

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PPG BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CRISTIANE CERUTI FRANCESCHINA

ESTUDO SOBRE SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS DA OVIPOSIÇÃO
EM *ANGIOSTRONGYLUS* SPP. E SUA UTILIDADE
NO TRATAMENTO ANTI-HELMÍNTICO

PORTO ALEGRE
2011

CRISTIANE CERUTI FRANCESCHINA

**ESTUDO SOBRE SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS DA OVIPOSIÇÃO EM
ANGIOSTRONGYLUS SPP. E SUA UTILIDADE NO TRATAMENTO ANTI-
HELMÍNTICO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós - Graduação da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Carlos Graeff-Teixeira

Co-Orientadora: Dra. Márcia Bohrer Mentz

Porto Alegre

2011

CRISTIANE CERUTI FRANCESCHINA

**ESTUDO SOBRE SUBSTÂNCIAS INIBIDORAS DA OVIPOSIÇÃO EM
ANGIOSTRONGYLUS SPP. E SUA UTILIDADE NO TRATAMENTO ANTI-
HELMÍNTICO**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós - Graduação da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Apresentada em 08 de abril de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira

Prof. Dra. Júlia Maria Costa Cruz

Prof. Dra. Zulma Medeiros

AGRADECIMENTOS

À Maria de Lourdes Ceruti e Antônio José Bergamaschi Franceschina pela minha Vida e a força que só eles são capazes de me oferecer.

Ao Pai, Filho e Espírito Santo, meu Anjo da Guarda e Santo Protetor pelas Graças e proteção nos vários momentos de “bocabertices” acidentais que passo durante todos os meus dias.

À Caroline Zanotto, Fabiana B. Büttow, Gabriela Carniel, Karine Ribeiro, Mariane L. Mariano da Rocha e Renata Zenker pela Amizade, à verdadeira amizade, hoje e sempre.

Ao professor Dr. Carlos Graeff-Teixeira pelas maravilhosas aulas de parasitologia que me levaram à monitoria e, posteriormente, ao estágio no Laboratório de Biologia Parasitária láááááá em 2006. Pelos ensinamentos em física, matemática, às vezes era astronomia, teve também história, geografia, mas na maioria das vezes era filosofia mesmo... Ah, teve sociologia também... E culinária, e por aí vai. Depende do livro da vez!!! Não posso deixar de agradecer também pelos ensinamentos para a Vida, o Viver, o Conviver. À professora Dra. Márcia Bohrer Mentz pela co-orientação neste trabalho e aos momentos divertidíssimos durante a viagem ao congresso de Parasitologia em Foz. Ao Juliano Romanzini já que foi ele quem me ensinou tudo o que sei na parte prática do laboratório. E agora tem uma baixinha no lugar dele que, sem sombra de dúvida, substituiu a altura o técnico que ninguém queria que fosse embora. À Priscilla Sundin Pedersen, muito obrigada pela ajuda nos momentos difíceis. Mas esse laboratório não é feito de quatro pessoas, tem mais, muito mais. A todos agradeço pelos momentos de trabalho compartilhado, de risadas, muuuuuitas risadas e pela amizade que sempre levarei comigo no coração.

Mas essa caminhada não termina aqui, apesar de uma pequena pedra que apareceu no caminho, este é longo e espero ter todos comigo do meu lado.

Mais uma vez, obrigada a todos, por tudo.

 *Com o Grêmio onde o Grêmio estiver!* 

“Quem ocupa o trono tem culpa
Quem oculta o crime também
Quem duvida da vida tem culpa
Quem evita a dúvida também tem

Somos quem podemos ser
Sonhos que podemos ter.”

Engenheiros do Hawaii

Resumo

Estudo sobre substâncias inibidoras da oviposição em *Angiostrongylus* spp e sua utilidade no tratamento anti-helmíntico

Angiostrongylus cantonensis é um nematódeo de roedores, seus hospedeiros definitivos. Ao infectar o ser humano, um hospedeiro não habitual, causa meningoencefalite eosinofílica. A droga indicada para o tratamento é o albendazol, porém não existe, até o presente momento, droga de eficácia clínica demonstrada para o tratamento das angiostrongilíases. Assim, a idéia de buscar uma substância que reduza ou previna a morbidade é uma alternativa à abordagem usual de drogas vermícidas. Neste sentido, o presente estudo objetivou verificar o efeito de três substâncias com potencial capacidade de inibição da oviposição em *A. cantonensis*. Roedores da espécie *Rattus norvegicus* foram inoculados com 100 larvas L3 de *A. cantonensis* e após 42 dias de infecção larvas L1 começaram a ser eliminadas nas fezes. As substâncias foram administradas aos animais com 42 dias de infecção durante 5 dias para a lovastatina (400 mg/Kg) pela via oral, 4 dias para a fenantrolina (20 mg/Kg) pela via intraperitoneal diluindo-se em carboximetilcelulose (CMC) a 1% como coadjuvante e 3 dias, de 12 em 12 horas, para a nitazoxanida (8,3 mg/Kg) pela via oral. Os resultados mostraram um declínio na eliminação de larvas por *R. norvegicus* quando foi utilizada a nitazoxanida em relação aos animais infectados e não tratados demonstrando um potencial efeito na inibição da oviposição deste parasito. Estes resultados demonstram que esta idéia deve ter continuidade e mais estudos devem ser realizados para aprimorar essa nova hipótese.

Palavras - chave: *Angiostrongylus cantonensis*. Tratamento. Lovastatina. Nitazoxanida. Fenantrolina.

Abstract

Study on substances that inhibit oviposition in *Angiostrongylus* spp and their utility in anthelmintic treatment

Angiostrongylus cantonensis is a nematode of rodents, their definitive hosts. When infects humans, its unusual host, it causes eosinophilic meningoencephalitis. So far no drug has been demonstrated clinical efficacy for the treatment of angiostrongyliasis, although albendazole has been employed as a drug of choice. The idea of seeking a drug that would reduce or prevent morbidity is an alternative approach for usual vermicides, which presents poor results in angiostrongyliasis. In this sense, the present study aimed, among other things, to evaluate the effect of three substances with the potential capacity to inhibit oviposition in *A. cantonensis*. Rodent species *Rattus norvegicus* were inoculated with 100 L3 larvae of *A. cantonensis* and after 42 days of infection L1 larvae began to be shed in feces. The substances were administered to animals with 42 days of infection and, for 5 days for lovastatin (400 mg/kg) orally, phenanthroline for 4 days (20 mg/kg) intraperitoneally using carboxymethylcellulose (CMC) 1% and 3 days as an adjuvant, 12 in 12 hours, for nitazoxanide (8,3 mg/kg) orally. The results showed a decline in the elimination of larvae *R. norvegicus* when was used nitazoxanide compared to untreated infected animals and demonstrate a potential effect on the inhibition of this parasite oviposition. These results demonstrate that some degree of reduction in egg production is attainable and further studies should be performed to pursue this new idea of virulence reduction as an alternative to parasite killing.

Key - words: *Angiostrongylus cantonensis*. Treatment. Lovastatin. Nitazoxanide. Phenanthroline.

Sumário

1. Introdução.....	10
1.1. O parasito.....	10
1.2. Ciclo de vida.....	10
1.3. Epidemiologia.....	112
1.4. Diagnóstico.....	123
1.5. Tratamento.....	15
1.5.1. Lovastatina.....	16
1.5.2. Fenantrolina.....	16
1.5.3. Nitazoxanida.....	16
1.6. Objetivos.....	178
1.6.1. Objetivo geral.....	178
1.6.2. Objetivos específicos.....	178
1.7. Justificativa.....	189
2. Materiais e métodos.....	20
2.1. Manutenção do ciclo do <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em laboratório.....	20
2.2. Produção de vermes adultos.....	20
2.3. Teste de substâncias inibitórias da oviposição.....	20
2.4. Análise estatística.....	201
3. Resultados.....	23
3.1. Ocorrência, por dia, da larvipostura nas fezes.....	23
3.1.1. Lovastatina.....	24
3.1.2. Fenantrolina.....	24
3.1.3. Nitazoxanida.....	25
3.2. Ocorrência total de larvipostura nas fezes.....	25
3.3. Ocorrência de vermes encontrados durante necropsia.....	256
3.3.1. Nitazoxanida.....	256
3.3.2. Lovastatina.....	256
3.3.3. Fenantrolina.....	267
4. Discussão.....	278
5. Conclusões.....	312
REFERÊNCIAS.....	323
APÊNDICE.....	356
APÊNDICE A - Valores de <i>p</i> para cada dia de coleta e contagem das larvas nas fezes para avaliação da ocorrência de larvipostura nas fezes entre os grupos tratados (nitazoxanida, fenantrolina e lovastatina) com o não-tratado utilizando-se o teste ANOVA.....	356

APÊNDICE B - Teste de Tukey para o 43º dia pós-infecção mostrando que nenhuma das substâncias obtiveram resultados significativos sobre a larvipostura utilizando o teste <i>post-hoc</i>	356
APÊNDICE C - Teste de Tukey para o 51º dia pós-infecção mostrando que somente a lovastatina e a nitazoxanida tiveram resultados significativos sobre a larvipostura utilizando o teste <i>post-hoc</i>	356
APÊNDICE D - Teste de Tukey para o 52º dia pós-infecção mostrando que somente a lovastatina e a nitazoxanida tiveram resultados significativos sobre a larvipostura utilizando o teste <i>post-hoc</i>	367
APÊNDICE E - Teste de Tukey para o 53º dia pós-infecção mostrando que somente a lovastatina apresentou um resultado significativo sobre a larvipostura ao utilizar o teste <i>post-hoc</i>	367
APÊNDICE F - Valores de significância para a recuperação de vermes machos e fêmeas entre os grupos tratados com o não-tratado.....	367
APÊNDICE G - Teste de Tukey para comparação entre cada substância testada com o controle sobre o número de vermes fêmeas recuperados.....	38
APÊNDICE H - Aceite do Comitê de Ética para o Uso de Animais.....	39

1. Introdução

1.1. O parasito

Angiostrongylus (Parastrongylus) cantonensis pertence ao filo: Nematelminthes; classe: Nematoda; ordem: *Strongylida*; superfamília: *Metastrongyloidea*; gênero: *Angiostrongylus*; espécie: *cantonensis*, sendo que existem cerca de 180 espécies dentro de 45 gêneros. Todos são parasitos de mamíferos e a maioria habita os pulmões de seus hospedeiros definitivos e têm como hospedeiros intermediários os gastrópodes. Das 20 espécies descritas de *Angiostrongylus* somente duas infectam o ser humano: *A. cantonensis* e *A. costaricensis* (Alicata, 1991; Dorta-Contreras *et al.*, 2007; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009).

