

CAPÍTULO 3

Protocolos fenotípicos para nematoides gastrintestinais

*Ana Carolina de Souza Chagas
Marcelo Beltrão Molento*

3.1 Teste da eclodibilidade de ovos – TEO (Egg Hatch Assay – EHA) para a detecção de resistência a benzimidazóis em nematoides

Originalmente, a técnica descrita no tópico 3.1.1 foi elaborada para se realizar o diagnóstico da resistência usando-se o tiabendazol (TIA) (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al., 2009). Entretanto, ela pode ser adaptada para avaliar outras substâncias com ação antiparasitária em ovos de nematoides. As concentrações e a forma de execução (diluição seriada ou não) devem ser ajustadas de acordo com a amplitude de ação da substância. Essa adequação pode ser acompanhada no tópico 3.1.2, que trata da avaliação da ação do albendazol comercial in vitro.

3.1.1 Teste da eclodibilidade de ovos para a detecção de resistência a benzimidazóis em nematoides usando-se o tiabendazol

a) Preparação do antiparasitário

- Solução-estoque A: dissolver 10 mg de tiabendazol (TBZ) (Sigma T8904, 100 g) em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).
- Solução-estoque B: adicionar 1 mL da solução-estoque A a 9 mL de água destilada (ou de DMSO). Pode ser necessário adicionar uma gota de HCl para obter melhor solubilização.

- Soluções de trabalho: adicionar 20 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL, 400 µL, 600 µL e 1.000 µL da solução B, completando-se o volume final até 10 mL de água destilada (ou DMSO).
- De cada uma das soluções de trabalho, colocar 10 µL em 1.990 µL de suspensão de ovos.

Volume da solução B (µL)	Volume DMSO (µL)	Concentração do TBZ na solução de trabalho (µL/mL)	Concentração final do TBZ nos poços (µL/mL)
Controle	9.980 + 0.020 H ₂ O	0	0
20	9.980	2	0,01
50	9.950	5	0,025
100	9.900	10	0,05
200	9.800	20	0,1
400	9.600	40	0,2
600	9.400	60	0,3
1.000	9.000	100	0,5

b) Preparação das placas

- Selecionar animais doadores com número de ovos por grama de fezes (OPG – descrição detalhada no item 11.2), preferencialmente acima de 2 mil, e recuperar os ovos conforme item 11.6.
- Quantificar os ovos em 3 a 5 alíquotas de 20 µL ou 50 µL.

Marcar as placas com linhas paralelas na parte inferior.

Colocar, em cada poço, aproximadamente 100 ovos (em cerca de 20 µL) + 1.970 de água destilada + 10 µL da solução-estoque.

- Fazer, preferencialmente, seis repetições para cada concentração.
- Identificar os poços e as placas (autor, data, tratamento, concentração) e acondicioná-las em BOD a 25 °C, por 48 horas (ou a 27 °C, por 24 horas, em caso de necessidade).

- Pingar uma gota de lugol para paralisar o processo e facilitar a leitura em microscópio invertido, na própria placa.

c) Observações

- Caso exista um grande número de ovos larvados, aguardar um pouco, para proceder à leitura.
- Em caso de resultados discrepantes ou de estudos mais detalhados, repetir o teste.
- Quando se tem mais do que 100 indivíduos por placa, pode-se contar até 100 indivíduos.

3.1.2 Teste da eclodibilidade de ovos para a detecção de resistência a benzimidazóis em nematoides usando-se o albendazol comercial

a) Preparação do antiparasitário

- Usar albendazol (SA) solução injetável, no qual cada 100 mL contenha 10 g de sulfóxido de albendazol, ou cada 10 µL contenha 1 mg ou 1.000 µg.
- Calcular o volume final por poço: 500 µL (100 µL de ovos + 400 µL da solução de SA).
- Fazer seis repetições de cada concentração.
- Usar o DMSO a 0,75% (concentração pré-determinada para o isolado de *H. contortus* do CPPSE, identificado e mantido sob infecção monoespecífica, conforme itens 11.4 e 11.5), mas pode variar de acordo com o isolado.
- Preparar a solução-mãe: acrescentar em tubo Falcon de 15 mL: 36 µL de sulfóxido de albendazol (3.600 µg SA) + 36 µL de DMSO

+ 4.728 μL de água destilada (TOTAL de 4.800 μL). Nessa solução, subtraiu-se o volume dos ovos.

- Preparar o controle positivo (com DMSO): acrescentar em tubo Falcon de 15 mL: 36 μL de DMSO + 4.764 μL de água destilada (TOTAL de 4.800 μL).
- Verificar, na tabela abaixo, o volume e a quantidade de anti-helmíntico utilizado em cada uma das 10 concentrações.

	Concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Quantidade de SA (μg)	SA por poço (μg)	Volume final (μL)	Ovos/poço (μL)
Solução-mãe/L	1.200	3.600	600	4.800	100
2	600	1.800	300	2.400	100
3	300	900	150	2.400	100
4	150	450	75	2.400	100
5	112,5	337,5	56,25	2.400	100
6	75	225	37,5	2.400	100
7	37,5	112,5	18,75	2.400	100
8	18,75	56,25	9,375	2.400	100
9	9,375	28,125	4,6875	2.400	100
10	4,6875	14,062	2,3437	2.400	100
Controle	0	0	0	2.400	100

b) Preparação das placas

- Recuperar os ovos conforme item 11.6.
- Quantificar os ovos em 3 a 5 alíquotas de 20 μL ou 50 μL .
- Marcar as placas com linhas paralelas na parte inferior e identificá-las (autor, data, tratamento e concentração).
- Colocar em cada poço aproximadamente 100 ovos (em no máximo 100 μL).



