



ALENIR NAVES DE SALES

**PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DE OVOS E LARVAS DE
Strongyloides venezuelensis Brumpt, 1934 PARA AVALIAÇÃO
DO EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO LARVÁRIO**

LAVRAS - MG

2019

ALENIR NAVES DE SALES

PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DE OVOS E LARVAS DE *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVÁRIO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Vitor Luís Tenório Mati

Orientador

LAVRAS - MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.

Sales, Alenir Naves de.

Padronização do cultivo de ovos e larvas de *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 para avaliação do efeito da dexametasona sobre o desenvolvimento larvário / Alenir Naves de Sales. - 2019.

65 p.: il.

Orientador(a): Vitor Luís Tenório Mati.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. *Strongyloides venezuelensis*. 2. Cultivo. 3. Dexametasona. I. Mati, Vitor Luís Tenório. II. Título.

ALENIR NAVES DE SALES

PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DE OVOS E LARVAS DE *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DEXAMETASONA SOBRE O DESENVOLVIMENTO LARVÁRIO

STANDARDIZATION OF EGGS AND LARVAE CULTIVATION OF *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 FOR THE EVALUATION OF THE EFFECT OF DEXAMETHASONE ON LARVAL DEVELOPMENT

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 12 de setembro de 2019.

Prof. Dr. Hudson Alves Pinto - UFMG

Prof. Dr. Sidney de Almeida Ferreira - UFLA

Prof. Dr. Vitor Luís Tenório Mati

Orientador

LAVRAS - MG

2019

A Deus, cuja essência é amor.
A Mateus e Lívia, meu bem maior.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao concluir mais uma jornada acadêmica, justo é prestar reconhecimento àqueles que participaram, direta ou indiretamente da realização da mesma. Registro aqui sinceros agradecimentos:

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciências da Saúde pela oportunidade de crescimento acadêmico e de realização pessoal enquanto participante das atividades de pesquisa ali desenvolvidas.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Vítor Luís Tenório Mati, mentor e orientador do presente estudo. Possuidor de visão ampla e de grande expertise na área das Ciências da Saúde, possibilitou-me conhecer um pouco do vasto campo da Parasitologia, particularmente no que repeita à estrogiloidose. Destaco sua humildade, paciência, otimismo, curiosidade científica e diligente busca pela excelência como características marcantes e fundamentais para o êxito desta pesquisa.

Aos Professores do Departamento de Ciências da Saúde pelo conhecimento ministrado, pelo exemplo de rigor metodológico e pela acessibilidade, em alguns casos, transformada em relações de afetuosa amizade.

Aos funcionários da UFLA, dos mais variados setores, que exerceram o funcionalismo público com boa vontade e competência.

Ao Professor Hudson Alves Pinto (UFMG) por ter doado os gerbis para a realização desta pesquisa.

Aos Professores Alan Lane de Melo (UFMG) e Narcisa Imaculada Brant Moreira (UFES) pela disponibilização da cepa de *Strongyloides venezuelensis*.

Aos estimados colegas de curso, merecedores não apenas dos agradecimentos, mas também da indelével lembrança dos momentos compartilhados.

Agradeço, na pessoa da Luciana da Silva, às secretárias que passaram pelo DSA durante o período de realização do mestrado, dispensando atenção e prestatividade a todos os discentes.

À Professora Adriana Mello Garcia por ter disponibilizado as dependências do Laboratório de Helminologia do Departamento de Medicina Veterinária (UFLA) para a condução dos experimentos e ao técnico do laboratório, Marcos, pelo auxílio logístico.

À estudante do curso de Biologia Camila Muniz Lopes que em alguns momentos participou das atividades de laboratório e em outros, se divertiu brincando com gerbis durante o manejo.

A Deus, Soberano Criador, pela vida, saúde e forças cotidianas, Aquele que esteve presente em todos os momentos, especialmente nos mais desafiadores!

Aos meus pais, maiores incentivadores e meus melhores exemplos de vida!

Aos meus amores, Mateus e Livia, agradeço com carinho extremado. Meus filhos, quando idealizei empreender mais esta jornada, pensei em vocês; quando senti cansaço ou desânimo, lembrei-me de vocês; quando sonhei em lhes deixar algum legado, conclui que o melhor seria o exemplo do esforço e da dedicação na busca pelo imperecível conhecimento, veiculado através da Ciência. Desejo sinceramente que superem, sobremaneira, as metas que consegui atingir!

Muito obrigada a todos!

“A estrogiloidose ainda é um campo aberto. Apenas alguns pesquisadores têm dedicado suas carreiras a essa parasitose e nossos esforços, combinados, geraram muito mais perguntas do que respostas.”

Robert M. Genta

RESUMO

A estrogiloidose humana, causada pelo nematódeo *Strongyloides stercoralis* é uma importante doença parasitária que, apesar da elevada prevalência e da gravidade associada à hiperinfecção e disseminação do parasito, tem sido reconhecidamente negligenciada. O estudo da biologia de *S. venezuelensis* tem possibilitado avanços em variados aspectos do conhecimento da estrogiloidose. No presente estudo avaliou-se, *a priori*, a padronização das condições de cultivo *in vitro* de *S. venezuelensis* (Experimento I). Posteriormente, avaliou-se o efeito de dexametasona sobre o desenvolvimento larval (Experimento II). Inicialmente, soluções saturadas de NaCl ou sacarose foram utilizadas na recuperação por centrífugo-flutuação de ovos de *S. venezuelensis* oriundos de material fecal de *Meriones unguiculatus* experimentalmente infectados pelo parasito. Avaliou-se também a manutenção e o desenvolvimento das larvas eclodidas dos ovos em água deionizada, em meios aquosos de glicose (5%) e de fezes de *M. unguiculatus* (1%) acondicionados em dois tipos de recipientes: placas para cultura celular ou tubos de Khan, a 27 °C. A seguir, testou-se o volume ideal de meio para o cultivo (1, 2 ou 4 ml). Por meio do Experimento I, verificou-se que solução salina saturada possibilitou a recuperação dos ovos, com até 89% de eficiência, sem interferência no subsequente desenvolvimento das larvas até o terceiro estágio (L3i). Os ovos cultivados em tubos de Khan não se desenvolveram. Já nas placas para cultura celular, o desenvolvimento de ovos até L3i foi significativamente superior no meio fecal a 1% quando incubados em 1 ou 2 ml. Além das características do meio de cultura, as diferenças observadas em função do recipiente utilizado indicam influência da superfície de contato com o ar e/ou da altura da coluna de água/meio no desenvolvimento e sobrevivência das larvas. Apesar de existirem processos de cultura para a obtenção de L3i de *Strongyloides* spp., em tempo real, é desejável, podendo ser útil na realização de testes futuros envolvendo fármacos. De posse dos resultados do Experimento I, ovos de *S. venezuelensis*, recuperados por centrífugo-flutuação em solução salina saturada, foram cultivados em placas para cultura celular contendo 1 ml de meio fecal a 1%. Ao meio, acrescentou-se dexametasona em três concentrações: 0,5, 0,05 ou 0,005 mg/ml. As placas foram incubadas a 27 °C por 48 horas e o desenvolvimento larval avaliado a cada oito horas. Os ovos cultivados em 0,5 mg/ml de dexametasona não se desenvolveram em larvas. Contudo, nas menores concentrações, percebeu-se efeito significativo do fármaco, em relação ao controle, promovendo aceleração do desenvolvimento do estádios larvais. Os resultados obtidos apoiam a hipótese do efeito direto de corticosteroides sobre o desenvolvimento larvário de espécies de *Strongyloides*.

Palavras-chave: *Strongyloides venezuelensis*. Cultivo. Dexametasona.

ABSTRACT

Human strongyloidiasis, caused by the *Strongyloides stercoralis* nematode, is an important parasitic disease that, despite the high prevalence and severity associated with parasite hyperinfection and dissemination, has been admittedly neglected. The study of *S. venezuelensis* biology has enabled advances in varied aspects of the knowledge of strongyloidiasis. In the present study, *a priori*, the standardization of the *in vitro* culture conditions of *S. venezuelensis* (Experiment I) was evaluated. Posteriorly, the effect of dexamethasone on larval development was evaluated (Experiment II). Initially, saturated solutions of NaCl or sucrose were used for centrifugal-flotation recovery of *S. venezuelensis* eggs from fecal material of *Meriones unguiculatus* experimentally infected by the parasite. The maintenance and development of hatched larvae of eggs in deionized water, aqueous glucose media (5%) and *M. unguiculatus* feces (1%) in two types of containers were also evaluated: cell culture plates or Khan's tubes at 27 °C. Then, the ideal volume of culture medium (1, 2 or 4 ml) was tested. Through Experiment I, it was found that saturated saline solution made it possible to recover eggs with up to 89% efficiency, without interference in the subsequent larval development until the third stage (L3i). The cultivated eggs in Khan's tubes haven't developed. In cell culture plates, egg development up to L3i was significantly higher in the 1% fecal medium when incubated in 1 or 2 ml. In addition to the characteristics of the culture medium, the differences observed as a function of the container used indicate the influence of the air contact surface and/or the height of the water column/medium on larval development and survival. Although there are culture processes for obtaining L3i from *Strongyloides* spp., the standardization of a methodology that allows monitoring of egg development to L3i in real time is desirable and may be useful for future tests drugs. With the results of Experiment I, *S. venezuelensis* eggs, recovered by centrifuge-flotation in saturated saline solution, were cultured in cell culture plates containing 1 ml of fecal medium 1%. In the medium, dexamethasone was added at three concentrations: 0.5, 0.05 or 0.005 mg/ml. The plates were incubated at 27 °C for 48 hours and larval development evaluated every eight hours. The cultivated eggs in dexamethasone 0.5 mg/ml haven't developed in larvae. However, at lower concentrations, a significant effect of the drug in relation to the control was observed, promoting acceleration of the development of the larval stadium. The obtained results support the hypothesis of the direct effect of corticosteroids on larval development of *Strongyloides* species.

Keywords: *Strongyloides venezuelensis*. Cultivation. Dexamethasone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida de <i>Strongyloides</i>	18
Figura 2 – Modelos propostos para a relação entre os corticosteroides e a síndrome da hiperinfecção.	26
Figura 3 – Estrutura química da 20-hidroxicadisona.....	26
Figura 4 – Aspectos morfológicos de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	27
Figura 5 – Delineamento do Experimento I: recuperação dos ovos de <i>S. venezuelensis</i> e padronizações das condições de cultivo (recipiente, meio e volume) e do Experimento II: avaliação do efeito de dexametasona sobre o desenvolvimento larvário	41
Figura 6 – Fórmula estrutural da dexametasona.....	44
Figura 7 – Percentual de recuperação de ovos de <i>S. venezuelensis</i> em diferentes soluções. ...	46
Figura 8 – Dados do cultivo de larvas de <i>S. venezuelensis</i> em diferentes meios de cultura por 24 horas	48
Figura 9 – Dados do cultivo de larvas de <i>S. venezuelensis</i> em diferentes meios de cultura por 48 horas	48
Figura 10 – Dados do cultivo de larvas de <i>S. venezuelensis</i> em diferentes meios e volumes. .	50
Figura 11 – Dados da razão entre o número de larvas L1 de <i>S. venezuelensis</i> e o número de ovos incubados	52
Figura 12 – Dados da razão entre o número de larvas L2 de <i>S. venezuelensis</i> e o número de ovos incubados.....	52
Figura 13 – Dados da razão entre o número de larvas L3 de <i>S. venezuelensis</i> e o número de ovos incubados.....	53
Figura 14 – Modelo do efeito direto de dexametasona sobre as ecdises de <i>Strongyloides</i>	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados morfométricos (μm) das formas evolutivas de <i>S. venezuelensis</i>	28
Tabela 2 – Síntese de pesquisas sobre o cultivo <i>in vitro</i> de <i>Strongyloides</i> spp.	34
Tabela 3 – Efetividade da recuperação de ovos de <i>S. venezuelensis</i> em diferentes soluções...45	
Tabela 4 – Dados da recuperação de larvas de <i>S. venezuelensis</i> provenientes de ovos recuperados em diferentes soluções saturadas.....47	
Tabela 5 – Dados do cultivo de larvas de <i>S. venezuelensis</i> em diferentes meios e volumes de cultivo.49	
Tabela 6 – Dados do cultivo de larvas de <i>S. venezuelensis</i> em diferentes meios e volumes....49	
Tabela 7 – Percentual de sobrevivência das larvas de <i>S. venezuelensis</i>49	
Tabela 8 – Dados da proporção do desenvolvimento de larvas de <i>S. venezuelensis</i> cultivadas em meio contendo dexametasona durante 24 horas51	
Tabela 9 – Dados da proporção do desenvolvimento de larvas de <i>S. venezuelensis</i> cultivadas em meio contendo dexametasona entre 32 e 48 horas51	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	O gênero <i>Strongyloides</i>	17
2.2	A estrogiloidose.....	19
2.2.1	Síndrome da hiperinfecção	20
2.2.2	Resposta imune	22
2.2.3	Os corticosteroides e a síndrome da hiperinfecção por <i>S. stercoralis</i>	23
2.2.3.1	Efeitos dos corticosteroides sobre o sistema imune como promotores da SHS ...	23
2.2.3.2	Efeitos dos corticosteroides sobre o processo de mudas em nematódeos como promotores da SHS	24
2.3	<i>Strongyloides venezuelensis</i> Brumpt, 1934 como modelo	27
2.4	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Strongyloides</i> spp.	30
3	JUSTIFICATIVA.....	38
4.1	Objetivo geral.....	39
4.2	Objetivos específicos.....	39
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1.1	Obtenção de <i>Strongyloides venezuelensis</i>	40
5.1.2	Manutenção de <i>Strongyloides venezuelensis</i> em laboratório.....	40
5.1.3	Delineamento experimental	40
5.2	Experimento I: manutenção <i>in vitro</i> do ciclo de vida livre de <i>S. venezuelensis</i> ...	41
5.2.1	Recuperação e quantificação dos ovos.....	41
5.2.2	Desenvolvimento e sobrevivência das larvas.....	42
5.2.3	Padronizações do meio de manutenção e do tipo de recipiente.....	42
5.2.4	Cultivo de larvas de <i>S. venezuelensis</i> em água ou fezes em diferentes volumes...	43
5.3	Experimento II: avaliação do efeito <i>in vitro</i> de dexametasona sobre o desenvolvimento de larvas de <i>S. venezuelensis</i>	43
5.4	Análise estatística.....	44
6	RESULTADOS.....	45
6.1	Experimento I: manutenção <i>in vitro</i> do ciclo de vida livre de <i>S. venezuelensis</i>	45
6.1.1.1	Recuperação dos ovos.....	45
6.1.1.2	Desenvolvimento e sobrevivência das larvas.....	46

6.1.2	Padronizações do meio de manutenção e do tipo de recipiente.....	47
6.2	Experimento II: avaliação do efeito <i>in vitro</i> de dexametasona sobre o desenvolvimento de larvas de <i>S. venezuelensis</i>	50
7	DISCUSSÃO	54
8	CONCLUSÕES.....	60
9	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

A estrogiloidose humana é uma importante doença parasitária, tendo como principal agente etiológico o nematódeo *Strongyloides stercoralis* (BAVAY, 1876). A parasitose, apesar de reconhecidamente negligenciada, apresenta amplo alcance epidemiológico, com estimativas de até 370 milhões de pessoas infectadas no mundo (MATI; RASO; DE MELO, 2014; HUNT et al. 2016). A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2019), contudo, estima que o número de infecados oscile entre 30 a 100 milhões, embora reconheça que dados precisos sobre a prevalência nos países endêmicos sejam desconhecidos. A importância médica da estrogiloidose, no entanto, se baseia, sobretudo, no fato de que, sob determinadas condições, particularmente durante a administração prolongada de corticosteroides, a população do parasito aumenta exacerbadamente (hiperinfecção) e a doença evolui para a forma grave, a estrogiloidose complicada. Nessa condição, as larvas podem se disseminar para múltiplos órgãos (síndrome da infecção disseminada), podendo ser fatal (VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; BASILE et al., 2010; MATI; RASO; DE MELO, 2014).

Não há consenso na literatura sobre os mecanismos que induzem à forma grave da doença mediante o tratamento com corticosteroides. O aumento da população do nematódeo tem sido relacionado principalmente ao comprometimento do sistema imune do hospedeiro (CRUZ; REBOUÇAS; ROCHA, 1966; TIWARI; RAUTARAYA; TRIPATHY, 2012; MATI; RASO; DE MELO, 2014; DOGAN et al., 2014; NUTMAN, 2017), ou seja, a um efeito indireto sobre o parasito. Contudo, outra hipótese, proposta por Genta (1992), sugere que a disseminação do parasito possa ocorrer devido ao efeito direto dos corticosteroides sobre o desenvolvimento das larvas de *Strongyloides* spp. Esse possível efeito direto, estaria relacionado à semelhança estrutural dos corticosteroides aos hormônios ecdisteroides, induzindo as mudas das larvas da forma rabditoide para a forma filarioide infectante (L3i). Tal modelo, proposto há quase três décadas, ainda levanta questionamentos na literatura, conforme observação feita por Nutman (2017), ao comentar que o postulado do efeito direto que os corticosteroides exerceriam sobre *S. stercoralis*, proposto por Genta em 1992, não foi demonstrado definitivamente.

Aspectos relacionados à pesquisa sobre a estrogiloidose humana podem envolver a utilização de modelos alternativos ao parasito humano, como *Strongyloides venezuelensis*, nematódeo que infecta roedores (MACHADO et al., 2001; PAULA et al., 2013). A permanência do parasito em laboratório, no entanto, requer passagens sucessivas do mesmo através de modelos animais, particularmente, roedores (ISLAM et al., 1999; BAEK et al. 2002; VINEY;

KIKUCHI, 2017; ANJOS-RAMOS et al., 2018). Dentre os roedores, os gerbis (*Meriones unguiculatus*), têm sido amplamente utilizados, com resultados satisfatórios, como modelo para explorar a relação parasito-hospedeiro da estrogiloidose, principalmente devido ao longo tempo de permanência da infecção por *Strongyloides venezuelensis* nesses animais (HORII; KHAN; NAWA, 1993; TSUJI; NAKAMURA; TAIRA, 1993; BAEK et al., 2002). Os animais infectados são fontes de ovos que são veiculados através das fezes e que podem ser cultivados para pesquisa direta ou envio para pesquisadores de instituições parceiras, visando à experimentação biomédica. Em ambos os casos, a manutenção do parasito em condições ideais, deve ser considerada como fator importante para a obtenção de tais propósitos.

