drugs for the control of parasite disease: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol* 2002;19:509–15.
- McKinty B, Fairweather I, Brennan GP, Forbes AB. Parasite hepatic tegumental surface alterations following treatment *in vivo* and *in vitro* with nitroxyyl (Trolox). *Parasitol Res* 2004;91:251–63.
- Vale C, Trevisi AB, Pavanzi A, Pico-Matiasoia L, Libert R, Woloszewski A, et al. Sequence and level of endogenous expression of calcium channel beta subunit in *Schistosoma mansoni* displaying different susceptibility to praziquantel. *Mol Biochem Parasitol* 2003;150:111–5.

- [6] Leffler R, Gobin C. Developmental changes of *Alveomonas multi-foveata* metacystidia revealed by tegumental ultrastructure and lectin-binding sites. *Parasitology* 1998;104:49–61.
- [7] Klatschko J, Berger J, Jansen JC, Klinkert MG, Zick UH, Kraemer PG, et al. *Alveomonas mussoni*: adhesion of mucus-binding lectin to surface glycoproteins of ovaries and adult worms. *Exp Parasitol* 2000;92:231–9.
- [8] Olson BJ, Coker JA, Cameron GD, Hildrich MR. Ultrastructural and lectin-histochemical differences between the metacystidia and bladder teguments of the Tawari monogeneic amblicostome. *J Parasitol* 2000;86:18–24.
- [9] Blair GR, Meade AG, Shaw C, Johnson CF, Hahn DW. Gross anatomy of the muscle system of *Parascaris leporina* as visualized by phalloidin-fluorescence and confocal microscopy. *Parasitology* 1994;117:71–82.
- [10] Wahlberg MH. The distribution of F-actin during the development of *Dipyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Cell Tissue Res* 1982;231:261–70.
- [11] Blair GR, Meade AG, Day T, Hahn DW. A confocal microscopic study of the musculature of adult *Alveomonas mussoni*. *Parasitology* 2000;121:162–70.
- [12] Apichanant W, Solihon P, Tanabe C, Mithong W, Sitongkiet S, Sitarama R, et al. *Opirioketia viverrini*: ultrastructure and cytotoxicity of the glycocalyx of the tegument. *J Helminthol* 2000;74:3–9.
- [13] Casanueva C, Malger R, Casanueva C. Characterization of carbohydrates of adult *Alveomonas grossi* by lectin-binding analysis. *J Parasitol* 2000;89:27–61.
- [14] Lee SH, Baik HJ, Hong SH, Choi JY, Hong ST. In vitro effect of proglutinal on *Paragonimus westermani* by light and scanning electron microscopic observation. *Kwangju Jeonghak Chupchi* 1997;25:34–46.
- [15] Redman CS, Robertson A, Fallon PG, Motta J, Kozal JR, Donnelly M, et al. Proglutinal: an important coating challenge. *Parasitol Today* 1994;12:14–20.
- [16] Urrutia-Park MA, Mirazo MJ, Casado N, Rodriguez-Cabeza F. In vitro effect of proglutinal and albendazole combination therapy on the larval stage of *Alveomonas grossi*. *Parasitol Res* 2006;98:937–64.
- [17] Dvornakova E, Hrdkova G, Hrdkova Z, Valsecky S, Dubinsky E. Effect of treatment with free and liposomized albendazole on selected immunological parameters and cyst growth in mice infected with *Alveomonas multi-foveata*. *Parasitol Int* 2004;53:3 E–22.
- [18] Red SI, Subramanyam K, Das PK. Detection of codon for amino acid 300 in isotype 1 beta-tubulin gene of *Haemonchus contortis* isolates, implicated in resistance to benzimidazole in other nematodes. *Acta Trop* 2002;86:77–81.
- [19] Hoopli KC. *Alveomonas coxi*, a new species of cestode from the mouse. *J Parasitol* 1924;12:91–6.
- [20] Hrdkova G, Valsecky S. Effect of proglutinal and liposome-incorporated proglutinal on peritoneal macrophage activation in mice infected with *Alveomonas coxi* tetrahyrida (Cestoda). *Parasitology* 1997;114:475–82.
- [21] Tamura NB, Renter M, Gonzalez MKS. An experimental, NAEPH-diaphorase histochemical and immunocytochemical study of *Alveomonas vogae* tetrahyrida. *Int J Parasitol* 1999;29:787–93.
- [22] Brito L, Dominguez L, Hildrich R, Marin M. Effect of proglutinal on the uterine development of *Alveomonas coxi* in vitro. *J Helminthol* 2000;74:293–9.
- [23] Saldana J, Marin M, Fernandez C, Dominguez L. The toxicity of proglutinal against *Alveomonas vogae* (syn. *M. coxi*) tetrahyrida can be assessed using a model in vitro system. *Parasitol Res* 2003;89:447–52.
- [24] Markovskii MM, Hissaro CV, Ferreira S, Espinosa I, Galanti N, Zaha A, et al. In vitro agglutination induction of *Alveomonas coxi* (Cestoda) tetrahyrida. *J Parasitol* 2003;89:27–34.
- [25] Riggs PJ, Marinko M. Formation and secretion of calcareous bodies by the metacystidia (tetrahyridum) of *Alveomonas vogae*. *J Parasitol* 1991;77:492–602.
- [26] Espinosa I, Galanti N, Hissaro CV, Ferreira SB, Zaha A, Galanti N. Early post-larval development of the entoparasitic platyhelminth *Alveomonas coxi*: again provides insights into tegumental damage leading to uncontrolled cell proliferation and growth. *J Cell Physiol* 2005;162:211–7. doi: 10.1002/cp.10883.
- [27] Robertson NG, Cain GD. Characterization of polysaccharides of the eggs and adults of *Alveomonas mussoni*. *Mol Biochem Parasitol* 1984;10:99–109.
- [28] Specht D, Vogt M. Asexual multiplication of *Alveomonas tetrahyrida* in laboratory animals. *J Parasitol* 1963;51:268–72.
- [29] Hart JL. Studies on the nervous system of *Tetrahyrida* (Cestoda: *Alveomonas*). *J Parasitol* 1967;53:803–9.
- [30] Novak M. Quantitative studies on the growth and multiplication of tetrahyrida of *Alveomonas coxi* Hoopli, 1925 (Cestoda: Cyclophyllidae) in rodents. *Can J Zool* 1972;50:1189–96.
- [31] Hissaro CV. Ultrastructural study of the tetrahyridum of *Alveomonas coxi* Hoopli, 1925 (Cestoda): pool of generative cells and suckers. *Rev Suisse Zool* 1981;88:661–74.
- [32] Hissaro CV. Ultrastructural study of the tetrahyridum of *Alveomonas coxi* Hoopli, 1925 (Cestoda): tegument and parenchyma. *Z Parasitenk* 1980;61:113–28.
- [33] Robert J, von Brand T, Vogt M. Asexual multiplication of *Alveomonas coxi* (Cestoda) in the intestines of dogs and shrews. *J Parasitol* 1969;55:261–9.
- [34] Novak M. Efficacy of a new cestocide, proglutinal, against larval *Alveomonas coxi* and *Tawari* cysteids in mice. *J Parasitol* 1977;63:949–50.
- [35] Hrdkova G, Valsecky S, Coker JA. Effect of free and liposomized proglutinal on the surface morphology and motility of *Alveomonas vogae* tetrahyrida (syn. *M. coxi*; Cestoda: Cyclophyllidae) in vitro. *Parasitol Res* 1998;94:230–8.
- [36] Deyan AD. Albendazole, mebendazole and proglutinal. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop* 2003;68:61–86.
- [37] Blair RL, Bennett JL, Fox RA. *Alveomonas mussoni*: cytopathic characteristics of phorbol ester-induced muscle contraction. *Exp Parasitol* 1994;78:100–16.
- [38] Jongsomkiet W, Sathapong S, Solihon P, Sitongkiet S, Kongsamrangsak N. Effects of proglutinal and albendazole on the tegument of adult *Alveomonas multi-foveata* harboured in mice. *Parasitol Int* 2005;54:177–82.
- [39] Wain PM, Kunt SS, Miller RR. Activation of protein kinase C by phorbol esters disrupts the tegument of *Alveomonas mussoni*. *Parasitology* 1994;109:661–8.
- [40] Shukla X, Singhal S, Chatter J, Taneer M. Tegumental changes in adult *Alveomonas mussoni* harboured in mice treated with proglutinal emulsion. *Acta Trop* 2000;78:107–17.
- [41] Apichanant W, Solihon P. *Opirioketia viverrini*: effect of proglutinal on the adult tegument. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1996;27:204–11.
- [42] Kohn AB, Roberts-Mistry JM, Anderson PA, Khan N, Greenberg RM. Specific sites in the beta 1 interaction domain of a rhesus monkey Ca²⁺ channel beta subunit are key to its role in sensitivity to the anti-arrhythmic drug proglutinal. *Parasitology* 2003;127:349–56.
- [43] DeWard MD, Pragnell M, Campbell KP. Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* 1994;13:693–703.
- [44] Kohn AB, Anderson PA, Roberts-Mistry JM, Greenberg RM. *Alveomonas* calcium channel beta subunit: unusual modulatory effects and potential role in the action of the anti-arrhythmic drug proglutinal. *J Biol Chem* 2001;276:46873–6.
- [45] Low MG, Huang KS. Factors affecting the ability of glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D to degrade the membrane anchors of cell surface proteins. *Biochem J* 1991;276:683–91.
- [46] Kinoshita H, Newman J, Lincoln B, Solihon LA, Gershman LC, Bates JL. Ca²⁺ regulation of glycine activity: binding and coupling of F-actin. *Biophys J* 1996;70:1161–9.
- [47] Gehret GN, Jones MK, Steward DD. Ultrastructural analysis of the adult *Alveomonas japonicum* by lectin cytochemistry. *Int J Parasitol* 1998;28:845–52.
- [48] Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the motility of actin and mechanism of drug resistance to benzimidazole. *Int J Parasitol* 1998;18:985–916.

- [17] Perez-Serrano J, Denegri G, Casado N, Rodrigo G, Rodriguez-Cabello F. Anti-tubulin immunohistochemistry study of *Edineovum grossi*/case protozoans incubated with albendazole and albendazole sulphoxide in vitro. *Parasitol Res* 1995;31:338–40.
- [18] De Nolle S, van den Bossche H. Biochemical effects of mebendazole on *Trichostrongylus axei* larvae. *J Parasitol* 1973;59:593–6.
- [19] Blazynski CN, Bengtson MR, Blacharskiy PK, Zaha A, Segayer MC, Farias RB. Differentially expressed sequences from a cestode parasite reveals conserved developmental genes in Platyhelminthes. *Mol Biochem Parasitol* 2002;144(1):114–8.

CAPÍTULO II. ESTABELECIMENTO DE CULTURAS CELULARES PRIMÁRIAS DE *MESOCESTOIDES CORTI*

Com o objetivo principal de desenvolver ferramentas que auxiliem no estudo, de forma mais direcionada, da bioquímica e fisiologia do metabolismo celular de parasitos, da regulação e controle da expressão gênica e de resposta a drogas anti-helmínticas, buscou-se estabelecer e caracterizar linhagens celulares do platelminto parasito *M. corti*. As fases larval e adulta, cultivadas *in vitro*, foram utilizadas para o isolamento de células.

Em experimentos prévios, foi demonstrado que quando tetratirídeos eram expostos a um pré-tratamento com tripsina para induzir segmentação (Markoski *et al.*, 2003), este causava o destacamento de um grande número de células, que se mantinham viáveis durante até 5 dias em cultura. Após a padronização das melhores condições para desprendimento, a origem das células, como pertencentes à *M. corti*, foi confirmada. Foram então estabelecidas as condições para o cultivo, onde as células desprendidas eram capazes de manter-se viáveis durante um período, pelo menos, superior a 15 dias, que permitisse o desenvolvimento de testes experimentais. *In vitro*, estas células secretaram uma densa matriz extracelular. Após análise da morfologia celular, através de experimentos de citoquímica e imunofluorescência, buscou-se caracterizar os componentes da matriz secretada. Platelmintos parasitas possuem um grande número de células armazenadoras de glicogênio, o principal material de reserva destes organismos. Estes helmintos também apresentam N-acetil-glicosamina na constituição do tegumento. Assim, foi analisada a detecção da presença de açúcares na constituição da matriz secretada. Como GAGs são constituintes de matrizes extracelulares dos mais diversos tipos de tecidos e organismos, era possível que estas moléculas também pudessem estar sendo secretadas pelas células cultivadas e sua presença também foi estudada.

Foi possível caracterizar parte dos componentes da matriz, identificando a presença de carboidratos neutros e carregados. A síntese do ácido hialurônico, importante GAG constituinte de matriz, foi determinada em experimentos de ELISA. A seguir, reportamos o manuscrito a ser submetido ao periódico *European Journal for Cell Biology* com os dados referentes ao estabelecimento da cultura primária de células desprendidas dos estágios larval e adulto do parasito *M. corti*.

ESTABLISHMENT OF PRIMARY CELL CULTURES OF THE PARASITE
PLATYHELMINTH *MESOCESTOIDES CORTI* (CESTODA).

Melissa M. Markoski^{1*}; Alice Laschuk¹; Isabel Neves²; Edvaldo S. Trindade^{2**}, Lucía Canclini³; Gustavo Chemale^{1***}; Adriana Estevez³; Helena B. Nader²; Norbel Galanti⁴; Arnaldo Zaha¹; Henrique B. Ferreira^{1****}.

¹Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Disciplina de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal do São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

³Laboratório de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

⁴Laboratório de Biologia Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

*Current address: Laboratório de Fitobacteriologia, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Bento Gonçalves, 7712, 90540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Current address: Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná.

***Current address: Institute of Biological Sciences, Edward Llwyd Building, The University of Wales Aberystwyth, Ceredigion, Wales.

**Corresponding author: LBMC, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Cx. Postal 15005, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: +55 51 3308 7768 Fax: +55 51 3308 7309

Email adress: henrique@cbiot.ufrgs.br (H. B. Ferreira)

Abstract

In this work we have isolated and established primary cell cultures from *Mesocestoides corti*, a platyhelminth parasite capable of in vivo and in vitro asexual reproduction as well as strobilation in appropriated culture conditions. Primary cell cultures from both tetrathyridia and segmented worms were standardized considering detachment and incubation conditions. Isolated cells can be cultivated in standard mammalian culture media, as RPMI or DMEM, supplemented with fetal bovine serum, at 37°C and 5% CO₂. Scanning and optical microscopy revealed at least two main cell populations with average diameters of 2 and 7µm. Both cell types were able to survive for up to 60 days, secreting large amounts of extracellular matrix. We are able to show that these cells were proliferative for up to 28 days. Cytochemical and immunological analyses identified some of the extracellular matrix compounds as neutral and charged carbohydrates, glycosaminoglycans and proteins.

Key words: *Mesocestoides corti*, Platyhelminthes, Cestoda, primary cell culture, in vitro culture, immunofluorescence, scanning electron microscopy, extracellular matrix.