- Controle negativo: distribuir 400 μL de água destilada em cada um dos seis poços.
- Controle positivo: distribuir 400 μL em cada um dos seis poços.
- Solução-mãe/Concentração 1: distribuir 400 μL em cada um dos seis poços (usar 2.400 μL).
- Concentração 2: pegar 2.400 μL da solução-mãe e acrescentar 2.400 μL de água destilada (Solução 1). Distribuir 400 μL em cada um dos seis poços.
- Concentração 3: adicionar 2.400 μL de água destilada aos 2.400 μL da concentração 2 e distribuir.
- Concentração 4: adicionar 2.400 μL de água destilada aos 2.400 μL da concentração 3 e distribuir.
- Concentração 5: adicionar 2.400 μL de água destilada aos 2.400 μL da concentração 4 e distribuir.
- Concentração 6: adicionar 2.400 μL de água destilada aos 2.400 μL da concentração 5 e distribuir.
- Concentração 7: adicionar 2.400 μL de água destilada aos 2.400 μL da concentração 6 e distribuir.
- Concentração 8: adicionar 2.400 μL de água destilada aos 2.400 μL da concentração 7 e distribuir.
- Concentração 9: adicionar 2.400 μL de água destilada aos 2.400 μL da concentração 8 e distribuir.
- Concentração 10: adicionar 2.400 μL de água destilada aos 2.400 μL da concentração 9 e distribuir.

c) Observações

- Identificar as placas e acondicioná-las em estufa BOD, a 25 °C, por 48 horas (ou a 27 °C, por 24 horas, em caso de necessidade).
- Pingar, na própria placa, uma gota de lugol para paralisar o processo e facilitar a leitura em microscópio invertido.

- Caso exista um grande número de ovos larvados, aguardar um pouco para proceder à leitura.
- Em caso de resultados discrepantes ou de estudos mais detalhados, repetir o teste.
- Colocar os controles em placa diferente daquelas dos tratados ou daquelas com o tratamento de menor concentração, especialmente no caso de avaliação de substâncias voláteis.
- Se houver mais do que 100 indivíduos por placa, poderão se contar até 100 indivíduos.

3.2 Teste de desenvolvimento larvar – TDL (Larval Development Assay – LDA)

a) Preparação

Proceder à recuperação dos ovos conforme item 11.6.

Para obter L₁, obedecer ao seguinte procedimento: deixar os ovos em bquer ou placa de Petri tampado, ou, preferencialmente, colocar aproximadamente 100 ovos/poço em placas de 24 poços e completar até 200 mL com água destilada.

Utilizar somente placas estéreis, cujo fundo, na sua parte externa, deve ser marcado com linhas-guia no momento do plaqueamento.

- Identificar e envolver as placas com plástico PVC, acondicionando-as em estufa BOD, a 27 °C, por 24 horas.
- Observar se todas as L₁ já eclodiram e proceder à produção das soluções-teste.
- Calcular, para um volume final por poço de 500 mL e seis poços por concentração.
- Manter a seguinte quantidade máxima de DMSO: 5 µL/poço (1% de concentração).

b) Sugestão para a produção das concentrações por seis poços

	DMS (2,5 µL)	Substân teste (µL)	Volume presente nos poços			Subtrair do volume	Água destilad (µL)
	15	300	480	1.200	1.995	3.000	1.005
5	15	150	480	1.200	1.845	3.000	1.155
2,5	15	75	480	1.200	1.770	3.000	1.230
1,25	15	37,5	480	1.200	1.732,5	3.000	1.267,5
0,625	15	18,75	480	1.200	1.713,75	3.000	1.286,25
0,3125	15	9,375	480	1.200	1.704,4	3.000	1.295,6
0,156	15	4,7	480	1.200	1.699,7	3.000	1.300,3
0,078	15	2,35	480	1.200	1.697,35	3.000	1.302,65
Controle +	15	0	480	1.200	1.695	3.000	1.305
Controle	0	0	480	1.200	1.680	3.000	1.320

Observar que as colunas 1, 2, 3 e 7 informam as substâncias e os volumes que devem ser adicionados, após 24 horas, para a preparação dos tratamentos, ou seja, sobre as L₁.

- Preparar as diluições em tubos Falcon de 15 mL, conforme sugerem as colunas 1, 2 e 7.

Agitar fortemente em vórtex e retirar 220 µL para adicionar a cada poço (cada poço já contém 200 µL de ovos).

- Colocar, em cada poço, 80 µL de *E. coli* (produção descrita no item 11.7).

Identificar cada linha/tratamento da placa de 24 poços, embalar com plástico PVC e acondicionar em BOD a 27 °C, por mais 4 dias.

- Verificar se o controle tem > 90% de L₃; em caso negativo, esperar por mais 24 horas.

Pingar lugol e proceder à contagem em microscópio invertido das L_1 , L_2 e L_3 em cada poço e fazer a média da percentagem de larvas que chegaram a L_3 .

c) Observações

- Como o teste de desenvolvimento ocorre com L_1 , iniciar as diluições em concentrações inferiores às do teste de eclodibilidade, por exemplo, pois são larvas bem mais sensíveis do que os ovos e as L_3 .

- Os cálculos supracitados poderão ser adaptados para concentrações mais baixas se a substância-teste for muito eficaz, o que facilitará o cálculo da CL_{50} e da CL_{99} via procedimento Probit.

A preparação das concentrações poderá ser simplificada diluindo-se a solução-mãe.

- O tween 80 é um emulsificante melhor do que o DMSO, mas não pode ser utilizado no TDL ou no Teste de Inibição da Alimentação, pois as L_1 são bem mais sensíveis a ele.
- Sugere-se colocar os controles em placa diferente da dos tratamentos, especialmente no caso de substâncias voláteis.

d) Modelo para a realização do TDL

Substância a ser testada (lote, validade, etc.): _____

Data da recuperação dos ovos:

Data da inclusão da substância-teste: _____

Data da leitura:

Quantificação dos ovos: + + + + + Média =

Marcar concentrações feitas e/ou inserir concentrações extras realizadas:

Concentração (%)	1 DMSO (2,5 μ L x 6)	2 Substância- teste (μ L)	3 <i>E. coli</i> (80 μ L x 6)	4 Volume presente no poço com larvas (μ L x 6)	5 Soma	6 Subtrair do volume final	7 Água destilada (μ L)
	15		480			3.000	
	15		480			3.000	
	15		480			3.000	
	15		480			3.000	
	15		480			3.000	
	15		480			3.000	
	15		480			3.000	
	15		480			3.000	
Controle +	15	0	480			3.000	
Controle -	0	0	480			3.000	