O verme de *A. cantonensis* foi descoberto nas artérias pulmonares e coração de ratos domésticos na China por Chen em 1935. Sua infecção é considerada uma zoonose que, em seres humanos, causa a angiostrongilíase e sua manifestação se dá pela meningite eosinofílica, resultado da infecção pelas larvas de quinto estágio (L5) deste nematódeo (Malek e Cheng, 1976; Alicata, 1991; Wang *et al.*, 2008). O verme macho mede cerca de 20 a 25 mm x 0.32 a 0.42 mm e o verme fêmea mede cerca de 22 a 34 mm x 0.34 a 0.56 mm (Figura 1) (Wang *et al.*, 2008).

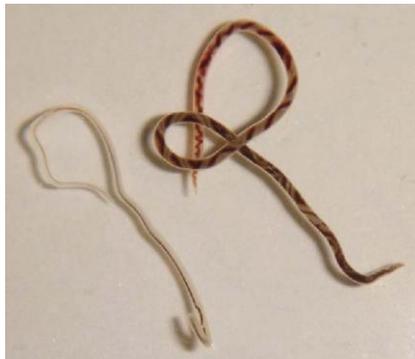


Figura 1: Verme de *A. cantonensis* com macho à esquerda medindo cerca de 20 a 25 mm x 0.32 a 0.42 mm e fêmea à direita medindo cerca de 22 a 34 mm x 0.34 a 0.56 mm (Eamsobhana *et al.*, 2009).

1.2. Ciclo de vida

Hospedeiros definitivos como *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* se infectam com o nematódeo ao ingerirem larvas de terceiro estágio (L3). Ao serem ingeridas, as larvas penetram a mucosa do intestino caindo na circulação sanguínea e migram até o sistema nervoso central onde se desenvolvem até adultos jovens (L5). Após realizar a muda de L4

para L5, esta migra para os pulmões onde desenvolve seu sistema reprodutor realizando sua última muda para verme adulto. O verme adulto vive nas artérias pulmonares dos roedores onde a fêmea produz cerca de 15000 ovos diariamente. Após realizarem a oviposição nos ramos terminais das artérias pulmonares, os mesmos eclodem e as larvas de primeiro estágio (L1) migram pela faringe para serem deglutidas e eliminadas com as fezes. As L1 quando entram em contato com moluscos, seus hospedeiros intermediários, penetram em sua musculatura e em 12 dias desenvolvem a forma infectante L3. *Achatina fulica*, *Pila* spp. e *Ampullarium canaliculata* são hospedeiros intermediários naturais (Wang *et al.*, 2008). A infecção do hospedeiro definitivo ocorre por ingestão das L3 que podem, também, infectar hospedeiros paratênicos como lagartos, planárias, camarões e caranguejos terrestres. O ser humano é um hospedeiro acidental e se infecta com o parasito ao ingerir moluscos ou hospedeiros paratênicos infectados e/ou alimentos contaminados com L3. As larvas infectantes ao penetrarem no intestino e entrarem na circulação, migram até o sistema nervoso central (Figura 2). Devido a uma forte reação inflamatória, as larvas ficam retidas e morrem nas meninges causando uma séria inflamação que se manifesta de três formas clínicas: meningite eosinofílica, encefalite ou angiostrongilíase ocular. (Dorta-Contreras *et al.*, 2007; Sawanyawesuth e Sawanyawesuth, 2008; Sinawat *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

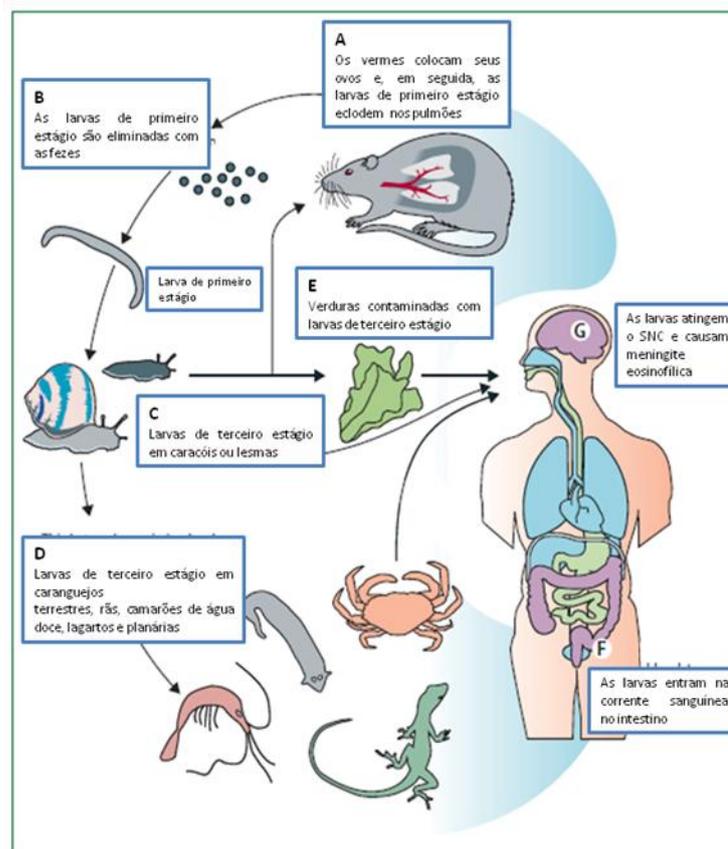


Figura 2: Ciclo evolutivo do *A. cantonensis* (Wang *et al.*, 2008)

1.3. Epidemiologia

O primeiro caso registrado em seres humanos foi em 1944 em Taiwan, no líquido céfalo-raquidiano de um jovem com sintomas de meningite (Nomura e Lin, 1945). Depois disso, 2827 casos foram relatados em mais de 30 países (Figura 3) como nas Filipinas, Indonésia, Malásia, Tailândia, Vietnã, Taiwan, Sumatra, China, Japão, Austrália, em regiões da África e, recentemente, foram encontrados casos isolados no continente americano em Cuba, nos Estados Unidos da América e Brasil (Malek e Cheng, 1976; Beneson, 1978; Vasconcellos e Pile, 2001; Dorta-Contreras *et al.*, 2007; Diaz, 2008; Graeff-Teixeira, 2007).

Nos últimos 10 anos os surtos desta parasitose ocorreram na China e Taiwan e os números de casos registrados fora das regiões endêmicas vêm crescendo através de viajantes que se infectam nestas áreas e retornam a seus países de origem. As áreas consideradas endêmicas estão no sul da Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália e Ilhas do Caribe (Wang *et al.*, 2008).

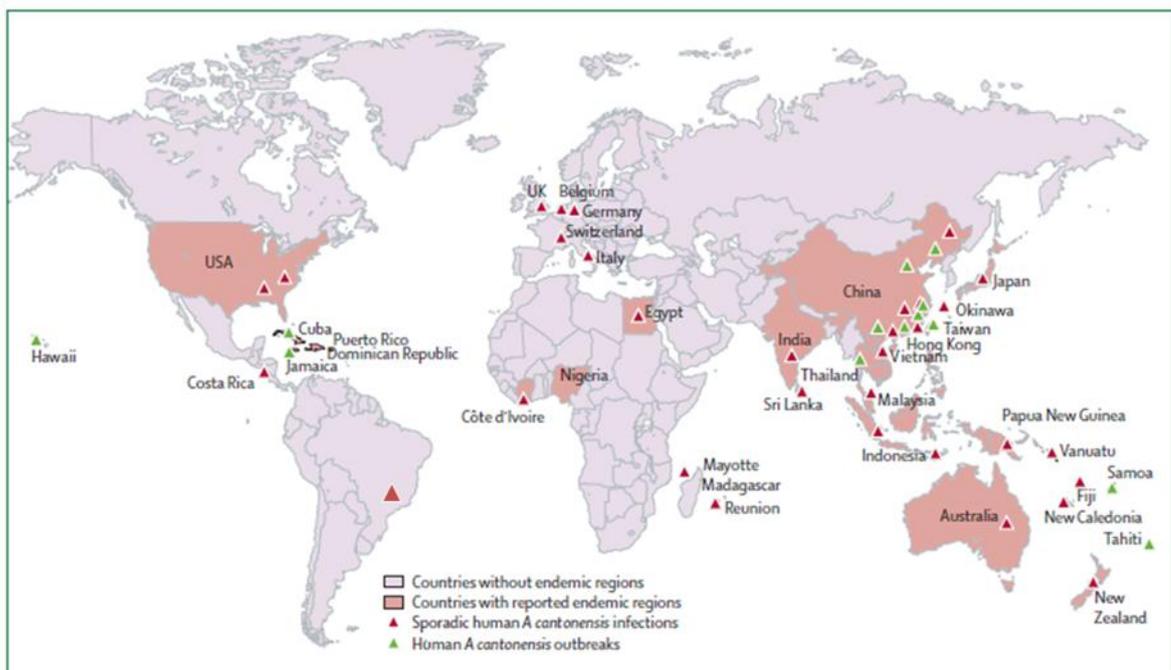


Figura 3: Mapa mundial mostrando a localização dos casos de angiostrongilíase (Wang *et al.*, 2008) com a inclusão do Brasil no grupo de países com infecções esporádicas.

