

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

JOANA BORGES OSÓRIO

ESTUDO SOBRE A INIBIÇÃO DA OVIPOSIÇÃO EM *Angiostrongylus
cantonensis* MEDIADA POR AGONISTA E ANTAGONISTA DA
SEROTONINA

Porto Alegre

2012

JOANA BORGES OSÓRIO

ESTUDO SOBRE A INIBIÇÃO DA OVIPOSIÇÃO EM *Angiostrongylus cantonensis* MEDIADA POR AGONISTA E ANTAGONISTA DA SEROTONINA

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

Orientador: Dr. Carlos Graeff-Teixeira

Porto Alegre

2012

JOANA BORGES OSÓRIO

ESTUDO SOBRE A INIBIÇÃO DA OVIPOSIÇÃO EM *Angiostrongylus cantonensis* MEDIADA POR AGONISTA E ANTAGONISTA DA SEROTONINA

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

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Alverne Barbosa

Dr. Fenando Bezerra

Dra. Zulma Medeiros

Porto Alegre

2012

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram e me ajudaram a concretizá-lo: à minha família, ao meu namorado, aos meus amigos, colegas e ao meu orientador.

Agradecimentos

Já adianto uma desculpa, pois isto vai ser comprido!

Meus agradecimentos iniciais vão, naturalmente, à família que eu tive a sorte de nascer. À minha mãe **Sônia** que sempre demonstrou um amor incondicional, que sempre me cuidou e me passou valores da vida que eu tenho orgulho de carregar; à minha tia **Nádia**, que admiro muito como mulher e profissional, minha 2ª mãe; à minha avó **Ignês**, um exemplo de coração e “cabeça” (espero ser um pouquinho para meus netos do que tu és para mim), minha outra 2ª mãe; ao meu irmão **Eduardo** que sempre conseguiu me fazer rir com seu jeito brincalhão de ser, por mais que as vezes haja atritos (bióloga X publicitário); ao **Renan**, que me acompanha há tanto tempo, sempre solícito a todos nós; aos meus tios “favoritos do Brasil” **Edson** e **Denise** que me incentivaram com os estudos e até me deram um livro novinho de Parasitologia do Rey!!! Ao meu único primo, **Guilherme**, que também me faz rir bastante e muitos momentos bons de convivência passamos juntos, principalmente falando de cinema; aos meus tios **Márcio** e **Ana** exemplos de profissionais, que me deram minhas priminhas lindas, **Paula** e **Maria**, que por mais longe que morem sempre que veem nos visitar passamos por momentos maravilhosos que deixam muitas saudades. À todos vocês, agradeço imensamente todo o carinho e confiança que sempre me deram. Cada um de vocês me ajudou a construir um pouquinho de mim e me incentivou a chegar até aqui. Ainda existem dois seres peludos e especiais na minha família, meus cachorros **Max** e **Jonas**, aos quais não consigo nem descrever meus sentimentos, obrigada por cada olhar, por cada lambida e pela alegria de me ver chegar em casa depois de cada dia de trabalho. Amo vocês, minha querida família.

Ao meu namorado **Vinícius** que (desde o TCC haha) sempre me apoiou e me ajudou em muitas etapas deste e outros trabalhos, agradeço por ter tido paciência, ter ficado ao meu lado e por todo o amor que sinto que tens por mim. Te amo! Agradeço também à tua família que sempre me proporcionou momentos muito bons, principalmente na presença do pequeno

Arthur. Um agradecimento especial à minha cunhada **Ana Paula** que me ajudou muito na busca aos medicamentos utilizados neste trabalho, fazendo cálculos e procurando onde compra-los... coisas que só uma boa farmacêutica conseguiria! Ana, ainda bem que te dispôs a me ajudar, caso contrário eu teria surtado!! Hehehehe

Ao meu orientador **Carlos Graeff-Teixeira**: o meu obrigada para ti é imenso. Me proporcionou inúmeros aprendizados que vão desde conceitos básicos da linda Parasitologia, à vida e até a morte... das relações que existem na natureza, ao que é ser bom ou ruim e, não esquecerei: devemos tratar os animais de maneira “desumana”. Tens uma visão diferente de muitas coisas, o que te tornas uma pessoa além de “interessante” diferente do convencional. Te admiro muito como profissional e como pessoa. Muito obrigada por permitir que eu faça parte deste grupo que coordenas e muito obrigada por aceitar me orientar neste trabalho.