Diante do contexto supracitado, a presente pesquisa avaliou o postulado do efeito direto dos corticosteroides sobre o desenvolvimento de larvas do parasito modelo, *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934, mantido em gerbis. As condições ideais para a manutenção do ciclo de vida livre do nematódeo em laboratório foram analisadas a partir de nova proposta metodológica para a recuperação dos ovos e para o cultivo das larvas em diferentes meios e recipientes, os quais propiciam diferentes condições biológicas e físico-químicas ao seu desenvolvimento. A padronização prévia da metodologia de cultivo *in vitro* de ovos e larvas de *S. venezuelensis* foi condição *sine qua non* para a avaliação do efeito do fármaco testado (dexametasona) sobre os aspectos do desenvolvimento fisiológico do nematódeo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Strongyloides*

O gênero *Strongyloides* Grassi, 1879 engloba cerca de 60 espécies de nematódeos parasitos gastrointestinais de vertebrados, incluindo mamíferos, aves, répteis e anfíbios, sendo a biologia de *Strongyloides* em hospedeiros ectotérmicos, como serpentes, similar àquela observada em mamíferos. O nome do gênero derivou das palavras gregas ‘strongylos’, que significa ‘ao redor’ e ‘eidos’, que significa ‘similar’, pretendendo mostrar que *Strongyloides* estava próximo ao gênero *Strongylus* (MATI; DE MELO, 2014; VINEY, 2017; VINEY; KIKUCHI, 2017).

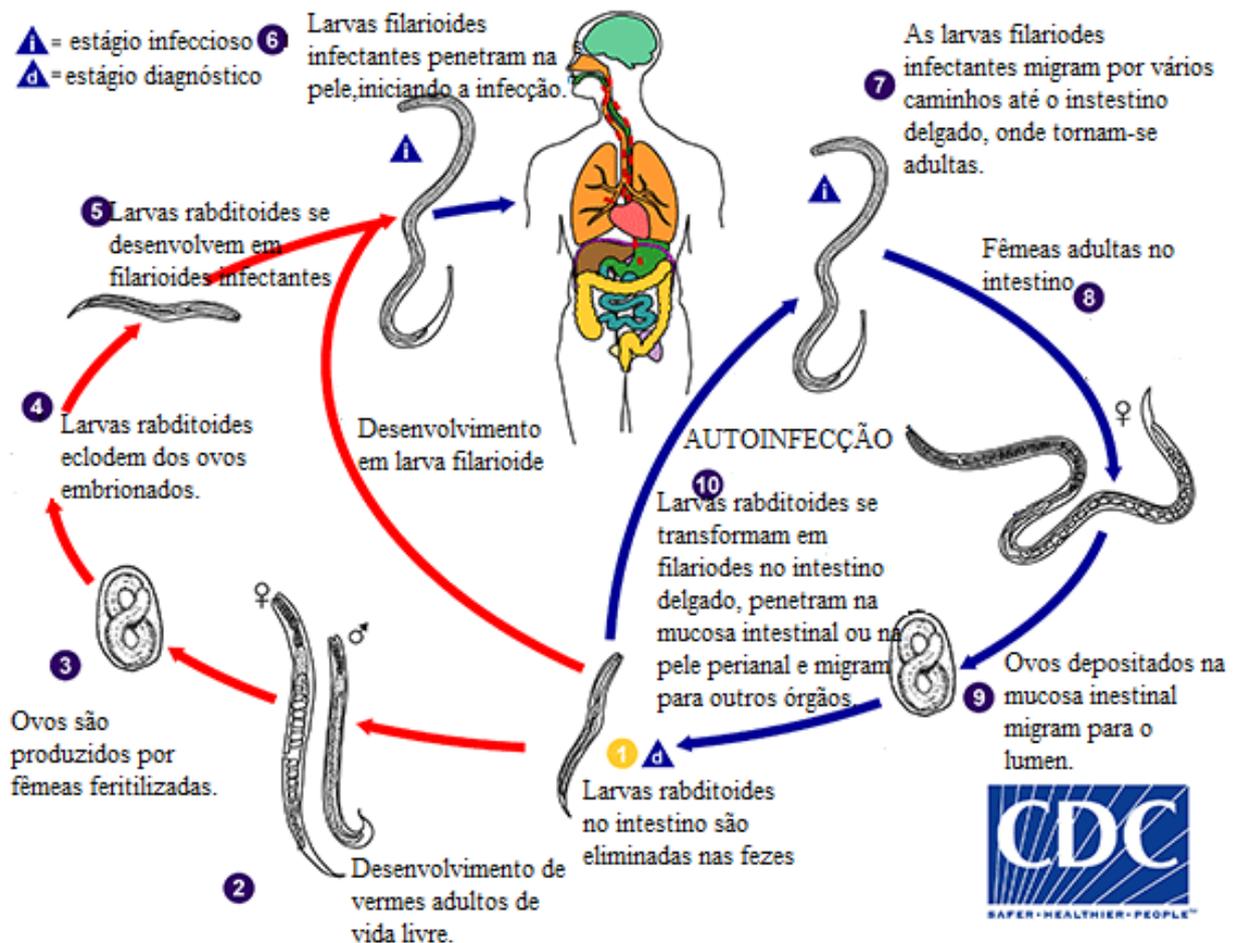
O ciclo de vida, incomum entre os nematódeos parasitas, tem duas gerações adultas, uma no hospedeiro e outra fora. A geração adulta parasitária, constituída por fêmeas exclusivamente, produz ovos por partenogênese no intestino delgado do hospedeiro. Dependendo da espécie, os ovos, larvas ou ambos são eliminados através das fezes e se desenvolvem no ambiente (STREIT, 2008).

As larvas eliminadas podem seguir o ciclo homogônico, transformando-se em larvas infectantes L3i; essas larvas penetram, principalmente, por via transcutânea no hospedeiro, migram através dos sistemas circulatório e respiratório até o intestino delgado, onde se estabelecem como fêmeas adultas. Alternativamente, as larvas podem se desenvolver em L3, não infectantes, morfologicamente distintas, e posteriormente, em adultos de vida livre (ciclo heterogônico). Normalmente, a progênie dos adultos de vida livre se desenvolve em larvas infectantes L3i que procuram um hospedeiro para continuar o ciclo (FIGURA 1) (STREIT, 2008; VINEY, 2017; CDC, 2019).

O gênero *Strongyloides*, segundo critérios estabelecidos por Little (1966) ao estudar, detalhadamente, a morfologia de 13 espécies, incluindo *S. stercoralis*, *S. fuelleborni*, *S. cebus*, *S. myopotami*, *S. venezuelensis* e *S. ratti*, apresenta determinadas características constantes que formam a base para uma definição detalhada. A morfologia de *Strongyloides* difere substancialmente entre as formas parasitária e de vida livre. Em linhas gerais, desconsiderando-se as diferenças interespecíficas, as fêmeas parasitas medem aproximadamente 2 mm de comprimento, apresentam esôfago filarioide que mede aproximadamente um terço do comprimento do corpo e cauda curta, abruptamente afilada; a vulva fica posicionada a aproximadamente dois terços ao longo do comprimento do corpo. Os estádios adultos de vida livre medem aproximadamente 1 mm de comprimento, sendo a fêmea ligeiramente maior que

o macho, com a vulva no ponto médio do corpo; ambos têm esôfago curto, do tipo rabditoide. As larvas infectantes L3 exibem esôfago filarioide, medindo aproximadamente metade do comprimento da larva; a cauda é pontiaguda com entalhe característico (VINEY; LOK, 2007).

Figura 1 – Ciclo de vida de *Strongyloides*.



Ciclo de vida livre: larvas rabditoides, eliminadas nas fezes, podem se tornar larvas filarioides infectantes (ciclo homogônico) ou se desenvolver em adultos de vida livre (ciclo heterogônico). As fêmeas de vida livre produzem ovos que ao eclodirem liberam larvas rabditoides que eventualmente se transformam em larvas filarioides infectantes. As larvas filarioides penetram na pele do hospedeiro humano para iniciar o ciclo parasitário. Ciclo parasitário: larvas filarioides penetram pela pele, e por várias rotas aleatórias, migram para o intestino delgado, onde se tornam fêmeas adultas. As fêmeas produzem ovos por partenogênese, que ao eclodirem, liberam larvas rabditoides. Essas, podem ser liberadas nas fezes ou tornar-se filarioides infectantes e penetrar na mucosa gastrointestinal ou na pele da região perianal, condição conhecida como autoinfecção, dando sequência ao ciclo (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention – CDC).

2.2 A estrogiloidose

Das espécies do gênero *Strongyloides*, pelo menos duas infectam humanos, *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*. Apesar de *S. fuelleborni* geralmente acometer primatas não-humanos, infecções humanas também ocorrem na África e no Sudeste Asiático (OLSEN et al., 2009). A infecção pode ser detectada através do exame de fezes do hospedeiro. As fezes recém coletadas podem conter ovos ou larvas, como nos casos de *S. fuelleborni* e *S. stercoralis*, respectivamente (VINEY, 2015).

Nenhum outro nematódeo parasito humano tem sido associado com tão amplo espectro de manifestações e implicado em tantas síndromes clínicas diferentes quanto *S. stercoralis*. O parasito, descoberto em 1876, em tropas francesas que retornavam do Vietnã, ocorre naturalmente em cães, primatas não humanos e humanos. A infecção em humanos predispõe a manifestações variando de leve assintomática a estrogiloidose sintomática crônica. Os pacientes, se sintomáticos, apresentam manifestações pulmonares e gastrointestinais (VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; OLSEN et al. 2009).

Mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com nematódeos intestinais. Segundo Hunt et al. (2016), somente as espécies *S. stercoralis* e *S. fuelleborni*, infectam cerca de 100 a 200 milhões de pessoas em todo o mundo. Já inquérito levantado por Schär et al. (2013), aponta que infecções por *S. stercoralis* afetam entre 10 a 40% da população em muitos países tropicais e subtropicais e, se o país for pobre, com cenários ecológicos e socioeconômicos propícios à disseminação do parasito, pode-se esperar taxas de infecção de até 60%.

A meta-análise realizada por Schär et al. (2013) revisou 378 artigos publicados durante 20 anos sobre a prevalência global de *S. stercoralis*. Segundo os autores, as informações sobre a prevalência da infecção são geralmente escassas, sugerindo que a mesma é altamente subnotificada, especialmente na África Subsaariana e Sudeste Asiático. Na África, a taxa de prevalência da infecção nas comunidades variou de 0,1% na República Centro-Africana até 91,8% no Gabão; na América Central e do Sul, a prevalência foi de 1,0% no Haiti, 13% no Brasil e 75,3% no Peru. No Sudeste Asiático as taxas de prevalência foram: 17,5% no Camboja, 23,7% na Tailândia, 26,2% na República Democrática Popular do Laos e 0,02% no Vietnã. Sobre a Europa e Estados Unidos, os autores comentaram que a infecção afeta predominantemente indivíduos que exercem atividades agrícolas ou mineiros. Além disso, nos países desenvolvidos, a estrogiloidose continua sendo uma questão para os imigrantes, turistas ou militares que retornam de áreas endêmicas em desenvolvimento. A despeito dos elevados

índices e do fato de ser uma infecção potencialmente grave, a estrogiloidose configura como doença negligenciada (OMS, 2019).

A estrogiloidose é um importante problema de saúde global, subestimada em muitos países. A parasitose se torna preocupante devido ao aumento das viagens, com migração de países não endêmicos para endêmicos, autoinfecção e síndrome da hiperinfecção em pacientes imunossuprimidos (MONTES; SAWHNEY; BARROS, 2010).

2.2.1 Síndrome da hiperinfecção

No ciclo de vida parasitário de *S. stercoralis* pode ocorrer a autoinfecção, processo em que as larvas rabditoides se tornam filarioides, no intestino delgado do hospedeiro. As larvas filarioides podem tanto penetrar na mucosa intestinal (autoinfecção interna) ou na pele da área perianal (autoinfecção externa). Em seguida, seguem o ciclo infeccioso normal: pulmões, brônquios, faringe e intestino delgado, onde tornam-se vermes adultos. Como *S. stercoralis* pode completar o seu ciclo de vida num único hospedeiro humano, através da autoinfecção, a infecção pode persistir por muitos anos após a exposição ao parasito (BASILE et al., 2010; BARRETT et al., 2016).

S. stercoralis tem sido descrito como helmintos causador de autoinfecção em humanos. A autoinfecção pode explicar a possibilidade de infecções persistentes por muitos anos em pessoas que não estiveram em área endêmica e de hiperinfecções em indivíduos imunossuprimidos (BASILE et al., 2010).

A autoinfecção pode levar à infecção assintomática, mas persistente ou, em determinadas circunstâncias, evoluir para hiperinfecção ou infecção disseminada, com complicações graves e ameaçadoras à vida. A forma grave ou hiperinfecção - rápido aumento na reprodução e migração das larvas de *Strongyloides* - pode ressurgir após imunossupressão, uso de esteroides, infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1), transplante de órgãos, doenças malignas, desnutrição crônica e outras doenças crônicas, como diabetes mellitus, doença pulmonar obstrutiva crônica, insuficiência pulmonar crônica ou ingestão de álcool (WEATHERHEAD; MEJIA, 2014; BARRETT et al., 2016). A infecção disseminada, termo que implica migração das larvas para outros órgãos, envolve múltiplos sistemas orgânicos além do respiratório e gastrointestinal, como o cérebro, coração, vesícula biliar e rins (VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; TIWARI; RAUTARAYA; TRIPATHY, 2012).

A síndrome da hiperinfecção por *S. stercoralis* (SHS) é caracterizada por sintomas gastrointestinais como dor abdominal, dispepsia, diarreia, constipação, enterite e/ou sangramento gastrointestinal; muitos pacientes desenvolvem pneumonite hemorrágica e parada respiratória. Durante a hiperinfecção as larvas filarioides podem transportar bactérias para a corrente sanguínea ou sistema nervoso central causando bacteremia e meningite, respectivamente. A taxa de mortalidade varia de 70 a 85%, apesar de o diagnóstico ser fácil devido à alta carga parasitária (BASILE et al., 2010; TIWARI; RAUTARAYA; TRIPATHY, 2012; NUTMAN, 2017; VASQUEZ-RIOS et al, 2019). No entanto, Feely et al. (2010), salientam que o diagnóstico precoce não é tão simples pois os sinais respiratórios e abdominais são inespecíficos e, em casos de diagnóstico tardio, a infecção pode ser fatal. Quando não for encontrado diagnóstico unificador para sinais e sintomas e há fatores de risco associados, a hiperinfecção por *S. stercoralis* deve ser considerada como diagnóstico diferencial. A SHS permanece como uma das condições mais negligenciadas na medicina tropical e geral. Apesar da alta taxa de mortalidade, constata-se escassez de relatórios, falta de políticas públicas de saúde para identificar os indivíduos em risco e limitado suporte diagnóstico, associados ao sub-reconhecimento pelos médicos na unidade de terapia intensiva. (VASQUEZ-RIOS et al, 2019).

No tratamento contra a estrogiloidose, Aendazol, Mebendazol, Tiabendazol e Ivermectina demonstraram eficácia, porém a droga de escolha, por ser a mais eficaz contra a infecção por *S. stercoralis* é a Ivermectina, que aumenta a permeabilidade da membrana aos íons cloreto, paralisando os nematódeos. Com o tratamento, a taxa de mortalidade devido à hiperinfecção fica próxima a 60%; sem o tratamento efetivo, é provável que seja em torno de 100%. Em revisão sistemática realizada por Buonfrate et al. (2013), de 244 casos avaliados de síndrome da hiperinfecção por *S. stercoralis* (SHS), as taxas de mortalidade foram: 73% entre os pacientes tratados com Albendazol, 51% entre os tratados com Tiabendazol, 47% entre os tratados com Ivermectina e de 83% entre aqueles tratados com outras drogas. A via usual de administração da Ivermectina é a oral. Atualmente, não existem antimicrobianos parenterais licenciados para uso em seres humanos, embora haja relato de pacientes tratados com sucesso com Ivermectina subcutânea (VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006; BARRETT et al., 2016).

2.2.2 Resposta imune

Segundo Weatherhead e Mejia (2014), *Strongyloides* e o sistema imune do hospedeiro estão intimamente entrelaçados. O parasito pode permanecer relativamente assintomático no hospedeiro por décadas até que ocorra alguma alteração no equilíbrio imune do hospedeiro; a alteração do equilíbrio Th-1/Th-2 pode induzir a hiperinfecção e disseminação desses helmintos, mudando a condição clínica favorável para outra, ameaçadora à vida.

A resposta imune humana a *S. stercoralis*, apesar de pouco estudada, sugere a participação da resposta imune inata e adaptativa na mediação da resistência à infecção. As respostas imunes inata e adaptativa desempenham papel crítico na manutenção da strongiloidose crônica e na prevenção da síndrome da hiperinfecção e disseminação (BONNE-ANNÉE, S.; HESS, J. A.; ABRAHAM, D, 2011; NUTMAN, 2017).

A resposta humana à infecção por *Strongyloides stercoralis* parece ser controlada através da resposta Th2, baseada em observações de pacientes coinfectados com vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e com *S. stercoralis*. Além disso, a imunidade protetora a larvas de *S. stercoralis* em ratos é dependente de células T CD4+, e estas células produzem tipicamente IL-4 e IL-5. As infecções em ratos e camundongos, por *S. ratti* e *S. venezuelensis*, respectivamente, resultaram em resposta Th2, com produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e supressão concomitante de IFN- γ (BONNE-ANNÉE; HESS; ABRAHAM; 2011; ANURADHA et al., 2015).

A resposta imune à infecção por *S. stercoralis* em função do tempo, estabelece que, quando larvas L3i penetram pela pele do hospedeiro, diferentes tipos celulares, como células linfoides inatas, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer*, basófilos, eosinófilos e mastócitos são ativados. No momento em que os vermes adultos se instalam no intestino delgado, ocorre a diferenciação de pequeno número de efetores Th1/Th17 e um número maior de células Th2 que atuam juntamente com anticorpos IgE para eliminar alguns parasitos (NUTMAN, 2017).

No período da patência, há expansão das células Th2/Th9 CD4+, redução de células Th1/Th17 e indução de macrófagos ativados (AAM). À medida que a infecção evolui para a fase crônica, há expansão associada de IL-10 e/ou produção de células reguladoras, 'Fator de transformação do crescimento beta' (TGF- β) e pequena redução de células Th2/Th9 (NUTMAN, 2017).

A interação sofisticada entre a infecção e o sistema imune do hospedeiro permite a sobrevivência do patógeno no trato gastrointestinal do hospedeiro por longo tempo. No entanto,

alterações no sistema imune têm sido associadas com aumento das taxas de infecção e com a manifestação de doença mais grave (WEATHERHEAD; MEJIA, 2014).