Em 1961, casos de meningite eosinofílica associada ao *A. cantonensis* foram identificados no Tahiti e na Polinésia Francesa e, desde sua confirmação no Hawaii em 1962, o parasito tem sido considerado a causa de muitos outros casos nas Ilhas do Pacífico e no sul da Ásia. O primeiro caso de angiostrongilíase humana nas Ilhas do Caribe ocorreu em Cuba

no ano de 1973 e muitas outras infecções graves foram relatadas na Costa Rica e Jamaica, onde um grupo de americanos apresentou meningite eosinofílica após retornar ao seu país em 2000. Além deste caso, muitos outros foram relatados de viajantes infectados após voltarem do Pacífico e Ilhas do Caribe. Os países que apresentam um maior número de casos são: Tailândia com 1337 casos, China 769 casos, EUA 116 e Cuba 114. Ainda sobre o *A. cantonensis*, foram relatados outros 20 casos na sua forma ocular na Tailândia, Vietnã, Japão, Taiwan, Nova Papua Guiné, Índia e Sri Lanka (Sinawat *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

1.4. Diagnóstico

As L3, quando ingeridas pelo ser humano, entram na circulação sanguínea e, ao chegar ao cérebro como L5, as larvas causam uma forte reação inflamatória. Essa infecção desencadeia uma resposta imune humoral com a presença de IgE e uma resposta celular com a presença de basófilos, macrófagos, plaquetas e, principalmente, eosinófilos. A morte por angiostrongilíase se dá, não pela parasitose em si, mas pela resposta imune exagerada. Anticorpos específicos da classe IgE sinalizam para que células fagocitárias, principalmente eosinófilos, migrem até o local onde se encontram as larvas e liberem toxinas, responsáveis por muitos dos danos observados (Dorta-Contreras *et al.*, 2007).

A principal alteração patológica desta parasitose ocorre no cérebro onde sua superfície externa e a medula espinhal apresentam aspecto normal, mas infiltrações de linfócitos, células plasmáticas e eosinófilos são comumente relatados nas meninges e ao redor dos vasos intra-cerebrais. Infiltrações celulares em torno de L5 vivas são incomuns, mas com a morte destas larvas ocorre a formação de granulomas, aumento do número de eosinófilos e cristais de Charcot-Leyden. Pode-se observar no cérebro lesões causadas por essas larvas como faixas e micro-cavidades causadas por seu movimento. As larvas ainda podem ir para os olhos causando a angiostrongilíase ocular (Wang *et al.*, 2008).

A confirmação da angiostrongilíase se dá a partir da recuperação de larvas de *A. cantonensis* no fluido cérebro-espinhal ou no globo ocular, entretanto essa recuperação de larvas é muito pequena e infreqüente. O diagnóstico presuntivo pode ser baseado nos sintomas clínicos, no histórico médico, em achados laboratoriais do sangue e fluido cérebro-espinhal, em resultados de tomografias computadorizadas do cérebro e testes sorológicos. O relato da ingestão dos hospedeiros intermediários ou dos hospedeiros paratênicos é crucial para o diagnóstico desta parasitose. Durante a infecção, a proporção de eosinófilos no fluido cérebro espinhal pode ser de 100 a 1000 eosinófilos por microlitro (o normal é de menos de

10 eosinófilos por microlitro) e no sangue periférico pode variar de 7 a 36% (o normal é de 0,5 a 5%). A tomografia computadorizada do cérebro pode ser normal ou pode mostrar resultados não específicos, incluindo edema cerebral, dilatação ventricular, e difuso anel de reforço das meninges ou lesões do disco, lembrando um tuberculoma. Anticorpos como IgA, IgM, IgG e IgE são produzidos logo após a infecção. Testes sorológicos, como o ELISA, têm sido desenvolvidos para detectar os antígenos ou anticorpos contra o *A. cantonensis* no soro ou fluido cérebroespinal (Eamsobhana *et al.*, 2009).

Existem vários testes sorológicos para a confirmação de uma angiostrongilíase. Testes de detecção de antígenos, como ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), têm sensibilidade de 88% no soro e de 100% no fluido cérebro-espinal. O ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay), utilizando antígeno bruto de vermes fêmeas, tem uma sensibilidade de 100% e especificidade de 67% quando o alvo está entre 29 kDa e 31 kDa. A detecção de antígenos utilizando ELISA-PCR tem uma sensibilidade de 98% e especificidade de 100% e detecções de antígenos com 15 kDa por ELISA têm sensibilidade de 87% e especificidade de 100%, antígenos com 32 kDa oferecem sensibilidade alta e especificidade de 100%. Testes realizados com o objetivo de detectar anticorpos com peso molecular de 29 kDa como o WB em soro e fluido cérebro-espinal, WB para IgG4 em soro e a combinação entre WB em soro e ELISA em fluido cérebro-espinal têm sensibilidade de 56%, 75% e 80% respectivamente. Pesquisas de anticorpos com 31 kDa ou 100 kDa, utilizando o teste *Dot-blot*, têm sensibilidade de 100% para ambos e especificidade de 100% para o anticorpo com 31 kDa e de 86% para o anticorpo com 100 kDa (Sawanyawesuth e Sawanyawesuth, 2008; Eamsobhana *et al.*, 2009; Graeff-Teixeira *et al.*, 2009).

A produção de enzimas proteolíticas e sua liberação na forma de produtos de excreção e secreção já foram relatadas em diversos helmintos e podem desempenhar um papel diagnóstico no futuro quando bem caracterizadas. Metaloproteases já foram encontradas em secreções de larvas de terceiro estágio do *A. cantonensis* com componentes de pesos moleculares de 50 kDa e 30 kDa podendo desempenhar um papel importante na penetração do parasito na parede do estômago ou intestinos. Essas mesmas enzimas também foram encontradas no líquido cefalorraquidiano de ratos infectados (Lai *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005). Além das metaloproteases outras enzimas foram descritas como enzimas antioxidantes que desempenham um papel central para facilitar a sobrevivência dos parasitos quando em seus hospedeiros. As glutatona transferases (GSTs) são responsáveis por desintoxicar uma ampla gama de compostos endógenos ou exógenos incluindo espécies reativas ao oxigênio. Essas GSTs vêm sendo estudadas como candidatas a vacinas, marcadores para

imunodiagnósticos e como alvos para tratamento e foram encontradas em extrato total de *A. cantonensis* podendo estar associadas com a regulação imune do hospedeiro (Morassutti *et al.*, 2011).

1.5. Tratamento

A maioria dos casos de angiostrongilíase cerebral humana é leve, mas nos casos mais graves pode ocorrer a morte se não houver um tratamento rápido e adequado. Deve-se fazer punção lombar para o alívio da pressão intracraniana e da dor de cabeça. O tratamento é sintomático com o uso de analgésicos associados ou não a corticóides (Wang *et al.*, 2008).

Albendazol e mebendazol são as duas drogas mais estudadas em animais para o tratamento do *A. cantonensis*. Ambas possuem um efeito larvicida agindo na β -tubulina, bloqueiam a polimerização de proteínas contráteis do parasito e inibem a absorção da glicose. Estudos clínicos mostraram uma boa eficácia do albendazol em crianças, mas não existem esses mesmos dados para o mebendazol em uso isolado (Sawanyawesuth e Sawanyawesuth, 2008). Além do albendazol, droga de escolha para o tratamento da angiostrongilíase causada por *A. cantonensis*, e o mebendazol, existem outros anti-helmínticos usados para essa parasitose. São eles: Tiabendazol, 1-tetramisole, avermectina B1a, ivermectina, flubendazol e milbemicina (Wang *et al.*, 2006). Apesar destas drogas serem estudadas para o tratamento da angiostrongilíase, há dúvidas quanto a sua recomendação pela possibilidade de exacerbarem os sintomas neurológicos, no entanto, elas estão sendo usadas na China, Taiwan e Tailândia para tratar a doença. Mesmo com eficácia reduzida esses medicamentos podem aliviar os sintomas e reduzir a duração da doença (Wang *et al.*, 2008).

Não há tratamento comprovadamente eficaz para a angiostrongilíase. Corticosteróides têm sido úteis em casos graves para aliviar a pressão intracraniana e os sintomas neurológicos devido à resposta inflamatória à migração e, eventualmente, à morte dos vermes. A terapia baseada no uso de corticóides mostrou-se eficaz no alívio da cefaléia causada pela meningite eosinofílica na Tailândia. A associação de corticóides com anti-helmínticos têm sido utilizada na China com sucesso e sem seqüelas (Pien e Pien, 1999; Wang *et al.*, 2008).

Devido a pouca eficácia relatada aos antiparasitários existentes para o tratamento das angiostrongilíases novos compostos estão sendo testados para diminuir a inflamação causada por estes parasitos além dos corticóides. A idéia de cessar a oviposição para que seus ovos não agravem o quadro do paciente é uma alternativa ao tratamento que visa à morte dos

vermes, especialmente na angiostrongilíase abdominal, causada pelo *A. costaricensis*, pois na infecção humana por *A. cantonensis* não há desenvolvimento pleno dos adultos e a oviposição. O modelo experimental utilizando roedores permite investigar esta possibilidade de bloqueio de oviposição na espécie *A. cantonensis*. Lovastatina, fenantrolina (Mentz e Teixeira, 2005) e nitazoxanida são alguns exemplos de substâncias promissoras quanto ao seu efeito sobre nematódeos do gênero *Angiostrongylus*.