À querida professora **Ana Cristina Áramburu da Silva**, que, como para muitas colegas, me serviu de exemplo e me fez querer embarcar neste mundo da Parasitologia, lá em 2007. Lembro do meu primeiro dia de aula contigo, no qual, casualmente fez, para mim, a primeira pergunta da aula (como eu descreveria um *Ascaris lumbricoides*). És outra pessoa que admiro muito, és uma profissional exemplar e me lembras muito minha tia Nádia, o que me faz gostar ainda mais de ti! Obrigada por permitir entrar neste grupo maravilhoso!

Agora vai ser grande: aos meus amigos e colegas do incrível Grupo de Biologia Parasitária...

À **Bianca Cognato**, como foi bom poder te conhecer melhor e te tornar uma amiga, durante todos esses anos de parceria!! Foram experimentos, questões do coração, de psicologia, choros, risadas e até aulas dadas contigo, hein Bi! Foram tantas coisas em comum (não é, taurina?) e tantos momentos inesquecíveis! **Carla Muller**, tu chegou para animar meus dias! Querida amiga, quanta energia boa e colorido entrou contigo na Parasito! Adorei todos os momentos que passamos, principalmente os joguinhos do Sim/Não/Irrelevante hehe. Tu e tuas histórias

muito engraçadas, me diverti muito, Carlinha!! Também te devo um obrigada enorme por ter me ajudado tanto no meus experimentos... até fim-de-semana me ajudando, justo tu que é super popstar!! À **Priscilla Pedersen**, que entrou no laboratório quando uma pessoa muito querida para nós, saiu... ficamos tristes e desconfiados de quem era essa moça que iria ocupar o lugar do querido Jú. Quando que eu iria imaginar que aquela moça pequeninha iria ocupar um lugar tão grande no meu coração... Além de técnica do laboratório és uma amiga que já me ajudou muito, desde o fim da faculdade, passando pelo TCC e esta dissertação, até a pegar cachorro perdido, neh Pri?! Convivi muito com essas três mulheres maravilhosas e quero agradecer cada minuto que passamos! Adoro muito vcs! À **Renata Russo**, quantas conversas, quantos conselhos e quantas angústias sobre cachorros da rua pude dividir contigo... Querida Rê, que bom que nos encontramos nesta vida! É muito bom saber que temos tanto em comum. Obrigada por me ajudar quando foi preciso e por deixar eu saber que posso conversar sempre contigo! À **Tháise Paim da Rosa**: adoooro nossas conversas! És uma pessoa muito engraçada e que adorei conhecer! Fostes a única que me entendeu naquela conversa tensa sobre casamento/separação HAHA! Queridas amigas, adoro muito, muito vocês e estou esperando o casamento de ambas, hein!! À **Cristiane Franceschina**, obrigada por me dar tantas dicas para fazer este trabalho e utilizar da tua experiência para me indicar o melhor caminho! Compartilhamos muitas conversas e risadas... ah e não posso esquecer do compartilhamento das casquinhas das lasanhas que eu almoçava, do restinho de feijão que sobrava... etc hahaha

À **Alessandra Morassutti**, muito obrigada por toooodas as dicas, sugestões e ajudas que me destes durante meu percurso. És uma pessoa muito querida, pacienciosa além de prestativa e, bom... como já foi dito, és um Carlos 2, o que dispensa mais elogios! Hehehe **Rafael Maurer**, és outra pessoa que admiro muito. Batalhador e estudioso sempre me passou uma imagem de colega que se pode confiar. Gostei muito de todas as conversas que tivemos sobre presente e futuro, embora acho que, ultimamente, tu tens sonhado de mais que eu fazia café! haha Torço muito por ti!