Introduction

Cell lines and primary cultures can be used as experimental tools to study cellular processes such as cell signaling and protein recruitment and to assess drug-mediated intracellular effects. Drug delivery and activity studies in whole parasitic platelminth organisms are complicated by the presence of tegument syncytium and parenchyma tissues, which might act as barriers to external agents. However, these experimental limitations could be surmounted by the establishment of cell lines and/or primary cultures from model organisms of this parasitic group. Furthermore, secretion products of cultured cells might provide useful material to study and modulate a variety of biochemical and mechanical signals acting in intra and extracellular context.

Some research has been carried out to establish cell lines from platyhelminths (Fiori et al., 1988; Hobbs et al., 1993; Toledo et al., 1997). However, some of the methodologies used did not eliminate some problems as contaminations of host materials, lack of proliferation, manipulation security, low reproducibility of experiments, and large cell mortality (Bayne, 1998). Hence, it is necessary a better standardization of worm cell lines establishment minimizing troubleshooting.

Mesocostoides corti, a cestode that does not include man as a host in its life cycle, can be used as a good model for the establishment of cell cultures. This platyhelminth is capable of asexual reproduction, both *in vivo* and *in vitro*, and strobilization and partial sexual development *in vitro* (Markoski et al., 2003). These characteristics allowed this worm to be largely used in developmental biology, pharmacology, physiology, and immunology experiments (Kammerling et al., 2005; Markoski et al., 2006).

Here, we describe the isolation and establishment of *M. corti* primary cell cultures. Cells were detached from tetrathyridia (larval stage) or adult worms and have been maintained in culture for up to 60 days. Our studies demonstrate that detached cells can be cultivated in RPMI medium supplemented with 20% FBS under 37°C and 5%CO₂ incubation. The cell cultures from both tetrathyridia and adult worms contained at least two morphologically distinct cell populations and they were able to synthesize extracellular matrix. Viability tests, microscopic analysis and preliminary biochemical characterizations of the extracellular matrix have been carried out.

Material and Methods

Collection of parasites and culture conditions

Balb/C mice and Wistar rats were used as hosts to maintain *M. corti* tetrathyridia by serial passages as described by Markoski et al. (2003) and following standard animal care norms (Trapp and Taylor, 1986). After 3 months of intraperitoneal infestation, hosts were euthanased by cervical dislocation, and larvae were aseptically collected and transferred to culture. Tetrathyridia in vitro cultures and strobilation induction were carried out as previously described (Markoski et al., 2003). Briefly, samples of 300-500 tetrathyridia were cultivated in horizontal 25cm² flasks (Corning) in a modified RPMI 1640 (Life Technologies) medium (McRPMI, 6 ml/flask), supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and with addition of gentamicin (Shering-Pough) to 100 µg/ml. Strobilation, was induced by a 24h incubation with 10⁵ BAEE/ml of trypsin (Sigma-Aldrich) in McRPMI at 39°C and in a 95%N₂/5%CO₂ atmosphere in a CO₂ incubator (Sanyo). Tetrathyridia, treated or not

to induce strobilation, were kept in culture for 6-10 days (time necessary for full strobilation of treated larvae), prior to cell detachment procedures.

Cell detachment and standard culture conditions

Cells were isolated from parasites through a combination of protocols using enzymatic and mechanical detachments. Collagenase type I (Gibco), 0.05g/l, was prepared in Hank's Balanced Salts Solution (HBSS); and 0.25g/l trypsin (Sigma-Aldrich), was dissolved in a 0.02g/l EDTA solution. Tetrathyridia and adult worms were collected from culture and each 100 μ l, containing 300 worms, were distributed in mortars (Chiarotti) and incubated in collagenase or trypsin solution, during 3 min at room temperature. After the enzyme treatment, the cellular extracts were mechanically homogenized, during 2-5 min, using a pestle (Chiarotti). McRPMI medium containing 20% FBS was added to the homogenate. The suspension was decanted during 30 min at room temperature and centrifuged at 950 rpm for 5 min to medium discharge. The cellular pellet was suspended in McRPMI medium supplemented with 20% FBS. Cells detached by these methods were cultivated in a standard protocol: incubation in 37°C temperature, 5% CO₂ partial pressure, using McRPMI medium supplemented with 20% FBS. Medium changes were performed every 2 days, collecting the supernatant and centrifuging in 950 rpm, during 5 min, and suspending in new McRPMI medium. Further, other mammalian media were also used to cultivate *M. corti* cells: DMEM (Life Technologies), RPMI 1640 (Life Technologies), McRPMI and CMRL 1066 (Sigma-Aldrich). Eventually, suspension material and adherent cells were collected and tested for contamination in proper conditions to bacteria, mycoplasma and yeast.

Viability and proliferation assays

To test viability, living cells dye exclusion was followed after staining with 0.4% (w/v) trypan blue (Gibco). Prior to test with dye exclusion, cells were permeabilized using 20mM of Triton X-100 (Merck) and stained with Sytox Green (Molecular Probes), according to manufacturer recommendations.

Cell proliferation was tested firstly using 5-bromo 2'-deoxy-uridine (BrdU) incorporation (Zymed Laboratories Inc.). Cells were detached and distributed in 12 well plates, 10^4 cell/ml, $n=8$ per experimental sample. Following the standard protocol of culture, $10\mu\text{M}$ of BrdU solution (1mM dissolved in PBS) was added to the wells with seeded cells for 6, 12 or 24h. Medium and coverslips collected were rinsed 5 times in PBS by immersion or by centrifugation at 950 rpm. Coverslips and suspension materials were fixed in cold 70% ethanol for 30 min at 4°C . Suspension was floated over slides and all glass material was coated using 3% H_2O_2 /methanol for 10 min. Half of the samples (4 coverslips and 4 floated suspension) were incubated with the primary and secondary antibodies following the BrdU manufacturer's recommendations. After secondary antibody incubation, these samples were denatured in ethanol (Merck) gradient, cleared in xylene (Merck) and slide-mounted in Histomount (Zymed Laboratories Inc). The other half of the samples, after denaturation and primary antibody incubation (1:100 dilution), were subjected to a different protocol for detection of incorporated BrdU. In these samples, it was used an other secondary antibody: 1:200 of Alexa Fluor 488-conjugated antibody α -Mouse Gold (Molecular Probes). After antibody labeling, samples were washed in PBS, nuclei were stained with Hoechst dye (Molecular Probes) and slide-

mounted in 50% glycerol (Sigma-Aldrich) in aqueous solution. To negative controls, the protocol was followed with samples without BrdU adding. The CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes) was also used to test proliferation along culture days, following the manufacturer instructions. A standard curve was obtained to quantify the cell number, according to the optical density (OD) reading, using NIH3T3 cell line as positive control and serial dilutions of tetrathyridia recently detached cells. After this standardization, cells were cultivated in sterile 96 well black microplates (Axygen) and the OD reads were obtained in a fluorescence microplate reader (Molecular Devices Corporation) in different intervals of hours (2 to 140h). Having the OD reads, the cell number present in an average of 4 wells was calculated.

Karyotyping of cultured cells

Sets of cells recently detached from a mouse and collected from 10 days culture were submitted to 1, 3, 6, 12, 24 or 48h incubation in presence of 100 μ g/ml (w/v) colchicine. Cells were collected from culture, passed to 1.5ml microtubes (Axygen) and maintained during 5 min in a sodium citrate (Merck) 1% aqueous solution. Citrate was removed after 950 rpm centrifugation of cells. Cells were floated in slides and fixed into glass Coplin jars using ethanol:acetic acid:water (3:3:4), ethanol:acetic acid (1:1), and only glacial acetic acid, during 1 min to each fixing solution. After fixation, the slides were dried at room temperature during 2h. Slides were stained in Feulgen solution (Guerra and Souza, 2002).

Sets of cells recently detached from a mouse and collected from 10 days culture were taken to cytometry analysis, following 0.2% of triton x-100 (Merck)

permeabilization and labeling at 1 µg/ml of propidium iodide (Molecular probes) in the dark during 30 min at 4°C. Cells of the murine line NIH3T3 were used as negative control. Samples were centrifuged at 950 rpm, suspended in PBS and carried to the flow cytometer (NPE Systems). Data were obtained using the Cell Quest and WinMDI 2.8 Softwares.

Species-specific PCR amplification

Culture flasks containing seeded 105 cells/ml from *M. corti* were incubated in standard protocol for 10 days. NIH3T3 cells were also incubated in the same initial conditions in DMEM medium for 5 days. Both cultures were collected, rinsed and submitted to DNA isolation using the Perfect gDNA Blood Kit (Eppendorf).

Each 100ng/µl of DNA isolated and a control murine cDNA was used as template in PCR experiments containing 10 µM/Reaction of primers (forward, 5'-CCGAACACACTGGTTCCTACTG-3' and reverse, 5'-CAGTGCTGATAGCCAGGACA) designed specifically to amplify an EST (Genebank accession code CX864683) of a *M. corti* cDNA library (Bizarro et al., 2005). Sets of primers (10 pmoles/µl/reaction) designed to conserved and variable regions of actin genes were used as controls to amplify products from all DNA or only murine DNA templates, respectively. PCR were performed using *Taq* and *Pfx* DNA polymerases (Invitrogen) with polymerization and annealing temperatures set according the enzyme requirement and primer T_m, respectively. Electrophoresis of PCR products were performed in 2% (w/v) agarose gel using TBE1X as buffer (Sambrook and Russell, 2001).

Antibody production and western blot

An extract of cells detached from tetrathyridia collected from a Wistar rat were used to immunize intraperitoneally a Balb/C mouse. Around 50 μ g in 1 ml were emulsioned in an equivalent amount of Freund complete or incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich) being inoculated 3 times at each 15 day intervals. The produced antiserum, at 1:100, was used to probe crude proteic extracts from *M. corti* tetrathyridia, cells cultured for 10 days, and tissues (liver, gut, skin and stomach) from a mouse. Western blot was made using anti-mouse peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich).

Cell immunofluorescence

Hoechst (Molecular Probes) was used for cell nuclei staining and a rabbit α -actin 76-375 human (Santa Cruz Inc.) for cytoplasm labeling. Cells recently detached were seeded over coverslips in 12 well plates. After 4 and 8 days of culture, both coverslips and suspension material were collected and washed in PBS. Suspension material was concentrated by gentle centrifugation and each 10 μ l were floated over glass slides. Slides and coverslip material was fixed in 2% paraformaldehyde (EMS) for 1h at 4 $^{\circ}$ C. Glass material was washed 3x in PBS and blocked with CasBlock (Zymed Laboratories Inc.) for 2h at 37 $^{\circ}$ C in humidified chamber. Primary antibody α -actin was added at 1:100 with a 1% BSA (Sigma-Aldrich)/0.1% saponine (Sigma-Aldrich)/3% calf normal serum (Life Technologies)/PBS blocking solution for 2h at 37 $^{\circ}$ C. After rinsing in PBS, cells were incubated with 1:200 concentration of the α -rabbit Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) conjugated-secondary antibody in the dark for 1h at 37 $^{\circ}$ C. Slides containing cellular material in suspension and coverslips with

adherent cells were also incubated with only the secondary antibody to be used as negative controls. Slides and coverslips were washed 3X in PBS, stained in Hoechst (50ng/sample) for 5 min, mounted using 50% glycerol solution.

Cytochemistry and histochemistry

Feulgen/fast green protocol (Mello and Vidal, 1978) was used for visualizations of cells. Cells adhered in coverslips and suspension culture material were collected and rinsed in PBS. Sodium citrate (Merck), 1% (w/v), was added to tubes during 10 min at room temperature. Citrate was removed by centrifugation and cells were fixed in 2% paraformaldehyde (EMS) during 24h at 4°C. Cellular material was dehydrated in ethanol series, hydrolyzed in 5N HCl (Merck), and stained with Feulgen for 30 min, in the dark, and fast green for 15 min at room temperature.

Cells, detached from tetrathyridia, grown on coverslips in 12 well plates were submitted to PAS staining (McManus, 1946). Coverslips and suspension were washed in PBS as standard protocol. Suspension material was spread over slides and dried at room temperature for 1h. Slides and coverslips were fixed in cold 100% methanol for 30 min at 4°C in Coplin jars. Samples were then oxidized in 0.5% periodic acid (Merck), for 10 min at room temperature, and stained with Schiff's reagent for 10-20 min. Three washes in sulfur water (5 min each), Harris' Haematoxylin contrast during 7 min, water rinsing, ethanol series dehydration, xylene clearing, and slide-mounting in Entellan synthetic resin (Eukitt) were made.

The Alcian Blue method (Spicer, 1965) was used to stain carboxylic and sulfated mucosubstances in the extracellular matrix secreted. Cell suspension was collected in days 0, 4 and 8 and spread in slides. After fixation, as described in PAS

protocol, samples were stained with a pH 2.5 alcian blue solution for 30 min at room temperature. Slides were treated and mounted in Entellan resin, as in PAS protocol.

Arteta's protocol (Lopez et al., 1982) was followed to test whether collagen was present in the material secreted by the cultured cells. Coverslips and suspension material, once spread on slides, were fixed in cold 100% methanol inside Coplin jars. Firstly, the nuclei were stained using Harris' Haematoxylin dye during 7 min and washed in running and distilled water. Slides and coverslips were treated in eritrosin/orange G (both reagents from Sigma-Aldrich) aqueous solution during 7 min. The samples were then submitted to 0.5% phosphotungstic acid during 10 min and quickly washed to receive the 1% toluidine blue staining during 2 min. Slide treatment post-staining and mounting was made as in PAS and Alcian Blue protocols.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to hyaluronic acid quantification

An ELISA (Martins *et al.*, 2003) was used to determine and quantify hyaluronic acid. Cells were seeded in 6 well plates (Corning) and collected after 5 days in culture ($n=3$). The cells were scrapped of the plate surface and the media was submitted to a high centrifugation to separate soluble from insoluble molecules. All samples were suspended in a 5mM Tris (Merck) buffer/1%BSA (Sigma) at pH7.5. A 96 well plate (Corning) was coated using 1 μ g/well of a hyaluronan-binding protein (HABP) during 18h at 4°C. After blocking time, samples were distributed along the plate and in dilutions of 1:4 and 1:4:50, all in triplicates. A standard curve with quantified amounts of hyaluronic acid was used as control. The incubation time of hyaluronic acid and linkage to the binding-protein was 18h at 4°C. The samples

received 100ng/well of the HABP plus biotin during 2h at 4°C. Plate was rinsed 6 times in PBS and labeled with streptavidin-europium conjugate (Molecular Probes) during 30 min. Rinses and reads were performed in an ELISA microplate washer and reader (Bio Tek).

Scanning electron microscopy analysis

For SEM, the standard protocol included steps of fixation, dehydration, critical point drying and gold coating. Cells from tetrathyridia and 6 days-strobilized worms were detached and cultivated, at the standard protocol, upon coverslips ($n=4$) inside 35mm petry dishes (Corning), for up to 28 days. Coverslips were collected in 1, 3, 7, 14, 21 and 28 cultured days and fixed in 2% paraformaldehyde/2% glutaraldehyde/PBS during 24h. Coverslips were rinsed in PBS and dehydrated in acetone series (30, 50, 70, 90 and 100%). After 8 successive cycles of acetone/CO₂, cells were dried to the critical point, coated with gold and carried to the scanning microscope. The critical point and gold coating were made in appropriate equipment (Balzers). Scanning microscopic analyses were proceeded using the JSM5800 or JSM6060 (Jeol) microscopes.