1.5.1. Lovastatina

A lovastatina, depois de ingerida, é hidrolisada da sua forma inativa para o seu hidroxiácido aberto correspondente, um inibidor da enzima 3-hidroxi 3-metilglutaril-coenzimaA (HMG-CoA) redutase. Essa enzima catalisa a conversão do HMG-CoA para mevalonato, uma etapa precoce e limitante da biossíntese do colesterol. Assim, a lovastatina funciona como um agente redutor do colesterol.

Em ensaios *in vivo* com *Schistosoma mansoni*, a lovastatina atuou diminuindo o número de vermes no mesentério e fígado e diminuiu significativamente o número de vermes fêmeas com ovos intra-uterinos. Em ensaios *in vitro* os ovos depositados por vermes expostos a lovastatina não se desenvolveram e foram encontrados mortos após cada experimento com variadas concentrações da droga (Araújo *et al.*, 2008).

1.5.2. Fenantrolina

A fenantrolina (1, 10 phenanthroline monohydrate) forma um complexo com o íon ferro e pode ser utilizado como quelante de outros íons metálicos como o zinco. Ela age modulando atividades enzimáticas relacionadas com o metabolismo energético celular produzindo efeito antioxidante e inibe a contratilidade muscular. Um de seus mecanismos de ação conhecidos é a inibição de aminopeptidases, efeito observado em *S. mansoni* que conduz à inibição da atividade motora, oviposição e viabilidade do parasito (Day e Chen, 1998).

1.5.3. Nitazoxanida

A nitazoxanida é rapidamente absorvida no trato intestinal e totalmente hidrolisada em um metabólito ativo, a tizoxanida, que é então conjugada em glucoronídeo tizoxanida. A nitazoxanida junto com seu metabólito inibem, *in vitro*, o crescimento de *Cryptosporidium*

parvum e de *Giardia lamblia*. O mecanismo de ação da nitazoxanida contra vermes ocorre através da inibição da polimerização da tubulina no parasita. Estudos realizados com o parasito *Brugia malayi* mostraram que após 8 dias de tratamento com nitazoxanida houve uma mudança na embriogênese de vermes fêmeas resultando em uma mudança nos ovos depositados pelas fêmeas (Rao *et al.*, 2009).

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo geral

Estudar a oviposição de *Angiostrongylus cantonensis* e o efeito de substâncias com potencial capacidade de inibição.

1.6.2. Objetivos específicos

Em modelos experimentais utilizando *A. cantonensis* em *Rattus norvegicus*:

- Quantificar e comparar a oviposição em vermes mantidos *in vivo*;
- Identificar se as substâncias lovastatina, fenantrolina e nitazoxanida são inibitórias da oviposição.

1.7. Justificativa

Até o presente momento não existe droga de eficácia clínica demonstrada para o tratamento das angiostrongilíases (Pien e Pien, 1999; Mentz e Graeff-Teixeira, 2003). Ainda persiste a preocupação com a morte repentina da população de vermes em um paciente e as repercussões inflamatórias da liberação maciça de antígenos (Morera e Bontempo, 1985; Mentz *et al.* 2004). Em todas as outras situações de helmintos teciduais, notadamente naquelas de localização visceral existe a mesma preocupação. Os ovos são elementos centrais da patogenia, entre outras helmintíases, das angiostrongilíases e das esquistossomoses. A idéia de buscar uma droga que reduza ou previna a morbidade permanece como alternativa a abordagem usual de drogas vermícidas, com poucos resultados nas angiostrongilíases. Especialmente neste aspecto, esta é uma abordagem inovadora no tratamento de infecções helmínticas e que se reveste de importância nas helmintíases teciduais. Baseados em experimentos iniciais feitos em roedores infectados com *Schistosoma mansoni*, não se conseguiu demonstrar o efeito inibitório sobre a oviposição do *A. costaricensis*, de derivados do mevinolin e da fenantrolina (Mentz *et al.*, 2007). Uma das dificuldades é a pouca adaptação dos roedores de laboratório e a necessidade de empregar roedores silvestres de difícil obtenção. A idéia de refinar as observações experimentais utilizando o *Angiostrongylus cantonensis* se fortalece pela possibilidade de utilizar como hospedeiro bem adaptado, o *Rattus norvegicus*.

2. Materiais e métodos

2.1. Manutenção do ciclo do *Angiostrongylus cantonensis* em laboratório

As larvas L3 infectantes para o hospedeiro definitivo de *Angiostrongylus cantonensis* foram isoladas de moluscos *Biomphalaria* sp. e inoculadas através de canulação esofágica em *Rattus norvegicus* anestesiados com isoflurano. Após 42 dias de infecção os roedores iniciaram a larvipostura de larvas L1 que foram recolhidas das fezes e colocadas em contato com os moluscos para a produção de L3.

2.2. Produção de vermes adultos

Os roedores foram inoculados por canulação esofágica com 100 larvas L3 obtidas da digestão dos moluscos infectados. Após quatro semanas, os vermes foram encontrados no interior dos vasos pulmonares.

2.3. Teste de substâncias inibitórias da oviposição

Cem larvas infectantes (L3), obtidas através da digestão de *Biomphalaria* sp. infectadas, foram inoculadas através de canulação esofágica em roedores anestesiados e divididos em quatro grupos, de oito roedores cada, conforme quadro 1. Estes oito animais foram divididos em dois grupos com quatro animais cada, ou seja, o experimento foi realizado em duplicata. E, além dos grupos referidos, foi montado mais um grupo com oito animais não infectados e não tratados para a realização de um controle ambiental.

Grupo	n	Tratamento
1	8	Infectado e não tratado (controle)
2	8	Lovastatina, 400 mg/Kg por 5 dias
3	8	Fenantrolina, 20 mg/Kg por 4 dias
4	8	Nitazoxanida, 8,3 mg/Kg por 3 dias

Quadro 1: 4 grupos com oito roedores cada

As substâncias utilizadas foram administradas aos grupos de roedores após 42 dias de infecção da seguinte forma: lovastatina (grupo 2), na dose de 400 mg/Kg durante 5 dias consecutivos (Araújo *et al.*, 2008); nitazoxanida (grupo 4), na dose de 8,3 mg/Kg durante 3 dias consecutivos e de 12h em 12h (conforme especificações da bula) e fenantrolina, (grupo 3), na dose de 20 mg/Kg por 4 dias consecutivos (Day e Chen, 1998).

As substâncias foram administradas a cada grupo por gavagem com cateter de metal, excetuando-se a fenantrolina, administrada por via intra-peritoneal se utilizando, como veículo, a carboxi-metil-celulose. No grupo controle infectado e não-tratado, metade dos animais recebeu água destilada através de gavagem e outra metade a carboxi-metil-celulose pela via intraperitoneal.

A oviposição de *A. cantonensis* para o modelo em *R. norvegicus* usualmente se inicia no 42º dia de infecção. Desde o 35º dia de infecção foi acompanhada a eliminação de larvas L1 nas fezes, através do Método de Baermann (Moraes, 1948), expressando-se a contagem de larvas relativa ao peso das fezes submetidas ao isolamento de larvas (larvas por grama de fezes).

Após o 53º dia de infecção os animais foram eutanasiados por depressão anestésica e recolhidos e contados foram os vermes existentes nas artérias pulmonares e cavidades cardíacas e congelados imediatamente.

A manipulação dos animais foi realizada de acordo com a lei brasileira 11794-8/10/2008, decreto 6899-15072009 e as recomendações do conselho nacional de controle de experimentação animal (CONEA) e o protocolo foi aprovado pelo comitê de ética da universidade (CEUA) sob o registro 09/00133 com data do ofício de 14 de abril de 2010.

2.4. Análise estatística

A grande variabilidade dos dados obtidos a partir das observações realizadas no teste para avaliação das substâncias estudadas impossibilitou o uso de técnicas inferenciais paramétricas. Para as análises desses dados aplicou-se o logaritmo de X+1 onde a variabilidade presente nos dados foi controlada e, em seguida, aplicou-se o teste ANOVA mostrando se houve diferença significativa ou não para cada dia analisado. Após a aplicação do ANOVA realizou-se o *post-hoc* de Tukey para mostrar quais são os grupos que diferem do controle. Os dados serão apresentados em média \pm erro padrão da média e significância de $p < 0,05$.

Para avaliação da recuperação de vermes após a necropsia realizou-se o teste ANOVA e novamente o *post-hoc* de Tukey. O programa utilizado para a realização dos testes estatísticos foi o SPSS.

3. Resultados

3.1. Ocorrência, por dia, da larvipostura nas fezes

Ao compararmos a carga parasitária por dia dos roedores tratados com os não-tratados observamos que as substâncias diferem significativamente do controle no fim dos dias analisados (figura 4).

A grande variabilidade dos dados obtidos impossibilitou o uso de técnicas inferenciais paramétricas. Para as análises desses dados aplicou-se o logaritmo de X+1 onde a variabilidade presente nos dados foi controlada. Para sabermos quais dias as substâncias analisadas obtiveram diferenças significativas em relação ao controle realizou-se o teste estatístico ANOVA e, para identificar qual a substância foi a que obteve diferença no respectivo dia acusado por ANOVA realizou-se o *post-hoc* de Tukey.