Ao **grupo de Parasitologia** em geral: **Ivone** (noivinha querida, muito obrigada por me convidar para um evento tão importante como teu casamento! Fiquei lisonjeada!), **Jana** (a pequeninha braba do laboratório, ri muito contigo!), **Bárbara** (querida colega, nunca vou esquecer quando tu disse que não queria que eu saísse do lab! Fiquei emocionada!!), **Silvana** (técnica do IPB, muito obrigada por me auxiliar quando precisei!), **Débora** (a pessoa com mais informações sobre, livros, filmes, atores e etc!) e tantos outros que vão e vêm e não temos a oportunidade de conhecer tanto), muito obrigada pela convivência e por todos esses anos de aprendizados e companheirismo! Adoro muito todos vocês!

Ao querido colega e amigo **José Ricardo Barradas**... quantas risadas? Perdi as contas! Muito obrigada por sempre fazer as aulas mais divertidas, pelas dúvidas que pude tirar contigo, pelas ajudas na estatística, pelos churrascos (que certamente ainda devo \$), pelas idas na fazenda e, principalmente pelo companheirismo de tanto tempo!!

Ao professor **Hélio Bittencourt** que se disponibilizou a me ajudar nas tão temidas análises estatísticas deste trabalho.

A **equipe** e aos **Professores do Programa de Pós-Graduação de Zoologia** que sempre foram prestativos comigo. Aos professores, também agradeço por me mostrarem, mais um pouco, o quão linda a Biologia é. Tenho muito orgulho de ter feito este Mestrado com vocês.

Ao **CNPq**, por possibilitar que esta minha trajetória acontecesse.

É difícil resumir tudo o que sinto e tudo que gostaria de dizer por cada um de vocês que ajudou a construir este trabalho e a construir tudo que vem antes e depois deste trabalho, mas cada um tem um lugarzinho no meu coração.

MUITO OBRIGADA!

Cada uno da lo que recibe
Y luego recibe lo que da,
Nada es más simple,
No hay otra norma:
Nada se pierde,
Todo se transforma.