2.2.3 Os corticosteroides e a síndrome da hiperinfecção por *S. stercoralis*

O uso de corticosteroides e a infecção por HTLV-1 são as duas condições mais frequentemente reconhecidas como fatores predisponentes para o desenvolvimento da síndrome da hiperinfecção por *S. stercoralis*. Em ambos os casos, a atividade imunológica do organismo é afetada principalmente pela interferência na imunidade mediada por células. Estudos da estrogiloidose disseminada em pacientes transplantados, asmáticos, pacientes com doença pulmonar crônica, ou com doença autoimune demonstraram que a terapia com corticosteroides tem sido um denominador comum no desenvolvimento de infecção grave (SIEGEL; SIMON, 2012).

Dois modelos, ilustrados na Figura 2, foram propostos para explicar a relação entre os corticosteroides e a síndrome da hiperinfecção e a síndrome da infecção disseminada. Em ambos os modelos, a terapia com corticosteroides, em pacientes com estrogiloidose assintomática ou moderada, desencadeia o aumento da frequência da hiperinfecção ou infecção disseminada.

2.2.3.1 Efeitos dos corticosteroides sobre o sistema imune como promotores da SHS

A progressão da estrogiloidose crônica para hiperinfecção e infecção disseminada tem sido bem associada com o uso de medicamentos imunossupressores, como os corticosteroides (WEATHERHEAD; MEJIA, 2014). Entretanto, de acordo com Mati; Raso; De Melo (2014), os mecanismos relacionados à disseminação ainda não são completamente conhecidos.

Da perspectiva dos efeitos dos corticosteroides sobre o sistema imune como promotores da SHS (aqui denominado efeito indireto), sabe-se que, mediante o uso da droga há redução na expressão de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas relacionadas à inflamação. Além desses, os corticosteroides interferem nas células circulantes e na migração dos leucócitos para o sítio de infecção. Paralelamente, verificam-se redução do número de monócitos, basófilos e eosinófilos, inibição da proliferação celular e apoptose de células imunes, incluindo linfócitos e eosinófilos. De maneira geral, apesar do amplo efeito dos corticosteroides sobre o sistema imune, o processo de hiperinfecção e disseminação de *S. stercoralis* no organismo hospedeiro ocorre particularmente como consequência da interferência

dos mesmos sobre a resposta Th2 (CORRIGAN, 1999; SCHLEIMER 2004; CZOCK et al. 2005; MATI; RASO; DE MELO, 2014).

Em suma, os corticosteroides, tanto endógenos quanto exógenos, afetam o sistema imune, atuando em receptores de glicocorticoides (GCRs) disponíveis na membrana de células CD4⁺ Th2. Como resultado, ocorre aumento da apoptose de células Th2, redução da contagem de eosinófilos e redução da resposta de mastócitos, conduzindo à hiperinfecção por *S.stercoralis* e às manifestações clínicas subseqüentes (VADLAMUDI; CHI; KRISHNASWAMY, 2006).

2.2.3.2 Efeitos dos corticosteroides sobre o processo de mudas em nematódeos como promotores da SHS

O modelo proposto por Genta (1992), sugere que hormônios ecdisteroides (20-hidroxiecdisona, Figura 3), que atuam no processo da ecdise, podem estar envolvidos na transmissão de sinais de muda em nematódeos (efeito direto). A hipótese parte da constatação de que compostos semelhantes aos ecdisteroides foram identificados no soro e urina de pacientes com filariose ou esquistossomose. Além do mais, os ecdisteroides já foram identificados em vários helmintos parasitas, embora sua função não tenha sido ainda elucidada. De acordo com Barker e Rees (1990), a ocorrência de ecdisteroides em nematódeos, embora em baixas concentrações, tem sido firmemente estabelecida. Os autores comentam que os ecdisteroides aplicados exogenamente, entre outras funções, aparentemente estimulam a muda em algumas espécies. A semelhança superficial entre o processo de muda em nematódeos e insetos levantou a possibilidade de que os respectivos sistemas regulamentares podem ter algumas características comuns. Outra pesquisa, realizada por Warbrick et al (1993) procurou verificar o efeito *in vitro* de hormônios que controlam o processo de mudas em insetos (ecdisona e 20-hidroxiecdisona) sobre as mudas de *Dirofilaria immitis*, um nematódeo. Os pesquisadores verificaram que 20-hidroxiecdisona (20-E), estimulou prematuramente a muda de *D. immitis* quando comparado com as larvas controle. Segundo eles, o efeito observado no estudo pode indicar papel hormonal para ecdisteroides no controle da ecdise em nematódeos comparável ao sistema que é encontrado nos insetos.

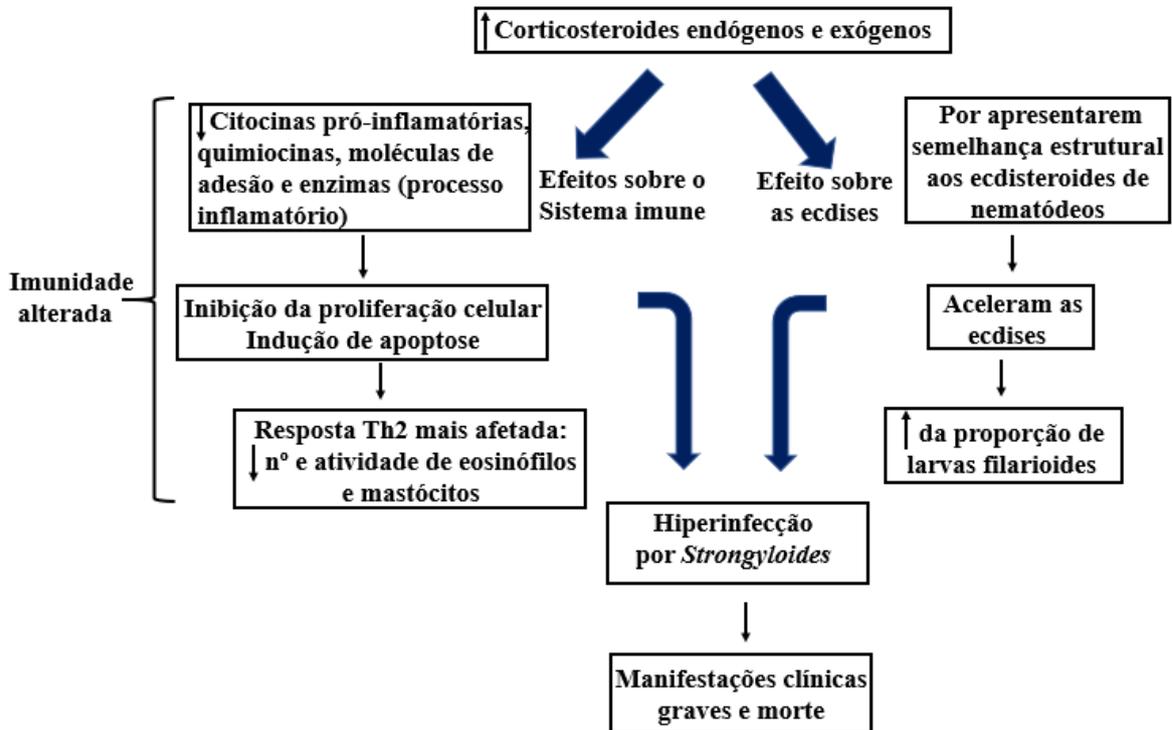
Segundo Genta (1992), a presença de substâncias semelhantes aos ecdisteroides em humanos, sem infecções parasitárias, indica que alguns metabólitos de esteroides humanos podem ter estrutura semelhante aos esteroides de muda. Em casos de excesso de tais metabólitos, por exemplo durante tratamento com corticosteroides, estes poderiam ocupar os receptores de ecdisteroides nos parasitos e atuar como promotores no processo de muda. Essas

substâncias enviariam sinais de muda para larvas rabditoídes que se transformariam em filariídes, desregulando o processo de crescimento populacional - hiperinfecção.

Genta (1992) assevera ainda que, "entre as questões biológicas básicas, a regulação da muda intraluminal é o problema mais urgente e, que, uma vez desvendado, talvez explicará como e porque a disseminação ocorre".

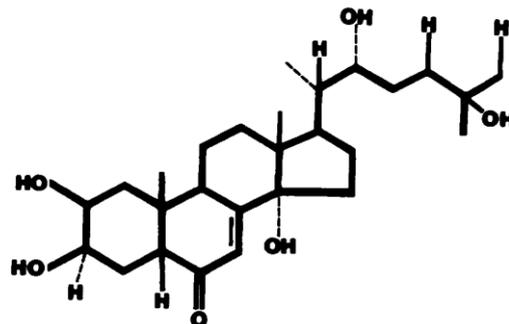
Nutman (2017), ao mencionar a hipótese do desenvolvimento direto proposto por Genta (1992), comenta que "foi postulado que os corticosteroides exerceriam efeito direto sobre o parasito *S. stercoralis*, embora isso não tenha sido mostrado definitivamente". Mati; Raso; De Melo (2014), estudando saguis (*Callithrix penicillata*) como modelo primata não-humano da infecção por um isolado humano de *S. stercoralis*, apontaram que um efeito direto da dexametasona no parasito não é necessário para sua disseminação no hospedeiro pesquisado. A conclusão dos pesquisadores baseou-se no fato de que a disseminação se deu tardiamente, bem após a interrupção do uso do fármaco. Segundo os mesmos, no momento da morte de espécimes de *C. penicillata* com estrogiloidose complicada, evidências indicaram que toda a droga presumivelmente tinha sido metabolizada pelo primata com tempo suficiente para permitir a restauração da resposta imune do hospedeiro. Logo, os resultados obtidos não apoiaram a hipótese de que a transformação de larvas de *S. stercoralis* mediante a administração de corticosteroides ao hospedeiro tenha sido o principal fator relacionado à ocorrência de infecção disseminada. Percebe-se, portanto, através dos trabalhos apontados, que a hipótese do desenvolvimento direto ainda permanece como um impasse na literatura, necessitando de investigação para comprovação ou rejeição do modelo proposto há quase três décadas.

Figura 2 – Modelos propostos para a relação entre os corticosteroides e a síndrome da hiperinfecção.



Via patofisiológica mostrando o mecanismo dos corticosteroides conduzindo à síndrome da hiperinfecção e infecção disseminada. Corticosteroides, juntamente com cortisol, atuam em receptores específicos chamados receptores de glicocorticoides (GCRs) disponíveis na membrana de células CD4+ Th2 alterando a resposta imune. Os corticosteroides também, por semelhança estrutural aos ecdisteroides de nematódeos, atuam como sinais de muda para ovos e larvas rabditoides, levando ao aumento do número de larvas filarioides. Adaptado de Vadlamudi; Chi; Krishnaswamy (2006).

Figura 3 – Estrutura química da 20-hidroxicdisona.



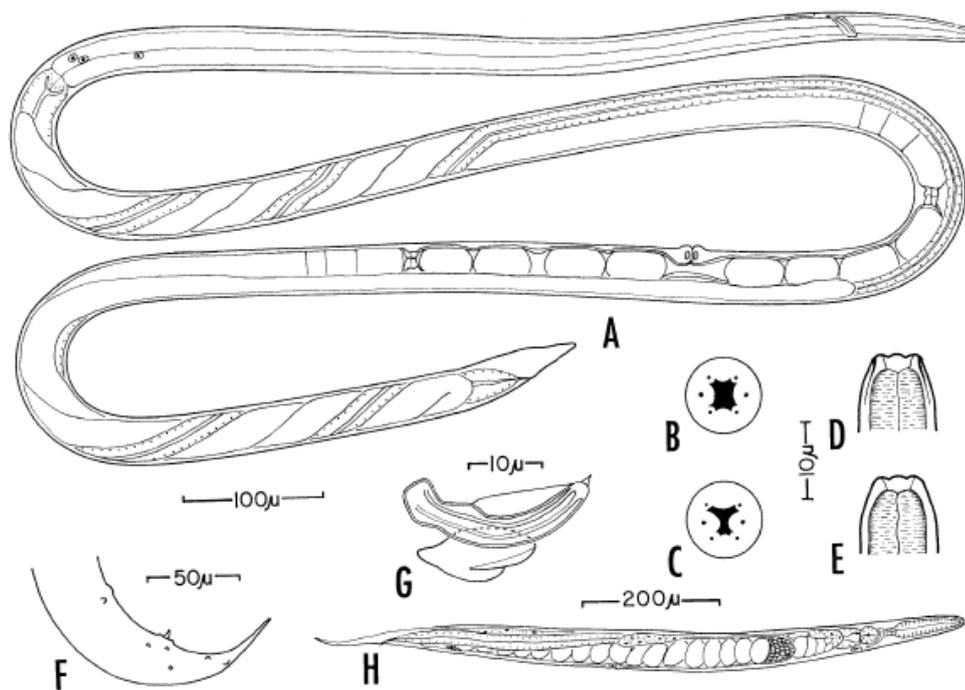
Genta (1992)

2.3 *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 como modelo

Strongyloides venezuelensis foi descrito pela primeira vez em ratos, na Venezuela (Brumpt, 1934) e, posteriormente redescrito, de forma mais detalhada, incluindo a geração de vida livre, em *Rattus norvegicus*, nos Estados Unidos. A espécie, contudo, encontra-se amplamente distribuída em regiões quentes do mundo, incluindo países como Israel, Brasil e Japão. Todos os casos relatados de infecção por *S. venezuelensis* ocorreram na mesma espécie hospedeira: ratos marrons (*R. norvegicus*) (VINEY; KIKUCHI, 2017).

Aspectos da morfologia de *S. venezuelensis* foram descritos por Little (1966). Na Figura 4, as letras A a E referem-se às fêmeas parasitas encontradas no intestino de *Rattus norvegicus*; essas apresentam estoma ornamentado, ovários espiralados em torno do intestino, oito a dez ovos no útero e cauda curta e cônica. As fêmeas de vida livre (H), não exibem contrações no corpo, os lábios da vulva não são proeminentes e os ovos apresentam-se em linha única no útero. Os machos (F) exibem papilas pós-anais subdorsais ligeiramente posteriores às subventrais, espículos inclinados (G) e membrana ventral proeminente. O mesmo autor aborda dados morfométricos de diferentes formas evolutivas do nematódeo, conforme Tabela 1.

Figura 4 – Aspectos morfológicos de *Strongyloides venezuelensis*.



A-E Fêmea parasita. A verme inteiro. B vista de frente, estoma aberto. C vista de frente, estoma fechado. D cabeça, vista dorsal. E cabeça, vista lateral. F macho de vida livre, cauda, vista lateral. G espícula. H fêmea de vida livre (Little, 1966).

Tabela 1 – Dados morfométricos (μm) das formas evolutivas de *S. venezuelensis*.

Formas evolutivas	Comprimento	Largura	Comp. esôfago
Fêmeas parasitas	2000 a 3200	33 a 41	600 a 780
Fêmeas de vida livre	810 a 1200	40 a 70	125 a 155
Machos de vida livre	800 a 930	40 a 50	110 a 125
Larvas filarioides	470 a 640	16 a 19	220 a 290

LITTLE, (1966)

Como parasito natural de ratos, *S. venezuelensis* inicia o ciclo de vida parasitário quando larvas L3i penetram na pele do hospedeiro. As larvas migram para os pulmões e seguem para o intestino delgado, onde eventualmente se desenvolvem em vermes adultos (ISLAM et al., 1999). Maruyama et al. (2006) demonstraram que a capacidade das larvas de invadir os tecidos se altera drasticamente durante a migração, por estar associada à expressão proteica. Os autores usaram larvas infectantes, larvas do tecido conjuntivo, larvas pulmonares e larvas da mucosa para infectar camundongos através de vários métodos de infecção, incluindo inoculação percutânea, subcutânea, oral e intraduodenal. Nas fases de migração, apenas larvas infectantes penetraram na pele do camundongo. As larvas, uma vez dentro do hospedeiro, rapidamente perderam a capacidade de penetração na pele, o que foi associado com o desaparecimento de uma metaloprotease específica da larva infectante.

Wertheim (1970) comparou o crescimento e desenvolvimento de *S. venezuelensis* com *S. ratti* em ratos albinos percutaneamente infectados. O autor verificou que o desenvolvimento de *S. venezuelensis* foi mais duradouro que o de *S. ratti*, principalmente pela longa permanência das larvas L3 na pele e nos pulmões. No mesmo tipo de estudo, Sato e Toma (1990) verificaram que camundongos BALB/c foram muito mais suscetíveis à infecção por *S. venezuelensis* do que por *S. ratti*, critério avaliado pela carga de vermes pulmonar e intestinal, além da contagem de ovos fecais. Os pesquisadores também verificaram que a maioria dos vermes inoculados foi recuperada dos pulmões (acima de 50% para *S. venezuelensis* e 2,5% para *S. ratti*) e subsequentemente do intestino delgado, sugerindo que a sua via migratória através dos pulmões para o intestino delgado é comparável à de *S. stercoralis* em humanos sendo, ambos, considerados modelos úteis para o estudo da estrogiloidose humana.

S. venezuelensis tem sido considerado como modelo adequado para o estudo da interação parasito-hospedeiro da estrogiloidose por fornecer elevado número de ovos a partir dos ratos infectados. Além do mais, o parasito não causa morte súbita em ratos, mesmo em infecção maciça (ISLAM et al., 1999). Para Sato e Toma (1990), camundongos infectados com *S. venezuelensis* ou *S. ratti* são considerados como modelos úteis para o estudo da

estrongiloidose humana. Uma limitação, no entanto, diz respeito ao fenômeno da auto-infecção interna, característica única observada em *S. stercoralis* e que não ocorre naturalmente com *S. venezuelensis* ou *S. ratti*, nem pode ser artificialmente induzida. Portanto, esse aspecto da estrongiloidose humana não pode ser recapitulado por esses modelos (VINEY; KIKUCHI, 2017).

Apesar de ser parasito natural de roedores, com o intuito de compreender melhor a estrongiloidose experimental em pequenos primatas do Novo Mundo – devido às semelhanças filogenéticas e fisiológicas com seres humanos – e também para avaliar aspectos da reinfecção e imunossupressão induzida por glicocorticoides, Melo, Mati e Martins (2012) infectaram nove espécimes de saguis (*Callithrix penicillata*) com 3.000 larvas de *S. venezuelensis* por animal. O estudo mostrou que o primata pode ser um modelo útil para as pesquisas sobre a estrongiloidose visto que todos os saguis foram suscetíveis ao parasito.