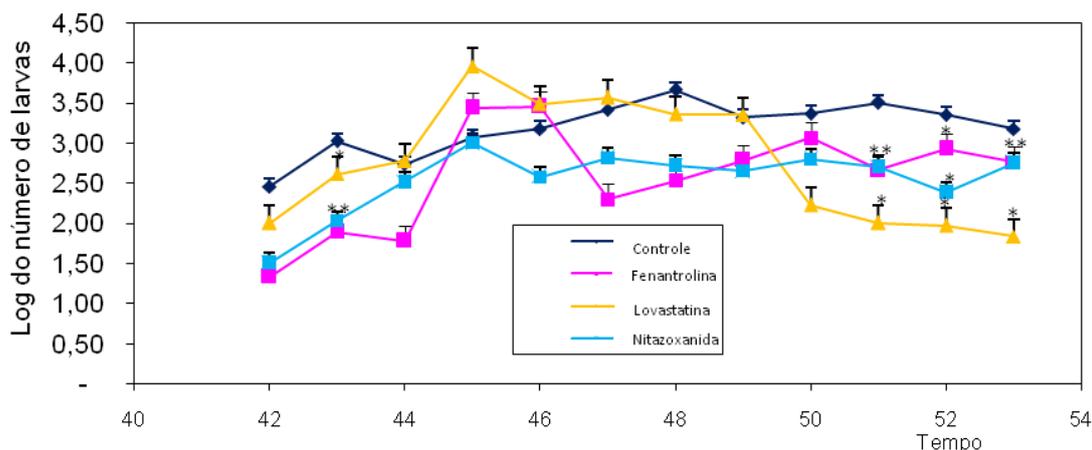


Figura 4: Prevalência da larvipostura em *Rattus norvegicus* infectados com larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* tratados e não-tratados entre o 42º e o 53º dia pós-infecção. * $p < 0,05$

Os animais foram avaliados a partir do 35º dia de infecção, mas todos, sem exceção, começaram a eliminar as larvas L1 somente no 42º dia pós-infecção. A partir do teste estatístico ANOVA observamos que para os dias 43, 51, 52 e 53 dos 12 dias analisados se obteve um $p < 0,05$ em relação ao grupo controle para todas as drogas (figura 4).

O 43º dia aponta, conforme figura 4, ter $p < 0,05$ obtido pelo teste ANOVA, mas após avaliarmos esse dia utilizando o *post-hoc* de Tukey observamos que nenhuma das substâncias analisadas obteve diferença quando comparadas individualmente com o controle. Ainda podemos observar que havia apenas um dia do começo da administração das substâncias a serem analisadas.

3.1.1. Lovastatina

Após a realização do *post-hoc* de Tukey observamos que a substância lovastatina obteve $p < 0,05$ nos dias 51, 52 e 53 mostrando que houve uma diminuição significativa das larvas em relação ao controle (figura 5).

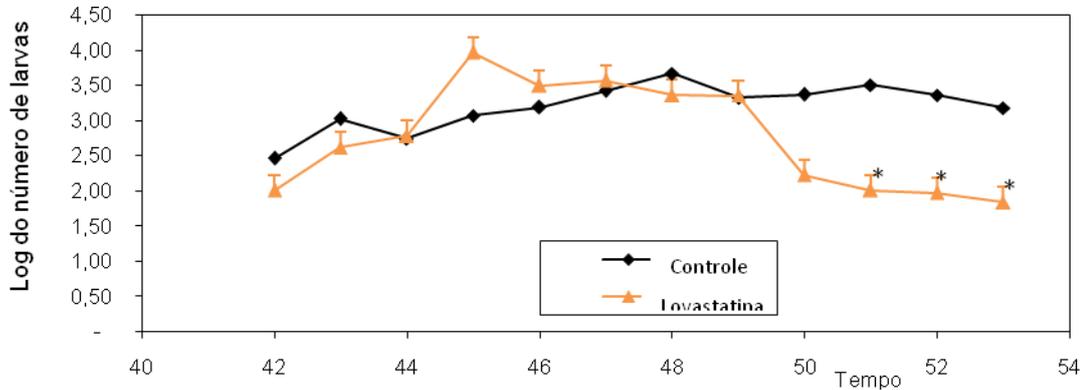


Figura 5: Prevalência da larvipostura em *Rattus norvegicus* infectados com larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* e tratados com lovastatina em relação ao controle. * $p < 0,05$

3.1.2. Fenantrolina

Após a realização do *post-hoc* de Tukey observamos que para a substância fenantrolina nenhum dos dias obteve diferença significativa em relação ao controle mostrando que não houve uma diminuição na eliminação das larvas (figura 6).

Observaram-se em dois roedores, após a administração da substância, pequenos tremores e, durante os quatro dias de tratamento, todos tinham sangue sendo eliminado junto às fezes.

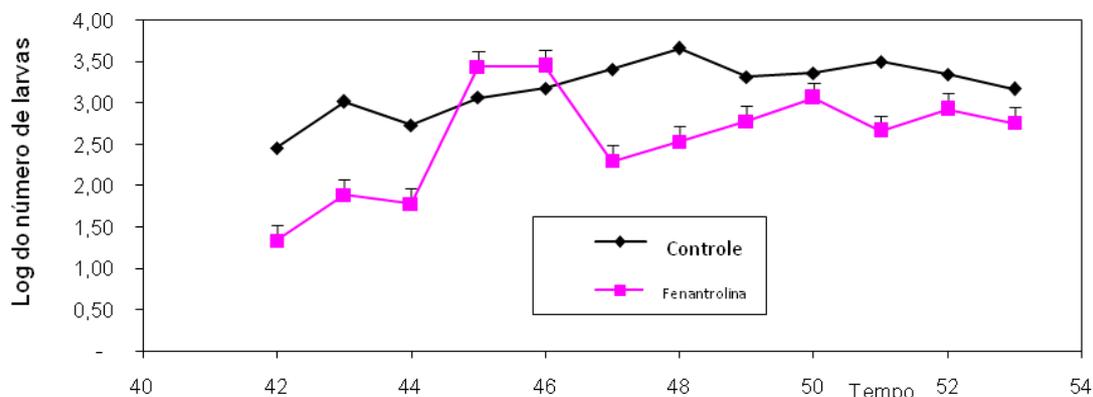


Figura 6: Prevalência da larvipostura em *Rattus norvegicus* infectados com larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* e tratados com fenantrolina em relação ao controle. * $p < 0,05$

3.1.3. Nitazoxanida

Após a realização do *post-hoc* de Tukey observamos que a substância nitazoxanida obteve $p < 0,05$ nos dias 51 e 52 mostrando que houve uma diminuição significativa das larvas em relação ao controle para os respectivos dias (figura 7).

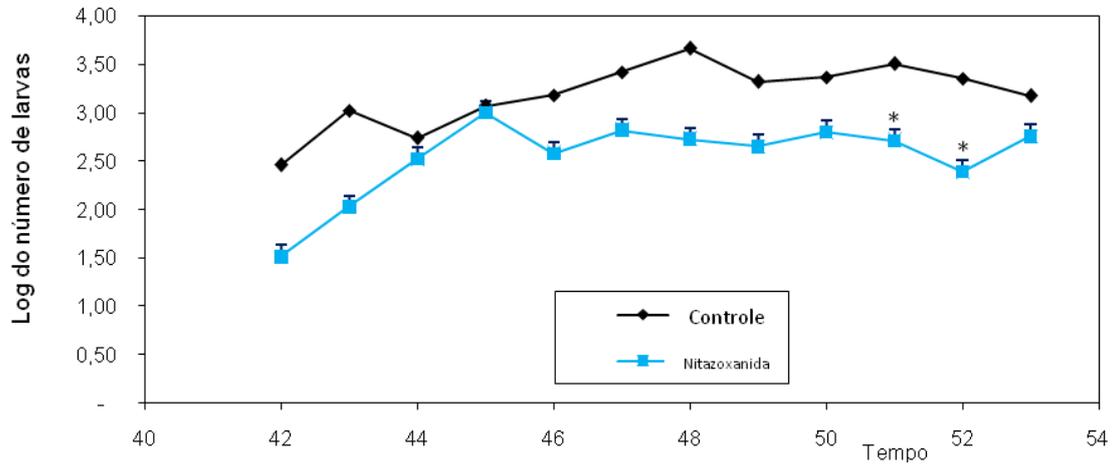


Figura 7: Prevalência da larvipostura em *Rattus norvegicus* infectados com larvas L3 de *Angiostrongylus cantonensis* e tratados com nitazoxanida em relação ao controle. * $p < 0,05$

3.2. Ocorrência total de larvipostura nas fezes

Ao analisarmos a carga parasitária total dos roedores tratados e não-tratados observamos que todas as substâncias diferem significativamente do controle mostrando que todas as substâncias agiram diminuindo a larvipostura dos animais infectados (figura 8).

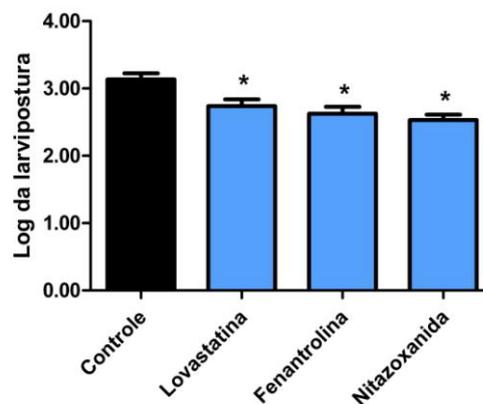


Figura 8: Ocorrência de larvipostura total das fezes dos animais infectados com *A. cantonensis* para cada grupo analisado. * $p < 0,05$

3.3. Ocorrência de vermes encontrados durante necropsia

Para identificarmos quais gêneros, se macho e/ou fêmea, obtiveram diferenças significativas em relação ao controle realizou-se o teste estatístico ANOVA e, para identificarmos qual a substância foi a que obteve diferença para o respectivo gênero acusado por ANOVA realizou-se o *post-hoc* de Tukey.

Após a realização do ANOVA observamos que somente o gênero feminino obteve diferença em relação ao grupo controle, ou seja, foi o gênero onde alguma das substâncias testadas teve diminuição no número de vermes recuperados (tabela 1).