Observações _____

3.3 Teste de inibição da alimentação larvar – TIAL (Larval Feeding Inhibition Assay – LFIA)

a) Obtenção de L₁ e execução do teste

Material

- Fezes de ovino contaminado com tricostrongilídeos
- Água destilada morna

- *E. coli* marcada com FITC
- Microtubos de 1,5 mL
- Placa de Petri e béquer
- Pipetas
- Estufa BOD a 25 °C e 27 °C
- Peneira de malha 25 µm
- Centrífuga
- Microscópio de fluorescência
- Lâminas e lamínulas

Método

- Proceder à recuperação dos ovos conforme item 11.6.
- Deixar os ovos em béquer tampado ou em placa de Petri a 27 °C, para a obtenção de L₁.
- Fazer o seguinte procedimento para permitir a migração das larvas pela peneira de 25 µm: colocar água destilada morna em uma placa de Petri e completar com água até o fundo da peneira. Adicionar as L₁ sobre a peneira. Deixar o aparato em repouso por 1 hora, em BOD, a ± 27 °C, para que as larvas viáveis passem pela malha.
- Quantificar as L₁ coletadas e colocar 100 larvas nos microtubos de 1,5 mL contendo a substância-teste (volume final do microtubo: 1.500 µL) na concentração desejada, em duplicata, inclusive os controles.
- Incubar os tubos horizontalmente, a 24 °C, por 2 horas.
- Adicionar 20 µL da *E. coli* marcada com FITC (produção descrita no item 11.8) e incubar horizontalmente por 18 a 24 horas, a 24 °C.
- Decorrido esse tempo, centrifugar os tubos a 6.000 rpm, por 1 minuto.



- Remover 800 µL do sobrenadante e examinar as larvas, em microscópio de fluorescência.
- Retirar de 8 µL a 20 µL do fundo, colocar sobre uma lâmina e quantificar as L₁ com o sistema digestivo fluorescente (Figura 1).
- Colocar a mesma lâmina em campo claro, quantificar o número total de larvas e subtrair das L₁ marcadas.
- Observar que o controle é a melhor referência para validar o teste, pois a porcentagem de larvas que não se alimentam deve ser pequena.
- Proceder da seguinte forma para calcular a porcentagem de eficácia:

Total de L₁ – L₁ que se alimentaram = L₁ que não se alimentaram;

Eficácia = [(n L₁ que se alimentaram no controle - n de L₁ que se alimentaram no tratamento)/n de L₁ que se alimentaram no controle] x 100.



Fotos: Ana Carolina de Souza Chagas

Figura 1. Larvas (L₁) de nematoides gastrintestinais com o sistema digestivo fluorescente, após ingestão de *Escherichia coli* marcada com fluoresceína (FITC).

b) Exemplo de preparação da substância-teste

Concentração	DMSO (μL)	Substância (μL)	L_1 (μL)	Total	Volume final	H ₂ O Destilada
5%	15	150	200	365	3.000	2.635
2,5%	15	75	200	290	3.000	2.710
1,25%	15	37,5	200	252,5	3.000	2.747,5
0,625%	15	18,75	200	233,75	3.000	2.766,25
0,3125%	15	9,375	200	224,37	3.000	2.775,6
Controle DMSO	15	0	200	215	3.000	2.785
Controle negativo	0	0	200	200	3.000	2.800

3.4 Teste de eliminação da cutícula larvar (Larval Exsheathment Assay - LEA)

a) Primeiro passo: obtenção de L_3 viáveis para o teste

Material

- Fezes de ovino contaminado com tricostrongilídeos
- Água
- Copo
- Tubos cônicos de 15 mL
- Placa de Petri
- Pipetas
- BOD a 27 °C
- Peneira de malha 25 μm
- Centrífuga

Método

- Realizar coprocultura conforme item 11.3 para a obtenção de L_3 .



- Migrar as larvas pela peneira de 25 μm : colocar água destilada morna em uma placa de Petri e completar até o fundo da peneira. Adicionar as L_3 sobre a peneira. Deixar o aparato em repouso por 1 hora, em BOD, a $\pm 27^\circ\text{C}$, para que as larvas viáveis passem pela malha.
- Colocar a solução de larvas em tubos cônicos de 15 mL e centrifugar a 6.000 rpm por 2 minutos. Descartar o sobrenadante e concentrar todas as larvas num único tubo.

b) Segundo passo: contagem de L_3

Material

- Pipeta de 20 μL
- Lâminas e lamínulas
- Lugol
- Microscópio óptico
- Contador manual

Método

- Homogeneizar a solução de larvas, pipetar e colocar cinco gotas de 20 μL na lâmina. Acrescentar sobre as gotas uma gota de lugol. Proceder à contagem das larvas em microscópio e fazer a média.

c) Terceiro passo: determinação da concentração de hipoclorito de sódio para a eliminação de cutícula em 60 minutos

Material

- Água destilada
- Hipoclorito de sódio
- Placa de cultura com 24 poços

- Pipetas
- Vidrarias
- Lugol
- Cronômetro
- Microscópio invertido
- Contador de células manual
- Larvas L₃

Método

- Preparar a solução de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações.
- Recomendação: solução 1: 125 µL de hipoclorito em 15,625 mL de água.
- Recomendação: solução 2: 150 µL de hipoclorito em 15.625 mL de água.
- Preencher seis poços com a solução 1, e seis poços com a solução 2, formando duas fileiras lineares.
- Recomendação: adicionar 1.400 µL da solução de hipoclorito e 100 µL de solução de larvas (contendo \pm 100 L₃).
- Adicionar, rapidamente, 100 L₃ a cada poço. Em seguida, ajustar o alarme do cronômetro para soar a cada 10 minutos. Ao soar o alarme, adicionar lugol no primeiro poço da solução 1 e da solução 2. Ligar o cronômetro novamente, e assim proceder até o sexto poço (total do teste: 60 minutos) (Figura 2).
- Realizar a leitura no microscópio invertido e quantificar as L₃ com e sem cutícula/poço.
- Escolher a solução de hipoclorito que, aos 60 minutos, possuir 100% de larvas sem cutícula. A perda da cutícula deve ser gradual ao longo dos seis poços. Essa solução será utilizada somente no quinto passo.