Um método de descontaminação de larvas de *S. venezuelensis* desenvolvido por Martins et al. (2000), avaliou a influência de micro-organismos intestinais no curso da estrongiloidose em camundongos isentos de vermes, gnotobióticos e convencionais. Os autores verificaram que o ecossistema intestinal bacteriano pode interferir no processo de parasitismo, protegendo o hospedeiro contra infecções experimentais com *S. venezuelensis*.

Em outra pesquisa, Mello, Vasconcelos e Grazzinelli (2006) estudaram as alterações histopatológicas nos pulmões e intestino de camundongos da linhagem AKR/J, reinfectedados por *S. venezuelensis* e submetidos à terapia por dexametasona. Os resultados obtidos indicaram que, nas reinfeções, as reações inflamatórias nesses órgãos participam na diminuição da população parasitária, fato que não é verificado quando esses camundongos são tratados com dexametasona e têm suas respostas inflamatórias suprimidas ou deprimidas.

Em estudo realizado por Baek et al. (2002), gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) foram infectados oralmente com 1.000 larvas L3i de *S. venezuelensis*, por animal, a fim de verificar a cinética da produção de ovos, o desenvolvimento larvário, a fecundidade e alterações hematológicas. Os gerbis foram monitorados por 570 dias, constatando-se que esses animais podem servir como portadores, a longo prazo, de *S. venezuelensis*. Os ovos nas fezes foram detectados pela primeira vez no quinto dia pós-infecção, atingindo o pico no nono dia e estabilizando-se até o final do período de observação. A infecção por *S. venezuelensis* em gerbis foi bastante estável ao longo do tempo, durante o qual os vermes mantiveram seu desenvolvimento normal, evidenciado pela dimensão corporal.

Em roedores e em humanos, a infecção por *Strongyloides* induz uma resposta imune que é predominantemente de natureza Th2 (NEGRÃO-CORRÊA et al. 2006). Rodrigues et al. (2009) demonstraram que o estabelecimento intestinal de *S. venezuelensis* é afetado pela ausência de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II durante a infecção pelo parasito. Os camundongos deficientes em MHC classe II (MHC II^{-/-}) apresentaram maior suscetibilidade à infecção por *S. venezuelensis*, com respostas deficientes ao verme, sugerindo que a falha da expressão de MHC de classe II afeta a apresentação de antígeno às células T CD4 + que é necessário para o início de uma resposta Th2 eficaz contra o parasito.

Machado et al. (2011a) estudaram os efeitos de Dexametasona sobre a resposta imune de camundongos infectados com *S. venezuelensis*. Os camundongos infectados e tratados com a droga apresentaram, em relação aos controles, aumento do número de neutrófilos circulantes no sangue, inibição de eosinófilos e células mononucleares no sangue, fluidos broncoalveolar e peritoneal. Outros efeitos da dexametasona foram a redução da produção de fator- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleucinas-3 (IL-3), IL-4, IL-5, IL-10 e IL-12 nos pulmões e redução nos níveis de imunoglobulinas G1 (IgG1), IgG2a, e IgE. Segundo os autores, o tratamento com dexametasona resultou em resposta imune anômala e aberrante, associada com aumento da carga parasitária, semelhantemente à resposta em humanos infectados com *S. stercoralis* quando em uso da mesma droga.

Infecções laboratoriais em ratos com *S. venezuelensis* e *S. ratti* provocaram resposta imune, de modo que os ratos infectados expeliram a maioria dos parasitas em cerca de 10–14 dias pós-infecção (dpi). Depois que os vermes são expelidos, os ratos são fortemente imunes à reinfeção, pela redução da carga de vermes e produção de ovos e expulsão rápida da infecção (VINEY; KIKUCHI, 2017).

2.4 Cultivo *in vitro* de *Strongyloides* spp.

Os estádios de vida livre de *Strongyloides* spp. podem ser obtidos com relativa facilidade a partir das fezes de hospedeiros naturais. Se as condições de umidade, pH e nutrição forem mantidas adequadamente, o desenvolvimento pode ser continuado através de gerações de vida livre e, teoricamente, por um período indefinido antes que o nematódeo origine larvas filarioides, embora o número de gerações de vida livre possa ser extremamente variável entre espécies (AHMED, 2014).

Vários tipos de pesquisas têm sido realizados envolvendo o cultivo *in vitro* de *Strongyloides* spp., tanto a partir do ovo ou das larvas rabditoides quanto das larvas filarioides, conforme sintetizado na Tabela 2, que inicia com os trabalhos realizados com *S. venezuelensis*, exclusivamente, e prossegue com outras espécies do gênero. Segundo Viney; Kikuchi (2017) *S. venezuelensis* pode ser mantido facilmente em laboratório através da inoculação subcutânea de larvas infectantes (L3i) em ratos. A dose a ser inoculada pode ser de até 30.000 L3i e, a partir de quatro a cinco dias, a infecção estará patente em pelo menos metade dos animais infectados. As fezes dos animais, mantidas úmidas e em temperatura ligeiramente elevada, poderão ser coletadas e utilizadas como fonte para obtenção da geração de vida livre.

Uma das técnicas para o cultivo *in vitro* de *Strongyloides* spp, há muito utilizada, emprega filtros de papel manchados com fezes de animais infectados e transferidos para tubos de ensaio contendo água (LITLLE, 1966; SATO; TOMA, 1990). Outra possibilidade, desenvolvida por Hansen; Buecher; Cryan (1969), estabeleceu a utilização de culturas fecais em ágar não-nutriente.

Baek; Islam; Kim (1998a), em pesquisa que visava o desenvolvimento de um método de cultivo *in vitro* para larvas infectantes de vida livre de *S. venezuelensis*, propuseram a utilização de meio químico (caldo nutriente), como substituto para as fezes de animais. Os autores apontaram os seguintes inconvenientes quanto ao uso das fezes: dificuldade de se evitar detritos fecais na suspensão larval, dificuldade para monitorar o desenvolvimento das larvas e necessidade de mais tempo para a recuperação das larvas do sistema de cultivo.

Em trabalho subsequente, Baek; Islam; Kim, (1998b), compararam o uso do meio previamente estabelecido (caldo nutriente) com fezes de ratos infectados, obtendo resultados bem mais expressivos na viabilidade das larvas com essas últimas. A maior viabilidade de L3 na suspensão fecal, segundo os autores, provavelmente se deveu à enorme quantidade de espécies de micro-organismos presentes nas fezes dos ratos que servem de nutrientes para as larvas. Inclusive, na mesma pesquisa, avaliou-se também a viabilidade das larvas em água de torneira e em solução salina. Os isolados L3 sobreviveram por período maior (32 dias) quando mantidos em água de torneira do que em solução salina (22 dias). Segundo os autores, o aumento da viabilidade dos isolados L3 em água de torneira pode ser também atribuído à presença de numerosos micro-organismos e/ou substâncias orgânicas presentes na água.

Além do meio de cultivo, outros parâmetros foram avaliados visando determinar as condições ótimas para a manutenção *in vitro* de diferentes formas (ovos, larvas L3i e vermes adultos) de *S. venezuelensis*, como a temperatura e tempo de cultivo (BAEK; ISLAM; KIM, 1998b). Já Islam et al. (1999) avaliaram os efeitos dos métodos de cultivo *in vitro* sobre o

desenvolvimento larvário e infectividade de larvas filarioides de *S. venezuelensis* inoculadas em ratos. Com objetivo semelhante, Machado et al. (2011b) verificaram a influência das condições ambientais, como temperatura e tempo em que larvas filarioides de *S. venezuelensis* permanecem no solo sobre a infectividade das mesmas.

Para *S. fuelleborni* Hansen; Buecher; Cryan (1969) verificaram a influência das condições ambientais sobre o surgimento de formas sexuais do parasito. Moncol; Triantaphyllou (1978) avaliaram os fatores que influenciam no desenvolvimento *in vitro* da geração de vida livre de *S. ransomi*. Nwaorgu (1983) pesquisou a influência da temperatura de incubação sobre o desenvolvimento dos estádios de vida livre de *S. papillosus*, em cultura fecal. A técnica utilizada pelo autor para o cultivo das larvas foi desenvolvida por Roberts; O'Sullivan (1950) e consistiu da mistura de esterco bovino seco e estéril a esterco fresco e serragem estéril.

Yamada et al. (1991) cultivaram *S. planiceps* e *S. stercoralis* a fim de comparar o desenvolvimento dos ciclos de vida livre de ambas as espécies, se homogônico ou heterogônico. Os pesquisadores investigaram a capacidade da geração de vida livre em continuar seu ciclo sexual por transplante sucessivo de ovos uterinos para um sistema de cultura fecal.

Anamnat et al. (2015) avaliaram a influência da diluição das fezes de *S. stercoralis*, provocada por águas pluviais, sobre a sobrevivência das larvas e, mais recentemente, Dulovic; Puller; Streit, (2016) buscaram otimizar as condições de cultivo para estádios de vida livre de *S. ratti*. Os autores testaram as interações entre temperatura, diferentes combinações de composições de placas com ágar (formulações V11 ou V12 ou meio para crescimento de nematódeo – NGM), fonte de alimento bacteriano (*E. coli* HB101 ou *E. coli* OP50) e presença ou ausência de água de Baermann - resíduo do qual os nematódeos foram isolados e que contém micro-organismos e outras substâncias presentes nas fezes do hospedeiro.

Considerando a cultura a partir de ovos ou larvas rabditoides nas pesquisas acima descritas para o cultivo *in vitro* de *Strongyloides* spp., em linhas gerais, boa viabilidade foi conseguida com fezes de animais, infectados ou não, ou com água de Baermann. Os métodos da utilização de filtro de papel ou coprocultura com carvão ou vermiculita, no entanto, possuem limitações para o acompanhamento da motilidade e da viabilidade ao longo do tempo, inviabilizando a classificação das larvas. Para determinados tipos de pesquisa, como a presente, para verificar o efeito de dexametasona sobre o desenvolvimento larvário, a padronização de uma metodologia de cultivo que permita o desenvolvimento e acompanhamento do nematódeo a partir do ovo até a estágio filarioide é imprescindível para a obtenção de resultados robustos.

Os diferentes trabalhos mencionados sobre a avaliação do cultivo de *Strongyloides* spp., usaram metodologias extremamente diversificadas, sem padronizações de meios de

cultivo, de recipientes, de tempo ou temperatura – condições físico-químicas que podem interferir sobremaneira nos resultados. Além do mais, a falta de padronização dificulta a comparação entre estudos, e em alguns casos, a reprodutibilidade. Alguns parâmetros importantes, tais como o efeito de diferentes soluções saturadas na recuperação de ovos viáveis do parasito de material fecal de animais infectados, ou a influência da altura da coluna de água/meio, bem como o efeito da superfície de contato com o oxigênio atmosférico sobre a sobrevivência das larvas não têm sido avaliados. Tais parâmetros talvez pudessem ter influenciado nos resultados obtidos para o acompanhamento da viabilidade larval e de seu desenvolvimento quando se considera o tempo de permanência das larvas *in vitro*.

Para avaliação de efeitos de fármacos, seja antiparasitário ou com potenciais efeitos fisiológicos, novas estratégias de cultivo são necessárias. Assim, na pesquisa com *Strongyloides* spp. novas ferramentas metodológicas devem ser propostas e implementadas que viabilizem o cultivo e o acompanhamento do desenvolvimento dos estádios de desenvolvimento dos nematódeos ao longo do tempo visando à experimentação biomédica.

Tabela 2 – Síntese de pesquisas sobre o cultivo *in vitro* de *Strongyloides* spp.

Espécies	Estádios	Métodos	Resultados	Referências
<i>S. venezuelensis</i>	L3i	<ul style="list-style-type: none"> - Utilização de meio quimicamente definido (Dulbecco's modificado por Eagle) - Tubos contendo meio com as larvas L3i foram incubados a 25 ou 37 °C. 	<ul style="list-style-type: none"> - Poucas larvas cultivadas a 25 °C apresentaram desenvolvimento. - A maioria das larvas cultivadas a 37 °C exibiram alterações. - A mudança da temperatura de 25 para 37 °C exerceu papel importante no desenvolvimento de larvas infectantes de vida livre para o estágio parasitário. 	Tsuji; Fujisaki (1994)
<i>S. venezuelensis</i>	Ovos	<ul style="list-style-type: none"> - Utilização de meio quimicamente definido (caldo nutriente). - Em sacos de polivinil foram testadas: <ul style="list-style-type: none"> - concentrações de caldo nutriente: 0,5, 0,25, 0,12, 0,06 e 0,03%, - temperatura (30, 25, 20 e 15 °C) - quantidade de ovos em mil (2, 5, 10, 15, 20, 40, 80). 	A mais alta produção de larvas infectantes (19,2%) foi obtida em sacos de polivinil inoculados com 15.000 ovos em 0,12% de caldo nutriente, incubados a 25 °C por quatro dias.	Baek; Islam; Kim (1998a)
<i>S. venezuelensis</i>	Ovos, L3i e adultos	<ul style="list-style-type: none"> -Ovos foram cultivados a 0, 4 ou 25 °C. - L3i cultivadas em sacos de polivinil para avaliar a influência da temperatura (4, 10, 15, 20, 25, 37 °C) e do meio de cultivo (caldo nutriente a 0,12% e fezes de ratos infectados em solução salina estéril). - Vermes adultos cultivados em caldo nutriente (0,12%) autoclavado, solução de soro de rato (10%), suplementado com 0,12% caldo nutriente ou suspensão fecal em solução salina. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ovos foram mantidos viáveis por 25 dias a 4 °C e por 15 dias à temperatura ambiente. - L3i sobreviveram por 45 dias em suspensão fecal e por 28 dias em 0,12% de caldo nutriente, ambos a 20 °C. - Vermes adultos sobreviveram por nove dias, a 37 °C, em solução de soro de rato a 10%, suplementado com 0,12% de caldo nutriente. 	Baek; Islam; Kim (1998b)

Continua...

Tabela 2 - Continuação

Espécies	Estádios	Métodos	Resultados	Referências
<i>S. venezuelensis</i>	L3	- Larvas filarioides foram cultivadas em caldo nutriente (0,12%), cultura fecal de ratos não infectados ou cultura em filtros de papel, com fezes de ratos infectados. - A infectividade foi avaliada através da inoculação e recuperação de larvas, de cada meio, dos pulmões e intestino delgado de ratos.	- O desenvolvimento larvário foi significativamente maior nos vermes que foram cultivados em filtro de papel e caldo nutriente. -A infectividade das larvas não sofreu influência dos diferentes meios avaliados.	Islam et al. (1999)
<i>S. venezuelensis</i>	L3	- L3i foram cultivadas em fezes de rato mantidas em carvão, nas seguintes condições: 28 °C/3 dc (dias de cultivo), 28 °C/7 dc ou 18 °C/7 dc. -Camundongos foram infectados com 1.500 larvas de cada tipo e eutanasiados nos dias 1, 3, 5, 7, 14 e 21 dias pós-infecção. -Quantificados: nº de células no sangue, no fluido da cavidade peritoneal, no líquido broncoalveolar, citocinas, nº de parasitas e ovos/g de fezes.	- Aumento de eosinófilos e células mononucleares no sangue, no fluido da cavidade peritoneal e no líquido broncoalveolar. - A infectividade e motilidade das larvas foram maiores quando mantidas a 28 °C/3 dc. - A fertilidade foi maior a 18 °C/7 dc, indicando que alta temperatura afeta negativamente a fertilidade. -A infectividade de <i>S. venezuelensis</i> é influenciada por variações na temperatura e tempo de cultivo.	Machado et al. (2011)
<i>S. stercoralis</i> , <i>S. fuelleborni</i> , <i>S. cebus</i> , <i>S. myopotami</i> , <i>S. venezuelensis</i> e <i>S. ratti</i>	Ovos e larvas (L1)	-Filtros de papel manchados com fezes de animais infectados, transferidos para placas de Petri com água. -Mistura fezes carvão	Estabelecimento de critérios para a identificação de espécies de <i>Strongyloides</i> spp.	Little (1966)
<i>S. fuelleborni</i>	Ovos	- Tubos inclinados contendo ágar não-nutriente, revestidos com esfregação fino ou espesso de fezes sem vermes; - variações nas concentrações de O ₂ e CO ₂ e na temp. de incubação.	Fatores ambientais como tipo de cultivo, temperatura e ambiente gasoso afetam o desenvolvimento de formas sexuais de <i>S. fuelleborni</i> .	Hansen; Buecher; Cryan (1969)

Tabela 2 - Continuação

Espécies	Estádios	Métodos	Resultados	Referências
<i>S. ransomi</i>	Ovos e larvas (L1)	- Substratos de fezes suínas (leitões ou adultos), integrais, autoclavados ou lavados sem substâncias químicas solúveis. - pH: entre 5.7 a 8.1.	- Machos apareceram na sétima semana de infecção. - Larvas infectantes procederam de substratos de leitões, autoclavados ou lavados, $5.9 > \text{pH} > 7.2$. - Fêmeas de vida livre procederam de substratos de suínos adultos, não autoclavados e não lavados, em valores intermediários de pH.	Moncol; Triantaphyllou (1978)
<i>S. papillosus</i>	Ovos	- Cultivo de ovos em mistura de esterco bovino seco e estéril a esterco fresco e serragem estéril; - Ovos cultivados por 24 h a 35 °C, 30 h a 30 °C, 48 h a 25 °C, 72 h a 20 °C e 168 h a 15 °C.	- Número de machos não apresentou diferença significativa a 20 °C e a 30 °C, - fêmeas adultas foram mais numerosas a 30 °C, - larvas infectantes foram mais numerosas a 20 °C, - larvas infetantes e fêmeas se desenvolveram de ovos geneticamente idênticos.	Nwaorgu (1983)
<i>S. venezuelensis</i> e <i>S. ratti</i>	Ovos	Filtros de papel manchados com fezes de ratos infectados, transferidos para tubos com água (28 °C).	<i>S. venezuelensis</i> e <i>S. ratti</i> são modelos úteis para estudo da estrogiloidose humana.	Sato; Toma (1990)
<i>S. planiceps</i> e <i>S. stercoralis</i>	Ovos e larvas (L1)	- Ovos de <i>S. planiceps</i> foram cultivados em 0,2 g de fezes de cães não parasitados. As fezes foram colocadas em tiras de filtros de papel e transferidas para tubos de ensaio contendo água. - Larvas rabditoides de <i>S. stercoralis</i> foram cultivadas nas mesmas condições acima descritas. - Ambos os sistemas foram incubados a 28 °C.	- Todos os ovos de fêmeas de vida livre da primeira geração de <i>S. stercoralis</i> se desenvolveram em L3. - Para <i>S. planiceps</i> predominaram as formas sexuais por nove ciclos consecutivos. - O padrão de desenvolvimento de vida livre entre as duas espécies é diferente.	Yamada et al. (1991)

Tabela 2 – Continuação

Espécies	Estádios	Métodos	Resultados	Referências
<i>S. stercoralis</i>	L1	<ul style="list-style-type: none"> - Um grama de fezes foi diluído sequencialmente de 1:2 a 1:480. - Três condições de cultivo para comparar a produção de L3i: suspensão de fezes, sedimento de fezes depositado no solo e L1 depositadas no solo. 	<ul style="list-style-type: none"> - A produção de L3i diminuiu à medida que a diluição das fezes aumentou, sendo negativa na diluição de 1:160. - Numerosas L3i foram geradas a partir de fezes não diluídas ou diluídas de 1: 2 e em sedimentos de fezes colocados no solo. - L1 isoladas de fezes diluídas e depositadas no solo deram origem a poucas L3i. - A precipitação pode dispersar ou diluir as fezes, prejudicando o desenvolvimento de larvas de vida livre. 	Anamnart et al. (2015)
<i>S. ratti</i>	Ovos	<ul style="list-style-type: none"> - Testaram-se as interações entre temperatura (19 ou 23 °C), placas com ágar (V11, V12 ou NGM), <i>E. coli</i> HB101 ou <i>E. coli</i> OP50 e presença ou ausência de água de Baermann. - Foram avaliados o número de ovos postos, o número de descendentes em desenvolvimento (nascidos) e a longevidade dos vermes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Água de Baermann apresentou maior efeito positivo quando nenhum outro alimento foi adicionado à placa. - As melhores condições testadas para a manutenção de <i>S. ratti</i> foram as seguintes: ágar V12, <i>E. coli</i> HB101, 23 °C, ausência de água de Baermann. 	Dulovic; Puller; Streit, (2016)

3 JUSTIFICATIVA

A estrongiloidose, doença endêmica prevalente nas regiões tropicais e subtropicais do globo, permanece dentre as infecções mais negligenciadas, apesar da importância epidemiológica e da gravidade dos casos associados à forma disseminada ou complicada da doença. Apesar dos avanços na compreensão dos aspectos relacionados ao ciclo de vida do parasito, à patologia da doença, às formas de diagnóstico e ao tratamento, alguns pontos precisam ainda ser melhor elucidados, como a ocorrência da infecção disseminada sob a administração de corticosteroides.