Optical microscopy and image capturing

Inverted and light microscopy analyses were made in Axiovert 25 and Axiolab HBO 5A/ac microscopes (Carl Zeiss). Fluorescence microscopic analyses were made in OptiPhot microscope (Nikon). Micrographies were taken in a digital Sony HAD camera (Sony). All micrographies were processed using the Corel Graphics Suite Package 11 software (Corel Corporation).

Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) test was applied to analyze variance along culture days. The comparisons among BrdU incorporation rates were made by heterogeneity chi-square tests using the Programs for Epidemiologists (PEPI) package (Gahlinger and Abramson, 2000). Differences between means were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Establishment of *M. corti* primary cell cultures

Fresh tetrathyridia and segmented worms, cultured for 6 days after strobilization induction, were collected and submitted to enzymatic and mechanic treatment for cell detachment. After incubation with the different proteolytic enzymes, cells were counted. Tripan blue staining showed that cells were viable. Using collagenase enzyme, an average of 1.3×10^7 cells/ml was detached while 6.8×10^6 cells/ml was obtained after trypsin treatment. However, when cells were seeded in 24 well plates in a density of 10^4 cells/well, in 4 culture days, those cells detached by trypsin treatment were much more proliferative than those isolated by collagenase treatment (Fig. 1A). Eventually, using trypsin, an average of 5×10^8 cells were obtained to each 3,000 tetrathyridia for the posterior experiments. We found that medium McRPMI supplemented with 20% FBS was the best culture condition for both cell growth and proliferation. (Fig. 1B). Cells cultured in both RPMI 1640 and CMRL 1099 showed low viability and rate of proliferation (data not shown). Figure 1C

shows cells and calcareous bodies recently detached from tetrathyridia. The continuous culture of cells showed the secretion of an extracellular matrix (Fig. 1D). Daily observations, at inverse-phase microscopic, associated with trypan blue staining showed that cultures consisted of cells that were capable of extracellular matrix synthesis for up to 60 days.

Experiments of BrdU incorporation were performed to assay proliferation of cells grown adhered to coverslips and in suspension. In microscopic analysis, BrdU-positive cells were counted considering 4 different randomly chosen microscopic fields. The average of BrdU-positive samples relative to the total number of cells counted in each field, at each time interval, is shown in Fig. 2A. These tests also revealed that in short time intervals there were more cells in suspension while in higher intervals, cells were adhered to coverslips. (Fig. 2A). It really occurs that most of the culture cells tended to decant and adhere to the coverslip surface, fact also observed by daily optical microscopic analysis. CyQuant quantitative method was used to verify cellular proliferation for periods of time from 2 to 140h (Fig. 2B). Results revealed that there was not a great number of cells present in the first hours but, along the days, populations of cells proliferated and established as a cellular primary culture. The primary cultures were named McCellTetra to populations isolated from tetrathyridia and, McCellSeg to those detached from strobilized worms.

We performed karyotyping to confirm the biological origin of both McCellTetra and McCellSeg. After 6h of incubation with colchicine, it was observed small chromosomes in $2n=14$ for both cells recently detached and cells cultured for 10 days (Fig 3). Flow cytometry analysis revealed that McCellTetra cell DNA content was quite distinct from that of NIH3T3 cells (data not shown), providing additional evidence that these cells are, in fact, from *M. corti* tetrathyridia. Chromosomes

number, cells size and morphology are different comparing McCellTetra and the murine NIH3T3 line. PCR amplification of an expected 250 bp fragment using cell-isolated DNA also confirmed that cultured cells are originated from *M. corti* (data not shown). A western blot experiment showed reaction using antisera from Balb/C mice immunized with cells detached from tetrathyridia, isolated from Wistar rats, with larva and cell extracts (data not shown).

Cell morphology analysis

Cytochemistry, associated to optical, fluorescent and electron microscopy, was used to morphologically evidence nuclei and cytoplasm of *M. corti* cultured cells. Feulgen and fast green were used to define nucleus and cytoplasm of cells recently detached from tetrathyridia (Fig. 4A,B). It was possible to observe the presence of mitotic cells (Fig. 4B). To stain cells along culture days it was used Hoechst for nuclei and an α -actin FITC-conjugated antibody to cytoplasm (Fig. 4C-N). According to this labeling, we distinguished two different cell subpopulations based on size: bigger cells (for example, Fig. 4C), with an average size of $7\mu\text{M}$, most frequent in adherent surface; and smaller cells (for example, Fig. 4L), with average size of $2\mu\text{M}$, grouped in suspension. These subpopulations were observed also in cultures of days 4 and 8. The SEM was used to analyze the cell shape and surface in different culture days. Cells seeded on coverslips were fixed in days 3, 7, 14, 21 and 28 and processed for scanning microscopy visualization. Fig 5 (A-I) shows the cells and secreted extracellular compounds fixed at different time intervals. First, the analysis confirmed the immunofluorescence results, where there were different cell subpopulations (Fig. 5A,F). It was also observed that, indeed, cells detached both from tetrathyridia and from segmented worms produced large amounts of extracellular matrix that form net-

shaped structures (Fig. 5H). We also observed some structures possibly corresponding to sugar crystals and calcareous corpuscles (Fig. 5G,I, respectively).

Analysis of extracellular matrix

In order to analyze its chemical composition, the secreted material produced by the primary culture cells were stained for carbohydrates, GAGs and proteins. First, different staining methods have been used to follow the synthesis in cultures for up to 8 days. Using PAS protocol, it was verified the presence of neutral carbohydrate moieties in the extracellular matrix secreted (Fig. 6A-D). These moieties were very dense in posterior culture days, mainly in the suspension samples. The alcian blue at pH2.5 was used to stain acidic and neutral glucosaminoglycans (Fig. 6E-G). Nevertheless, there was only a few staining indicating that neutral carbohydrates can be more representative in the synthesized extracellular matrix. Arteta staining showed that there is no collagen secretion along culture days, but also revealed that exist a low remaining (or formation?) of tissues is suspension material marked by eritrosin/orange G (Fig. 6H-M). There were only blue small corpuscles that might be those known as the tegument cytons, present in platyhelminths (for example, Fig. 6H, M). In fact, such points could be observed in SEM analysis (Fig. 5C). Using ELISA, we could identify and quantify the hyaluronic acid synthesized by these cells (Fig. 7). It seems that there was almost three times more hialuronan in suspension material (84 mg/ml), both in soluble and insoluble fractions, than in adhered matrix (28 mg/ml) along 5 days.

Discussion

Recent molecular data suggest that the platyhelminthes constitute a polyphyletic phylum and would be the first animals in the *Lophotrochozoa* clade to present body segmentation (Baguna and Riutort, 2004), features that make this phylum attractive for developmental biology studies. Besides, the phylum includes the three classes mostly formed by parasitic worms, some of which are etiological agents of important human and veterinary diseases (Aguilar-Rebolledo et al., 2002; Hanna et al., 2005; Lorenzo et al., 2005). The genera *Schistosoma*, *Echinococcus* and *Taenia* include parasites that are studied in immunology, pharmacology, physiology and molecular biology. All include humans as hosts in their life cycles, implying in some risks to experimental manipulation. The generation of biological materials from these species also is difficult. In this way, a parasite platyhelminth, closely related to these worms, but which does not present such problems, would be an interesting tool for diverse studies.

In this work, we could establish cultures of cells detached from both *M. corti* larval and strobilated worms. The platyhelminth primary cell cultures could be maintained for up to 60 days in appropriate conditions. The *M. corti* karyotype obtained from both the recently detached as well as 10 days cultured cells, confirmed the one previously described (Raghunathan and Voge, 1974). Differently of what happens in turbellarians, that might present polyploid karyotypes conformations (Gremigni et al., 1980), in *M. corti* cultured cells, based on flow cytometry analysis, it seems that ploidy was only observed in the $2n$ typical pattern. PCR reactions using specific designed primers and templates to both murine and *M. corti* cell DNA, flow cytometry and western blot experiments also confirmed the cell culture origin. Cultured cells appeared with populations of different sizes, with average sizes of 2

and 7 μm , with different morphologies (spherical or irregular forms), proliferating and, at least some of them, able of secrete large amounts of extracellular matrix.

Some of the specialized cell types from the tetrathyridium body have already been described: the small cytons in tegument (Hess, 1980); muscle and glycogen storing cells constituting the parenchyma (Hess, 1980); differentiated cells, as neurons, present in ganglia (Terenina et al., 1999); flame cells, principally located in the posterior body end (Markoski et al., 2006); calcareous corpuscles, mineral concretions formed from a specialized cell type (Vargas-Parada and Lanclette, 1999), eventually observed in the first days of culture but removed by the medium changes, also found in the parenchyma (Etges and Marinakis, 1991). *M. corti* cultured cells were viewed basically as small, 1-2 μm and large cells, 5-8 μm (Hess, 1981). Small and larger cells are observed in the tetrathyridia and adult parenchyma, which points that the cultured cells could be originated from this tissue. The differences separating small and large cells were also shown in the oncosphere cells (Ogren, 1956). As described by Ogren (1956), small cells would be "somatic" ones while large cells are considered "germinative". In tetrathyridia, Hess (1981) classified the last as *dark* and *light* germinative cells but points that both germinative cell subtypes could be only two physiologic stages of a single cellular type (Hess, 1981). Cell types with the described morphology were seen even in 28 days of culture (Fig. 5F).

As previously shown by Hess (1981), the tetrathyridia muscle cells are, in fact, originated from germinative cells. The stem cells would be possibly distributed in all body and not in particular sites. In the *M. corti* adult, it was demonstrated by [^3H]-thymidine incorporation, that there were proliferating signals along ganglia in the entire worm's body (Espinoza et al., 2005). Even a high cell concentration on apical massif was described to tetrathyridia, experiments with BrdU showed that there are

signals in whole body in 24 h staining and it is unlikely that cells could be migrating from a single place to multiplication target sites at this time (Hess, 1980; Smith and McKerr, 2000). Our results also confirmed the 24 h of BrdU incorporation and they showed an increase of two more times in the number of BrdU-positives cell in relation to the first hours of analysis. This suggests that the cultured *M. corti* cells possess a 12 to 13 h cell cycle. Furthermore, these observations corroborate with the fact that it is possible that different cellular types, including multiplying and/or germinative cells, could be present in the in vitro culture. In fact, mitosis could be observed by haematoxylin staining (Fig. 6L) and proliferative cells could be viewed in up to 7 days as demonstrated by CyQuant method. Afterwards, based on cultured cells morphology analysis, using scanning microscopy, there was suggestion of cell duplications, which points that cells would remain proliferative even after 28 days in culture. In the trematode *S. mansoni*, germ cells appear as the most persistent in primary cell cultures (Bayne et al., 1994). In *T. crassiceps*, the addition of some growth factors, as the host's gonadotropin or concanavalin A, was eventually necessary to induce proliferation in primary cell cultures (Toledo et al., 1997). In our cultures, 20% FBS supplementation was supposed to be sufficient and essential to maintenance of proliferating cells. Nevertheless, we are now able to test the influence of medium additives, as growth factors and cell cycle regulators.

The *M. corti* cells were able of proliferation in culture conditions as well as they could secrete extracellular matrix. The extracellular matrix, a complex net of glycosaminoglycans, proteoglycans and proteins, is important to the maintenance of a great number of mammalian cell cultures. In fact, proteoglycans are the major constituents of connective tissues, such as the worm parenchyma. In our cultures, both adherent and suspension cells were possibly releasing carbohydrates, which

were present in higher concentrations at the suspension. Actually, glycogen is an abundant storing-energetic reserve in platyhelminths (Hess, 1980) and it is possibly involved in glucose distribution to different tissues (Willms et al., 2003). Alcian blue, a cationic dye, pointed to the presence of some acidic polysaccharides. In this way, a protocol based on the separation of glycosaminoglycans, using agarose gel electrophoresis in 1.3-diaminopropane acetate buffer, was attempted to evaluate the presence of chondroitin sulfate, heparan sulfate and dermatan sulfate (Dietrich et al., 1977). Nevertheless, we failed in isolating sulfated glycosaminoglycans from the cell cultures, being only obtained using tetrathyridia extract (unpublished data). Furthermore, it was quantified the hyaluronan produced by the cultured cells. The hyaluronic acid, one of the major extracellular-forming constituents, is responsible by the binding and migration between adjacent cells (Ponting and Kumar, 1995). In addition to the carbohydrate and glycosaminoglycan analysis, some proteins of the extracellular matrix were also characterized. As previously showed, the platyhelminthes tegument is rich in collagen, which also appear in suckers neighboring and basal lamina (Mehlhorn et al., 1983). Thus, corroborating with the observation of the collagenase strong action in cell detachment, it was possible that collagen was present in cellular cultures. Nevertheless, only a quite weak staining was shown in Arteta method revealing some blue points that could be the tegument cytons or other collagen aggregate. Once polarized light was used to measuring birefringence of suspension and adherent samples, it did not detect collagen fibers, which led us to believe that this protein was not present, in the extracellular matrix synthesized, in fibrile form. Further, using immunofluorescence, great masses of actin were detected in culture. Actin is a protein with strong association with extracellular matrix proteins such as integrin (Brakebusch and Fässler, 2003). Thus,

actin would be connected to integrin and its associated-proteins resulting in the very strong green pattern observed in the Fig. 4 (H, N). However, we can not ignore that the strong actin staining could represent a physiological injury status. In preliminary experiments using immunoblot with extracts of cultured cells and commercialized antibodies produced in mice and goat, it was identified a considerable number of proteins and proteoglycans in the extracellular matrix, such as fibronectin, laminin, integrin, collagen, heparin, and fucan (unpublished data). In summary, we were able to show neutral and charged carbohydrates, glycosaminoglycans and proteins forming the extracellular matrix synthesized by the primary cell cultures. We suggest that the secreted extracellular matrix would operate as a *feeder layer*, where communication and maintenance of cells could be facilitated, being essential to the cell survival.

There are only few cell lines successfully established to parasite worms, basically obtained from nematodes (Bayne, 1998; Higazi et al., 2004). In this work we showed that cestode primary cell lines could be established and standardized. In specific case of *M. corti*, cells could be proliferative for at least 28 days and viable, extracellular matrix secreting, for up to 60 days. As future prospects, we will continue the cell morphology characterization using transmission electronic microscopy as well as analyzing precisely other extracellular matrix compounds and its influence for the in vitro cell metabolism. It would be very interesting to answer how a relative few cell quantity is capable of generate a great mass of extracellular matrix. We are able to proceed using 2D electrophoresis to determine the expression profile of cultured cells and matrix. This primary cell cultures will be also used to test plasmid constructions transiently expressing reporter genes under *M. corti* promoters' control.

Acknowledgments

We would like to thank Gonzalo Cabrera, Veronica Jiménez and Rodolfo Paredes by their help in cytochemistry experiments and immunofluorescence analysis; Dr. Vera Gayesky, Tanise Knakievicz, and Marisa Santos-Collares, by their help in the karyotype experiments; Dr. Nance Nardi and Dr. Andreas Canedo, for their assistance in flow cytometry; Dr. Guido Lenz and Alessandra Tamajusuku by the donation of primers and murine DNA to PCR reactions; Dr. Manuel Simões, by his help with the histochemistry experiments; Dr. Carlos Termignoni and Antonio Pinto by their assistance in fluorimetric quantifications; Dr. Marilene Veinstein, Dr. Walquiria Arruda, and Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul for their support for scanning electronic microscopy; Dr. Cristiano Bizarro for manuscript critical reading. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Red de Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Parasitarias del Cono Sur de America Latina (RTPD Network, SIDA/SAREK). M. M. M. was a recipient of a predoctoral fellowship from CNPq.