Foto: Ana Carolina de Souza Chagas

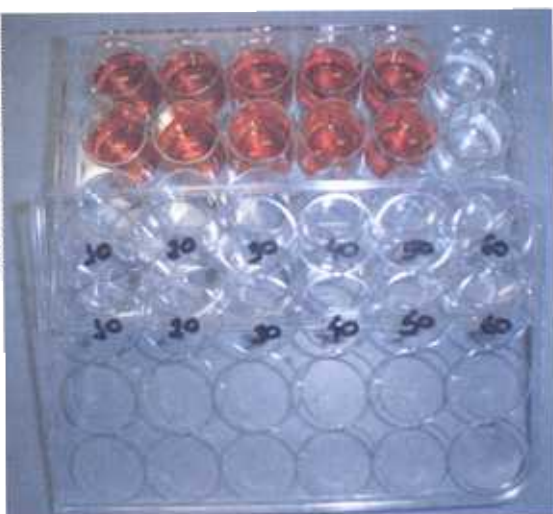


Figura 2. Preparação da placa com duas repetições para cada tempo de exposição à solução de hipoclorito.

d) Quarto passo: preparação da substância-teste e tratamento das larvas

Material

- Água destilada
- Substância a ser testada
- Tubos Falcon de 15 mL
- Micropipetas
- Solvente, se necessário
- Larvas L₃
- Centrífuga

Método

- Calcular o número de tratamentos a serem realizados (sugere-se no mínimo cinco), além do controle negativo (água destilada) e positivo (água destilada e o solvente na mesma concentração). Cada tratamento terá duas repetições. Verificar se o volume de solução L₃ (n de L₃) é suficiente.

- Preparar cada tratamento em tubos Falcon de 15 mL; cada substância-teste pode ter o volume total de 10 mL (já nas concentrações definidas).

A título de ilustração, tome-se o seguinte exemplo: para uma solução de larvas $\pm 100 L_3/25 \mu\text{L}$, tem-se, então:

- Substância-teste a 0,15%: 15 μL da substância + 15 μL de tween 80 + 300 μL de solução L_3 (12 poços (duas repetições) x 25 μL) + 9.670 μL de água destilada (q.s.p. 10 mL).
- Substância-teste a 0,3%: 30 μL da substância + 15 μL de tween 80 + 300 μL de solução L_3 (12 poços x 25 μL) + 9.655 μL (q.s.p. 10 mL).

Controlo positivo: 15 μL de tween 80 + 300 μL de solução L_3 (12 poços x 25 μL) + 9.685 μL (q.s.p. 10 mL).

incubação por 3 horas, a 22 °C.

- Após a incubação, centrifugar os tubos a 6.000 rpm, por 2 minutos. Retirar 8 mL do sobrenadante, completar com 8 mL de água destilada e centrifugar. Repetir a lavagem mais duas vezes. Sifonar 8.800 μL para ficar o residual de 1.200 μL (100 larvas/100 μL).

2) QUINTO passo: exposição das larvas tratadas na solução de hipoclorito de sódio

MATERIAL

1 placa de 24 poços

Água destilada

Solução de hipoclorito de sódio

Larvas L_3

Micropipetas

Método

Depois de determinar qual é a solução de hipoclorito mais adequada no terceiro passo (solução 1 ou 2), calcular a quantidade de solução de hipoclorito a ser utilizada, acompanhando o seguinte procedimento:

- Preparar o volume necessário para 5 concentrações + 2 controles x 12 poços = 84 x 1.400 µL = 117,6 mL.
- Se a solução de 125 µL permitiu a liberação gradual da cutícula, então (se 125 – 15,625 mL, então x – 117,6, ou 125 mL, para garantir).
- Preparar as placas de 24 poços, identificando os tratamentos e marcando as linhas na parte inferior das placas.
- Adicionar a cada poço 1.400 µL da solução de hipoclorito.
- Adicionar, rapidamente, 100 µL de água destilada, com cerca de 100 L₃.
- Ligar o cronômetro e pingar lugol no sentido vertical, a cada 10 minutos.
- Proceder à leitura em microscópio ótico invertido (Figura 3).

Foto: Ana Carolina de Souza Chagas

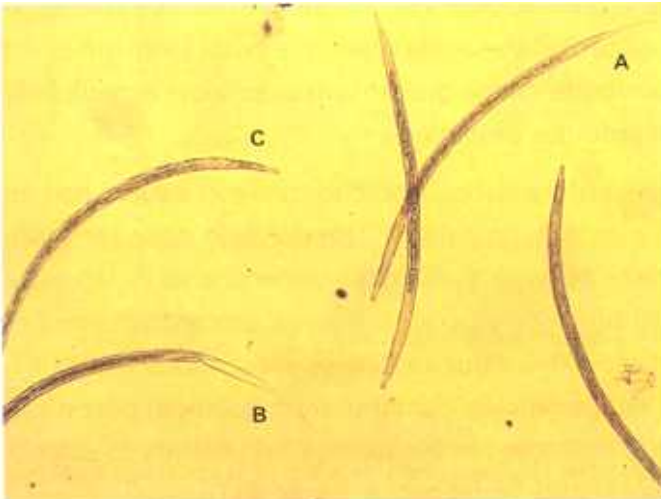


Figura 3. Larvas de nematoides gastrintestinais (L₃) com cutícula (A), perdendo a cutícula (B) e sem cutícula (C).

f) Observações

- Por experiência, concluiu-se que se deve determinar a concentração do hipoclorito sempre que o LEA for feito, pois a sensibilidade à sua ação varia a cada novo grupo de larvas. Uma liberação gradual da cutícula ao longo dos 60 minutos garante bom controle e valida o experimento com a substância-teste.
- Utilizar L₃ de coproculturas realizadas por no máximo 30 dias.

Usar somente água destilada, para não atrapalhar a viabilidade das larvas. Elas também poderão ser incubadas em PBS (7,2 pH).

Sempre colocar mais de 100 L₃ por tratamento, pois algumas são descartadas no processo de centrifugação/lavagem.