Como foi proposto, no início da década de 1990, que os corticosteroides poderiam favorecer a disseminação de *Strongyloides stercoralis* por semelhança estrutural aos ecdisteroides, e tal postulado não foi experimentalmente demonstrado, permanecendo como incerto na literatura até a atualidade, a presente pesquisa procurou responder a essa questão, utilizando *Strongyloides venezuelensis* como modelo de nematódeo em testes *in vitro*.

Os métodos que têm sido propostos para o cultivo *in vitro* de *Strongyloides* spp. inviabilizam o acompanhamento do desenvolvimento larvário em tempo real, impossibilitando algumas modalidades de pesquisa, como a presente.

Diante da necessidade de um modelo para tal investigação, por este instrumento, buscou-se ainda contribuir para a padronização da obtenção de ovos viáveis de *S. venezuelensis* a partir de material fecal de gerbis infectados; a partir dos ovos, procurou-se manter o ciclo de vida livre do parasito em condições laboratoriais otimizadas, com fins à experimentação biomédica, incluindo a possibilidade de avaliação dos estádios larvais e/ou adultos de vida livre, ao longo do tempo, quando submetidos a diferentes variáveis.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Padronizar uma metodologia para o cultivo *in vitro* de ovos e larvas de *Strongyloides venezuelensis* para avaliar o efeito de dexametasona sobre o desenvolvimento larvário.

4.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito de diferentes soluções saturadas (salina e sacarose) na recuperação de ovos viáveis de *S. venezuelensis* de material fecal de gerbis (*Meriones unguiculatus*) infectados com o parasito;
- Avaliar a sobrevivência das larvas de *S. venezuelensis* após o cultivo de ovos do parasito;
- Verificar a influência de dois tipos de recipientes sobre a viabilidade e sobrevivência das larvas rabditoides e filarioides;
- Analisar o efeito da manutenção em água e em meio de cultura sobre a viabilidade e sobrevivência das larvas rabditoides e filarioides de *S. venezuelensis*;
- Analisar o efeito da manutenção em água e em meio de cultura, em diferentes volumes, sobre a viabilidade e sobrevivência das larvas rabditoides e filarioides de *S. venezuelensis*;
- Avaliar o efeito *in vitro* de dexametasona, em três concentrações, sobre a ecdise e a sobrevivência das larvas de *S. venezuelensis*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Obtenção de *Strongyloides venezuelensis*

Para este estudo foram utilizados, como parasito-modelo, *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934, pertencentes a uma cepa isolada em 1987 e inicialmente mantida no Laboratório de Taxonomia e Biologia de Invertebrados do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, através de passagens sucessivas em camundongos da linhagem AKR/J (MARTINS et al., 2009). Posteriormente, a partir de 2010, a cepa passou a ser mantida também no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia da UFES, em gerbis da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), sendo gentilmente cedida pela Professora Narcisa Imaculada Brant Moreira para realização deste estudo.

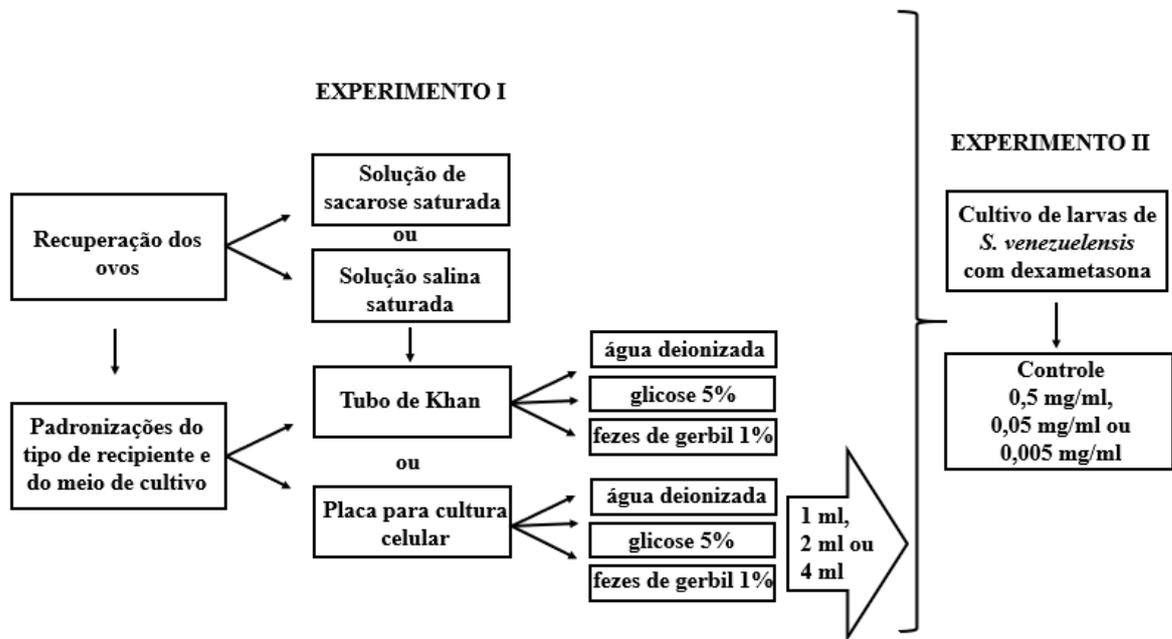
5.1.2 Manutenção de *Strongyloides venezuelensis* em laboratório

Durante a realização da presente pesquisa, a cepa de *S. venezuelensis* foi mantida em *M. unguiculatus*, machos (n = 4), infectados subcutaneamente com 2000 larvas filarioides do parasito, sendo as fezes destes roedores utilizadas para obtenção dos ovos de *S. venezuelensis* para os experimentos. O material fecal para meio de cultura foi proveniente de *M. unguiculatus* não infectado. Os animais foram acondicionados em gaiolas de porte médio forrada com maravalha e providas de fonte de água e ração *ad libidum*. A utilização dos gerbis foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFLA e aprovada conforme Protocolo nº 095/18 de 19/10/2018.

5.1.3 Delineamento experimental

Para avaliar o efeito de dexametasona sobre o desenvolvimento das larvas de *S. venezuelensis* foi imprescindível a padronização de uma metodologia apropriada que possibilitasse o acompanhamento dos estádios do ciclo de vida livre do parasito, desde o ovo até L3. A padronização referida está detalhada no Experimento I, que trata dos aspectos metodológicos para a recuperação dos ovos e da padronizações do meio de manutenção e do tipo de recipiente para o cultivo de *S. venezuelensis*. A partir dos resultados do experimento I, avaliou-se o efeito de dexametasona, em três concentrações, sobre o desenvolvimento larval – Experimento II. O delineamento experimental está esquematizado na Figura 5.

Figura 5 – Delineamento do Experimento I: recuperação dos ovos de *S. venezuelensis* e padronizações das condições de cultivo (recipiente, meio e volume) e do Experimento II: avaliação do efeito de dexametasona sobre o desenvolvimento larvário.



5.2 Experimento I: manutenção *in vitro* do ciclo de vida livre de *S. venezuelensis*

5.2.1 Recuperação e quantificação dos ovos

Fezes dos gerbis infectados foram recuperadas pelo processo de centrífugo-flutuação, a partir de modificações em metodologias utilizadas para fins de diagnóstico (SHEATHER, 1923; WILLIS-MOLLAY, 1921). Para tanto, as fezes foram coletadas, pesadas em balança analítica, transferidas para dois béqueres, e maceradas com bastão de vidro. Posteriormente, as fezes foram diluídas em soluções saturadas de cloreto de sódio (NaCl) ou sacarose na concentração média de $84,3 \text{ mg/ml} \pm 17,4$, homogeneizadas, transferidas para tubos Falcon de 15 ml (em duplicata) com auxílio de pipeta de Pasteur e centrifugadas a 126 g por 10 minutos. O sobrenadante (2 ml) de cada tubo foi coletado com auxílio de pipeta automática de 1000 μl . Cerca de 3 mm da ponta da ponteira foi retirado com lâmina cirúrgica de forma a facilitar a coleta dos ovos em meio a alguns debris fecais.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo Falcon, cujo volume foi completado com água deionizada e centrifugado a 126 g/10min para a sedimentação dos ovos. Após a centrifugação, a água dos tubos foi retirada com pipeta de Pasteur até restar um volume de 2 ml que foi novamente completado com água deionizada e centrifugado. O procedimento de lavagem

foi realizado três vezes a fim de retirar o excesso de solutos das soluções saturadas. O volume residual final (2 ml) foi utilizado para a determinação do número de ovos presentes nas amostras e para a verificação do desenvolvimento e sobrevivência das larvas ao longo de 96 horas.

Para a determinação do número de ovos foram retiradas, sucessivamente, três alíquotas de 25 µl de cada tubo Falcon que foram gotejadas em lâminas de vidro e contadas ao microscópio. O número médio de ovos por solução saturada foi determinado. A fim de avaliar a efetividade das soluções saturadas na recuperação dos ovos, foram reservadas quantidades de fezes correspondentes a, aproximadamente, 10% do total utilizado na recuperação dos ovos. As fezes foram pesadas em balança analítica, processadas pelo método de sedimentação espontânea (LUTZ, 1919; HOFFMAN; PONS; JANER, 1934) e todo o sedimento do cálice fixado em formalina para posterior análise microscópica. A efetividade das soluções saturadas foi determinada pela análise comparativa da quantidade de ovos recuperada com a quantidade total presente na amostra inicial, verificada por meio de exame de fezes quantitativo.

5.2.2 Desenvolvimento e sobrevivência das larvas

Para a verificação do desenvolvimento e sobrevivência das larvas, os conteúdos residuais dos tubos Falcon foram transferidos para tampas de placas de Petri (37 x 8 mm), com extremidades côncavas para facilitar a visualização microscópica. As placas de Petri foram sucessivamente cobertas com papel filme, para evitar a perda de água por evaporação e o papel filme foi perfurado com agulha para favorecer a oxigenação do meio de cultivo. As tampas das placas foram acondicionadas em incubadora BOD a 27 °C, por 96 horas e o desenvolvimento e sobrevivência das larvas foram avaliados a cada 24 horas. Nessa avaliação, as tampas das placas eram colocadas sobre uma lâmina de vidro para a contagem direta ao microscópio, após agitação prévia.

5.2.3 Padronizações do meio de manutenção e do tipo de recipiente

Nesta etapa da pesquisa buscou-se padronizar o tipo de recipiente bem como o meio de cultura mais adequados para o cultivo de *S. venezuelensis*. Ovos de *S. venezuelensis*, obtidos por centrífugo-flutuação, conforme melhor resultado verificado no item 3.2.1 (i.e., em solução salina saturada), foram contados a partir de alíquotas de 25µl, como já descrito.

Cerca de 60 ovos, estimados a partir da contagem de três alíquotas de 25 µl, contidos em 400 µl de suspensão - resultante do processo de recuperação - foram aleatoriamente

transferidos para dois tipos de recipientes: placas para cultura celular de 6 poços (35 x 18 mm) ou tubos de Khan (12 x 75 mm). Os recipientes continham os seguintes meios de cultivo: água deionizada, solução de glicose (5%) ou meio fecal 1%; para esse último, utilizaram-se fezes de gerbil não infectado, diluídas em água deionizada. As fezes foram maceradas e a mistura posteriormente homogeneizada e passada em gaze cirúrgica de 11 malhas/cm³ para a remoção dos debrís fecais. O volume de meio utilizado nesta etapa, em todos os cultivos, foi de 2 ml.

Os recipientes, após serem cobertos com papel filme e perfurados com agulha, foram acondicionados em incubadora BOD a 27,0 °C. As formas evolutivas foram contadas e classificadas a 24 e 48 horas. Para essa avaliação, os conteúdos dos recipientes eram transferidos, com auxílio de pipeta automática, para tampas de placas de Petri (37 x 8 mm), que eram colocadas sobre uma lâmina de vidro para a análise microscópica. Todos os procedimentos experimentais foram realizados duas vezes.

5.2.4 Cultivo de larvas de *S. venezuelensis* em água ou fezes em diferentes volumes

Mediante os resultados obtidos com os experimentos de padronização do tipo de recipiente, realizou-se outro experimento, com maior quantidade de ovos, cultivados em água deionizada ou em meio fecal 1%, em diferentes volumes de meios de cultivo (1, 2 ou 4 ml). Cerca de 240 ovos, estimados a partir de três alíquotas verificadas após o processo de recuperação, e contidos em 500 µl de solução, foram alternadamente transferidos, em duplicata, para placas para cultura celular. As placas foram cobertas com papel filme, perfurado com agulha, e acondicionadas em incubadora BOD a 27,0 °C durante 96 horas. O desenvolvimento e a sobrevivência das larvas foram avaliados a cada 24 horas.

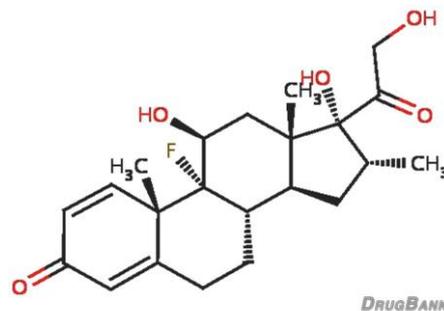
5.3 Experimento II: avaliação do efeito *in vitro* de dexametasona sobre o desenvolvimento de larvas de *S. venezuelensis*

Para a obtenção da resposta sobre o efeito direto de dexametasona sobre o desenvolvimento larvário de *S. venezuelensis*, foi realizado um experimento com larvas provenientes de ovos (e cultivadas) a partir das melhores condições definidas no experimento I. Alíquotas de 500 µl, contendo um número estimado de 106 ovos (contagem de 3 alíquotas de 25 µl), recuperados por centrífugo-flutuação, foram transferidas, aleatoriamente, para placas para cultura celular contendo 1 ml de meio fecal 1%. Após a transferência dos ovos, acrescentou-se dexametasona (Decadron® 2mg/ml, Aché, Brasil), nas seguintes concentrações:

0,5, 0,05 e 0,005 mg/ml. A fórmula molecular da dexametasona é C₂₂H₂₉FO₅ e a estrutural está representada na Figura 6. As concentrações do fármaco foram calculadas tomando-se como referência o peso corporal médio dos gerbis. A dose intermediária utilizada teve como base estudos prévios *in vivo* que utilizaram altas doses em roedores e as demais foram calculadas por proporção (10 vezes maior e 10 vezes menor).

As placas foram cobertas com papel filme, perfurado com agulha, e incubadas a 27 °C por 48 horas. A cada oito horas o conteúdo dos recipientes era retirado com auxílio de pipeta automática e transferido para tampas de placas de Petri (37 x 8 mm), para análise microscópica. Foram avaliados os estádios de desenvolvimento das larvas até a fase filarioide (L3), bem como a sobrevivência das mesmas. Para essa análise, era realizada estimulação prévia, através de agitação do meio por movimentos de pipetagem antes da transferência para as tampas de placas de Petri, a fim de verificar a condição das larvas pós-estimulação, se vivas ou mortas. Todos os tratamentos, bem como os respectivos controles (larvas e água), foram realizados em triplicata. Todo o procedimento experimental foi realizado duas vezes.

Figura 6 - Fórmula estrutural da dexametasona.



Modificado de DrugBank®.

5.4 Análise estatística

Para determinação da normalidade utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste t não-pareado (para a análise das soluções saturadas), teste do qui-quadrado para as porcentagens de sobrevivência das larvas após cultivo em resíduos de soluções saturadas e ao teste de Tukey nas demais análises. Todos as análises foram realizadas no *software* Prism 6.

6 RESULTADOS

6.1 Experimento I: manutenção *in vitro* do ciclo de vida livre de *S. venezuelensis*

6.1.1.1 Recuperação dos ovos

Os dados referentes a três repetições do experimento de recuperação de ovos de *S. venezuelensis* em soluções saturadas de sacarose ou de cloreto de sódio (NaCl) estão ordenados na Tabela 3. De forma geral, ambas as soluções apresentaram resultados satisfatórios, não apresentando diferença estatisticamente significativa. O percentual de eficiência na recuperação de ovos foi, em média, de $74,5\% \pm 17,5$ e $65,8\% \pm 12$ nas soluções saturadas de NaCl e sacarose, respectivamente (FIGURA 7), chegando a atingir 89% em solução salina saturada.