References

Aguilar-Rebolledo, F., Meza-Lucas, A., Torres, J., Cedillo-Rivera, R., Enciso, A., Garcia, R.C., Munoz, O., Correa, D., 2002. Evaluation of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for diagnosis of neurocysticercosis in children. *J. Child Neurol.* 17:416-420.

- Baguna, J., Riutort, M., 2004. The dawn of bilaterian animals: the case of acoelomorph flatworms. *Bioessays*. 26, 1046-1057.
- Bayne, C. J., Menino, J. S., Hobbs, D. J., Barnes, D. W., 1994. In vitro cultivation of cells from larval *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 80, 29-35.
- Bayne, C. J., 1998. Invertebrate cell culture considerations: insects, ticks, shellfish, and worms. *Met. Cell Biol.* 57, 187- 201.
- Beiguelman, B., 2002. Curso prático de bioestatística. FUNPEC Editora, Ribeirão Preto.
- Bizarro, C.V., Bengtson, M.H., Ricachenevsky, F.K., Zaha, A., Sogayar, M.C., Ferreira, H.B., 2005. Differentially expressed sequences from a cetode parasite reveals conserved developmental genes in platyhelminthes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 144, 114-118.
- Brakebusch, C., Fässler, R., 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO* 22, 2324-2333.
- Dietrich, C.P., McDuffie, N.M., Sampaio, L.O, 1977. Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 130, 299-304.
- Espinoza, I., Galindo, M., Bizarro, C.V., Ferreira, H.B., Zaha, A., Galanti, N., 2005. Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocestoides corti*: trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth. *J. Cell Physiol.* 205, 211-217.
- Etges, F.J., Marinakis, V., 1991. Formation and excretion of calcareous bodies by the metacestode (tetrathyridium) of *Mesocestoides vogae*. *J. Parasitol.* 77, 595-602.

Fiori, P.L., Monaco, G., Scappaticci, S., Pugliesi, A., Cana, N., Cappuccinelli, P., 1988. Establishment of cell cultures from hydatid cysts of *Echinococcus granulosus*. *Int. J. Parasitol.* 18, 297-305.

Gremigni, V., Miceli, C., Puccinelli, I., 1980. On the role of germ cells in planarian regeneration. I. A karyological investigation. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 55, 53-63.

Guerra, M., Souza, M.J., 2002. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. FUNPEC-Editora, Ribeirão Preto.

Hanna, S., Gharibi, B., Lepidi, H., Montet, J.C., Dummon, H., de Reggi, M, 2005. Experimental schistosomiasis, protective aspects of granulomatous reaction in the mouse liver. *Parasitol. Res.* 96:6-11.

Hess E., 1980. Ultrastructural study of the tetrathyridium of *Mesocestoides corti* Hoespli, 1925 (Cestoda): tegument and parenchyma. *Z. Parasitenkd.* 61, 135-159.

Hess, E., 1981. Ultrastructural study of the tetrathyridium of *Mesocestoides corti* Hoespli, 1925 (Cestoda): pool of germinative cells and suckers. *Rev. Suisse Zool.* 88, 661-674.

Higazi, T.B., Shu, L., Unnasch, T.R., 2004. Development and transfection of short-term primary cell cultures from *Brugia malayi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 137, 345-348.

Hobbs, D.J., Fryer, S.E., Duimstra, J.R., Hedstrom, O.R., Brodie, A.E., Collodi, P.A., Menino, J.S., Bayne, C.J., Barnes, D.W., 1993. Culture of cells from juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasitol.* 79, 913- 921.

Kemmerling, U., Cabrera, G., Campos, E.O., Inestrosa, N.C., Galanti, N., 2005. Localization, specific activity, and molecular forms of acetylcholinesterase in developmental stages of the cestode *Mesocestoides corti*. *J. Cell Physiol.*, *no prelo*.

Lopez, M.L., Leyton, C., Graf, M.E., 1982. Técnicas de Histología y Citología. Universidad de Chile, Santiago.

Lorenzo, C., Ferreira, H.B., Monteiro, K.M., Rosenzvit, M., Kamenetzky, L., Garcia, H.H., Vasquez, Y., Naquira, C., Sanchez, E., Lorca, M., Contreras, M., Last, J.A., Gonzalez-Sapienza, G.G., 2005. Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double-blind, randomized multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2764-2770.

Markoski, M.M., Bizarro, C.V., Farias, S., Espinoza, I., Galanti, N., Zaha, A., Ferreira, H.B., 2003. *In vitro* segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *J. Parasitol.* 89, 27-34.

Markoski, M.M., Trindade, E.S., Cabrera, G., Laschuk, A., Galanti, N., Zaha, A., Nader, H.B., Ferreira, H.B., 2006. Praziquantel and albendazole damaging action on *in vitro* developing of *Mesocestoides corti* (Platyhelminthes: Cestoda). *Parasitol. Int.*, 55, 51-61.

McManus, J.F.A., 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature* 158, 202.

Mehlhorn, H., Eckert, J., Thompson, R.C., 1983. Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis*. II. Ultrastructural investigations. *Z. Parasitenkd.* 69, 749-763.

Mello, M.L.S, Vidal, B.C., 1978. A reação de Feulgen. *Ciência e Cultura* 30, 665-676.

Ogren, R.E., 1956. Development and morphology of the oncosphere of *Mesocestoides corti*, a tapeworm of mammals. *J. Parasitol.* 42, 414-428.

Ponting, J.M., Kumar, S., 1995. Isolation and characterisation of a hyaluronan binding protein, hyaluronectin, from human placenta and its colocalisation with hyaluronan. *J Anat.* 186, 131-142.

Raghunathan, L., VOGEL, M., 1974. Chromosome analysis of *Mesocestoides corti* (Cestoda). *J. Parasitol.* 60, 558-60.

- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Smith, A.G., McKerr, G., 2000. Tritiated thymidine ($[^3\text{H}]\text{-TdR}$) and immunocytochemical tracing of cellular fate within the asexual dividing cestode *Mesocestoides vogae* (syn. *M. corti*). *Parasitology* 121, 105-110.
- Smyth, J.D., McManus, D.P., 1989. *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press, New York.
- Spicer, S.S., 1965. Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically. *J. Hist. Cytochem.* 13, 211.
- Terenina, N.B., Reuter, M., Gustafsson, M.K.S., 1999. An experimental, NADPH-diaphorase histochemical and immunocytochemical study of *Mesocestoides vogae* tetrathyridia. *Int. J. Parasitol.* 29, 787-793.
- Toledo, A., Cruz, C., Fragoso, G., Lacleste, J.P., Merchant, M.T., Hernandez, M., Sciutto, E., 1997. *In vitro* culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *J. Parasitol.* 83, 189-93.
- Willms, K., Robert, L., Caro, J.A., 2003. Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in *Taenia solium* tapeworms from experimentally infected hamsters. *Parasitol. Res.* 89, 308-316.

Legends to Figures

Fig 1. Detachment and culture conditions establishment of *M. corti* tetrathyridia cells. (A) *M. corti* larva were treated with trypsin (dark bars) or collagenase (light bars) to the detachment of cells. Graphic bars represent the average counting of cells totally collected from three wells in each day ($F_{\text{calc}} = 11.33 > F_{0.05;1;23} = 5.99$). (B) Detached cells were cultured in McRPMI (light bars) or DMEM (dark bars) media. Graphic bars represent the average counting of cells totally collected from three wells in each day ($F_{\text{calc}} = 11.45 > F_{0.05;1;6} = 5.99$). (C) Optical micrography of recently detached cells. Arrowheads point to cells of different size types and arrows point to calcareous corpuscles (A=400x). (D) Panel of optical micrography, acquiring in inverted light microscope, of cells cultured in horizontal flasks after 24 and 72 h. Arrowheads point to the different cell sizes and arrows point to calcareous corpuscles (A=100x).

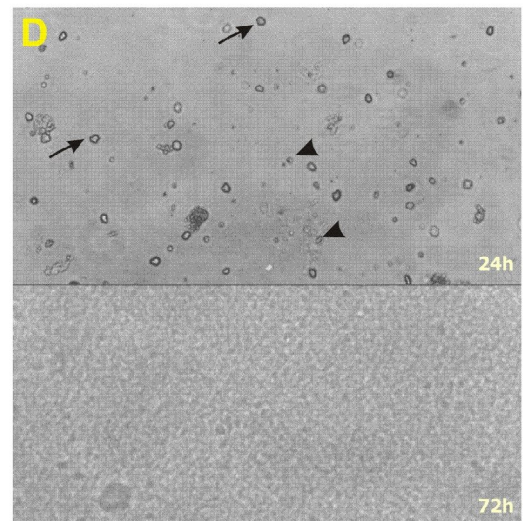
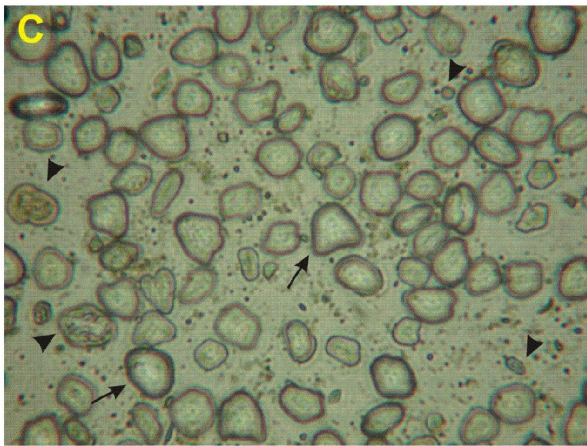
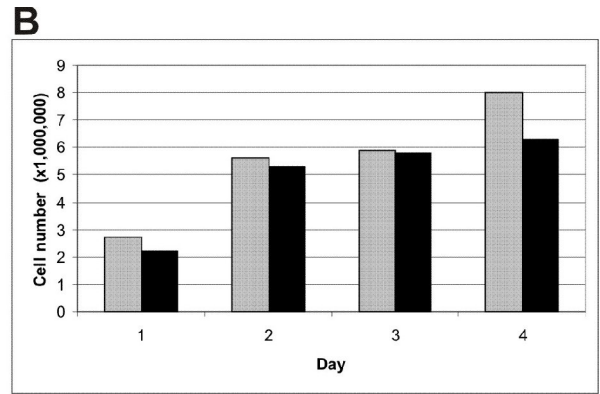
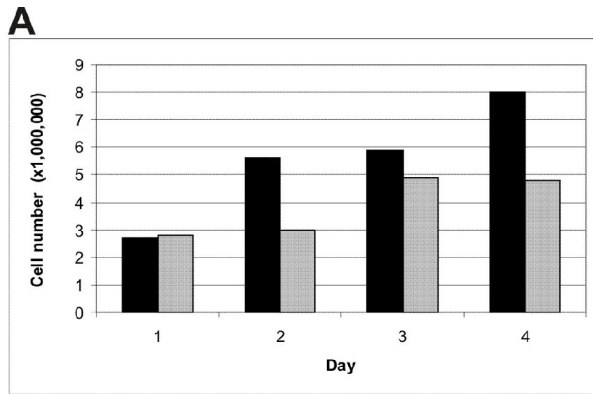
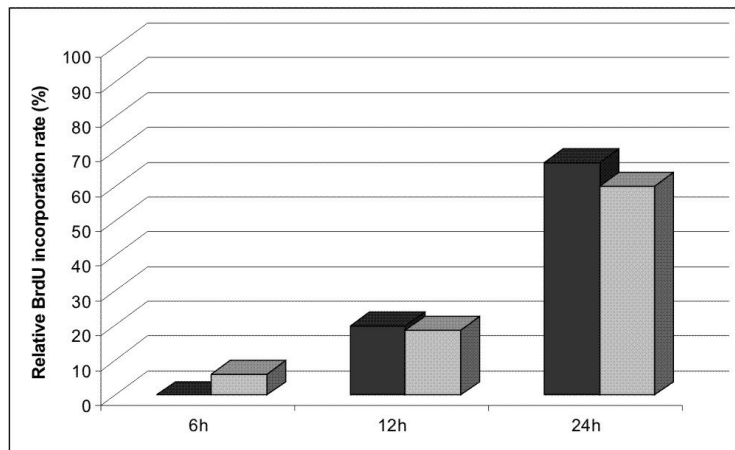


Fig 2. Proliferation assays of primary cultured tetrathyridia cells. (A) Cells cultured over coverslips (dark bars) and suspension (light bars) treated to BrdU incorporation after 6, 12 and 24 h. Bars mean the average counting of BrdU-positive cells in 4 randomly-chosen microscopic fields ($\chi^2=47.68$; $P<0.05$; significant differences in incorporation elapsing 6 and 24 h). (B) CyQuant assay to analyze proliferation in cultured cells. Bars mean the cell counting based on fluorimetric optical density (OD) reading taken in different hours of culture.

A



B

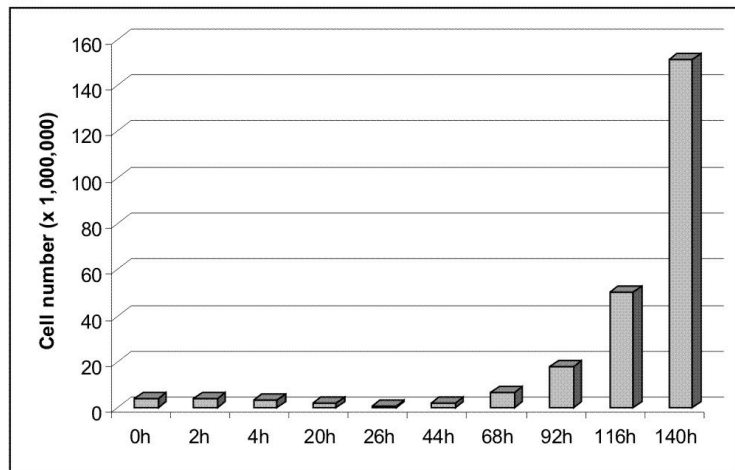


Fig 3. Origin confirmation of cultured cells. Karyotyping of tetrathyridia cells cultured for 10 days confirming the *M. corti* 2n=14 pattern. Arrows point to the metaphasic chromosomes.



Fig 4. Morphological analysis of *M. corti* cultured cells using cytochemistry and immunofluorescence. (A,B) Optical micrographies representing tetrathyridia recently detached cells stained with feulgen (magenta) and fast green to nuclei and cytoplasm, respectively. (C-N) Optical micrographies acquired of adherent and suspension samples of cellular culture of days 4 (C-H) and 8 (I-N). Hoechst was used to stain nuclei (D, G, J, M) and an antibody α -actin was used to label cytoplasm (E, H, K, N). Light field micrographies of superimposition images are shown in figures C, F, I, L. Arrows point to some randomly chosen cells. Scale bar, 5 μ m.