3.5 Teste de migração em ágar – TMA (modificado) com isolados sensíveis e resistentes (Larval Migration on Agar Test – LMA)

O objetivo desta técnica é determinar o efeito, via impedimento da motilidade, de produtos antiparasitários em larvas de terceiro estágio recém-desembainhadas. O resultado permite discutir o estado de tolerância para determinado produto. Pode-se ainda supor que exista tanto um efeito diferenciado entre isolados de campo quanto uma ação sobre a motilidade no caso de testes com produtos candidatos.

Para realizar testes entre isolados, é preciso conhecer a curva-padrão para tal droga e para a espécie do parasita. Um exemplo pode ser verificado na Figura 4, onde se observa o efeito da ivermectina sobre larvas de *H. contortus*. Para construir tal curva, o ideal é que a concentração de origem não apresente eficácia (0%) e que se alcance eficácia total (100%) (Figura 4a). O alto valor de R-quadrado demonstrará o potencial para o cálculo da dose letal e sua utilização em avaliações com isolados de campo. A Figura 4b demonstra a análise Probit para o cálculo da DL₅₀.

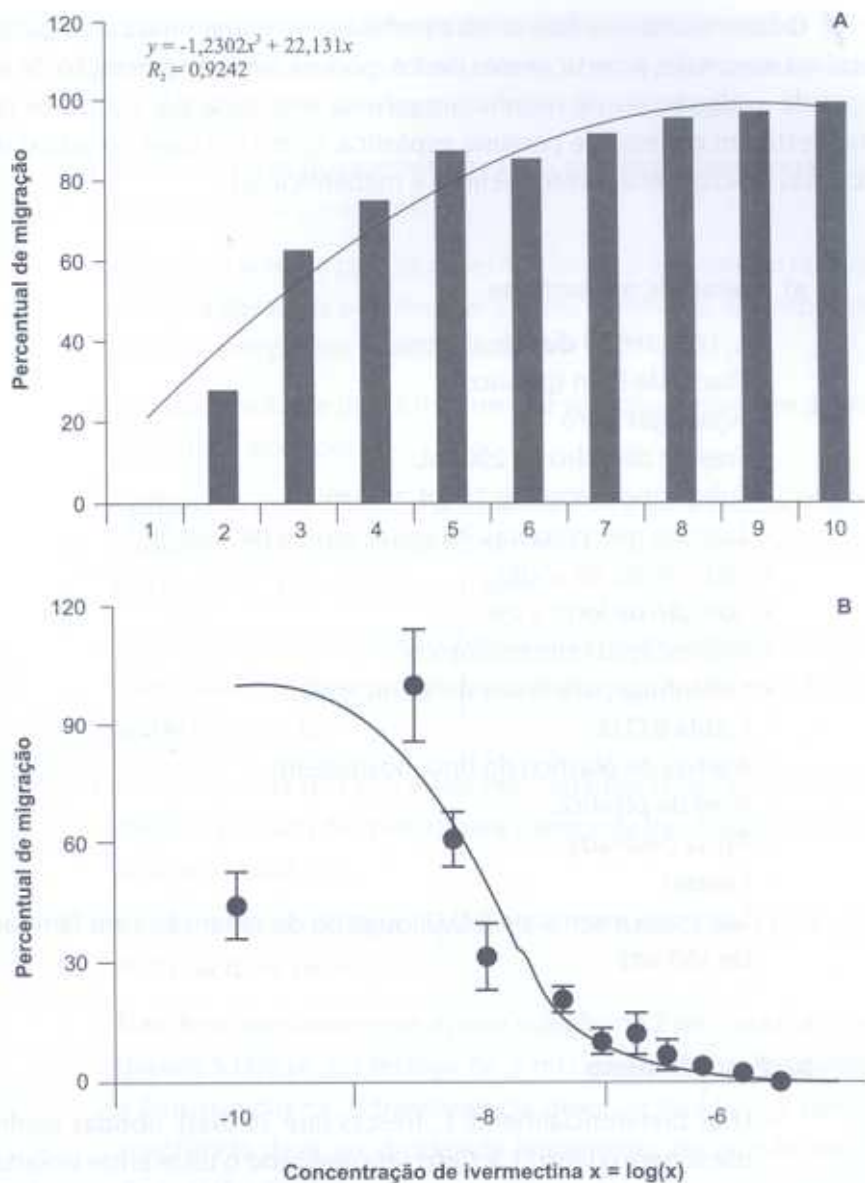


Figura 4. Percentual de eficácia da ivermectina em concentrações crescentes, em teste de migração em ágar contra *H. contortus*: (A) média dos dados em triplicata no Excel; e (B) cálculo da DL₅₀ no programa Prism.

O laboratório que fizer o teste poderá determinar uma curva-padrão local ou regional e, a partir desses dados, poderá oferecer prestação de serviços de avaliação ou de monitoramento da eficiência dos produtos que manifestarem o efeito de paralisia espástica, como é o caso do grupo das lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas).

a) Materiais necessários

- L₃ com até 30 dias de cultura
- Placas de Petri (plástico)
- Ágar-ágar puro
- Frascos de vidro de 200 mL
- Tubos tipo Falcon de 15 mL e 50 mL
- Jogo de micropipetas, inclusive pipeta de 5 mL
- Hipoclorito de sódio
- Solução de iodo a 2%
- Microscópio estereoscópico
- Centrífuga para tubos de 15 mL e 50 mL
- Estufa B.O.D.
- Malhas de plástico do tipo mosquiteiro
- Anel de plástico
- Água destilada
- Freezer
- Lâmpada interna na B.O.D. ou cabo de extensão com lâmpada de 150 wtz

b) Procedimento

- Usar preferencialmente L₃ frescas (até 30 dias), obtidas conforme sugere o item 11.3. Caso seja realizado o teste entre isolados, deve-se colher fezes de ovinos doadores, infectados artificialmente com *H. contortus* ou outros isolados (ver item 11.5).
- Calcular um total de 10 mil a 12 mil larvas para um teste em placa de 24 poços.