Tabela 1: Número de vermes recuperados dos pulmões dos animais infectados com *A. cantonensis* após necropsia. * $p < 0,05$

	Grupo	Nº de vermes
Fêmea*	Controle	180
	Lovastatina	80
	Fenantrolina	114
	Nitazoxanida	131
Macho	Controle	124
	Lovastatina	66
	Fenantrolina	107
	Nitazoxanida	109

3.3.1. Nitazoxanida

A substância nitazoxanida é o único grupo que não difere do grupo controle (figura 9). O número de vermes fêmeas recuperado nos pulmões dos roedores tratados com a nitazoxanida foi de 131 e o número recuperado nos roedores controle foi de 180 (tabela 1). Esse achado sugere que houve ação sobre a oviposição dos vermes analisados, pois há uma diminuição significativa na larvipostura nos roedores (figura 7) sem causar a morte dos vermes encontrados em seus pulmões (figura 10).

3.3.2. Lovastatina

Quanto à lovastatina podemos observar que o número de vermes fêmeas, conforme figura 10, recuperados após a necropsia foi muito inferior ao obtido pelo grupo controle. A tabela 1 mostra que o grupo lovastatina obteve um número de vermes fêmeas recuperados de 80, enquanto o número de vermes fêmeas recuperados do grupo controle foi de 180. Ao

realizarmos o *post-hoc* de Tukey confirmamos que o número de vermes recuperados nos pulmões dos roedores tratados apresentou diferença em relação ao controle (figura 9). Ainda se observou, durante necropsia, que havia um grande número de vermes mortos nas artérias pulmonares dos roedores.

3.3.3. Fenantrolina

O número de vermes fêmeas recuperados após a necropsia dos roedores tratados com a substância fenantrolina foi de 114 contra 180 do grupo controle (tabela 1). Com a realização do *post-hoc* de Tukey verificou-se que essa substância, assim como a lovastatina, também teve uma diminuição do número de vermes fêmeas em relação ao controle (figura 10). Esse achado confirma que houve uma diminuição significativa no número de vermes recuperados (figura 9).

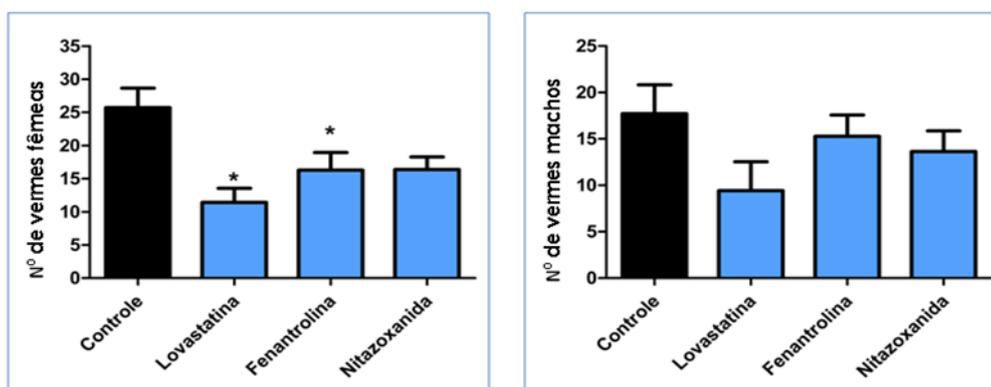


Figura 9: Ocorrência do número de vermes fêmeas e machos recuperados nos pulmões dos animais infectados com *A. cantonensis* para cada grupo analisado. * $p < 0,05$

O somatório do número de vermes recuperados nos mostra, novamente, que o grupo da nitazoxanida foi o que se manteve ao nível dos valores observados no grupo controle. A figura 10 nos mostra que o grupo tratado com lovastatina foi o grupo onde houve uma menor recuperação de vermes vivos seguido do grupo tratado com fenantrolina.

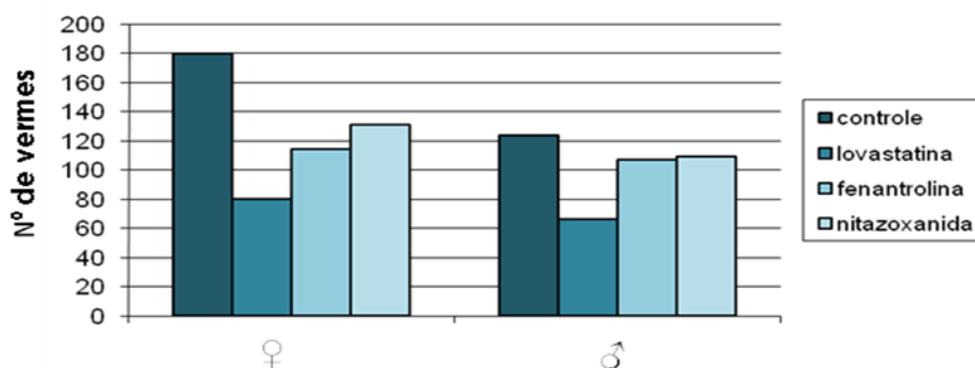


Figura 10: Somatório do número de vermes fêmeas e machos recuperados durante necropsia.

4. Discussão

Várias tentativas de tratamento para as angiostrongilíases têm sido realizadas ao longo dos anos, mas ainda não se encontrou uma substância capaz de tratar ou prevenir as formas graves da doença causados por estes parasitos (Graeff-Teixeira *et al.*, 2009). A angiostrongilíase causada pelo *A. cantonensis* tem como característica a presença de L5 no cérebro, ou seja, larvas sem seu aparelho reprodutor formado, o que somente ocorre quando os juvenis chegam aos pulmões do hospedeiro definitivo. Estudos sobre a inibição da oviposição são necessários para, além de contribuir com alternativas para tratamento de inúmeras outras parasitoses, conterem a inflamação causada pelo *Angiostrongylus costaricensis*. Este parasito causa a angiostrongilíase abdominal e seus ovos e larvas são os maiores causadores da inflamação intestinal (Mentz *et al.*, 2007).

Para a realização de estudos referentes à biologia das angiostrongilíases o modelo experimental utilizando *A. cantonensis* é o melhor indicado. Isso se deve ao fato de que seu hospedeiro definitivo está melhor adaptado ao parasitismo do que o observado com a outra espécie de *Angiostrongylus*, o *A. costaricensis* que, além de uma maior mortalidade dos roedores, apresenta um número menor de larvas sendo eliminadas nas fezes.

Neste estudo foram avaliadas três substâncias sobre a oviposição do *A. cantonensis* e quais foram seus efeitos no número de vermes pós-necropsia, empregando seu hospedeiro melhor adaptado, o *Rattus norvegicus*.

A lovastatina, apesar de ter apresentado uma diminuição da larvipostura por um número de dias maior em relação ao controle e mostrar que houve efeito quando analisamos sua larvipostura total, não apresentou eficácia sobre a oviposição por haver uma menor recuperação de vermes em comparação com o grupo controle. Esses dados indicam que a ação da lovastatina foi sobre os vermes, ou seja, ela agiu matando-os ao invés de diminuir sua oviposição. Estudos relataram que o mevinolin (lovastatina), em *Schistosoma mansoni*, inibiu a produção de ovos e que esta inibição pode ser revogada com o uso do mevalonato (precursor da biossíntese do colesterol). Na verdade, o mevalonato estimulou a produção de ovos pelo parasito (Chen *et al.*, 1991). Nossos resultados diferem dos achados por Araújo *et al.* (2008) que, ao estudarem seus efeitos sobre *Schistosoma mansoni* utilizando a mesma dose e por um mesmo período de tratamento, mostrou a eficácia da lovastatina com uma ausência de ovos intra-uterinos em 91,7% dos vermes fêmeas recuperados. Ainda existe a questão que, na esquistossomose, existem fármacos que matam os vermes como praziquantel e

oxamniquine sem grandes paraefeitos, o que tira um pouco do interesse em buscar outras estratégias de tratamento das esquistossomoses (Araújo *et al.*, 2008).

No caso da fenantrolina novamente não foi observado efeito sobre a oviposição do parasito, somente sobre o número de vermes encontrados mortos pós-necropsia. Estudos realizados utilizando a mesma dosagem e o mesmo tempo de tratamento em *S. mansoni* mostraram que a fenantrolina teve efeito *in vivo*, diminuindo o número de vermes. Alguns roedores apresentaram um ligeiro tremor após três dias de tratamento e verificou-se que houve um maior deslocamento de vermes para o fígado. O efeito sobre a inibição da oviposição foi observado somente *in vitro* sendo que a produção de ovos foi quase que completamente inibida (Day e Chen, 1998).

A partir dos resultados obtidos observamos que o grupo que obteve um melhor resultado foi o grupo da nitazoxanida. Além do Teste de Tukey mostrar diferença entre o grupo controle nos 51^o e 52^o dias pós-infecção o somatório da larvipostura mostrou que este grupo foi o que obteve a menor larvipostura não diferindo do controle. O Teste de Tukey mostrou ainda que foi a nitazoxanida o grupo que não obteve diferença na recuperação de vermes, ou seja, foi o grupo que obteve a menor larvipostura e que manteve o número de vermes sem que eles morressem nos pulmões dos roedores infectados. Rao *et al.* (2009) não mostrou efeito da nitazoxanida sobre microfilárias de *Brugia malayi*, em experimentos *in vivo*, mas conseguiu obter bons resultados sobre a oviposição do parasito *in vitro*.

O presente experimento buscava encontrar uma substância que inibisse a oviposição do *A. cantonensis* sem ocasionar a morte do verme para tentar, no futuro, testar em modelos com angiostrongilíase abdominal. Interessantemente, a substância que mostrou uma maior eficácia é o antiparasitário já existente no mercado. Não podemos afirmar que este medicamento é eficaz contra as angiostrongilíases, mas não podemos excluir esta possibilidade e mais estudos terão que ser realizados para testar sua eficácia.