Todo se transforma – Jorge Drexler

Resumo

O gênero *Angiostrongylus* engloba duas espécies *A. cantonensis* e *A. costaricensis*, que podem infectar o ser humano e causar infecções conhecidas como meningite eosinofílica e angiostrongilíase abdominal, respectivamente. Na infecção por *A. costaricensis*, ovos e larvas são elementos centrais nas reações inflamatórias podendo haver o agravamento dessas lesões, pela morte dos vermes. Os anti-helmínticos atualmente disponíveis, atuam em vias metabólicas essenciais ao parasito, culminando com a morte dos vermes. Portanto, uma droga alternativa para o tratamento das angiostrongilíases, que atue principalmente na reprodução dos vermes, se torna necessária. Um estudo *in vitro* realizado com *Schistosoma mansoni* demonstrou a inibição da oviposição pela fenantrolina. Em outro estudo com *Caenorhabditis elegans* foi demonstrado que a serotonina estimula o aumento da taxa de ovos liberados pela fêmea do nematódeo, além de controlar a alteração do seu estado de postura (repouso e ativação). A serotonina é um neurotransmissor presente tanto em vertebrados como em invertebrados. Com o objetivo de testar o efeito na oviposição de *Angiostrongylus cantonensis*, duas substâncias que interferem na neurotransmissão da serotonina em humanos, Buspirona e Pizotifeno, foram utilizadas em modelo experimental *in vivo*. 28 roedores da espécie *Rattus norvegicus* foram divididos em 3 grupos e infectados com 100 L3 de *A. cantonensis*: um grupo controle (não tratado) e 2 grupos tratados com cada substância. As substâncias foram administradas a partir do momento em que todos os roedores iniciaram a larvipostura, uma vez ao dia por via oral, durante 10 dias, numa concentração de 0,03 mg/mL cada. Neste período as fezes dos roedores foram recolhidas diariamente para a contagem do número de L1 eliminadas e, após os 10 dias, os animais foram eutanasiados para coleta dos vermes. A média de larvas eliminadas nas fezes para o grupo controle foi 37.934, para o grupo Buspirona 10.658 e para o grupo Pizotifeno 6.658. Os vermes foram contados e separados pelo sexo: no grupo controle foram obtidas 59 fêmeas e 40 machos; no grupo Buspirona foram encontradas 86 fêmeas e 41 machos e no grupo Pizotifeno 83 fêmeas e 64 machos. A comparação dos dados dos grupos experimentais e do controle foram analisadas estatisticamente pelo teste ANOVA e nenhuma diferença significativa foi verificada. As fêmeas foram medidas através de uma ocular milimetrada instalada em um estereomicroscópio. A análise foi feita também pelo teste ANOVA e resultou numa diferença significativa entre o grupo controle e o Pizotifeno, no qual teve um tamanho médio de 18 mm, em comparação com o tamanho médio do controle de 19 mm, indicando que o Pizotifeno poderia ter algum efeito no desenvolvimento dos nematódeos, porém não afetando a reprodução. Estes resultados indicam que para a procura de drogas alternativas, que atuem na oviposição, é necessário uma melhor compreensão das vias reguladoras do sistema reprodutivo dos organismos parasitos.

Palavras-chave: *Angiostrongylus costaricensis*; tratamento; Buspirona; Pizotifeno;

Abstract

The *Angiostrongylus* genus includes two species that can infect humans, *A. cantonensis* and *A. costaricensis*. They may cause infections known as eosinophilic meningitis and abdominal angiostrongyliasis, respectively. In *A. costaricensis* infection, eggs and larvae are central elements in the inflammatory reactions, which may get worse with death of the worms.

The currently available anthelmintics act on the parasite essential metabolic pathways with a killing effect. Therefore, an alternative substance to treat angiostrongyliasis, acting mainly in worms reproduction is necessary. An *in vitro* study conducted with *Schistosoma mansoni* showed inhibition of oviposition by Phenanthroline. In another study with *Caenorhabditis elegans*, it was shown that serotonin increases the egg-laying rate of the female nematode, besides controlling the change of its posture state (rest and activation). Serotonin is a neurotransmitter present in vertebrates and invertebrates. In order to test the effect on egg laying of *Angiostrongylus* spp., two substances that interfere with serotonin neurotransmission in humans, Buspirone and Pizotifen, were used in an experimental model *in vivo*. 28 rodents of species *Rattus norvegicus* were divided into three groups and infected with 100 L3 of *A. cantonensis*: a control group (untreated) and two groups treated with each substance. The substances were administered as soon as all rodents started releasing larvae, once a day, orally, for 10 days, at a concentration of 0.03 mg / mL each. In this period rodent feces were collected daily for counting the number of L1 and after 10 days the animals were euthanized for collection of the worms. The average number of larvae released in feces was 37,934 by the Control group, 10,658 by the Buspirone group and 6,658 by the Pizotifen group. The worms were counted and separated by sex: in the Control group 59 females and 40 males were obtained; in Buspirone group 86 females and 41 males were found; and in the Pizotifen group 83 females and 64 males were counted. The comparison of data from Control and Experimental groups was statistically analyzed by ANOVA and no significant difference was observed. Females were measured using a millimetric eyepiece installed in a stereomicroscope. The ANOVA analysis resulted in a significant difference between Control and Pizotifen, which had an average size of 18 mm, compared with to average size of 19 mm of Control, indicating that Pizotifen would have some effect in the nematodes development, but not affecting their reproduction. These results indicate that the search for alternative drugs that act on egg laying needs a better understanding of the pathways that regulate the reproductive system of parasitic organisms.