- Adicionar 2% de hipoclorito de sódio para desembainhar as larvas (aproximadamente 1 hora). Verificar as larvas a cada 20 minutos até obter 90% sem bainha e 90% de motilidade.
- Lavar as larvas duas vezes em água destilada, centrifugando a 3.000 rpm, por 2 minutos.
- Calcular o volume para se obter 400 larvas e adicionar o restante de água destilada para formar 0,5 mL. Lembrete: os grupos devem ser compostos por triplicata.
- Calcular o volume de 0,5 mL com até sete concentrações do produto (mais controle).
- Misturar as duas soluções em placa de 24 poços. Homogeneizar a solução com o auxílio de micropipeta. Colocar em incubadora B.O.D. (27 °C, UR > 60%) por 6 horas.
- Após a primeira incubação, preparar a solução líquida de ágar a 1,4%, mantendo em temperatura de aproximadamente 40 °C, e agitar levemente.
- Retirar apenas três placas de Petri/aparato (Figuras 5 e 6) para iniciar o preparo das placas para a segunda incubação, sem prejudicar a sequência.
- Adicionar 1 mL de ágar líquido ao poço (pipeta de 0.000 µL), e misturar duas vezes.
- Transferir imediatamente a nova solução de 2 mL para o aparato (pipeta 5.000 µL ou seringa de 3 mL), previamente preparado, e limpar a pipeta. A transferência deve ser rápida, e a solução ágar/larvas deve ser despejada lentamente, na porção central do anel de plástico.
- Colocar o aparato em incubadora B.O.D. (27 °C, UR > 60%) por 18 horas, sob lâmpada de 150 Watts. O objetivo da exposição à luz é estimular o deslocamento das larvas para fora do gel.

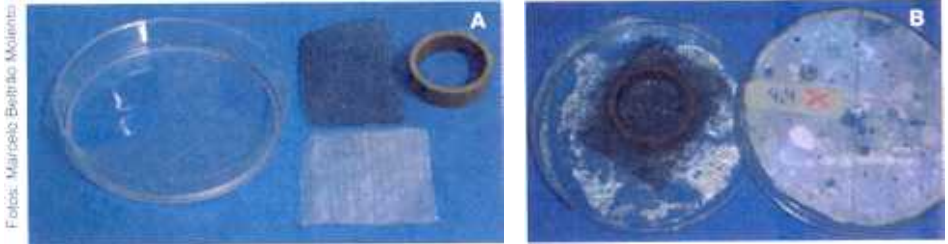


Figura 5. Montagem do aparato: (A) Placa de Petri, malhas e anel de plástico (comparar o tamanho das malhas com os da placa e do anel de plástico); (B) aparato já com 22 mL de água congelada, no momento de transferir a solução de ágar líquido. Lembrete: conferir se o gelo está vedando os orifícios da malha superior.

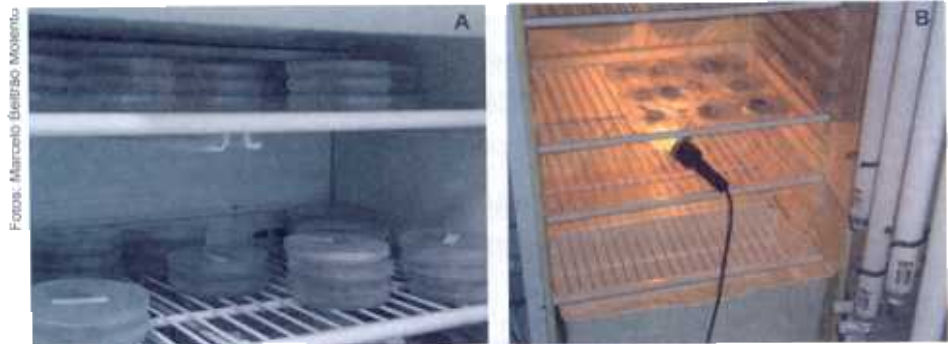


Figura 6. Preparação das placas no freezer (A), antes do experimento, e exposição das placas em estufa (B), onde se nota a grande incidência de luz para estimular o deslocamento das larvas para fora da solução de ágar.

- Após a segunda incubação, com o auxílio de uma pinça lisa, retirar o anel de plástico com as duas malhas, e transferir a porção líquida da solução para um tubo de 50 mL.
- Centrifugar a 3.000 rpm por 5 minutos e ajustar o volume final para 10 mL.
- Transferir para tubos de 15 mL.
- Agitar o tubo em vórtex por 3 segundos, retirar uma alíquota de 1 mL para análise e colocar 10 μ L de solução de iodo a 2% em cada amostra.



- Repetir 3x. Em seguida, colher três amostras de cada tratamento ($n = 9$).
- Colocar as amostras de 1 mL em microtubo e centrifugar por 3 minutos, a 3.000 rpm.
- Retirar o sobrenadante (900 μ L), adicionar 20 μ L de solução de iodo para imobilizar as larvas e contar as larvas em microscópio em aumento de 10x (Figura 7).
- Multiplicar a média obtida das alíquotas por 10.
- Para cálculo da DL_{50} (Probit), utilizar os dados brutos das nove amostras, aumentando o grau de liberdade da análise.

Fotos: Marcelo Beltrão Molteni

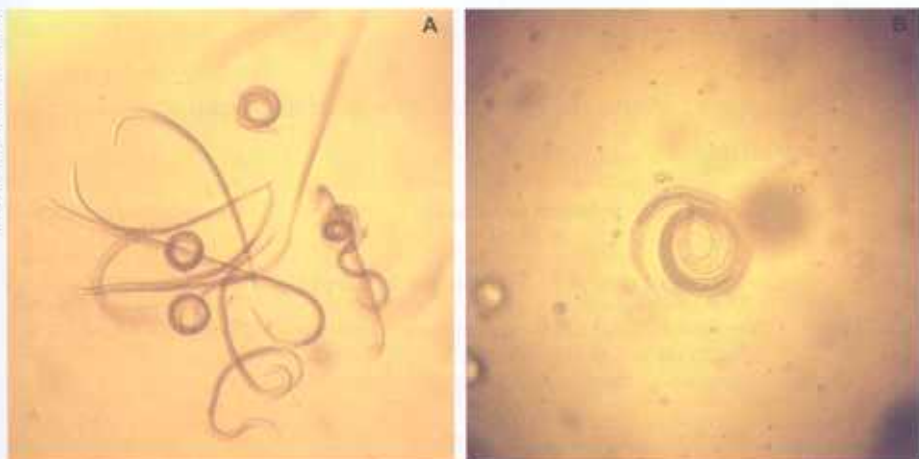


Figura 7. Larvas com movimento sigmoide livres na água, sem a adição da solução de iodo (A); larva retida no ágar (B).

c) Preparo do aparato

O aparato é constituído por uma placa de Petri de 10 cm de diâmetro, contendo uma malha de plástico com abertura de 2 mm (3,0 cm x 3,0 cm) e uma malha de abertura de 1 mm (3,0 cm x 3,0 cm) sobre essa. Colocar

Tabela 1. Continuação.