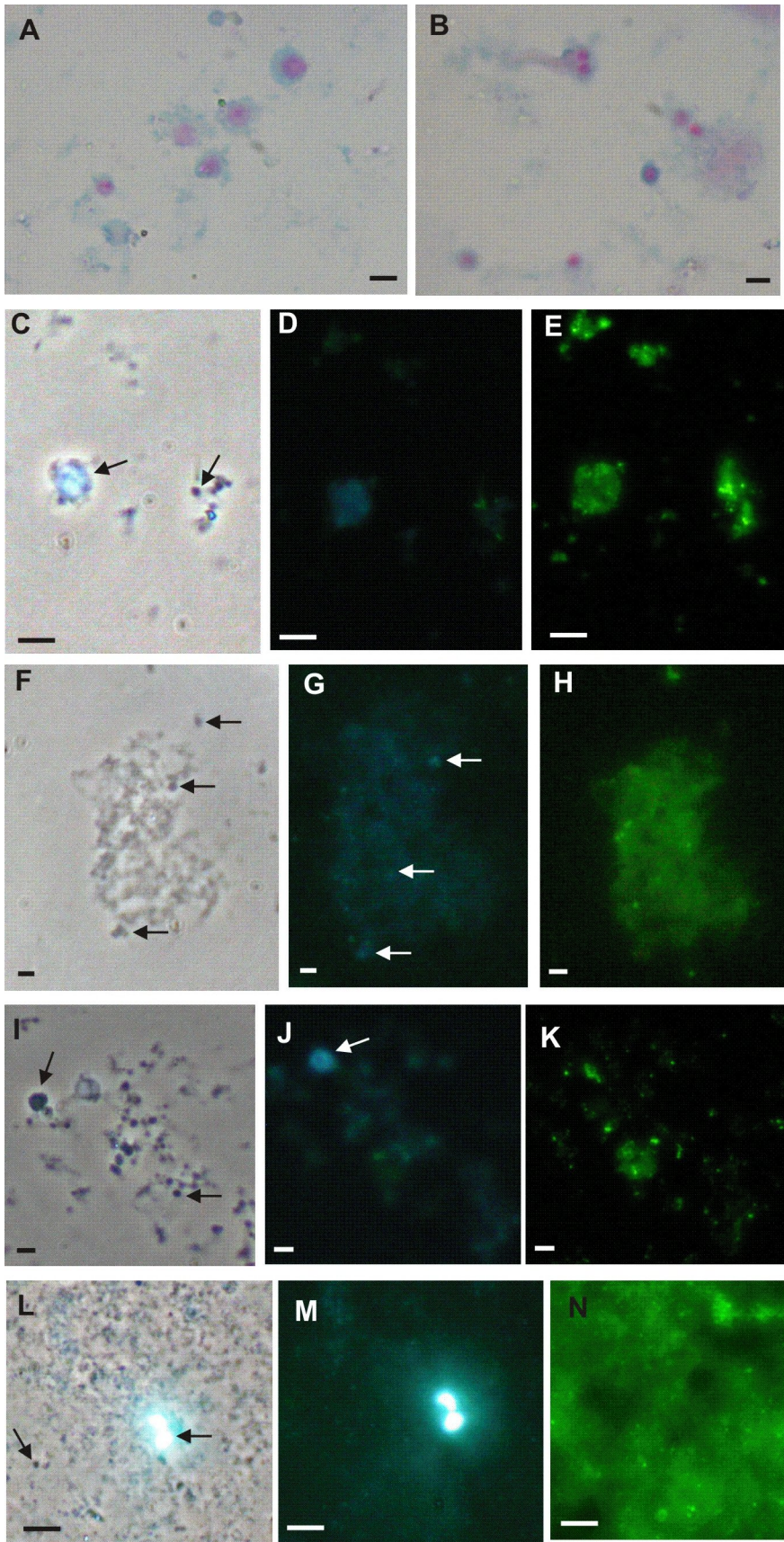


Fig 5. Scanning electron microscopy of *M. corti* cultured cells detached from tetrathyridia and adult worms. Cells were fixed after 3 (A,B), 21 (C) and 28 (E) culture days, while cells from adult worms were fixed after 3 (D) and 28 (F) days. Arrows in C point to small cells, which could be structures cyton-like; the arrowhead in F are pointing and a possible dividing cell and the arrows point to the typical cell size types (large and small). Probable components of the secreted extracellular matrix are indicated: carbohydrate crystals (G), the net that may contain protein and glycosaminoglycans (H), as well as, calcareous corpuscles (I).

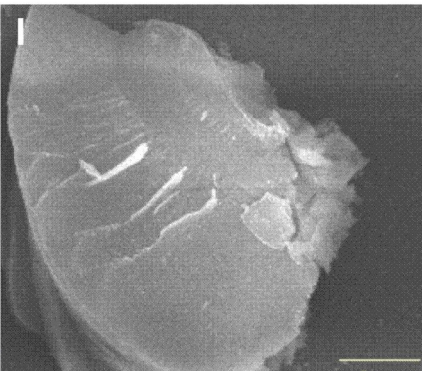
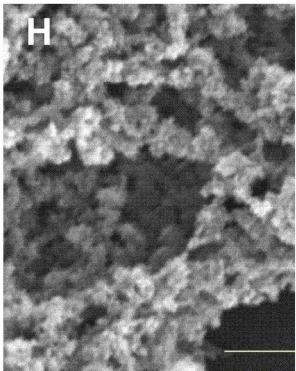
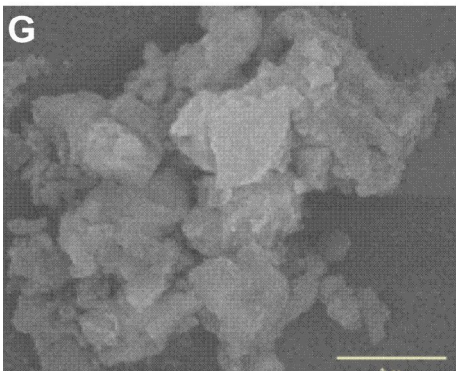
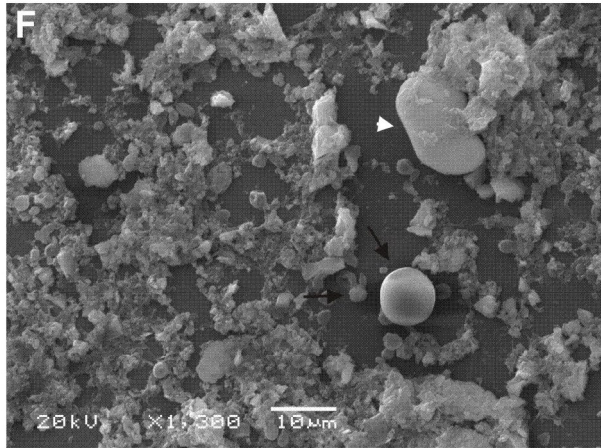
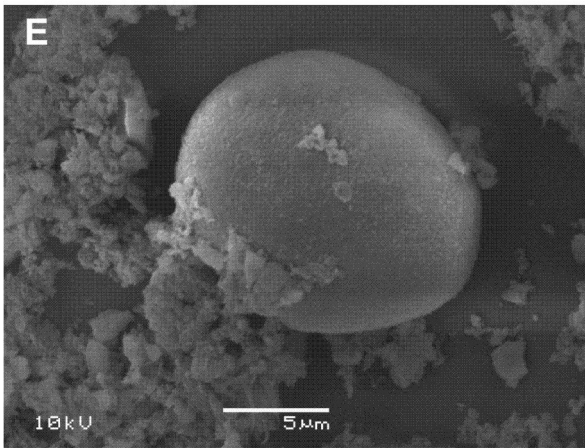
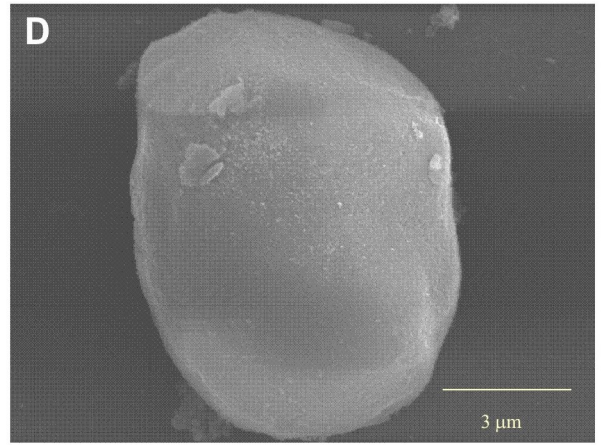
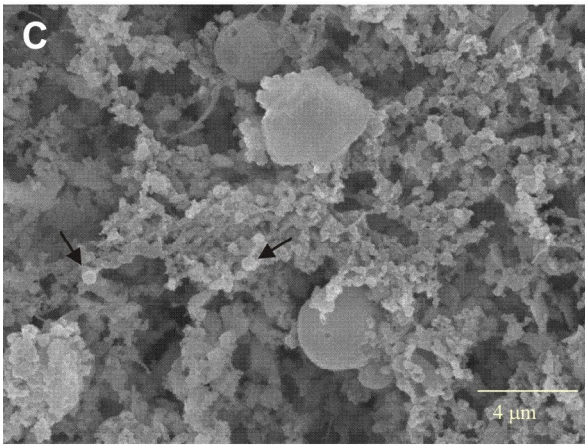
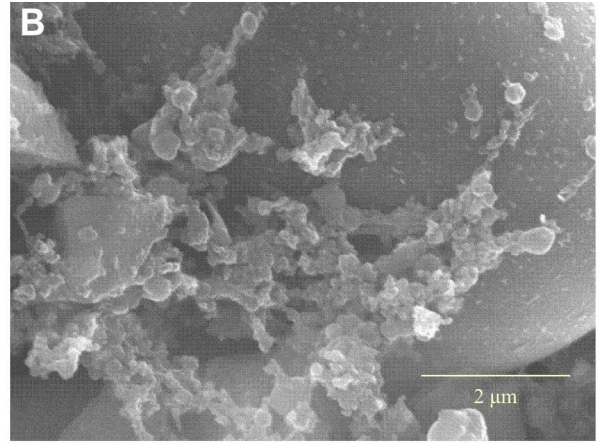
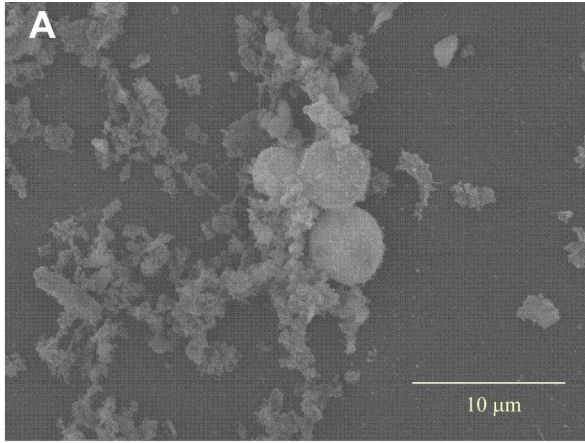


Fig 6. Citochemistry analysis of *M. corti* cultured cells and extracellular matrix. (A-D) Optical micrographies of PAS staining to samples of cell culture products secreted on coverslips (A,C) or in suspension (B,D), up to days 4 (A,B) and 8 (C,D). (E-G) Optical micrographies of alcian blue staining, at pH2.5, to cellular products secreted in suspension at day 0 (E) or up to days 4 (F) and 8 (G). (H-M) Optical micrographies of Arteta staining, following nuclei with haematoxilin (violet), cytoplasm with Eritrosine/Orange G (magenta) and collagen with toluidin blue (blue), to samples of cellular culture on coverslips (H,J,L) and suspension (I,K,M), taken at day 0 (H,I), or up to days 4 (J,K) and 8 (L,M). Arrows point the cyton-like structures (H,I) and a mitotic cell (L). Scale bar, 5 μ m.

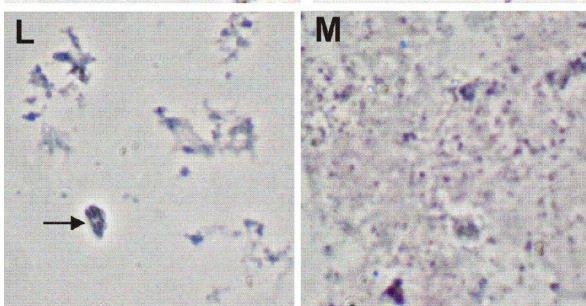
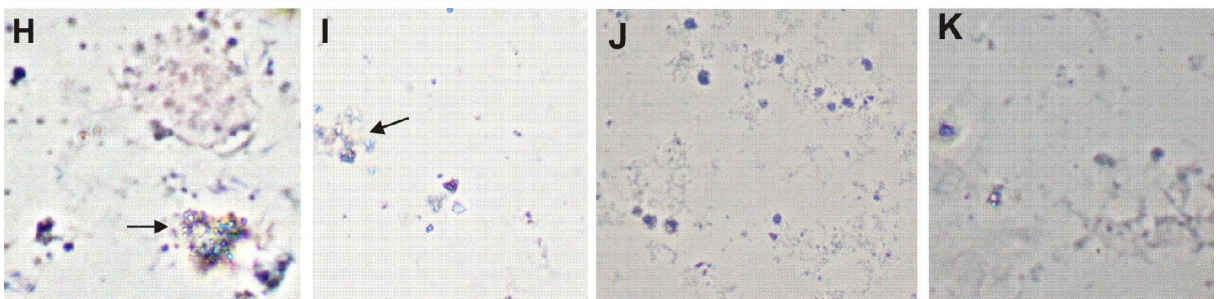
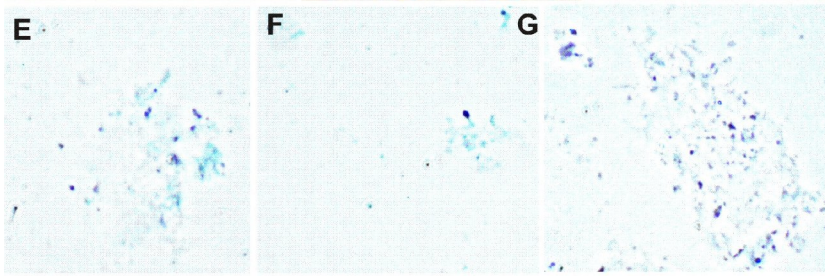
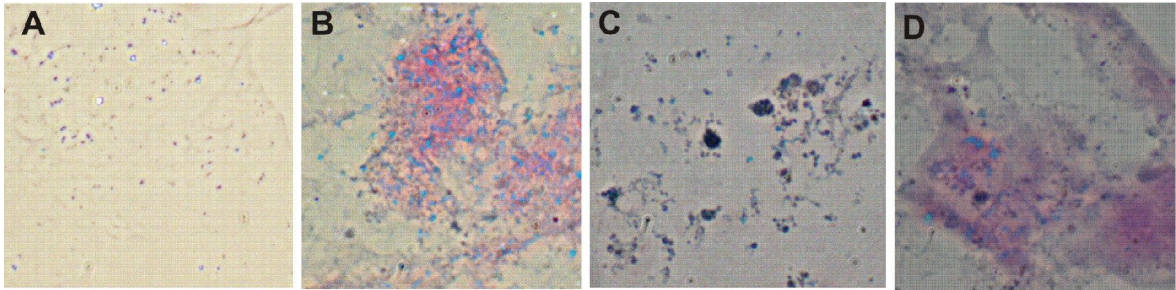
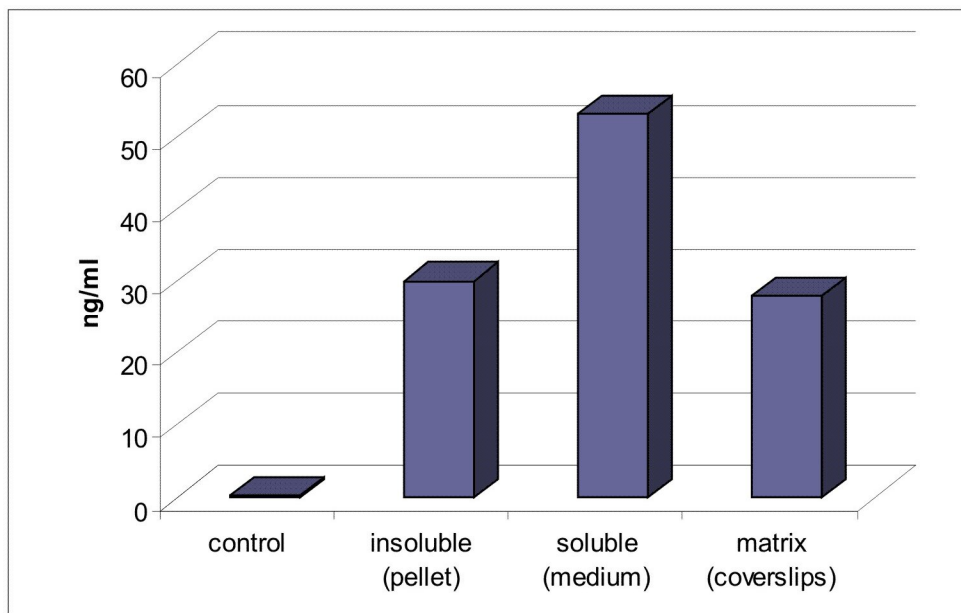