A idéia baseada na inibição da oviposição de parasitos como o *A. cantonensis* é válida justamente pela piora da infecção causada em seres humanos por esses ovos. Estudos com esse objetivo são raros na literatura pela carência de dados que suportem a hipótese de que nem sempre a eliminação do patógeno é a melhor escolha de tratamento.

Experimentos utilizando bactérias mostram que terapias anti-virulência são uma tendência atual no tratamento das infecções dentro de uma visão ecológica da interação parasito-hospedeiro (Gal-Mor *et al.*, 2008). Estudos da fisiologia entre parasitos e hospedeiros vêm sendo realizados a fim de compreender essa interação a nível molecular de fatores que promovem a patogeneicidade.

Em bactérias, estes estudos incluem estruturas que promovem a adesão, colonização e disseminação, componentes responsáveis pela comunicação entre células e funções de regulação, fatores que facilitam a evasão do sistema imunológico e a produção de toxinas (Brötz-Oesterhelt e Sass, 2010).

O protozoário *Plasmodium falciparum*, responsável pela maior parte das mortes de seres humanos causados por parasitos, também é alvo de pesquisas anti-virulência. Os estudos focam em descobrir as proteínas secretadas pelo parasito diretamente para as hemácias do hospedeiro causando uma maior rigidez e adesividade dessas células. Muitas dessas proteínas já foram descobertas e desempenham um papel na geração da maior rigidez das hemácias infectadas sendo os alvos para a terapia anti-virulência (Maier *et al.*, 2008).

Em relação aos parasitos helmintos, ainda faltam estudos em relação à anti-virulência. Proteínas relacionadas com a penetração do parasito na parede do intestino e enzimas secretadas pelo parasito associadas a regulação imune do hospedeiro, entre outras, já foram descobertas e podem ser alvo de pesquisas relacionadas a terapias anti-virulência contra helmintos.

Nematódeos filarióides, causadores da elefantíase e oncocercose nos seres humanos, são alvos de terapias anti-virulência por terem suas larvas infectantes, as L3, transmitidas por vetores artrópodes. A melhor compreensão dos mecanismos moleculares associados a esta forma de transmissão pode fornecer pistas no desenvolvimento de novas terapias e vacinas para a prevenção destas infecções. Estudos realizados com *Brugia malayi* exploram as mudanças na expressão dos genes associados com a transição das L3 em mosquitos para os hospedeiros mamíferos sobre a ação da radiação. As L3 irradiadas podem induzir uma imunidade parcial à infecção por essa filária e as alterações causadas por essa radiação evitam ou retardam o desenvolvimento e a muda dessas larvas. A melhor compreensão das moléculas envolvidas na invasão do parasito e evasão da resposta imune, moléculas necessárias para seu crescimento e desenvolvimento, pode ser um caminho na busca de terapias anti-virulência (Li *et al.*, 2009).

Outro nematódeo estudado com o objetivo de terapia anti-virulência é o *Ancylostoma caninum*. As larvas L3 desses nematóides secretam macromoléculas essenciais à infecção e o estabelecimento do parasito no hospedeiro. O cão, quando infectado, segrega uma metaloprotease, a Ac-MTP-1. Estudos realizados na *George Washington University Medical Center USA* utilizaram um recombinante desta metaloprotease para imunizar um cão. Essa enzima inibiu a capacidade de recombinação da MTP-1 para digerir o colágeno e inibiu a migração de larvas através dos tecidos *in vitro*. Estudos com inibidores de metaloproteases de

EDTA e fenantrolina também reduziram a penetração das L3 através da pele *in vitro*. Estes estudos sugerem que a MTP-1 é fundamental no processo de invasão de larvas de ancilostomídeos e que anticorpos podem neutralizar sua função inibindo a migração do parasito (Williamson *et al.*, 2006).

Outros estudos mostram que pesquisadores conseguiram, a partir de seres humanos infectados com *Ancylostoma duodenale*, codificar o DNA de um peptídeo anticoagulante chamado AduNAP4. Este peptídeo tem 104 aminoácidos e mostra uma similaridade de até 50% com outra proteína anticoagulante de nematódeos conhecida como NAP. A AduNAP4 prolonga o tempo de tromboplastina parcial ativada e é um inibidor dos fatores de coagulação Xa e XIa. Os resultados deste estudo sugerem que o ancilostomídeo desenvolveu um mecanismo potente que interfere na coagulação através da inibição do fator XIa para facilitar a sua vida durante sua alimentação por sangue apresentando-se como mais um alvo na terapia anti-virulência (Gan *et al.*, 2009).

O parasito conhecido como *Ancylostoma duodenale* infecta 730 milhões de seres humanos nos países em desenvolvimento e são a principal causa de perda de sangue intestinal e anemia causada por deficiência de ferro. O verme, quando no local de fixação no hospedeiro, ingere hemoglobina ao lisar as hemácias para liberação da mesma. Para a digestão desta hemoglobina, o verme utiliza uma cascata de proteólises. Ao vacinar cães com o recombinante Ac-APR-1, anticorpos que induzem respostas celulares e resultam em uma redução significativa de vermes e da contagem de ovos nas fezes, observou-se que eles foram protegidos contra a perda de sangue e não desenvolveram anemia. As pesquisas realizadas por Loukas *et al.* (2005) mostraram que, em vermes recuperados de cães vacinados, o recombinante diminuiu a atividade catalítica da enzima APR-1. Esses resultados significam que a vacina interfere na capacidade do parasito de digerir a hemoglobina (Loukas *et al.*, 2005).

A vacina recombinante contra um parasito hematófago que reduz significativamente a carga parasitária e perda de sangue é apenas o começo na busca de terapias anti-virulência para este e outros helmintos. A terapia buscando inibir a oviposição ao invés de causar a morte dos parasitos apresenta-se como uma alternativa segura e eficaz. Os resultados obtidos neste experimento mostram que esta idéia deve ter continuidade e mais estudos devem ser realizados para aprimorar essa nova hipótese.

A terapia anti-virulência é uma alternativa que, combinada à idéia de cessar a oviposição, deve ser mais bem estudada junto a busca de moléculas envolvidas na reprodução do parasito.

5. Conclusões

A lovastatina agiu somente diminuindo a quantidade de vermes encontrados nos pulmões dos roedores infectados mostrando não ser eficaz contra a oviposição do *A. cantonensis*, mas sim contra seus vermes.

A fenantrolina, assim como a lovastatina, agiu sobre os vermes do parasito e, mesmo tendo um número reduzido de vermes, manteve sua larvipostura tal como o controle.

A nitazoxanida mostrou uma diminuição da larvipostura sem reduzir o número de vermes dos pulmões dos roedores estudados.

Estudos sobre a fisiologia e bioquímica do *A. cantonensis* são necessários para a busca de novas substâncias para o tratamento destas parasitoses pela inibição de sua oviposição buscando tratamentos anti-virulência.

REFERÊNCIAS

- Alicata JE. **The discovery of *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of human eosinophilic meningitis.** *Parasitol Today*. 1991 Jun;7(6):151-3.
- Araújo N, Mattos AC, Sarvel AK, Coelho PM, Katz N. **Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental *Schistosomiasis mansoni*.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 Aug;103(5):450-4.
- Beneson AS. **El control de las enfermedades transmisibles en el hombre.** Organización Panamericana de La Salud. 1978, Washinton, DC.
- Bhaibulaya M. **Snail borne parasitic zoonoses: angiostrongyliasis.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1991 Dec;22 Suppl:189-93.
- Brötz-Oesterhelt H, Sass P. **Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery.** *Future Microbiol*. 2010 Oct;5:1553-79.
- Chen GZ, Foster L, Bennett JL. **Purification and characterization of 3-hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase of *Schistosoma mansoni*: regulation of parasite enzyme activity differs from mammalian host.** *Exp Parasitol*. 1991 Jul;73(1):82-92.
- Day TA, Chen GZ. **The metalloprotease inhibitor 1,10-phenanthroline affects *Schistosoma mansoni* motor activity, egg laying and viability.** *Parasitology*. 1998 Apr;116 (Pt 4):319-25.
- Diaz JH. **Helminthic eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South.** *J La State Med Soc*. 2008 Nov-Dec;160(6):333-42.
- Dorta-Contreras AJ, Núñez-Fernandez FA, Pérez-Martín O, Lastre-González M, Magraner-Tarrau ME, Bu-Coifiú Fanego R, Noris-García E, Padilla-Docal B, Interián Morales MT, Martínez-Delgado JF, Sánchez-Zulueta E. **Peculiarities of meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in America.** *Rev Neurol*. 2007 Dec 16-31;45(12):755-63.
- Eamsobhana P, Yong HS. **Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae).** *Int J Infect Dis*. 2009 Jul;13(4):425-31. Epub 2008 Dec 30.
- Gal-Mor O, Gibson DL, Baluta D, Vallance BA, Finlay BB. **A novel secretion pathway of *Salmonella enterica* acts as an antivirulence modulator during salmonellosis.** *PLoS Pathog*. 2008 Apr 4;4(4):e1000036.
- Gan W, Deng L, Yang C, He Q, Hu J, Yin H, Jin X, Lu C, Wu Y, Peng L. **An anticoagulant peptide from the human hookworm, *Ancylostoma duodenale* that inhibits coagulation factors Xa and XIa.** *FEBS Lett*. 2009 Jun 18;583(12):1976-80. Epub 2009 May 14.

Graeff-Teixeira C. **Expansion of *Achatina fulica* in Brazil and potential increased risk for angiostrongyliasis.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007 Aug;101(8):743-4.