Tratamento	Poço	Ovos	Larvas	Total (%)	Inibição (%)	Média
600 µg/mL	1	69	25	94	73,40	81,16
600 µg/mL	2	75	17	92	81,52	
600 µg/mL	3	91	17	108	84,26	
600 µg/mL	4	90	15	105	85,71	
600 µg/mL	5	74	20	94	78,72	
600 µg/mL	6	65	13	78	83,33	
300 µg/mL	1	30	50	80	37,50	51,88
300 µg/mL	2	44	76	120	36,67	
300 µg/mL	3	61	39	100	61,00	
300 µg/mL	4	50	38	88	56,82	
300 µg/mL	5	49	35	84	58,33	
300 µg/mL	6	50	32	82	60,98	
150 µg/mL	1	28	75	103	27,18	32,9
150 µg/mL	2	20	81	101	19,80	
150 µg/mL	3	48	137	185	25,95	
150 µg/mL	4	23	90	113	20,35	

Deve-se iniciar a leitura pelos controles negativo (água destilada) e positivo (água destilada mais solvente utilizado para diluir a substância anti-helmíntica). A porcentagem média de inibição nos controles deve ser muito baixa (máximo de 10%), pois isso validará os demais resultados. A partir dessa constatação, proceder à leitura dos tratamentos, iniciando pelas maiores concentrações. Muitas vezes, observa-se haver 100% de inibição; nesse caso, não é necessário realizar a contagem, e colocam-se 100% de eficácia, como na tabela acima, no tratamento de 1.200 µg/mL de albendazol.

Os dados que resultaram do cálculo da média de inibição por tratamento (Tabela 2) já permitem visualizar o resultado do teste (Figura 8). Nes-

sa etapa, é possível saber se é necessário fazer testes com concentrações maiores ou menores do que as avaliadas, ou até mesmo com concentrações intermediárias. O ideal é que os dados variem entre valores próximos de 0 e 100% de inibição, de forma linear e dose-dependente, pois, assim, as estimativas das CL_{50} e CL_{90} refletirão os resultados encontrados e serão mais confiáveis.

Tabela 2. Porcentagem de inibição média da eclosão dos ovos expostos aos distintos tratamentos de albendazol comercial ($\mu\text{g/mL}$) e controles.

Controle de água	3,61
Controle DMSO	
2,34	2,60
4,69	5,62
9,37	3,84
18,75	5,24
37,5	7,92
75	
150	
300	51,88
600	81,16
1.200	100,00

A análise estatística pode ser feita usando-se vários programas, tais como Probit do SAS, Prism, Apolo e SPSS. No caso do Probit, deve-se colocar os resultados do teste na ordem ilustrada na Tabela 3. Onde estiver o controle, utilizam-se os dados do controle positivo (com o DMSO, por exemplo), que recebe a identificação de albendazol 0 $\mu\text{g/mL}$. Quando se obtêm resultados contraditórios em alguns poços, é possível anular os dados da análise, colocando-se apenas um ponto como valor. Algumas vezes, é necessário repetir todo o teste.

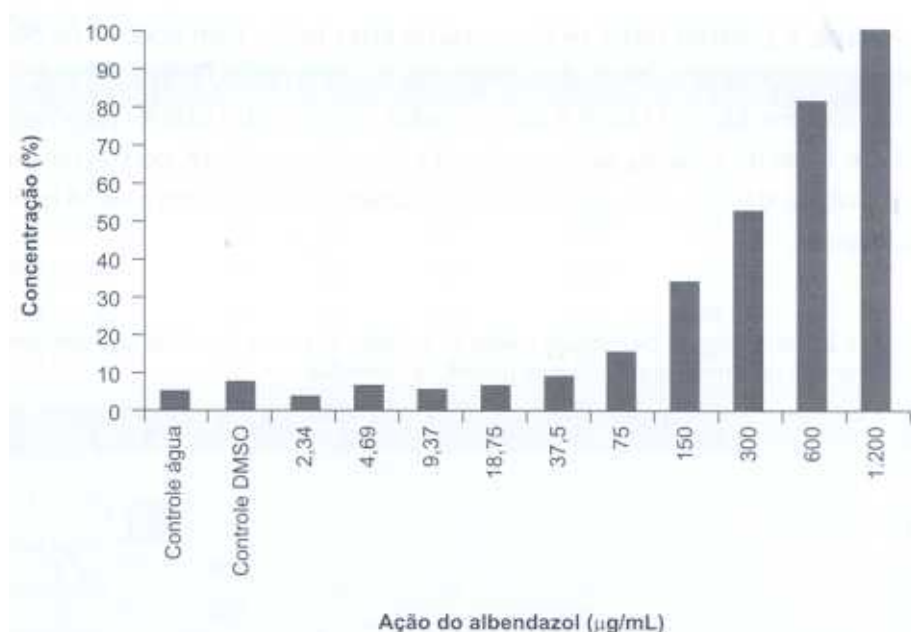


Figura 8. Ação do albendazol sobre as distintas concentrações avaliadas. Notar que a amplitude das concentrações deve variar preferencialmente de 0 a 100% de eficácia.

Tabela 3. Organização no Excel dos dados obtidos no teste de eclodibilidade, em várias concentrações de albendazol, a serem inseridos no SAS Probit para análise.

Antipar	Dose (µg/mL)	Repetição	Larvas	Ovos	Total
Albendazol	0	1	84	5	89
Albendazol	0	2	86	6	92
Albendazol	0	3	82	6	88
Albendazol	0	4	84	4	88
Albendazol	0	5	90	8	98
Albendazol	0	6	60	3	63
Albendazol	1.200	1	0	100	100
Albendazol	1.200	2	0	100	100
Albendazol	1.200	3	0	100	100

Tabela 3. Continuação.