Fig 7. Elisa assay to quantification of synthesized hyaluronic acid by *M. corti* cultured cells. Products secreted by cells cultured for 5 days were collected from coverslips surfaces and media, which were centrifuged to separate soluble and insoluble components. Bars mean the relative quantities of hialuronan secreted by cells obtained by fluorimetric optical density (OD) reading when coated by an anti-agrecan binding protein-europium conjugated for the different samples.



Discussão

Este trabalho descreveu experimentos relacionados ao desenvolvimento *in vitro* do platelminto parasita *Mesocestoides corti*. Primeiramente, foi acompanhado o desenvolvimento da fase larval até a fase adulta através da observação tridimensional da dinâmica corporal. Também foi analisado o efeito de drogas anti-helmínticas sobre diferentes estágios de desenvolvimento durante a estrobilização. Posteriormente, células obtidas das fases larval e adulta do parasito tiveram suas condições de cultivo estabelecidas e foram preliminarmente caracterizadas. O estudo abordou algumas caracterizações que servirão para um melhor entendimento sobre a biologia dos cestódeos.

O ciclo vital de *M. corti* ainda não foi totalmente elucidado. Entretanto, a descoberta de que uma fase do ciclo seria capaz de reproduzir-se assexualmente (Specht & Voge, 1965) e regenerar (Hart, 1967) fez com que a espécie fosse considerada um bom modelo de estudo entre os platelmintos parasitos (Thompson *et al.*, 1982). As infecções em hospedeiros como ratos e camundongos, causadas por tetratirídeos, revelaram-se como úteis nos estudos de resposta imune e farmacologia (Abraham & Teale, 1987; Hrcková & Valebný, 1997). A padronização da indução da estrobilização *in vitro* projetou ainda mais o organismo como modelo para estudar desenvolvimento de helmintos (Markoski *et al.*, 2003; Espinoza *et al.*, 2005). Recentes estudos apontam para alta taxa de parasitemia causada por este parasito o que tem elevado, ainda mais, sua importância em estudos de epidemiologia e parasitologia (Toplu *et al.*, 2004). Entretanto, o modelo carece de estudos mais básicos, a respeito da morfologia. Assim, a análise da dinâmica das modificações corporais que ocorrem durante a estrobilização pode fornecer mais conhecimento sobre aspectos básicos da morfologia do desenvolvimento de vermes parasitos, proporcionando a comparação com, por exemplo, outros cestódeos que, por serem muito patogênicos ou não ser possível a obtenção de material biológico, não permitem este tipo de estudo.

Toda a superfície corporal dos platelmintos parasitos é recoberta por uma estrutura sincicial, o tegumento. O tegumento de *M. corti* é formado por dois grupos de células com capacidade de multiplicação: o primeiro formado de células multipotentes, constituindo a "massa apical", capaz de diferenciação em células parenquimais, armazenadoras de glicogênio; e outro, formado por células musculares tegumentares, que podem sofrer multiplicação mitótica para tornarem-se as células musculares do parênquima (Hess, 1980). Também foi proposto que o tegumento estaria dividido em duas grandes zonas: uma superficial, citoplasmática, e outra, profunda, composta de núcleos (Sobhon & Apinhasmit, 1995). Nossas observações comprovaram a presença destas duas zonas e foi verificado que, durante o desenvolvimento, o tegumento sofre alterações em sua espessura, chegando a ficar bastante fino na região mais posterior do verme adulto. A superfície tegumentar é formada por microtríquias, microfilamentos responsáveis pela absorção de nutrientes (Voge *et al.*, 1979). O glicocálice, uma camada constituída de polissacarídeos e glicoproteínas, recobre a superfície das microtríquias. Redes de carboidratos negativamente carregados sobre o glicocálice confeririam proteção contra a resposta imune do hospedeiro (Weiss *et al.*, 1986; Míguez *et al.*, 1996). Um destes carboidratos é a *N*-acetil- β -D-glicosamina, fortemente evidenciada na coloração com lectina WGA, utilizada neste trabalho. Foi demonstrado que as redes de carboidratos que revestem o tegumento variam durante o desenvolvimento *in vitro*, utilizando a lectina como sonda. No início, o tegumento aparece compacto e denso e, mais tarde, no verme adulto, ele se torna delgado. Estes dados sugerem que os glicoconjugados do glicocálice do tegumento poderiam ter importante papel na resistência contra o sistema digestivo do hospedeiro. Isto poderia ocorrer porque os açúcares também poderiam servir para proteger as estruturas internas do parasito contra lipases e proteases do intestino do hospedeiro (Robertson & Cain, 1984). Uma vez no organismo hospedeiro, os vermes necessitam se proteger e depois, despender energia para a formação dos órgãos sexuais e ovos. Assim, simulando, em parte, o que

aconteceria *in vivo*, vermes cultivados durante um período de tempo mais longo estariam mais sujeitos a sofrerem danos causados por condições ambientais adversas na camada tegumentar. Isto ocorreu, por exemplo, após a exposição à PZQ e ABZ. Cabe ao tegumento a comunicação entre o parasito e o meio externo, o organismo hospedeiro. Desta forma, dos pontos de vista bioquímico, fisiológico e imunológico, o tegumento é um dos tecidos mais importantes e o primeiro a ser atingido por ação de drogas anti-helmínticas (Becker *et al.*, 1981).

A ação do PZQ sobre platelmintos trematódeos e cestódeos foi relativamente bem estudada (Harnett, 1988; Redman *et al.*, 1996; Apinhasmit & Sobhon, 1996). O estudo da influência do PZQ sobre os canais de Ca^{+2} de *S. mansoni* mostrou que as alterações causadas pela droga sobre a abertura destes canais levam à vacuolização do tegumento e à desregulação da homeostasia (Blair *et al.*, 1992). Em cestódeos, tendo-se *M. corti* como modelo, o efeito parece ser o mesmo, como anteriormente sugerido por Hrcková *et al.* (1998) e agora confirmado pela observação direta dos efeitos da droga sobre os vermes em processo de estrobilização. Como ocorre em *S. mansoni*, a exposição ao PZQ causou uma imediata contração muscular e a formação de vesículas e vacúolos em toda a extensão do tegumento. Nossos resultados mostraram que, durante o cultivo *in vitro*, da diferenciação do tetratirídeo à fase adulta, todas as fases são atingidas por ação da droga, que, mesmo em concentrações muito baixas em relação àquelas recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (Dayan, 2003), levam impreterivelmente a morte dos parasitos. O PZQ é facilmente absorvido pelo organismo animal e para o tratamento de doenças causadas por platelmintos, as doses recomendadas são de 10-25 mg/kg para cães. Nas curvas para estabelecimento de dose letal (LC_{50}), verificamos que uma concentração de PZQ $2,5 \times 10^6$ vezes menor em relação àquela utilizada nos tratamentos veterinários foi suficiente para matar os parasitos *in vitro* em 5 min. Optou-se então pela utilização de uma concentração 1.000 vezes menor que a da LC_{50} , de modo a viabilizar a observação de alterações

morfológicas decorrentes da administração da droga ao longo de um período de pelo menos 24 h. A droga mostrou-se bastante efetiva sobre a fase adulta, causando desde perfurações e grandes rupturas no tecido tegumental até a completa fragmentação das fibras musculares circulares e longitudinais. Os órgãos sexuais, internalizados no tecido parenquimatoso, também foram atingidos pela ação do PZQ. Considerando-se que o PZQ é de fácil absorção (Bjorklund & Bylund, 1997), é provável que doses inferiores às recomendadas pela Organização Mundial de Saúde sejam eficazes para tratamento da cestodíase peritoneal. Entretanto, ainda não se pode inferir que as doses capazes de induzir a morte de parasitos de *M. corti* poderiam ter efeito similar em outros cestódeos.

As doses de ABZ recomendadas para tratamento veterinário são, em geral, de 400 mg/animal (considerando-se o cachorro), dos quais 10 mg/kg são efetivamente absorvidos, uma vez que a droga não é aquosamente solúvel. Devido a problemas de solubilidade, também foi utilizada a concentração de 200 ng/ml de ABZ nos experimentos. Embora, diferentemente do PZQ, o ABZ não fosse capaz de levar a morte no período de 24h, a droga também apresentou ação sobre tegumento e sistema muscular. O ABZ age sobre a β -tubulina, bloqueando a formação de microtúbulos e levando a paralisia e morte (Lacey, 1988). De acordo com nossas observações, a perda da contratilidade muscular causada por ABZ é tardia. De forma geral, os efeitos causados por ação do ABZ foram mais drásticos ao final do período de 24h, enquanto que após 1h de exposição já eram observados efeitos em tratamentos com PZQ, e as perfurações que ocorrem no tegumento são menores em número e tamanho quando comparadas às causadas pelo PZQ. Dados da literatura apontam que o ABZ e seu metabólito sulfóxido de ABZ foram bastante eficientes em produzir alterações na tubulina quando administrado em protoescólices de *E. granulosus in vitro* (Pérez-Serrano et al., 1995). Entretanto, em comparação com a dose utilizada em nossos experimentos, uma quantidade 50 vezes maior do princípio ativo da droga

foi adicionada aos cultivos de protoescólices. Ainda que estas concentrações estejam dentro das recomendadas pela Organização Mundial de Saúde (Dayan, 2003), o ABZ, como molécula de baixa solubilidade, tem pouca absorção pelo trato digestivo, o que exige a utilização de quantidades maiores para que a droga seja realmente efetiva em tratamentos terapêuticos.

Embora outros estudos se façam necessários para caracterizar todo o repertório de efeitos das drogas anti-helmínticas sobre platelmintos parasitos, nosso trabalho contribuiu para demonstrar o efeito da ação de drogas de amplo espectro, como PZQ e ABZ, em diferentes fases do desenvolvimento de um cestódeo, sobre diferentes tecidos. O estudo apontou as principais modificações morfológicas que ocorrem sobre tegumento e sistema muscular de diferentes fases do desenvolvimento *in vitro* de *M. corti*, revelando que a fase adulta é mais susceptível ao efeito de ambas as drogas. Entretanto, análises mais aprofundadas focando os mecanismos moleculares da ação das drogas, ainda se fazem bastante necessárias para cestódeos.

Na década de 1980, pesquisadores buscaram estabelecer linhagens celulares de helmintos parasitas (Hemphill *et al.*, 2002). As linhagens celulares servem como ferramentas para a identificação e a caracterização de moléculas envolvidas nas relações parasito-hospedeiro e em resposta imune; para teste de efeito de drogas; e em estudos de expressão gênica. Entretanto, estes estudos foram dificultados tanto por terem sido utilizados organismos de difícil obtenção de material biológico, quanto pela falta de viabilidade e/ou proliferação celular, ou pela ocorrência de contaminação dos cultivos com células do hospedeiro. Ou ainda, devido ao fato de que alguns parasitos tenham uma relação tão íntima com seus hospedeiros, isto tornaria seu cultivo celular fortemente dependente de moléculas provenientes do organismo hospedeiro. Considerando estas dificuldades, não foram estabelecidas as condições apropriadas, considerando-se viabilidade, proliferação e especificidade de origem, ao estabelecimento das culturas celulares de platelmintos parasitas.

Nos trabalhos de Hobbs *et al.* (1993) e Bayne *et al.* (1994), que estabeleceram culturas celulares primárias de *S. mansoni*, foi verificado que estas células eram predominantemente de formato esférico (5µm de diâmetro) e aderentes à superfície do frasco de cultivo, individualmente ou em grupos de 5 a 25, o que também foi observado para células de *M. corti*. Entretanto, células isoladas da fase adulta de *S. mansoni*, sem a presença de aditivos, rapidamente degeneraram no cultivo *in vitro* (Hobbs *et al.*, 1993), o que não ocorreu com as células cultivadas de *M. corti*. E mesmo quando as células foram mantidas por mais de 4 semanas no cultivo *in vitro*, não foi observada proliferação celular para as culturas primárias de *S. mansoni*.

O estabelecimento de linhagens isoladas para espécies do gênero *Echinococcus* foi questionado (Howell & Matthaei, 1988). Foi apontado, através de observações posteriores, que a linhagem descrita para *E. granulosus* (Fiori *et al.*, 1988), que presumivelmente seria capaz de proliferação *in vitro*, na verdade, estava contaminada com células do hospedeiro bovino. A linhagem isolada e estabelecida para *E. multilocularis* (Furuya *et al.*, 1991), descrita como tendo capacidade proliferativa *in vitro*, foi posteriormente perdida (Bayne, 1998). Para platelmintos, apenas linhagens celulares para espécies de planárias, um verme de vida livre, como a linhagem neuronal HAC (Asami *et al.*, 2002) tiveram sucesso no seu estabelecimento. Estas culturas representam muita importância do ponto de vista da facilidade de manutenção e experimentação, pois tratam-se de células capazes de estender neuritos sobre matrizes extracelulares. Entretanto, não seriam modelo para se estudar, considerando-se a ênfase celular, relações parasito-hospedeiro.