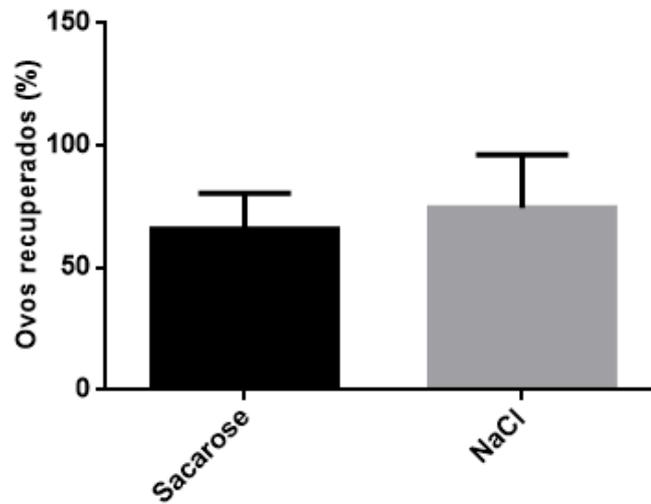
Tabela 3 – Efetividade da recuperação de ovos de *S. venezuelensis* em diferentes soluções.

	Repetição 1		Repetição 2		Repetição 3	
Massa fezes – total (g)	1,8		6,0		5,6	
Massa fezes - exame (g)	0,183		0,5		0,3	
Nº de ovos totais (exame)	356		172		277	
Nº ovos/g fezes	1945		344		923	
	NaCl	Sacarose	NaCl	Sacarose	NaCl	Sacarose
Massa (g) fezes processadas	0,92	0,92	3,0	3,0	2,8	2,8
Nº de ovos recuperados	1600	1400	880	720	280	280
Ovos recuperados/g fezes	1731	1514	293	240	457	457
Ovos recuperados (%)*	89	78	85	70	49,5	49,5

* % ovos recuperados/g fezes divididos por ovos/g fezes

Efetividade determinada pela análise comparativa da quantidade de ovos recuperada por centrífugo-flutuação em soluções saturadas de sacarose ou de NaCl, com a quantidade total de ovos presentes nas amostras de fezes não processadas, determinada por exame de fezes quantitativo (4 linhas iniciais).

Figura 7 – Percentual de recuperação de ovos de *S. venezuelensis* em diferentes soluções.



Percentual de recuperação de ovos de *S. venezuelensis* determinado pela razão entre a quantidade de ovos recuperada por centrifugo-flutuação em soluções saturadas de sacarose ou de NaCl, com a quantidade total de ovos presentes nas amostras de fezes não processadas, determinada por exame de fezes quantitativo ($p = 0,598$).

6.1.1.2 Desenvolvimento e sobrevivência das larvas

A média e o desvio padrão do número de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas durante 96 horas no líquido residual oriundo do processo de recuperação dos ovos por centrifugo-flutuação em soluções saturadas (NaCl ou sacarose) estão esboçadas na Tabela 4. O número de ovos incubados, estimados pela contagem de três alíquotas de 25 μ l, foi de 496 em solução salina saturada e de 480 em solução de sacarose saturada.

Após 24 horas de incubação, considerando-se o somatório das larvas L1 e L2, a taxa de sobrevivência verificada, em relação ao número de ovos incubados, foi de 15,5% no líquido residual procedente do processo de recuperação em solução salina saturada e de 11,5% em solução de sacarose saturada. Considerando-se ainda o somatório, em relação às primeiras 24 horas, após 96 horas de incubação, da mesma forma, constatou-se maior sobrevivência das larvas provenientes dos resíduos de solução salina saturada (31,2%) em relação àquelas procedentes de solução de sacarose saturada (15,7%). Contudo, a diferença entre as porcentagens, em ambos dos casos, foi estatisticamente igual ($p = 0,205$).

Tabela 4 – Dados da recuperação de larvas de *S. venezuelensis* provenientes de ovos recuperados em diferentes soluções saturadas.

	NaCl			Sacarose		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3
24h	21±0	56±16	0	0	54±16	0
48h	3,5±0	2±2	24±7,5	0	2±2	8,5±7,5
72h	0	0	37±7	0	0	7±7
96h	0	0	24±8,5	0	0	8,5±8,5

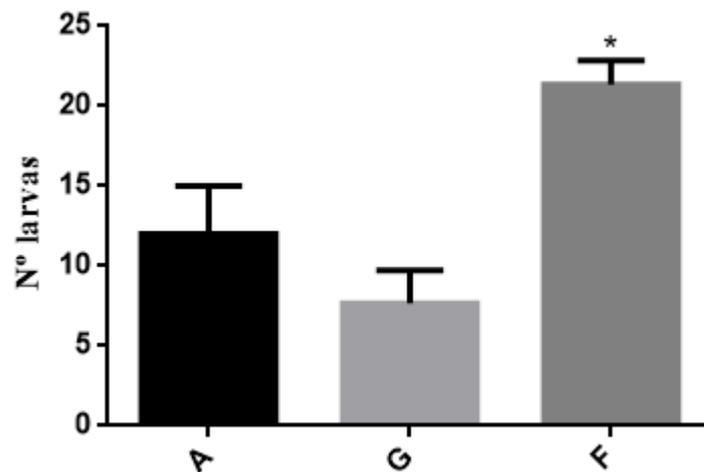
Médias e desvios-padrões do número de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas durante 96 horas em 2 ml de líquido residual oriundo do processo de recuperação dos ovos por centrífugo-flutuação em soluções saturadas de sacarose ou de NaCl.

6.1.2 Padronizações do meio de manutenção e do tipo de recipiente

Ovos de *S. venezuelensis*, recuperados por centrífugo-flutuação em solução salina saturada, e incubados em tubos de Khan, não se desenvolveram em nenhum dos meios de cultivo avaliados; sendo assim, os poços de placas para cultura celular foram adotados como recipientes padrão.

Os resultados referentes ao cultivo de larvas de *S. venezuelensis*, em placas para cultura celular contendo água, solução de glicose a 5% ou meio fecal a 1%, durante 24 e 48 horas, estão representados nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Após 24 horas de cultivo, constatou-se que no meio fecal a 1% houve maior número de larvas, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0085$) em relação à água ou solução de glicose a 5%, enquanto que, após 48 horas, houve diferença significativa apenas entre glicose e fezes ($p = 0,0410$). O meio glicosado foi inserido neste trabalho como estudo piloto, dadas as observações prévias de boa motilidade das larvas durante o cultivo em líquido residual oriundo do processo de recuperação dos ovos por centrífugo-flutuação em solução saturada de sacarose. No entanto, devido aos resultados insatisfatórios verificados em relação aos demais meios, o meio glicosado não foi utilizado nas etapas subsequentes de padronização do cultivo das larvas de *S. venezuelensis*.

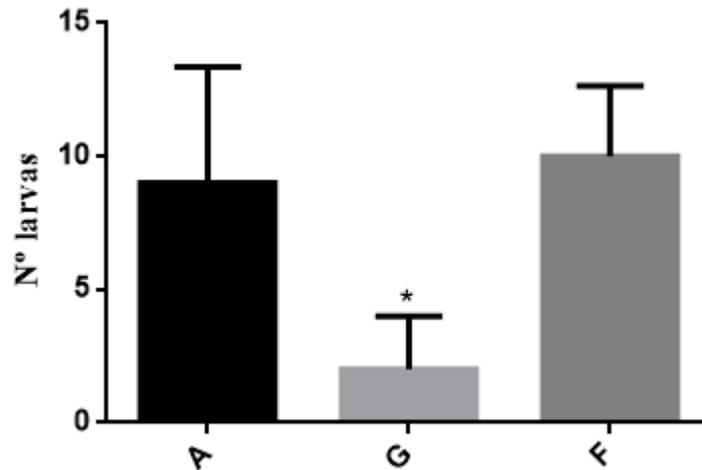
Figura 8 – Dados do cultivo de larvas de *S. venezuelensis* em diferentes meios de cultura por 24 horas.



Médias e desvios-padrões do número de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas em placa para cultura celular contendo 2ml de água (A), solução de glicose a 5% (G) ou meio fecal a 1% (F).

*(F-A; F-G): estatisticamente diferente ($p = 0,0085$), Teste de Tukey.

Figura 9 – Dados do cultivo de larvas de *S. venezuelensis* em diferentes meios de cultura por 48 horas.



Médias e desvios-padrões do número de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas em placa para cultura celular contendo 2ml de água (A), solução de glicose a 5% (G) ou meio fecal a 1% (F).

* G-F: estatisticamente diferente ($p = 0,0410$), Teste de Tukey.

As Tabelas 5, 6 e 7 e a Figura 10 ilustram os resultados obtidos do cultivo de ovos de *S. venezuelensis*, em placas para cultura celular, contendo água deionizada ou meio fecal 1%, ambos em três diferentes volumes (1, 2 ou 4 ml) durante 96 horas. O número estimado de ovos incubado por poço foi 240, contidos em 500 µl de volume residual do processo de recuperação por centrífugo-flutuação em solução salina saturada.

Nota-se, principalmente na Tabela 7, que a sobrevivência das larvas ao longo do tempo, de forma geral, foi maior nos meios contendo 1 ou 2 ml de meio fecal a 1%. O volume de 4 ml, tanto em água quanto no meio constituído por fezes, apresentou o menor percentual de sobrevivência, sendo o cultivo em 4 ml de água a pior condição.

Através do teste de Tukey, foram apontadas diferenças significativas ($p < 0,0001$) entre volumes no mesmo meio de cultivo (A1 e A4; F1 e F4; F2 e F4) e entre os volumes e os dois tipos de meios (A1 e F4; A2 e F1; A2 e F2; A4 e F1; A4 e F2).

Tabela 5 – Dados do cultivo de larvas de *S. venezuelensis* em diferentes meios e volumes de cultivo.

	24 h			48 h		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3
água - 1 ml	20,5±2,5	71 ± 12	0,5 ± 0,5	2 ± 1	2 ± 2	54 ± 16
água - 2 ml	20 ± 2,5	71 ± 12	0,5 ± 0,5	1,5 ± 0,5	1 ± 0	34 ± 0
água - 4 ml	22,5 ± 4	46 ± 4	0	2 ± 0	0	20,5 ± 0,5
fezes - 1 ml	11 ± 0	73 ± 2	22,5±13,5	0	0,5 ± 0,5	43 ± 1
fezes - 2 ml	6 ± 1	83,5 ± 5,5	20 ± 0	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	42 ± 12
fezes - 4 ml	4,5 ± 1,5	41 ± 1	10 ± 0	0,5 ± 0,5	1 ± 0	30,5 ± 4,5

Médias e desvios-padrões dos números de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas durante 48 horas em placa para cultura celular contendo 1, 2 ou 4 ml de água deionizada ou meio fecal a 1%.

Tabela 6 – Dados do cultivo de larvas de *S. venezuelensis* em diferentes meios e volumes.

	72 h			96 h		
	L1	L2	L3	L1	L2	L3
água - 1 ml	0	0	58,5 ± 1,5	0	0	50 ± 1,0
água - 2 ml	0	0	40 ± 1,0	0	0	36 ± 0
água - 4 ml	0	0	28,5 ± 3,5	0	0	27,5 ± 3,5
fezes - 1 ml	0	0	83,5 ± 0,5	0	0	57 ± 6,0
fezes - 2 ml	0	0	71,5 ± 8,5	0	0	65 ± 6,0
fezes - 4 ml	0	0	38,5 ± 1,5	0	0	39,5 ± 5,5

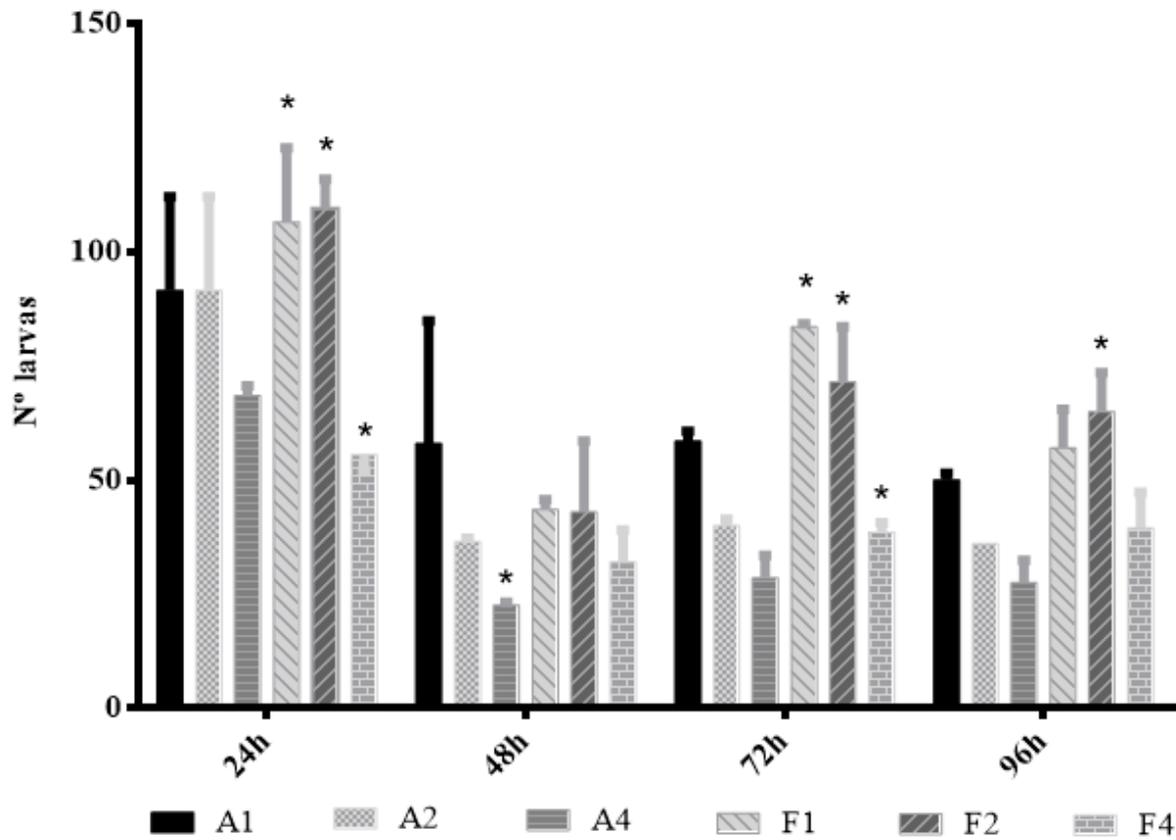
Médias e desvios-padrões dos números de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas entre 72 e 96 horas em placa para cultura celular contendo 1, 2 ou 4 ml de água deionizada ou meio fecal a 1%.

Tabela 7 – Percentual de sobrevivência das larvas de *S. venezuelensis*.

	24 h	48 h	72 h	96h
água - 1 ml	38,3	24,2	24,4	20,8
água - 2 ml	38,3	15,2	16,7	15,0
água - 4 ml	28,5	9,4	3,9	11,4
fezes - 1 ml	44,2	18,1	34,8	23,7
fezes - 2 ml	45,6	17,9	29,8	27,1
fezes - 4 ml	23,1	13,3	16,0	16,4

Percentual obtido pela relação entre a soma das médias de L1, L2 e L3 e o número de ovos incubados ao longo de 96 horas em placa para cultura celular contendo 1, 2 ou 4 ml de água deionizada ou meio fecal a 1%.

Figura 10 – Dados do cultivo de larvas de *S. venezuelensis* em diferentes meios e volumes.



Médias e desvios-padrões dos números de larvas de *S. venezuelensis* (L1, L2 e L3) cultivadas em água deionizada (1 ml = A1; 2 ml = A2; 4 ml = A4) ou em meio fecal a 1% (1 ml = F1; 2 ml = F2; 4 ml = F4) durante 96 horas. Nota: Os ovos (n = 240) foram incubados no tempo zero.

* Estatisticamente diferente $p < 0,0001$ (Teste de Tukey):

24 h: (A4-F1; A4-F2); (F4-F1; F4-F2); (F4-A1; F4-A2)

48 h: A1-A4

72 h: (F1-A2; F1-A4); F2-A4; (F4-F1, F4-F2)

96 h: A4-F2

6.2 Experimento II: avaliação do efeito *in vitro* de dexametasona sobre o desenvolvimento de larvas de *S. venezuelensis*

Para obtenção da resposta sobre o efeito *in vitro* de dexametasona sobre o desenvolvimento de larvas de *S. venezuelensis*, 106 ± 0 ovos/média (500 μ l), recuperados em solução salina saturada, foram transferidos para placas para cultura celular contendo 1 ml de meio fecal a 1% em cada poço. Adicionou-se dexametasona ao cultivo, nas concentrações já especificadas.

A maior concentração de dexametasona testada (0,5 mg/ml), inviabilizou o desenvolvimento das larvas e/ou embriões dos ovos. Após oito horas de cultivo nessa concentração, não foi constatada a presença do parasito em qualquer estágio do ciclo evolutivo.

Contudo, nas concentrações de 0,05 e 0,005 mg/ml, verificou-se efeito significativo do fármaco sobre o desenvolvimento larvário, acelerando as ecdises, particularmente nas primeiras 16 horas de cultivo (TABELAS 8 e 9; FIGURAS 11, 12 e 13). A proporção do desenvolvimento das larvas L2 em relação ao somatório de L1 e L2 (L2/L1+L2), nesse período, passou de 51,1% (controle) para 76,5% e 73,0% nas concentrações de 0,05 e 0,005 mg/ml de dexametasona, respectivamente (TABELA 8). As diferenças entre as proporções, em relação ao controle, foram de 25,4% na concentração de 0,05mg/ml de dexametasona e de 21,9% na concentração de 0,005 mg/ml.

A razão entre o número de larvas L3 e o número de ovos incubados, em 24 horas, foi estatisticamente diferente no tratamento com dexametasona (0,005 mg/ml) em relação ao controle; após 32 horas, detectou-se diferença estatisticamente significativa na razão entre o número de larvas L3 e o número de ovos incubados, entre o controle e as duas concentrações de dexametasona $p < 0,0001$ (Teste de Tukey).

Tabela 8 – Dados da proporção do desenvolvimento de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas em meio contendo dexametasona durante 24 horas.