Keywords: *Angiostrongylus costaricensis*, treatment, Buspirone, Pizotifen;

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Vermes de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> observados no pulmão de roedor infectado com o nematódeo.....	15
Figura 2 – Ciclo de vida de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	17
Figura 3 – Distribuição mundial de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	18
Figura 4 – Vermes de <i>Angiostrongylus costaricensis</i> visualizados nas artérias mesentéricas de roedor silvestre infectado experimentalmente com o nematódeo.....	19
Figura 5 – Ciclo de vida do <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	21
Figura 6 – Distribuição mundial de <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	22
Figura 7 – Estrutura química da substância Buspirona.....	26
Figura 8 – Estrutura química da substância Pizotifeno.....	27
Figura 9 – Ocorrência da larvipostura em roedores infectados com L3 de <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	34
Figura 10 – Número médio de vermes retirados na necropsia para cada indivíduo infectado com <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	35
Figura 11 – Número de vermes separados pelo sexo de acordo com cada grupo experimental.....	36
Figura 12 – Tamanho das fêmeas dos grupos Controle, Pizotifeno e Buspirona.....	37
Figura 13 – Comparação dos pesos dos indivíduos de cada grupo experimental.....	38
Figura 14 – Taxa de mortalidade dos roedores dos grupos controles e dos grupos tratados com Pizotifeno e Buspirona	39

Sumário

1. Introdução	15
1.1 <i>Angiostrongylus cantonensis</i>	15
1.1.1 O parasito.....	15
1.1.2 Ciclo de vida.....	16
1.1.3 Distribuição.....	18
1.2 <i>Angiostrongylus costaricensis</i>	19
1.2.1 O parasito.....	19
1.2.2 Ciclo de vida.....	20
1.2.3 Distribuição.....	21
1.3 Serotonina.....	23
1.4 Inibição da oviposição.....	25
1.5 Substâncias.....	26
1.5.1 Buspirona.....	26
1.5.2 Pizotifeno.....	27
1.6 Justificativa.....	28
1.7 Objetivo.....	30
2. Materiais e Métodos	31
2.1 Animais.....	31
2.2 Infecção e manutenção do ciclo de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> em laboratório.....	32
2.3 Recuperação das larvas de primeiro estágio.....	32
2.4 Tratamento.....	32
2.5 Recuperação dos vermes	33
2.6 Fluxograma da metodologia experimental	33
3. Resultados	34
3.1 Larvipostura diária nas fezes.....	34
3.2 N° de vermes encontrados durante a necropsia dos roedores.....	34
3.3 Medida corporal dos vermes fêmeas de <i>A. cantonensis</i>	36
3.4 Sintomas da infecção nos roedores.....	37
4. Discussão	40
5. Conclusão	47
REFERÊNCIAS	48

ANEXO

Protocolo de Aceitação do Comitê de Ética PUCRS.....	56
APÊNDICE A – Valores de p para o número de L1 coletadas durante os dias de tratamento entre os grupos Controle, Buspirona e Pizotifeno. Dados logaritimizados e analisados pelo teste ANOVA.....	57
APÊNDICE B – Teste ANOVA para comparação do número de vermes encontrados por roedor.....	57
APÊNDICE C – Teste Qui-quadrado para comparação entre os grupos em relação ao número de vermes machos e fêmeas.....	57
APÊNDICE D – Teste ANOVA para comparação do tamanho dos vermes fêmeas.....	58
APÊNDICE E – Teste de Tukey indicando a diferença de tamanho entre os grupos Controle e Pizotifeno.....	58
APÊNDICE F – Teste ANOVA para comparação dos pesos dos roedores de cada grupo.....	58
APÊNDICE G – Teste de Tukey para a comparação dos pesos dos roedores de cada grupo.....	59
APÊNDICE H – Teste ANOVA com medidas repetidas para a comparação dos pesos dos roedores de cada grupo.....	59