Utilizando-se nematódeos como modelos, entretanto, algumas linhagens puderam ser estabelecidas. Primeiramente, foi isolada uma linhagem de um fitopatógeno, *Meloidogyne incognita* (Manousis & Ellar, 1990). Culturas de células embrionárias, capazes de se diferenciarem em células neurais e musculares *in vitro*, foram estabelecidas para *Caenorhabditis elegans* (Christensen *et al.*, 2002). Recentemente, foi

reportado o isolamento e estabelecimento de uma linhagem células de *Brugya malayi* (Higazi *et al.*, 2004). As células isoladas destes nematódeos também apresentaram diferentes morfologias no cultivo *in vitro*, com diâmetros variando de 4 a 10 μm . Diferentemente do que ocorreu para as linhagens estabelecidas para platelmintos, as culturas celulares primárias de nematódeos mostraram-se proliferativas e puderam ser transfectadas com plasmídeos portando oncogenes e imortalizadas (Higazi *et al.*, 2004).

O modelo *M. corti* foi utilizado na tentativa de estabelecer culturas celulares para platelmintos parasitos. Conforme previamente demonstrado, em experimentos de incorporação de timidina tritiada ([^3H]-TdR), células-tronco e/ou outras células com capacidade proliferativa, estão distribuídas, no parênquima, ao longo de toda extensão corporal do tetratirídeo e, no verme adulto, principalmente ao longo dos gânglios (Smith & McKerr, 2000; Espinoza *et al.*, 2004). Desta forma, células desprendidas destas fases do parasito, que se mostraram proliferativas em cultura, poderiam ser originárias, a princípio, do parênquima. Entretanto, embora em sua maior parte, o tegumento represente um sincício, a "massa apical" (Hess, 1980) também poderia ser fonte das células que se mantém proliferamente ativas em cultura.

Os fatores que poderiam levar à manutenção da capacidade proliferativa das células isoladas de tetratirídeos de *M. corti* poderiam estar relacionados à possibilidade que estas larvas têm em realizar reprodução assexual tanto em organismos pecilotérmicos como homeotérmicos, bem como, em sua própria permanência e multiplicação no cultivo *in vitro*. Estas observações vêm a sugerir que as larvas devem possuir mecanismos moleculares que permitam as multiplicações celulares necessárias a ambas as formas de reprodução (assexual e sexual) e que os mecanismos envolvidos poderiam estar sendo mantidos em células cultivadas *in vitro*. O fato de que é sintetizada uma matriz extracelular, possivelmente envolvida na manutenção e comunicação entre as células, também poderia inferir que esta matriz auxiliaria na manutenção de

outros processos celulares, tais como o de capacidade proliferativa. Também é importante ressaltar que as condições em que as células melhor se adaptaram, sendo mais viáveis, proliferativas e com secreção de maior quantidade de matriz extracelular, foram as mesmas utilizadas para cultivo dos vermes (meio McRPMI suplementado com 20% de SFB, incubação à 37°C, atmosfera de CO₂5%). Inclusive, quando co-culturas foram realizadas entre células desprendidas e tetratirídeos em sistema de cultivo *transwell*, uma elevada quantidade de proteínas foi obtida destas células em comparação às células cultivadas nos diferentes meios e temperaturas testados (dados não mostrados). E, pelo que foi sugerido através de análises da morfologia celular por MEV, onde as células supostamente estariam realizando mitose, as culturas celulares, tanto obtidas de tetratirídeos como de adultos, não perdem a capacidade proliferativa mesmo após 28 dias em cultivo. Esta capacidade proliferativa pode sugerir uma vantagem no estabelecimento de culturas celulares de *M. corti* frente aos demais cestódeos que não possuem um rearranjo corporal tão dinâmico e que não realizam multiplicação assexuada, sendo, por vezes, menos metabolicamente ativos.

Os mecanismos moleculares pelos quais as células desprendidas de *M. corti* se mantêm durante vários dias em condições *in vitro* são desconhecidos. Entretanto, diferentemente do que foi visto para as outras linhagens de platelmintos, estas células são capazes de sintetizar grande quantidade de matriz extracelular. Matrizes extracelulares desempenham diversas funções envolvidas na manutenção das células. Dentre estas, estão, por exemplo, as relacionadas a modulações do formato celular (Sims *et al.*, 1992). Conforme observado por Hobbs *et al.* (1993), no estabelecimento de culturas primárias de *S. mansoni*, células "alimentadoras" poderiam remover componentes do meio de cultivo que seriam nocivos às células do verme ou sintetizar uma matriz extracelular insolúvel necessária à manutenção das células. Assim, é possível que a matriz sintetizada pelas células isoladas de *M. corti* esteja envolvida com o fornecimento de moléculas necessárias à adaptação e sobrevivência das

células em cultivo, garantindo a comunicação, nutrição e migração entre as células.

Uma caracterização preliminar apontou a presença de componentes como proteínas, carboidratos e GAGs na composição da matriz extracelular das culturas celulares. Primeiramente, devido a sua presença na composição do tegumento de cestódeos (Mehlhorn *et al.*, 1983), e na ação da colagenase sobre o desprendimento celular, foi verificada a presença de colágeno. A coloração fraca, obtida pelo método de Arteta (Lopez *et al.*, 1982) apontou a presença de proteínas colágenas em pequena quantidade, indicando que, possivelmente, não há formação de fibrilas em cultivo. Entretanto, matrizes extracelulares podem ser formadas por redes de proteínas envolvidas nas relações intra e extracelulares (Itoh *et al.*, 2005). Através de experimentos de imunofluorescência, a presença de actinas, formando grandes massas foi verificada. Embora não aparente, devido a controles específicos e sua manutenção no cultivo *in vitro*, não se pode descartar que estas massas também sejam constituídas de *debries* celulares emitindo fluorescência. Assim como também é possível que estas massas sejam redes formadas por associação de actinas com outras proteínas, como as integrinas (Brakebusch & Fässler, 2003). Um envolvimento estrutural da matriz extracelular com microfilamentos de actina e integrinas sugeriria que efeitos da matriz sobre transformações que ocorrem no formato celular são provavelmente mediados via alterações do citoesqueleto (Sims *et al.*, 1992). A comunicação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto de actina é principalmente mediada via receptores da família das integrinas. Além da integração com o citoesqueleto de actina, as integrinas podem associar-se a várias outras proteínas constituintes das matrizes extracelulares, como fibronectinas, vitronectinas e colágeno (Sims *et al.*, 1992). Produtos de amplificação por PCR utilizando oligonucleotídeos degenerados foram caracterizados como relacionados a seqüências correspondentes a actina (Volkweiss, 2000). O isolamento, caracterização, clonagem e expressão de seqüências de actina, visando à produção de

anti-soro específico, bem como experimentos de co-imunoprecipitação realizados utilizando-se extratos celulares, contendo matriz sintetizada, seriam uma boa abordagem para analisar proteínas associadas às actinas.

Outras moléculas como as GAGs, em especial o ácido hialurônico, também estão envolvidas na manutenção do meio extracelular das células, desempenhando função de sustentação em diferentes tecidos (Ponting and Kumar, 1995). Os carboidratos são essenciais para crescimento e multiplicação celular (Hanko & Rohrer, 2000). Bastante envolvidos em mecanismos de evasão de resposta imune, os polissacarídeos são estruturas abundantemente presentes nos cestódeos (Hülsmeier *et al.*, 2002). A presença de açúcares neutros e carregados na matriz extracelular sintetizada por células de *M. corti* foi demonstrada por experimentos de imuno-histoquímica. Considerando-se que o glicogênio é fonte de carbono dos platelmintos, as colorações positivas para carboidratos poderiam ser resultantes de secreção de glicogênio, através da atividade de células armazenadoras que estariam presentes nos cultivos, ou, até mesmo, da combinação de moléculas sintetizadas pelas células com componentes do SFB formando estruturas polissacarídicas.

Através deste trabalho foi verificado que culturas celulares de *M. corti*, modelo de estudo para platelmintos parasitos, puderam ser estabelecidas. Ambas culturas, obtidas das fases larval e adulta foram capazes de sintetizar densa matriz extracelular. Estudos visando a caracterização de fatores que influenciam estrutura, metabolismo, fisiologia e proliferação das células, bem como da modulação da matriz extracelular, devem ser feitos. A melhor caracterização irá permitir o uso das culturas celulares como ferramentas à análise do efeito de drogas anti-helmínticas em nível celular e estudos de regulação da expressão gênica, comparando mecanismos moleculares entre outros cestódeos, como dos gêneros *Echinococcus* e *Taenia*.

Perspectivas

Em ensaios preliminares, células desprendidas de tetratirídeos, foram cultivadas durante 8 dias e submetidas a avaliação dos níveis de apoptose, utilizando-se a técnica de TUNEL (Gavrielli, 1992). Conforme a execução do protocolo do *kit* comercial (Promega), foi verificado que as células de *M. corti* realizam morte celular programada em diferentes dias de cultivo, sendo inicialmente mais efetivo no primeiro dia. Partindo-se do mesmo princípio, as células foram submetidas à incubação com Actinomicina D, um potente indutor de apoptose, as quais responderam à ação da droga. Estes experimentos sugerem uma primeira aplicação prática às culturas estabelecidas a partir de um platelminto parasita.

Durante os experimentos do estudo do efeito de drogas anti-helmínticas e partindo-se do fato de que GAGs, como sulfato de condroitina, heparana-sulfato e dermatana-sulfato, foram dosados a partir de tetratirídeos (dados não publicados), foi analisada a influência de selenato, um inibidor da síntese de GAGs, sobre o desenvolvimento dos vermes. De fato, o selenato de sódio mostrou-se como um potente inibidor do desenvolvimento de *M. corti* quando tetratirídeos foram induzidos a diferenciarem-se em adultos concomitantemente expostos ao sal. Estes experimentos preliminares apontam para a provável influência da ação do selenato durante o desenvolvimento de platelmintos parasitas e sua importância quanto a, possivelmente, vir a ser um candidato em estudos relacionados à terapêutica de doenças causadas por platelmintos.

Experimentos de microscopia eletrônica de transmissão estão sendo realizados para caracterizar as estruturas internas das células isoladas de *M. corti*. Células desprendidas de diferentes fases do desenvolvimento *in vitro* do parasito foram fixadas, contrastadas em ósmio e incluídas em resina líquida. Espera-se que estes experimentos auxiliem para elucidar os componentes celulares das culturas primárias de *M. corti*.

A partir da padronização das curvas de dose de PZQ e seu efeito sobre a estrutura do verme adulto, estão sendo realizados experimentos

onde, após incubação de adultos à ação da droga, os extratos protéicos serão separados por eletroforese bidimensional. Busca-se identificar proteínas diferencialmente expressas nas duas condições e analisar as seqüências peptídicas através de espectrometria de massas.

Referências Bibliográficas

- ABRAHAM, K.M.; TEALE, J.M. Isotype restriction during infection of mice with the cestode *Mesocestoides corti*: role of immune suppression. *Journal of Immunology*, 138:1699-1674, 1987.
- ASAMI, M.; NAKATSUKA, T.; HAYASHI, T.; KOU, K.; KAGAWA, H.; AGATA, K. Cultivation and characterization of planarian neuronal cells isolated by fluorescence activated cell sorting (FACS). *Zoological Science*, 19:1257-1265, 2002.
- BAGUNA, J. & RIUTORT, M. The dawn of bilaterian animals: the case of acoelomorph flatworms. *Bioessays*, 26:1046-1057, 2004.
- BARRET, N.J.; SMYTH, J.D.; ONG, J. Spontaneous sexual differentiation of *Mesocestoides corti* tetrathyridia *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 12: 315-322, 1982.
- BARRIGA, O. *Veterinary Parasitology for Practitioners*. Second edition, Minnesota, USA. Burgess Publishing, 1997.
- BARUTZKI, D.; SCHAPER, R. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. *Parasitology Research*, 90: S148-50, 2003.
- BAYNE, C.J.; MENINO, J.S.; HOBBS, D.J.; BARNES, D.W. In vitro cultivation of cells from larval *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*, 80: 29-35, 1994.
- BAYNE, C. J. Invertebrate cell culture considerations: insects, ticks, shellfish, and worms. *Methods in Cell Biology*, 57:187- 201, 1998.
- BECKER, B.; MEHLHORN, H.; ANDREWS, P.; THOMAS, H. Ultrastructural investigations on the effect of praziquantel on the tegument of five species of cestodes. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 64:257-69, 1981.
- BIZARRO, C.V.; BENGTON, M.H.; RICACHENEVSKY, F.K.; ZAHA, A.; SOGAYAR M.C.; FERREIRA, H.B. Differentially expressed sequences from a cestode parasite reveals conserved developmental genes in platyhelminthes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 144: 114-8, 2005.

BJORKLUND, H.; BYLUND, G. Absorption, distribution and excretion of the anthelmintic praziquantel (Droncit) in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Parasitology Research*, 73:240-244, 1987.

BONFANTI, U.; BERTAZZOLO, W.; PAGLIARO, L.; DEMARCO, B.; VENCO, L.; CASIRAGHI, M.; BANDI C. Clinical, cytological and molecular evidence of *Mesocestoides* sp. infection in a dog from Italy. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 51:435-438, 2004.

BRITOS, L.; DOMÍNGUEZ, R.; EHRlich, R.; MARÍN, M. Effect of praziquantel on the strobilar development of *Mesocestoides corti* *in vitro*. *Journal of Helminthology*, 74:295-299, 2000.

CARABIN, H.; BUDKE, C.M.; COWAN, L.D.; WILLINGHAM, A.L. 3RD; TORGERSON, P.R. Methods for assessing the burden of parasitic zoonoses: echinococcosis and cysticercosis. *Trends in Parasitology*, 31:327-333, 2005.

CARUSO, K.J.; JAMES, M.P.; FISHER, D.; PAULSON, R.L.; CHRISTOPHER, M.M. Cytologic diagnosis of peritoneal cestodiasis in dogs caused by *Mesocestoides* sp. *Veterinary Clinical Pathology*, 32:50-60, 2003.

CHEN, S.N.; WANG, C.S. Establishment of cell lines derived from oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg and hard clam, *Meretrix lusoria* Roding. *Methods in Cell Science*, 21: 183-92, 1999.

CHRISTENSEN, M.; ESTEVEZ, A.; YIN, X.; FOX, R.; MORRISON, R.; MCDONNELL, M.; GLEASON, C.; MILLER, D.M. 3RD; STRANGE, K. A primary culture system for functional analysis of *C. elegans* neurons and muscle cells. *Neuron*, 33:503-514, 2002.

COON, D.B. The biology of flatworms (Platyhelminthes): parenchyma cells and extracellular matrices. *Transactions of the American Microscopical Society*, 112:241-261, 1993.

CRAIG, H.L., CRAIG, P.S. Helminth parasites of wolves (*Canis lupus*): a species list and an analysis of published prevalence studies in Nearctic and Palaearctic populations. *Journal of Helminthology*, 79:95-103, 2005.

CROSBIE, P.R.; BOYCE, W.M.; PLATZER, E.G.; NADLER, S.A.; KERNER, C. Diagnostic procedures and treatment of eleven dogs with peritoneal

infections caused by *Mesocestoides spp.* *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213:1578-83, 1998.