Graeff-Teixeira C, da Silva AC, Yoshimura K. **Update on eosinophilic meningoencephalitis and its clinical relevance.** Clin Microbiol Rev. 2009 Apr;22(2):322-48.

Lai SC, Jiang ST, Chen KM, Lee HH. **Matrix metalloproteinases activity demonstrated in the infective stage of the nematodes, *Angiostrongylus cantonensis*.** Parasitol Res. 2005 Dec;97(6):466-71.

Lee JD, Yen CM. **Protease secreted by the infective larvae of *angiostrongylus cantonensis* and its role in the penetration of mouse intestine.** Am J Trop Med Hyg. 2005 Jun;72(6):831-6.

Li BW, Rush AC, Mitreva M, Yin Y, Spiro D, Ghedin E, Weil GJ. **Transcriptomes and pathways associated with infectivity, survival and immunogenicity in *Brugia malayi* L3.** BMC Genomics. 2009 Jun 15;10:267.

Loukas A, Bethony JM, Mendez S, Fujiwara RT, Goud GN, Ranjit N, Zhan B, Jones K, Bottazzi ME, Hotez PJ. **Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs.** PLoS Med. 2005 Oct;2(10):e295. Epub 2005 Oct 4.

Malek EA, Cheng TC. **Medical and Economic Malacology.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 1976, pp. 203-204.

Maier AG, Rug M, O'Neill MT, Brown M, Chakravorty S, Szeszak T, Chesson J, Wu Y, Hughes K, Coppel RL, Newbold C, Beeson JG, Craig A, Crabb BS, Cowman AF. **Exported proteins required for virulence and rigidity of *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes.** Cell. 2008 Jul 11;134(1):48-61.

Mentz MB, Teixeira CG. **Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003 Jul-Aug;45(4):179-84.

Mentz MB, Teixeira CG, Garrido CT. **Treatment with mebendazole is not associated with distal migration of adult *Angiostrongylus costaricensis* in the murine experimental infection.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004 Mar-Apr;46(2):73-5.

Mentz MB, Teixeira CG. **In vitro maintenance of *Angiostrongylus costaricensis* does not provide physiological conditions for egg laying.** Rev Soc Bras Med Trop. 2005 Mar-Apr;38(2):205-6.

Mentz MB, Dallegrave E, Agostini AA, Graeff-Teixeira C. **Phenantroline, lovastatin, and mebendazole do not inhibit oviposition in the murine experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis*.** Parasitol Res. 2007 100: 379-382.

Morassutti AL, Pinto PM, Dutra BK, Oliveira GT, Ferreira HB, Graeff-Teixeira C. **Detection of anti-oxidant enzymatic activities and purification of glutathione transferases from *Angiostrongylus cantonensis*.** Exp Parasitol. 2011 Feb;127(2):365-9. Epub 2010 Aug 31.

Morera P, Bomtempo F. **Acción de algunos antihelmínticos sobre *Angiostrongylus contaricensis***. Rev. Med. Hosp. Nac. Niños Costa Rica 1985, 20:165-174.

Moraes, RG. **Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da estromboloidíase no Brasil**. Rev. Serv. esp. Saúde públ. (Rio de J.), 1: 507-524, 1948.

Nomura S, Lin PH. **First case report of human infection with *Hamostrongylus ratti yokogawa* Taiwan**. No Ikai, 1945, 3:589-592.

Pien FD, Pien BC. ***Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis**. Int J Infect Dis. 1999 Spring;3(3):161-3.

Rao RU, Huang Y, Fischer K, Fischer PU, Weil GJ. ***Brugia malayi*: Effects of nitazoxanide and tizoxanide on adult worms and microfilariae of filarial nematodes**. Exp Parasitol. 2009 Jan;121(1):38-45. Epub 2008 Oct 17.

Sawanyawisuth K, Sawanyawisuth K. **Treatment of angiostrongyliasis**. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008 Oct;102(10):990-6.

Sinawat S, Sanguansak T, Angkawinijwong T, Ratanapakorn T, Intapan PM, Sinawat S, Yospaiboon Y. **Ocular angiostrongyliasis: clinical study of three cases**. Eye (Lond). 2008 Nov;22(11):1446-8. Epub 2008 Jun 6.

Vasconcellos MC, Pile E. **Occurrence of *Achatina fulica* in the Vale do Paraíba, Rio de Janeiro state, Brazil**. Rev Saude Publica. 2001 Dec;35(6):582-4.

Wang LC, Jung SM, Chen CC, Wong HF, Wan DP, Wan YL. **Pathological changes in the brains of rabbits experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis* after albendazole treatment: histopathological and magnetic resonance imaging studies**. J Antimicrob Chemother. 2006 Feb;57(2):294-300.

Wang QP, Lai DH, Zhu XQ, Chen XG, Lun ZR. **Human angiostrongyliasis**. Lancet Infect Dis. 2008 Oct;8(10):621-30.

Williamson AL, Lustigman S, Oksov Y, Deumic V, Plieskatt J, Mendez S, Zhan B, Bottazzi ME, Hotez PJ, Loukas A. ***Ancylostoma caninum* MTP-1, an astacin-like metalloprotease secreted by infective hookworm larvae, is involved in tissue migration**. Infect Immun. 2006 Feb;74(2):961-7.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Valores de p para cada dia de coleta e contagem das larvas nas fezes para avaliação da ocorrência de larvipostura nas fezes entre os grupos tratados (nitazoxanida, fenantrolina e lovastatina) com o não-tratado utilizando-se o teste ANOVA.

Dias	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53
Pós-Infecção												
Significância	,155	,040*	,310	,272	,230	,430	,163	,054	,125	,000**	,000**	,003**

*Significativo ao nível de 5%. ** Significativo ao nível de 1%.

APÊNDICE B - Teste de Tukey para o 43° dia pós-infecção mostrando que nenhuma das substâncias obtiveram resultados significativos sobre a larvipostura utilizando o teste *post-hoc*.

Sub-conjunto para $p = 0,05$		
Droga	N	1
Fenantrolina	7	1,600198
Nitazoxanida	8	2,013722
Controle	7	2,785479
Lovastatina	7	3,004558

APÊNDICE C - Teste de Tukey para o 51° dia pós-infecção mostrando que somente a lovastatina e a nitazoxanida tiveram resultados significativos sobre a larvipostura utilizando o teste *post-hoc*.

Sub-conjunto para $p = 0,05$			
Droga	N	1	2
Lovastatina	7	1,902904	
Nitazoxanida	8	2,567603	
Fenantrolina	7	2,666115	2,666115
Controle	7		3,444553

APÊNDICE D - Teste de Tukey para o 52º dia pós-infecção mostrando que somente a lovastatina e a nitazoxanida tiveram resultados significativos sobre a larvipostura utilizando o teste *post-hoc*.

Sub-conjunto para $p = 0,05$				
Droga	N	1	2	3
Lovastatina	7	1,910740		
Nitazoxanida	8	2,410976	2,410976	
Fenantrolina	7		2,743181	2,743181
Controle	7			3,421693

APÊNDICE E - Teste de Tukey para o 53º dia pós-infecção mostrando que somente a lovastatina apresentou um resultado significativo sobre a larvipostura ao utilizar o teste *post-hoc*.

Sub-conjunto para $p = 0,05$			
Droga	N	1	2
Lovastatina	7	1,793688	
Fenantrolina	8	2,586139	2,586139
Nitazoxanida	7	2,678511	2,678511
Controle	7		3,369206

APÊNDICE F - Valores de significância para a recuperação de vermes machos e fêmeas entre os grupos tratados com o não-tratado.

	Grupo	Significância
Fêmea	Controle	,003*
	Lovastatina	
	Fenantrolina	
	Nitazoxanida	
Macho	Controle	0,208
	Lovastatina	
	Fenantrolina	
	Nitazoxanida	

*Significativo ao nível de 5%. (Teste ANOVA)

APÊNDICE G - Teste de Tukey para comparação entre cada substância testada com o controle sobre o número de vermes fêmeas recuperados.

Sub-conjunto para $p = 0,05$

Droga	N	1	2
Lovastatina	7	11,4286	
Fenantrolina	8	16,2857	
Nitazoxanida	7	16,3750	16,3750
Controle	7		25,7143

APÊNDICE H - Aceite do Comitê de Ética para o Uso de Animais.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 051/10 – CEUA

Porto Alegre, 14 de abril de 2010.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00133, intitulado: **“Estudo sobre substâncias inibidoras da oviposição em *Angiostrongylus cantonensis* e sua utilidade no tratamento anti-helmíntico”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,



Profa. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira
Fabio
N/Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

Imprimir

Page 1 of 1

[Imprimir - Fechar janela](#)

Assunto: ENC: Submission Confirmation
De: Carlos Graeff Teixeira (graeteix@puers.br)
Para: graeff.teixeira@gmail.com;
Cc: babycris_rs@yahoo.com.br;
Data: Ter, 07 Jun 2011 23:26:47

Prof. Dr. Carlos Graeff Teixeira, ATM-80

Grupo de Parasitologia Biomédica da PUCRS
Faculdade de Biociências e Instituto de Pesquisas Biomédicas

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Coordenadoria de Pesquisa, Setor de Pesquisa Interdisciplinar

De: ees.parint.0.11adb5.01bbf8f9@eesmail.elsevier.com em nome de Parasitology International
Enviada: ter 7/6/2011 14:25
Para: Carlos Graeff Teixeira
Assunto: Submission Confirmation

Dear Carlos,

Your submission entitled "Larvae elimination is partially inhibited by nitazoxanide but it is neither inhibited by lovastatin nor by phenanthroline in rodent experimental infection with *Angiostrongylus cantonensis*" has been received by Parasitology International

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/parint/>.

Your username is: graeffteixeira

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/parint/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Parasitology International