Antipar	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Repetição	Larvas	Ovos	Total
Albendazol	1.200	4	0	100	100
Albendazol	1.200	5	0	100	100
Albendazol	1.200	6	0	100	100
Albendazol	600	1	25	69	94
Albendazol	600	2	17	75	92
Albendazol	600	3	17	91	108
Albendazol	600	4	15	90	105
Albendazol	600	5	20	74	94
Albendazol	600	6	13	65	78
Albendazol	300	1	50	30	80
Albendazol	300	2	76	44	120
Albendazol	300	3	39	61	100
Albendazol	300	4	38	50	88
Albendazol	300	5	35	49	84
Albendazol	300	6	32	50	82
Albendazol	150	1	75	28	103
Albendazol	150	2	81	20	101
Albendazol	150	3	137	48	185
Albendazol	150	4	90	23	113
Albendazol	150	5	80	28	108
Albendazol	150	6	17	61	78

Após a inserção dos dados no SAS, são tecidos alguns comentários sobre a identificação do teste. Já os comandos mais comuns seguem abaixo, em destaque cinza. Esses comandos são imprescindíveis para que o sistema reconheça e analise os dados, bem como para a inserção de pontos nos dados cancelados e de comandos limitados por barras. Neste último

caso, as barras devem ser retiradas quando se analisam, simultaneamente, diferentes substâncias, por exemplo, albendazol e levamisol.

/* ===== Comentários SAS =====

dose e resp(%)

Objetivo: encontrar o probit para os dados abaixo de dose-resposta

ECLO = Inibição de Eclodibilidade larvar

=====*/

data ECLO;

input ANTIPAR \$ dose repeticao LARVAS OVOS TOTAL;

cards;

Albendazol	0	1	84	5	89
Albendazol	0	2	86	6	92
Albendazol	0	3	82	6	88
Albendazol	0	4	84	4	88
Albendazol	0	5	90	8	98
Albendazol	0	6	60	3	63
Albendazol	1.200	1	0	100	100
Albendazol	1.200	2	0	100	100
Albendazol	1.200	3	0	100	100
Albendazol	1.200	4	0	100	100
Albendazol	1.200	5	0	100	100
Albendazol	1.200	6	0	100	100
Albendazol	600	1	25	69	94
Albendazol	600	2	17	75	92
Albendazol	600	3	17	91	108
Albendazol	600	4	15	90	105
Albendazol	600	5	20	74	94
Albendazol	600	6	13	65	78
Albendazol	300	1	50	30	80
Albendazol	300	2	76	44	120
Albendazol	300	3	39	61	100

Albendazol	300	4	38	50	88
Albendazol	300	5	35	49	84
Albendazol	300	6	32	50	82
Albendazol	150	1	75	28	103
Albendazol	150	2	81	20	101
Albendazol	150	3	137	48	185
Albendazol	150	4	90	23	113
Albendazol	150	5	80	28	108
Albendazol	150	6	.	.	.

;

proc print data=ecl0;**run;**

/* proc sort data=ecl0; by antipar;*/

run;**proc probit** DATA=ecl0 log10; /* by antipar; */

model ovos/total=Dose / d=logistic inversecl;

predpplot var = dose cfit = blue cframe=ligr inborder;

output out=B p=Prob std=std xbeta=xbeta;

title 'Output from Probit Procedure';

run;

Ao final da análise, o programa estima todas as concentrações letais (probabilidade) e intervalos de confiança (95%). Eles são estimados em logaritmo 10 (CL_{50} 2,35 $\mu\text{g/mL}$ (2,32-2,37) e CL_{90} 3,13 $\mu\text{g/mL}$ (3,08-3,19)), e, depois, em dados não transformados (CL_{50} 222,17 $\mu\text{g/mL}$ (208,44-237,12) e CL_{90} 1.361 $\mu\text{g/mL}$ (1.210-1.548)). Esses resultados podem ser visualizados em um gráfico, também gerado pelo programa (Figura 9). Nele, pode-se observar a característica do efeito da substância, isto é, se ela possui ação rápida ou gradual. As CLs não transformadas devem ser comparadas com os resultados da Tabela 2, que permitem verificar se houve coerência entre os dados, pois algum erro pode ter ocorrido durante a análise estatística.

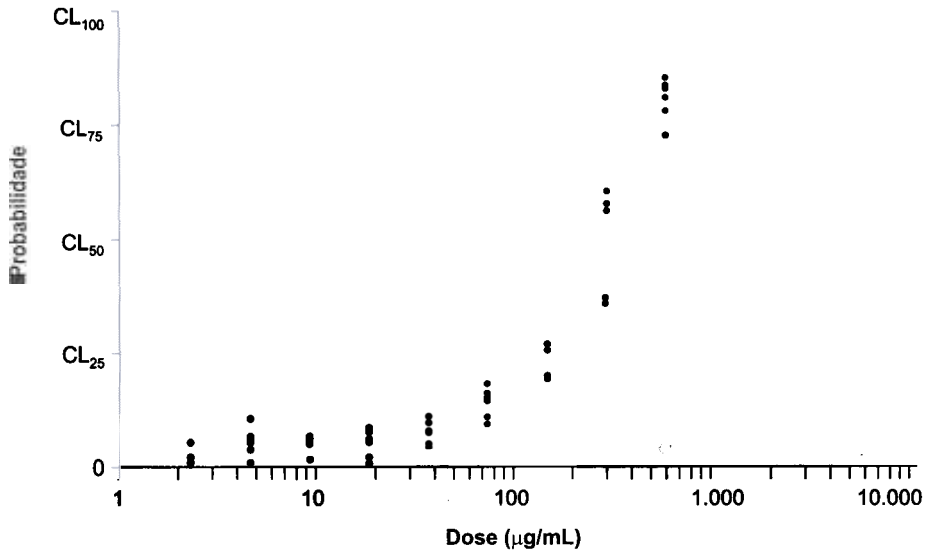


Figura 9. Gráfico de eficácia do albendazol gerado pelo programa Probit SAS, no qual as CL₂₅, CL₅₀, CL₇₅ e CL₁₀₀ estão em destaque no eixo Y, de acordo com o tratamento realizado (dose em µg/mL).