CROSBIE, P.R.; NADLER, S.A.; PLATZER, E.G.; KERNER, C.; MARIAUX, J.; BOYCE, W.M. Molecular systematics of *Mesocestoides* spp (cestoda: mesocestoididae) from domestic dogs (*Canis familiaris*) and coyotes (*Canis latrans*). *Journal of Parasitology*, 86:350-357, 2000.

DAYAN, A.D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86:141-159, 2003.

ECKERT, J.; VON BRAND, T.; VOGEL, M. Asexual multiplication of *Mesocestoides corti* (Cestoda) in the intestine of dogs and skunks. *Journal of Parasitology*, 55:241-249, 1969.

EL-ON, J. Benzimidazole treatment of cystic echinococcosis. *Acta Tropica*, 85:243-252, 2003.

ESPINOZA, I.; GALINDO, M.; BIZARRO, C.V.; FERREIRA, H.B.; ZAHA, A.; GALANTI, N. Early post-larval development of the endoparasitic platyhelminth *Mesocestoides corti*: Trypsin provokes reversible tegumental damage leading to serum-induced cell proliferation and growth. *Journal of Cellular Physiology*, 205:211-217, 2005.

ETGES, F.J. The proliferative tetrathyridium of *Mesocestoides vogae* sp. n. (Cestoda). *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 58:181-185, 1991.

FAIRWEATHER, I.; BORAY, J.C. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Veterinary Journal*, 158:81-112, 1999.

FAN, P.C.; WU, C.C.; HUANG, P.; YEN, C.W. Determination of the minimum effective dosages of praziquantel, albendazole, and mebendazole against *Clonorchis sinensis* infection in rats. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 21:448-451, 2005.

FIORI, P.L.; MONACO, G.; SCAPPATICCI, S.; PUGLIESI, A.; CANA, N.; CAPPUCINELLI, P. Establishment of cell cultures from hydatid cysts of *Echinococcus granulosus*. *International Journal for Parasitology*, 18:297-305, 1998.

FURUYA, K. An established cell line of larval *Echinococcus multilocularis*. *International Journal for Parasitology*, 21:233-240, 1991.

GARCIA, L.S; BRUCKNER, D.A. *Diagnostic Medical Parasitology*. 3ed Washington, ASM Press, 1997.

GULSEN, M.; SAVAS, M.C.; KORUK, M.; KADAYIFCI, A.; DEMIRCI, F. Fascioliasis: a report of five cases presenting with common bile duct obstruction. *The Netherlands Journal of Medicine*, 64:17-19, 2006.

GUTIERREZ, Y.; BUCHINO, J.J.; SCHUBERT, W.K. Mesocestoides (Cestoda) infection in children in the United States. *The Journal of Pediatrics*, 93:245-247, 1978.

HALANYCH, K.M. The new view of animal phylogeny. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35:229-256, 2004.

HANKO, V.P.; ROHRER, J.S. Determination of carbohydrates, sugar alcohols, and glycols in cell cultures and fermentation broths using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry*, 283:192-199, 2000.

HARNETT, W. The anthelmintic action of praziquantel. *Parasitology Today*, 4: 144-146, 1988.

HART, J.L. Studies on the nervous system of *tetrathyridia* of *Mesocestoides* (Cestoda: Mesocestoides) *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Parasitology*, 5:1032-1039, 1967

HART, J.L. Regeneration of *tetrathyridia* of *Mesocestoides* (Cestode, Cyclophyllidea) *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Parasitology*, 54:950-956, 1968.

HARTGERS, F.C.; SMITS, H.H.; VAN DER KLEIJ, D.; YAZDANBAKHS, M. Innate, adaptive and regulatory responses in schistosomiasis: relationship to allergy. *Chemical Immunology and Allergy*, 90:157-175, 2006.

HESS, E. Ultrastructural study of the tetrathyridium of *Mesocestoides corti* Hoeppli, 1925 (Cestoda): tegument and parenchyma. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 61:135-159, 1980.

HESS, E. Ultrastructural study of the tetrathyridium of *Mesocestoides corti* Hoeppli, 1925 (Cestoda): pool of germinative cells and suckers. *Revisite Suisse de Zoologie*, 88:661-674, 1981.

HOBBS, D.J.; FRYER, S.E.; DUIMSTRA, J.R.; HEDSTROM, O.R.; BRODIE, A.E.; COLLODI, P.A.; MENINO, J.S.; BAYNE, C.J.; BARNES, D.W. Culture of cells from juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*, 79:913- 921, 1993.

HOEPPLI, R.J.C. *Mesocestoides corti*, a new species of cestode from the mouse. *Journal of Parasitology*, 12:91-96, 1925.

HOTI, S.L.; SUBRAMANIYAN, K.; DAS P.K. Detection of codon for amino acid 200 in isotype 1 beta-tubulin gene of *Wuchereria bancrofti* isolates, implicated in resistance to benzimidazoles in other nematodes. *Acta Tropica*, 88:77-81, 2003.

HOWELL, M.J.; MATTHAEI, K. Points in question. In vitro culture of host or parasite cells? *International Journal for Parasitology*, 18:883-884, 1988.

HRCKOVA, G.; VALEBNY, S. Effect of praziquantel and liposome-incorporated praziquantel on peritoneal macrophage activation in mice infected with *Mesocestoides corti* tetrathyridia (Cestoda). *Parasitology*, 114:475-482, 1997.

HULSMEIERS, A.J.; GEHRIG, P.M.; GEYER, R.; SACK, R.; GOTTSTEIN, B.; DEPLAZES, P.; KOHLER, P. A major *Echinococcus multilocularis* antigen is a mucin-type glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 277:5742-5748, 2002.

INFANGER, M.; KOSSMEHL, P.; GRIMM, D. Surgical and medical management of rare echinococcosis of the extremities: pre- and post-operative long-term chemotherapy. *Scandinavian Journal of infectious diseases*, 37:954-957, 2006.

JEON, H.K.; LEE, K.H.; KIM, K.H.; HWANG, U.W.; EOM, K.S. Complete sequence and structure of the mitochondrial genome of the human tapeworm, *Taenia asiatica* (Platyhelminthes; Cestoda). *Parasitology*, 130:717-726, 2005.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; SAHAPHONG, S.; SOBHON, P.; RIENGROJPITAK, S.; KANGWANRANGSAN, N. Effects of praziquantel and artesunate on the

tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitology International*, 54:177-183, 2005.

JONES, M.K. Structure and diversity of cestode epithelia. *International Journal for Parasitology*, 28:913-923, 1998.

KALINER, G. Bronchitis caused by Tetrathyridia (Mesocestoididae, Cestoda) in chickens. *Avian Disease*, 18:255-257, 1974.

KAWAMOTO, F.; FUJIOKA, H. & KUMADA, N. Studies on the post-larval development of cestodes of the genus *Mesocestoides*: trypsin-induced development of *M. linetus* *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 16:333-340, 1986.

KERMMERLING, U.; CABRERA G.; CAMPOS, E.O.; INESTROSA, N;C.; GALANTI, N. Localization, specific activity, and molecular forms of acetylcholinesterase in developmental stages of the cestode *Mesocestoides corti*. *Journal of Cell Physiology (no prelo)*

KHURANA, S.; DUBEY, M.L.; MALLA, N. Association of parasitic infections and cancer. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23:74-79, 2005.

LALANNE, A.I.; BRITOS, L.; EHRLICH, R.; CASTILLO, E. *Mesocestoides corti*: a LIM-homeobox gene upregulated during strobilar development. *Experimental Parasitology*, 108: 169-75, 2004.

LOOS-FRANK, B. Shedding of gravid proglottids and destrobilation in experimental infections of foxes with *Mesocestoides leptothylacus* Loos-Frank, 1980 (Cestoda). *Journal of Helminthology*, 61:213-218, 1987.

LOOS-FRANK, B. One or two intermediated hosts in the life cycle of *Mesocestoides* (Cyclophyllidea, Mesocestoididae)? *Parasitology Research*, 77:726-728, 1991.

MARKOSKI, M.M.; BIZARRO, C.V.; FARIAS, S.; ESPINOZA, I.; GALANTI, N.; ZAHA, A.; FERREIRA, H.B. *In vitro* segmentation induction of *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. *Journal of Parasitology*, 89:27-34, 2003.

MCMANUS, D.P.; LE, T.H.; BLAIR, D. Genomics of parasitic flatworms. *International Journal for Parasitology*, 34:153-158, 2004.

MIGUEZ, M.; BAZ, A.; NIETO, A. Carbohydrates on the surface of *Echinococcus granulosus* protoscoleces are immunodominant in mice. *Parasite Immunology*, 18:559-569, 1996.

MIN, D.Y. Cestode infections in Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 28:123-144, 1990.

NASR, N.M.; FALLON, A.M. Detection of lysozyme-like enzymatic activity secreted by an immune-responsive mosquito cell line. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82:162-166, 2003.

NOBLE, E.; NOBLE, G.; SCHAD, G.; MACINNES, A. *Parasitology, the Biology of Animal Parasites*. Lea and Febiger editors. Sixth edition, Philadelphia, USA. Pergamon Press, pp 211-261, 1989.

OGREN, R.E. Development and morphology of the oncosphere of *Mesocestoides corti*, a tapeworm of mammals. *Journal of Parasitology*, 42:414-428, 1956.

ONG, S. & SMYTH, J. D. Effects of some culture factors on sexual differentiation of *Mesocestoides corti* grown from tetrathyridia *in vitro*. *International Journal for Parasitology*, 16:361-368, 1986.

PADGETT, K.A.; BOYCE, W.M. Ants as first intermediate hosts of *Mesocestoides* on San Miguel Island, USA. *Journal of Helminthology*, 79:67-73, 2005.

PEREZ-SERRANO J, GROSMAN C, URREA-PARIS MA, DENEGRI G, CASADO N, RODRIGUEZ-CAABEIRO F. Depolarization of the tegument precedes morphological alterations in *Echinococcus granulosus* protoscoleces incubated with ivermectin. *Parasitology Research*, 87:804-807, 2001.

PONTING, J.M.; KUMAR, S. Localisation and cellular origin of hyaluronectin. *Journal of Anatomy*, 187:331-346, 1995.

REDMAN, C.A.; ROBERTSON, A.; FALLON, P.G.; MODHA, J.; KUSEL, J.R. DOENHOFF, M.J. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitology Today*, 12:14-20, 1996.

REY, L. *Parasitologia*. 2ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991.

ROBERTSON, N.P.; CAIN, G.D. Glycosaminoglycans of tegumental fractions of *Hymenolepis diminuta*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 12:173-183, 1984.

RUIZ-TRILLO, I.; RIUTORT, M.; FOURCADE, H.M.; BAGUNA, J.; BOORE, J.L. Mitochondrial genome data support the basal position of Acoelomorpha and the polyphyly of the Platyhelminthes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33:321-332, 2004.

SAWADA, I.; KUGI, G. *Journal of parasitology*, 22:45-47, 1973.

SCHMIDT, J.M.; TODD, K.S. Life cycle of *Mesocestoides corti* in the dog (*Canis familiaris*). *American Journal of Veterinary Research*, 39:1490-1493, 1978.

SMYTH, J.D. *Introduction to animal parasitology*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

SOBHON, P.; APINHASMIT, W. *Opisthorchis viverrini*: the tegumental cytoskeleton. *International Journal of Parasitology*, 25: 787-96, 1995.

SOLDATOVA, A.P.A. A contribution to the study of the development cycle in the cestode *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1882). *Annals of Faculty of Medicine Veterinary Pisa*, 19:325-339, 1944

SOULSBY, E.J.L. *Textbook of Veterinary Clinical Parasitology*. vol 1. Helminths Philadelphia, F.A. Davis Company, 1965.

SPRECHT, D.; VOGEL, M. Asexual multiplication of *Mesocestoides* tetrathyridia in laboratory animals. *The Journal of Parasitology*, 51: 268-72, 1965.

TELFORD, M.J.; LOCKYER, A.E.; CARTWRIGHT-FINCH, C.; LITTLEWOOD, D.T. Combined large and small subunit ribosomal RNA phylogenies support a basal position of the acoelomorph flatworms. *Proceedings in Biological Science*, 270:1077-1083, 2003.

TERENINA, N.B.; REUTER, M.; GUSTAFSSON, M.K.S. An experimental, NADPH-diaphorase histochemical and immunocytochemical study of *Mesocestoides vogae* tetrathyridia. *International Journal for Parasitology*, 29:187-193, 1999.

THOMPSON, R.C.A.; JUE SUE, L.P.; BUCKLEY, S.J. *In vitro* development of the strobilar stage of *Mesocestoides corti*. *International Journal for Parasitology*, 1:303-14, 1982.

TODD, K.S. JR; SIMON, J.; DIPIETRO, J.A. Pathological changes in mice infected with tetrathyridia of *Mesocestoides corti*. *Lab Animal*, 12:51-53, 1978.

TOLEDO, A.; CRUZ, C.; FRAGOSO, G.; LACLETTE, J. P.; Merchant, M. T.; HERNANDEZ, M.; SCIUTTO, E. *In vitro* culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *Journal of Parasitology*, 83: 189-93, 1997.

TOPLU, N.; YILDIZ, K.; TUNAY, R. Massive cystic tetrathyridiosis in a dog. *The Journal of Small Animal Practice*, 45:410-412, 2004.

TORRES, J.; MIQUEL, J.; MOTJÉ, M. Helminth parasites of the eurasian badger (*Meles meles* L.) in Spain: a biogeographic approach. *Parasitology Research*, 87:259-263, 2001.

URREA-PARIS M.A.; MORENO, M.J.; CASADO, N.; RODRIGUEZ-CAABEIRO, F. *In vitro* effect of praziquantel and albendazole combination therapy on the larval stage of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology Research*, 86:957-964, 2000.

VOGE, M.; SEIDEL, J.S. Continuous growth *in vitro* of *Mesocestoides* (Cestoda) from oncosphere to fully developed tetrathyridium. *Journal of Parasitology*, 54:269-71, 1968.

VOLKWEISS, A. Clonagem e caracterização de seqüências genômicas relacionadas à actina de *Mesocestoides corti*. Trabalho de conclusão de Curso, UFRGS, 2003.

VUITTON, D.A.; ZHOU, H.; BRESSON-HADNI, S.; WANG, Q.; PIARROUX, M.; RAOUL, F.; GIRAUDOUX, P. Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitology*, 127:S87-S107, 2003.

VOGE, M. North America cestodes from the genus *Mesocestoides*. *University of California Publications in Zoology*, 59:549-580, 1955.

WEISS, J.B.; MAGNANI, J.L.; STRAND, M. Identification of *Schistosoma mansoni* glycolipids that share immunogenic carbohydrate epitopes with glycoproteins. *Journal of Immunology*, 136:4275-4282, 1986.

WHITFIELD, P.J.; EVANS, N.A. Parthenogenesis and asexual multiplication among parasitic platyhelminths. *Parasitology*, 86:121-160, 1983.

WILLIAMS, C.A.; CONN, D.B. Localization and associated histopathology of asexually proliferative *Mesocestoides corti* tetrathyridia (Cestoda) infecting mouse mammary glands. *International Journal for Parasitology*, 15:245-248, 1985.

ZRZAVY, J. The interrelationships of metazoan parasites: a review of phylum-and higher-level hypotheses from recent morphological and molecular phylogenetic analyses. *Folia Parasitologica*, 48:81-103, 2001.