	8 h			16 h			24 h			
	L1	L2	L2/L1 +L2	L1	L2	L2/L1 +L2	L1	L2	L3	L3/L2 +L3
Controle	0,363	0,002	5,2	0,252	0,263	51,1	0,052	0,412	0,036	8,0
Dexa 0,05	0,374	0,000	0	0,119	0,387	76,5	0,053	0,464	0,036	7,2
Dexa 0,005	0,355	0,011	3	0,134	0,379	73,0	0,030	0,406	0,086	17,5

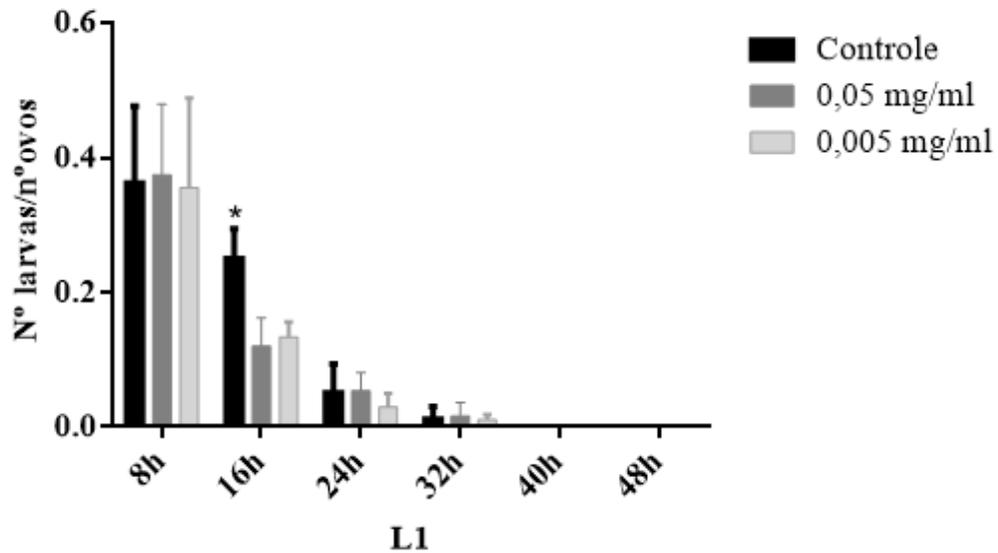
Proporção do desenvolvimento de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas em placa para cultura celular contendo 1 ml de meio fecal a 1% acrescido de dexametasona (0,05 ou 0,005 mg/ml). Nota: os números de larvas (L1, L2 e L3) foram obtidos através da razão entre a média do número de larvas cultivadas pelo número de ovos incubados.

Tabela 9 – Dados da proporção do desenvolvimento de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas em meio contendo dexametasona entre 32 e 48 horas.

	32 h			40 h			48 h		
	L2	L3	L3/L3 +L2	L2	L3	L3/L3 +L2	L2	L3	L3/L3 +L2
Controle	0,091	0,255	73,7	0,019	0,325	94,5	0,011	0,313	96,6
Dexa 0,05	0,063	0,319	83,5	0,025	0,330	92,9	0,008	0,341	97,7
Dexa 0,005	0,060	0,313	83,9	0,014	0,263	95,0	0,003	0,280	99,0

Proporção do desenvolvimento de larvas de *S. venezuelensis* cultivadas em placa para cultura celular contendo 1 ml de meio fecal a 1% acrescido de dexametasona (0,05 ou 0,005 mg/ml). Nota: os números de larvas (L1, L2 e L3) foram obtidos através da razão entre a média do número de larvas cultivadas pelo número de ovos incubados.

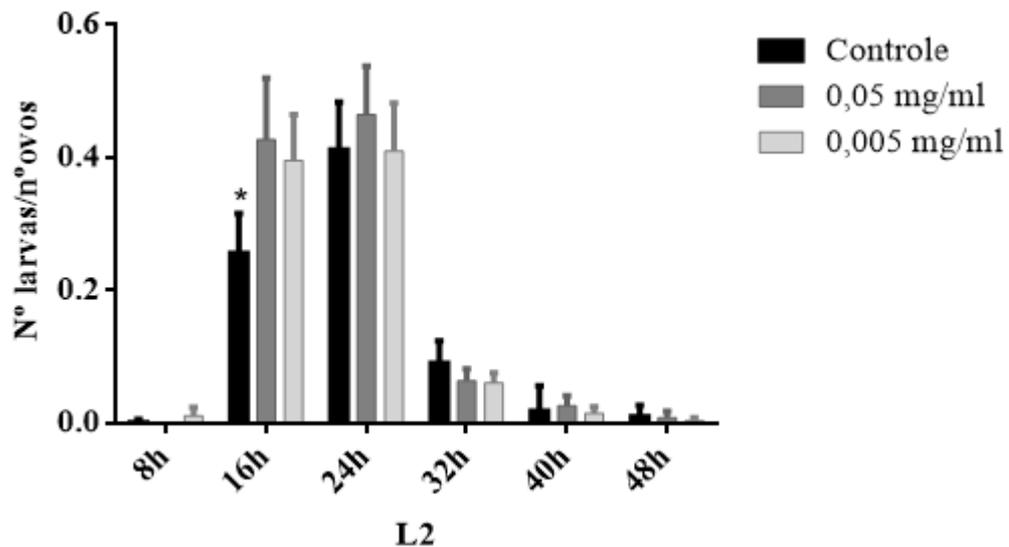
Figura 11 – Dados da razão entre o número de larvas L1 de *S. venezuelensis* e o número de ovos incubados.



Razão entre o número de larvas L1 de *S. venezuelensis* e o número de ovos de cultivados em placas para cultura celular contendo 1 ml de meio fecal 1% acrescido de dexametasona (0,05 ou 0,005 mg/ml) durante 48 horas.

* Estatisticamente diferente $p < 0,0001$ (Teste de Tukey):
Controle-0,05mg/ml; Controle-0,005 mg/ml

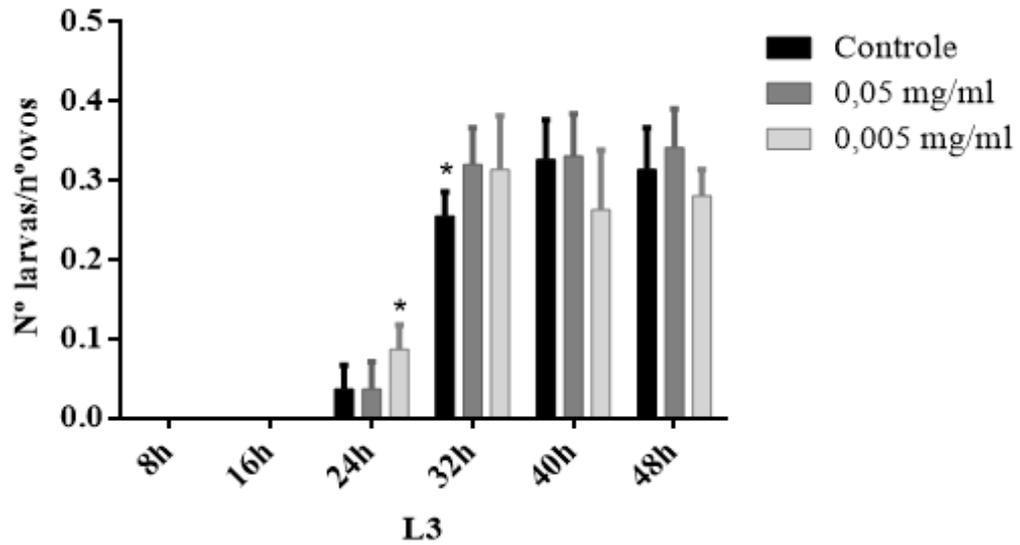
Figura 12 – Dados da razão entre o número de larvas L2 de *S. venezuelensis* e o número de ovos incubados.



Razão entre o número de larvas L2 de *S. venezuelensis* e o número de ovos de cultivados em placas para cultura celular contendo 1 ml de meio fecal 1% acrescido de dexametasona (0,05 ou 0,005 mg/ml) durante 48 horas.

* Estatisticamente diferente $p < 0,0001$ (Teste de Tukey):
Controle-0,05mg/ml; Controle-0,005 mg/ml

Figura 13 – Dados da razão entre o número de larvas L3 de *S. venezuelensis* e o número de ovos incubados.



Razão entre o número de larvas L3 de *S. venezuelensis* e o número de ovos de cultivados em placas para cultura celular contendo 1 ml de meio fecal 1% acrescido de dexametasona (0,05 ou 0,005 mg/ml) durante 48 horas.

* Estatisticamente diferente $p < 0,0001$ (Teste de Tukey):

24 h: Controle-0,005 mg/ml

32 h: Controle-0,05mg/ml; Controle-0,005 mg/ml

7 DISCUSSÃO

No presente estudo estabeleceram-se métodos para a obtenção de ovos de *S. venezuelensis* e padronizou-se o cultivo *in vitro*, incluindo o tipo de recipiente, o meio de cultivo e o volume que permitem o uso da espécie como modelo para ensaios farmacológicos; esta etapa preliminar possibilitou a avaliação subsequente do efeito da dexametasona sobre o desenvolvimento larvário.

Na metodologia desenvolvida para a recuperação de ovos de *S. venezuelensis* pelo método por centrífugo-flutuação, considerando-se as densidades das soluções saturadas de NaCl (1,200 g/ml) e de sacarose (1,280 g/ml), justifica-se a eficiência de ambas no processo. No entanto, a solução salina saturada apresentou vantagens na visibilidade e na viabilidade das larvas, no cultivo subsequente. Na solução de sacarose saturada, os resíduos dificultaram a contagem dos ovos e a posterior classificação do desenvolvimento larvário, além de favorecer o crescimento de fungos filamentosos que também limitaram o cultivo e a visualização. Dados compatíveis com estes foram encontrados em um trabalho preliminar realizado por Pujoni e Melo (2007).

O método de flutuação de ovos em solução saturada tem sido usado há muito tempo e de diferentes formas em parasitologia, basicamente para fins de diagnóstico (SHEATHER, 1923; WILLIS, 1921). Na metodologia ora proposta, as modificações introduzidas para a recuperação de ovos de *S. venezuelensis* por centrífugo-flutuação em solução salina saturada, permitiram tanto a eficiência na recuperação dos ovos (quantitativo) quanto o desenvolvimento dos mesmos em condições *in vitro* (qualitativo) para o acompanhamento dos estádios larvais subsequentes.

Em testes prévios à padronização da técnica, percebeu-se influência do estado de hidratação das fezes ou da diluição e processamento das mesmas na eficiência da recuperação dos ovos (dados não mostrados). Nas fezes secas, ou diluídas em água para maceração, ou passadas em gaze cirúrgica para a remoção dos debrís fecais, a eficiência foi, na média de quatro tentativas, de 19,8% em solução saturada de açúcar (menor valor 3,7%; maior, 34,3%) e de 18,4% em solução salina saturada (5,1%; 34,3%).

Na metodologia para recuperação de ovos de *S. venezuelensis* utilizada por Baek; Islam; Kim (1998a), fezes de ratos infectados foram diluídas em água de torneira e passadas em peneira de metal. Posteriormente, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e adicionado solução salina saturada à suspensão. Os ovos coletados foram lavados em solução salina estéril (0,85%) sob centrifugação por sete vezes. Os autores avaliaram subsequentemente

a taxa de eclosão dos ovos em diferentes temperaturas de cultivo, que atingiu até 100% a 25 °C. Os resultados, entretanto, trataram apenas da taxa de eclosão dos ovos recuperados, sem mensurar a quantidade total presente na amostra inicial. Possivelmente, nas etapas de processamento das fezes, como na diluição e/ou no peneiramento, tenha ocorrido perda significativa de ovos, como percebido nos testes prévios, no presente estudo.

A metodologia ora proposta para a recuperação de ovos de *S. venezuelensis* em solução salina saturada é eficiente, rápida e de fácil execução, podendo provavelmente ser também válida para outras espécies de *Strongyloides* que eliminem ovos nas fezes e talvez para outros nematódeos parasitos.

Os resultados encontrados na presente pesquisa evidenciaram a importância do tipo de recipiente para o cultivo de larvas de *S. venezuelensis*. Os tubos de Khan, além do formato cilíndrico, que eleva a altura da coluna de água e/ou meio, possuem pequena área de contato com o ar atmosférico (12 x 75 mm), diferentemente das placas para cultura celular (37 x 8 mm). Cabe ainda considerar as diferentes pressões hidrostáticas exercidas pelos meios de cultivo sobre as larvas em ambos os recipientes. Tais fatores, isolados ou combinados, provavelmente, influenciaram na sobrevivência das larvas, inviabilizando o cultivo das mesmas nos tubos de Khan. Em pesquisa semelhante, realizada por Anamnart et al. (2013), suspensões fecais contendo larvas rabditoídes de *S. stercoralis* foram mantidas em tubos ou placas de 35 ou 90 mm, com profundidades respectivas de 80, 11 e 2 mm. Nos tubos, verificaram-se declínio do número de larvas filarióides em relação ao tempo de incubação chegando a zero após 14 h. Por outro lado, o número de larvas filarióides, a partir da suspensão mantida em placas de 90 mm, permaneceu estável até 36 h. Os resultados evidenciaram o efeito prejudicial da submersão em água no desenvolvimento de *S. stercoralis*, conforme verificado também com *S. venezuelensis* na presente pesquisa.

O volume de meio adicionado às placas também influenciou no tempo de sobrevivência e no desenvolvimento das larvas até o estágio L3, sendo menor em 4 ml. Infere-se que maiores volumes possam comprometer a obtenção de determinados recursos, como a captação de oxigênio atmosférico para a manutenção da normalidade fisiológica, em função da maior distância entre o fundo do recipiente, onde estão as larvas, e a superfície. Tal parâmetro também foi verificado no trabalho de Anamnart et al. (2013), no qual, tubos controle, sem aeração mecânica, não apresentaram larvas filarióides após 8 horas de incubação. Entretanto, tubos providos de aeração produziram número constante de larvas filarióides ao longo das 18 horas de incubação, o que sugere que o parasito seja sensível à privação do ar atmosférico.

No período de incubação em BOD, apesar das placas estarem cobertas com papel filme, ocorreu perda de água por evaporação. A opção, portanto, pelo volume do meio de cultivo, se 1 ou 2 ml, deve levar em consideração o tempo desejável de incubação para não comprometer os aspectos do metabolismo das larvas, influenciando no tempo de sobrevivência nessa condição; se o tempo for estendido, o volume poderá ser completado periodicamente.

Vários trabalhos realizados com *Strongyloides* spp. utilizaram fezes de animais para o cultivo *in vitro* (LITTLE, 1966; HANSEN; BUECHER; CRYAN, 1969; MONCOL; TRIANTAPHYLLOU, 1978; NWAORGU, 1983; SATO; TOMA, 1990; YAMADA et al., 1991; BAEK; ISLAM; KIM, 1998b; ISLAM et al., 1999; MACHADO et al., 2011; ANAMNART et al., 2015). A utilização de fezes de animais é indiscutivelmente vantajosa por conter microorganismos que são fontes de alimento para os nematódeos. Outras pesquisas propuseram a utilização de meios químicos como alternativa para o uso de fezes, devido à vantagem da clareza do meio e melhor visualização dos parasitos em seus variados estádios de desenvolvimento. Na presente pesquisa, o uso das fezes de gerbil não-infectado demonstrou ser uma opção viável para o cultivo *in vitro* de *S. venezuelensis* por possibilitar a manutenção do parasito em todos os estádios do ciclo vital, a partir do ovo, e não comprometer o desenvolvimento das larvas até a fase filarioide; as taxas de sobrevivência atingiram 34,8 e 27,1% ao longo de 72 e 96 horas, respectivamente. A demanda energética requerida para o desenvolvimento do ciclo evolutivo, provavelmente, foi comprometida em um meio desprovido de nutrientes, como a água. A visibilidade necessária para o acompanhamento do cultivo e para a classificação das larvas não foi prejudicada pelo uso das fezes, cujos resíduos maiores ficaram retidos em gaze cirúrgica durante o preparo do meio.

Apesar de existirem processos de cultura para a obtenção de L3i de *Strongyloides* spp., a padronização de uma metodologia que permita o acompanhamento do desenvolvimento do ovo à L3i em tempo real fazia-se necessária, podendo ser útil na realização de testes futuros envolvendo fármacos. Outra possibilidade é a aplicação em pesquisas relacionadas à biologia do nematódeo, como a avaliação do efeito *in vitro* de dexametasona sobre o desenvolvimento larvário, que foi realizado, de forma inédita, neste estudo.

Os resultados encontrados na presente pesquisa apoiam a hipótese proposta por Genta (1992) a respeito do efeito direto dos corticosteroides sobre o desenvolvimento de larvas de *S. stercoralis*. A hipótese, que trata da desregulação da estrogiloidose, propõe que, em casos de excesso de corticosteroides, esses poderiam ocupar os receptores de ecdisteroides nos parasitos, devido à semelhança estrutural entre ambos, e agir como promotores do processo de muda. Genta (1992), inclusive, ilustrou criativamente seu modelo fazendo analogia com a

metamorfose da borboleta, no subtítulo de sua revisão, “de verme à borboleta”, em alusão ao fenômeno hormonal envolvido. O autor ponderou, contudo, que seu postulado tratava-se apenas de uma visão altamente especulativa, baseada em evidências muito circunstanciais, mas que esperava com isso, desafiar pesquisadores para a tão necessária pesquisa sobre a biologia de *S. stercoralis*, um “parasito enigmático”. De fato, algumas revisões têm repetido essa ideia interessante, ainda que na ausência de comprovações científicas.

Poucos pesquisadores têm procurado verificar a ocorrência de ecdisteroides em nematódeos. Apesar disso, de acordo com Barker e Rees (1990), a ocorrência de ecdisteroides em nematódeos, embora em baixas concentrações, tem sido bem estabelecida (considerando-se aplicações exógenas). Os autores comentaram que a semelhança superficial entre o processo de muda em nematódeos e insetos levantou a possibilidade de que os respectivos sistemas reguladores possam ter algumas características comuns. Outra pesquisa, realizada por Warbrick et al (1993) constatou que a 20-hidroxiecdisona (20-E) estimulou prematuramente a muda de *Dirofilaria immitis* (um nematódeo), quando comparado com as larvas controle. Segundo eles, o efeito observado no estudo pode indicar papel hormonal para ecdisteroides no controle da ecdise em nematódeos comparável ao sistema que é encontrado nos insetos. A partir dos resultados verificados nessas pesquisas, percebe-se que há forte tendência para o estabelecimento da relação entre nematódeos e ecdisteroides.

Pela presente pesquisa, há um indicativo de que dexametasona interferiu na ecdise das larvas de *S. venezuelensis*. No entanto, a partir desta constatação, várias outras questões podem ser propostas, tais como: de que modo, onde e por que ocorreu a interferência? Ou ainda: há realmente ecdisteroides ou a interferência pode ser por outro motivo? Relacionando os dados ora obtidos com os supracitados, pode-se inferir que os ecdisteroides regulem as ecdises em *Strongyloides* e talvez em outros nematódeos.

As metodologias padronizadas neste estudo para a recuperação e cultivo dos estádios do ciclo de vida livre de *S. venezuelensis* e a avaliação do efeito de dexametasona sobre o desenvolvimento larvário representam um passo importante para a realização de experimentos futuros que possam elucidar os mecanismos mais complexos envolvidos no processo de intensificação das ecdises.

Desde quando foi proposta, há 27 anos, a hipótese de Genta (1992) permanece, como nas palavras do próprio proponente, baseada apenas em evidências especulativas, talvez devido à dificuldade de cultivar o nematódeo *in vitro*, desde o ovo até a fase filarioide. Para esse propósito, o meio e as condições de cultivo devem favorecer não apenas o desenvolvimento do ciclo evolutivo, mas também a possibilidade de acompanhamento e classificação do mesmo.

Conforme já mencionado, a maioria dos métodos cultura para *Strongyloides* spp. não permite o acompanhamento de ovos até larvas filarioides em tempo real, como o método ora estabelecido, que viabilizou a experimentação com dexametasona para o teste do efeito direto sobre o desenvolvimento larvário.

Genta (1992), propôs em seu estudo uma modelagem matemática segundo a qual numa população inicial de 100 vermes adultos intestinais, se a taxa de mudas for de 3%, a população aumentará para aproximadamente 5.000 vermes no decorrer de 15 ciclos (seis meses) e atingirá 340.000 ao final de 12 meses; se a taxa de mudas aumentar para 30%, a população atingirá 360.000 indivíduos em apenas dois meses. Baseado nesse modelo, o autor infere que parece que o aumento na taxa de mudas é o elemento-chave na progressão para a disseminação se manifestar clinicamente. Os valores observados nesta pesquisa são semelhantes àqueles do modelo proposto, particularmente na intensificação das mudas sob o efeito de dexametasona nos primeiros estádios, ou seja, de L1 para L2, de 21,9 a 25,4% (conforme concentração do fármaco). A intensificação das mudas sob o efeito de dexametasona, particularmente nos primeiros estádios, demanda investigação futura sobre os mecanismos que interferem no processo.

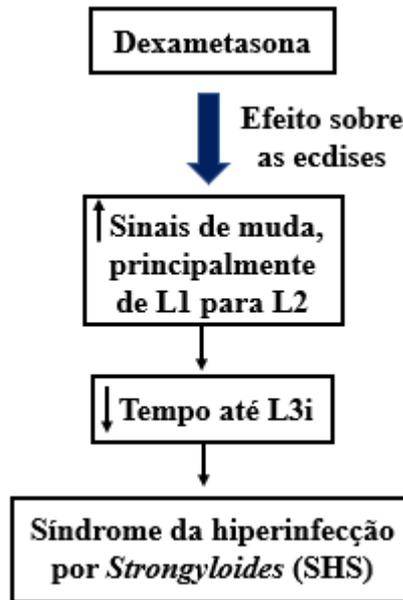
Dadas as comparações entre *S. stercoralis* e *S. venezuelensis* acima traçadas, estabeleceu-se esse último como modelo apropriado para este tipo de estudo, bem como de outros, envolvendo a biologia de *S. stercoralis*, por apresentar as seguintes vantagens:

- relativa facilidade de manutenção em laboratório, através de passagens sucessivas por roedores, particularmente *M. unguiculatus* (pelas vantagens já mencionadas);
- possibilidade de obtenção de ovos a partir das fezes para o acompanhamento do ciclo evolutivo de vida livre;
- por passar por todos os estádios, como *S. stercoralis*, porém de forma mais lenta, facilitando o acompanhamento do desenvolvimento larvário em tempo real;
- não ser patogênico ao ser humano.

O presente trabalho corrobora o modelo proposto por Genta (1992) particularmente ao considerar-se que *S. venezuelensis* apresenta desenvolvimento natural do ovo até L3i mais lento que o observado em *S. stercoralis*. Assim, como neste estudo com *S. venezuelensis*, percebeu-se um favorecimento na ecdise de L1 para L2, possivelmente, em *S. stercoralis* - que tem desenvolvimento mais rápido – isso poderia reduzir ainda mais o tempo necessário para a diferenciação do parasito em L3i e para a autoinfecção se intensificar (FIGURA 14). Soma-se a este efeito direto dos corticosteroides sobre o desenvolvimento larvário, o efeito

imunossupressor que tais fármacos reconhecidamente induzem sobre o hospedeiro, predispondo à desregulação da população de *S. stercoralis* e, conseqüentemente, à SHS.

Figura 14 – Modelo do efeito direto de dexametasona sobre as ecdises de *Strongyloides*.



A dexametasona exerce efeito sobre as ecdises de *Strongyloides* acelerando o desenvolvimento larvário, principalmente do estágio L1 para o L2. Como consequência, diminui o tempo para o nematódeo atingir o estágio L3i. Para *S. stercoralis* esse efeito direto contribuiria para a evolução da parasitose para a síndrome da hiperinfecção (SHS).

8 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos nos experimentos realizados no presente estudo, conclui-se que:

- O uso de solução salina saturada para a recuperação de ovos de *S. venezuelensis* pelo método de centrífugo-flutuação apresenta elevada eficácia e oferece vantagens em relação ao uso de solução de sacarose saturada, por não favorecer o crescimento de micro-organismos que dificultam o cultivo subsequente, como os fungos filamentosos. Ademais, ovos e larvas provenientes desse método de recuperação desenvolvem-se até a fase filarioide e sobrevivem por tempo considerável em condições de cultivo *in vitro*.

- Dentre os métodos testados neste estudo para o cultivo *in vitro* do ciclo de vida livre de *S. venezuelensis* - do ovo à larva filarioide - o mais eficaz foi o uso de 1 ou 2 ml de meio fecal 1% de gerbil (1%) depositados em placa para cultura celular, coberta com papel filme;

- A metodologia ora padronizada para o cultivo *in vitro* do ciclo de vida livre de *S. venezuelensis* permite o acompanhamento do desenvolvimento do ovo à L3, em tempo real, podendo ser útil na realização de testes futuros envolvendo fármacos, fato comprovado pelo teste com dexametasona no Experimento II.

- As concentrações de 0,05 ou 0,005 mg/ml de dexametasona aceleraram as ecdises das larvas de *S. venezuelensis*, particularmente do estágio L1 para o L2;

- O presente estudo apoia a hipótese proposta por Genta (1992) sobre a existência de um efeito direto de corticosteroides sobre larvas de *Strongyloides* spp. usando *S. venezuelensis*, mantidos em gerbis, como modelo.

9 REFERÊNCIAS

- AHMED, N. Cultivation of parasites. **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 80-89, 2014.
- ANAMNART, W. et al. Effect of dilution of stool soluble component on growth and development of *Strongyloides stercoralis*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-5, 2015.
- ANAMNART, W. et al. Detrimental effect of water submersion of stools on development of *Strongyloides stercoralis*. **PLoS ONE** 8(12): e82339, 2013.
- ANURADHA, R. et al. Parasite antigen-specific regulation of Th1, Th2, and Th17 responses in *Strongyloides stercoralis* infection. **Journal of Immunology**, v. 195, p. 2241-2250, 2015.
- BAEK, B. K; ISLAM, M. K; KIM, J. H. Development of an in vitro culture method for harvesting the free-living infective larvae of *Strongyloides venezuelensis*. **Korean Journal of Parasitology**, v. 36, n. 1, p. 15-22, 1998a.
- BAEK, B. K; ISLAM, M. K; KIM, J. H. Viability of eggs, filariform larvae and adults of *Strongyloides venezuelensis* (Nematoda: Strongyloidea) maintained in vitro. **Korean Journal of parasitology**, v. 36, n. 2, p. 99-107, 1998b.
- BAEK, B. K. et al. Persistent infection with *Strongyloides venezuelensis* in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Korean Journal of Parasitology**, v. 40, n. 4, p. 181–6, 2002.
- BARKER, G. C; REES, H. H. Ecdysteroids in nematodes. **Parasitology Today**, v. 6, n. 12, p. 384-387, 1990.
- BARRETT et al. Subcutaneous ivermectin use in the treatment of severe *Strongyloides stercoralis* infection: two case reports and a discussion of the literature. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. 220-225, 2016.
- BASILE, A. et al. Disseminated *Strongyloides stercoralis*: Hyperinfection during medical immunosuppression. **Journal of American Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 896-902, 2010.
- BAVAY, A. Sur l'*Anguillule stercorale*. **C R Hebd Séances Acad Sci**, v. 83, p. 694-696, 1876.
- BONNE-ANNÉE, S.; HESS, J. A.; ABRAHAM, D. Innate and adaptive immunity to the nematode *Strongyloides stercoralis* in a mouse model. **Immunologic Research**, v. 51, p. 205-214, 2011.
- BRUMPT, E. Précis de Parasitologie, 6th Edn. **Masson et Cie.**, Paris, 1042 pp., 1934.
- BUONFRATE et al. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. **BMC Infectious Diseases**, 13:78, 2013.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Disponível em <<https://www.cdc.gov/dpdx/>>. Acesso em: 17 de março de 2019.

- CORRIGAN, C. J. Cellular effects of glucocorticoids. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 19 p. 671-682, 1999.
- CRUZ, R; REBOUÇAS, G; ROCHA, H. Fatal strongyloidiasis in patients receiving corticosteroids. **New England Journal of Medicine**, v. 275, p. 1093-1096, 1966.
- CZOCK D. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, p. 61-98, 2005.
- DOGAN, C. et al. Pulmonary *Strongyloides stercoralis* infection. **Respiratory Medicines Case Reports**, v. 11, p. 12–15, 2014.
- ANJOS-RAMOS, L. et al. Electroacupuncture in rats infected with *Strongyloides venezuelensis*: Effects on gastrointestinal transit and parasitological measurements. **Acupuncture in Medicine**, v. 36, n. 1, p. 44-51, 2018.
- DULOVIC, A.; PULLER, V.; STREIT, A. Optimizing culture conditions for free-living stages of the nematode parasite *Strongyloides ratti*. **Experimental Parasitology**, v. 168, p. 25-30, 2016.
- FEELY et al. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection: difficulties in diagnosis and treatment. **Anaesthesia**, v. 65, p. 298-301, 2010.
- GENTA, R. M. Dysregulation of strongyloidiasis: A new hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 4, p. 345-355, 1992.
- GRASSI, G. B.; PARONA, C. Sovra l' *Anguillula intestinale* (dell'uomo) e sopra embrioni probabilmente d' *Anguillula intestinale*. **Arch per le Sc Med**, v. 3, p. 1-15, 1879.
- HANSEN, L.; BUECHER, J.; CRYAN, S. *Strongyloides fuelleborni*: Environmental factors and free-living generations, **Experimental Parasitology**, v. 26, p. 336-343, 1969.
- HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. Sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **Puerto Rico Journal of Public Health**, v. 9, p. 283-298, 1934.
- HORII, Y.; KHAN, A. I.; NAWA, Y. Persistent infection of *Strongyloides venezuelensis* and normal expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*, with reference to the cellular responses in the intestinal mucosa. **Parasite Immunology**, v. 15, n. 3, p. 175-179, 1993.
- HUNT, V. L. et al. The genomic basis of parasitism in the *Strongyloides* clade of nematodes. **Nature Genetics**, v. 48, n. 3, p. 299-307, 2016.
- ISLAM, M. K. et al. Effects of in vitro culture methods on morphological development and infectivity of *Strongyloides venezuelensis* filariform larvae. **Korean Journal of Parasitology**, v. 37, n. 1, p. 13-19, 1999.
- LITTLE, M. D. Comparative morphology of six species of *Strongyloides* (Nematoda) and redefinition of the genus. **Journal of Parasitology**, v. 52, n. 1, p. 69-84, 1966.

LUTZ, A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose, segundo observações feitas no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 121-155, 1919.

MACHADO, E. R. et al. Dexamethasone effects in the *Strongyloides venezuelensis* infection in a murine model. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 6, p. 957-966, 2011a.

MACHADO, E. R. et al. Infectivity of *Strongyloides venezuelensis* is influenced by variations in temperature and time of culture. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 72-79, 2011b.

MACHADO, E. R. et al. Diagnosis of human strongyloidiasis using particulate antigen of two strains of *Strongyloides venezuelensis* in indirect immunofluorescence antibody test. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 52-55, 2001.

MARUYAMA, H. et al. Successive changes in tissue migration capacity of developing larvae of an intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*. **Parasitology**, v. 132, p. 411-418, 2006.

MARTINS W. A. et al. A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 387-390, 2000.

MARTINS W. A. et al. *Strongyloides venezuelensis*: efeito de antimicrobiano e imunossupressor no curso da infecção em camundongos da linhagem AKR/J. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.8, p. 315-324, 2009.

MATI, V. L. T.; DE MELO, A. L. Some aspects of the life history and morphology of *Strongyloides ophidiae* Pereira, 1929 (Rhabditida: Strongyloididae) in *Liophis miliaris* (Squamata: Dipsadidae). **Neotropical Helminthology**, v. 8, n. 2, p. 203-216, 2014.

MATI, V. L. T.; RASO, P.; DE MELO, A. L. *Strongyloides stercoralis* infection in marmosets: replication of complicated and uncomplicated human disease and parasite biology. **Parasites & Vectors**, 7:579, 2014.

MELO, A. L.; VASCONCELOS, A. C.; GAZZINELLI, S. E. P. Alterações histopatológicas em camundongos AKR/J reinfetados por *Strongyloides venezuelensis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, p. 7-12, 2006.

MELO, A. L.; MATI, V. L. T.; MARTINS, W. A. *Callithrix penicillata* as a nonhuman primate model for strongyloidiasis. **Primates**, v. 53, p. 303-309, 2012.

MONCOL, D. J.; TRIANTAPHYLLOU, A. C. *Strongyloides ransomi*: Factors influencing the *in vitro* development of the free-living generation. **Journal of Parasitology**, v. 64, n. 2, p. 220-225, 1978.

MONTES, M.; SAWHNEY, C.; BARROS, N. *Strongyloides stercoralis*: There but not seen. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 500-504, 2010.

NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Expression of IL-4 receptor on non-bone marrow-derived cells is necessary for the timely elimination of *Strongyloides venezuelensis* in mice, but not for

intestinal IL-4 production. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 1185-1195, 2006.

NUTMAN, T. B. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. **Parasitology**, v. 144, p. 263-273, 2017.

NWAORGU, O. C. The development of the free-living stages of *Strongyloides papillosus*. I. Effect of temperature on the development of the heterogonic and homogenic nematodes in faecal culture. **Veterinary Parasitology**, v. 13, n. 3, p. 213-223, 1983.

OLSEN et al. Strongyloidiasis - the most neglected of the neglected tropical diseases? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 967-972, 2009.

OMS [homepage na internet]. Geneva: World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em 17 de março de 2019.

PAULA, F. M. et al. Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 141-143, 2013.

PUJONI, D. G. F.; MELO, A. L. Eficácia do uso do gradiente bifásico de densidade como técnica para a quantificação de ovos de *Strongyloides venezuelensis* em fezes de camundongos. In: **XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007**, Recife. XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007.

ROBERTS, F.; O'SULLIVAN, P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 1, p. 99, 1950.

RODRIGUES et al. Major histocompatibility complex (MHC) class II but not MHC class I molecules are required for efficient control of *Strongyloides venezuelensis* in mice. **Immunology**, v. 128, p. 432-441, 2009.

SATO, Y.; TOMA, H. *Strongyloides venezuelensis* infections in mice. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 57-62, 1990.

SCHÄR, F. et al. *Strongyloides stercoralis*: Global distribution and risk factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7: e2288, 2013.

SCHLEIMER, R. P. Glucocorticoids suppress inflammation but spare innate immune responses in airway epithelium. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, p. 222-230, 2004.

SHEATHER A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a floatation technique. **Journal of Pathology and Therapy**, v. 36, p. 266-275, 1923.

SIEGEL, M. O.; SIMON, G. L. Is human immunodeficiency virus infection a risk factor for *Strongyloides stercoralis* hyperinfection and dissemination? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 7, p. 1-4, 2012.

STREIT, A. Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis. **Parasitology**, v. 135, p. 285–294, 2008.

TIWARI, S.; RAUTARAYA, B.; TRIPATHY, K. P. Hyperinfection of *Strongyloides stercoralis* in an immunocompetent patient. **Tropical Parasitology**, v. 2, p. 135-137, 2012.

TSUJI, N.; FUJISAKI, K. Development *in vitro* of free-living infective larvae to the parasitic stage of *Strongyloides venezuelensis* by temperature shift. **Parasitology**, v. 109, n. 5, p. 643-648, 1994.

TSUJI, N.; NAKAMURA, Y.; TAIRA, N. Long-lasting Parasitism of *Strongyloides venezuelensis* in Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 305-307, 1993.

VADLAMUDI, R. S.; CHI, D. S.; KRISHNASWAMY, G. Intestinal strongyloidiasis and hyperinfection syndrome. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 4, p. 8, 2006.

VASQUEZ-RIOS et al. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: a deeper understanding of a neglected disease. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 43, n. 2, p. 167-175, 2019.

VINEY, M. E.; LOK, J. B. *Strongyloides* spp. **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/ wormbook.1.141.1, <http://www.wormbook.org> **WormBook**, p. 1-17, 2007.

VINEY, M. E. The biology of *Strongyloides* spp. **WormBook**, p. 1-17, 2015.

VINEY, M. *Strongyloides*. **Parasitology**, v. 144, n. 3, p. 259-262, 2017.

VINEY, M.; KIKUCHI, T. *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis* - Rodent models of *Strongyloides* infection. **Parasitology**, v. 144, n. 3, p. 285-294, 2017.

WARBRICK et al. The effect of invertebrate hormones and potential hormone inhibitors on the third larval moult of the filarial nematode, *Dirofilaria immitis*, *in vitro*. **Parasitology**, v. 107, p. 459-46, 1993.

WEATHERHEAD, J. E.; MEJIA, R. Immune response to infection with *Strongyloides stercoralis* in patients with infection and hyperinfection. **Applied Health Economics and Health Policy**, v. 1, n. 4, p. 229-233, 2014.

WERTHEIM, G. Growth and development of *Strongyloides venezuelensis* Brumpt, 1934 in the albino rat. **Parasitology**, v. 61, p. 381-388, 1970.

WILLIS, H. H. A simple levitation method for the detection of hookworm ova. **Medical Journal of Australia**, v. 2, p. 375-376, 1921.

YAMADA, M. et al. Species-specific differences in heterogonic development of serially transferred free-living generations of *Strongyloides planiceps* and *Strongyloides stercoralis*. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 4, p. 592-594, 1991.