1 Introdução

1.1 *Angiostrongylus cantonensis*

1.1.1 O parasito

Angiostrongylus cantonensis é um nematódeo (Fig. 1) pertencente ao filo: Nematelminthes; classe: Nematoda; ordem: Strongylida; superfamília: Metastrongyloidea; gênero: *Angiostrongylus*; espécie: *cantonensis*, parasito das artérias pulmonares e coração de roedores urbanos (*Rattus rattus* e *R. norvegicus*), que foi descrito em Guangzhou (Canton), China, por Chen em 1935 (Chen, 1935). O indivíduo adulto macho mede de 20 a 25 mm x 0.32 a 0.42 mm e a fêmea mede de 22 a 34 mm x 0.34 a 0.56 mm (Wang et al., 2008).



Figura 1 – Vermes de *Angiostrongylus cantonensis* observados no pulmão de roedor infectado com o nematódeo. Fêmeas possuem o intestino e o tubo reprodutor espiralados e os machos possuem ambos retilíneos (Fonte: Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS).

1.1.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida deste parasito (Fig. 2) envolve ratos (*Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*) como hospedeiros definitivos e moluscos como hospedeiro intermediário (Alicata, 1965). *Achatina fulica* é uma das espécies de moluscos terrestres de maior importância na transmissão desta parasitose, sendo inclusive, encontrada infectada no Brasil (Caldeira et al., 2007). Outros animais como crustáceos, ácaros da terra, planárias, sapos e lagartos podem atuar como hospedeiros paratênicos (Wang et al., 2008). O hospedeiro definitivo se infecta ao ingerir as larvas de terceiro estágio quando se alimentam dos hospedeiros intermediários ou paratênicos ou de alimentos que contenham o muco do molusco infectado, como aconteceu com turistas na Jamaica, que apresentaram os sintomas da infecção após a ingestão de salada (Slom et al., 2002). Essas larvas penetram no estômago, entram nos vasos do sistema porta hepático e sistema linfático mesentérico, sendo, após, carregados ao longo do corpo pela circulação arterial entrando no sistema nervoso central, dois ou três dias pós-infecção. Enquanto as larvas migram, obrigatoriamente, para o cérebro, sofrem duas mudas nesta rota para o espaço subaracnóideo de 12 a 14 dias pós-infecção. De 28 a 33 dias, os vermes viajam para o coração e artérias pulmonares onde amadurecem. Os ovos liberados pela fêmea nas artérias pulmonares são carregados pela circulação até os pulmões, onde embrionam. Eclodem em larvas de primeiro estágio que penetram nos alvéolos e então transitam pela árvore brônquica e acabam sendo deglutidas e saindo com as fezes. Quando o hospedeiro intermediário ou paratênico ingere essas fezes contaminadas com as larvas, dão seguimento ao ciclo (Alicata, 1965).

O ser humano se infecta ao ingerir as larvas de terceiro estágio do parasito, do mesmo modo que o roedor. Uma vez engolidas, as larvas invadem o tecido intestinal causando enterite, antes de chegar no fígado. São sintomas como tosse, rinorréia, garganta inflamada, mal-estar e febre que podem desenvolver quando os vermes vão para os pulmões. Depois de duas semanas, as larvas alcançam o sistema nervoso central, causando uma intensa reação inflamatória retendo as larvas que acabam morrendo nas meninges que, por sua vez, causam outra forte reação inflamatória que

desenvolve a meningite eosinofílica seguida de encefalite (Sawanyawesuth et al., 2003) ou a Angiostrongilíase Ocular (Sinawat et al., 2008; Wang et al., 2008). Esta infecção não possui tratamento comprovado, apenas corticoides para o alívio da pressão intracraniana e sintomas neurológicos, devido à reação inflamatória (Pien & Pien, 1999).

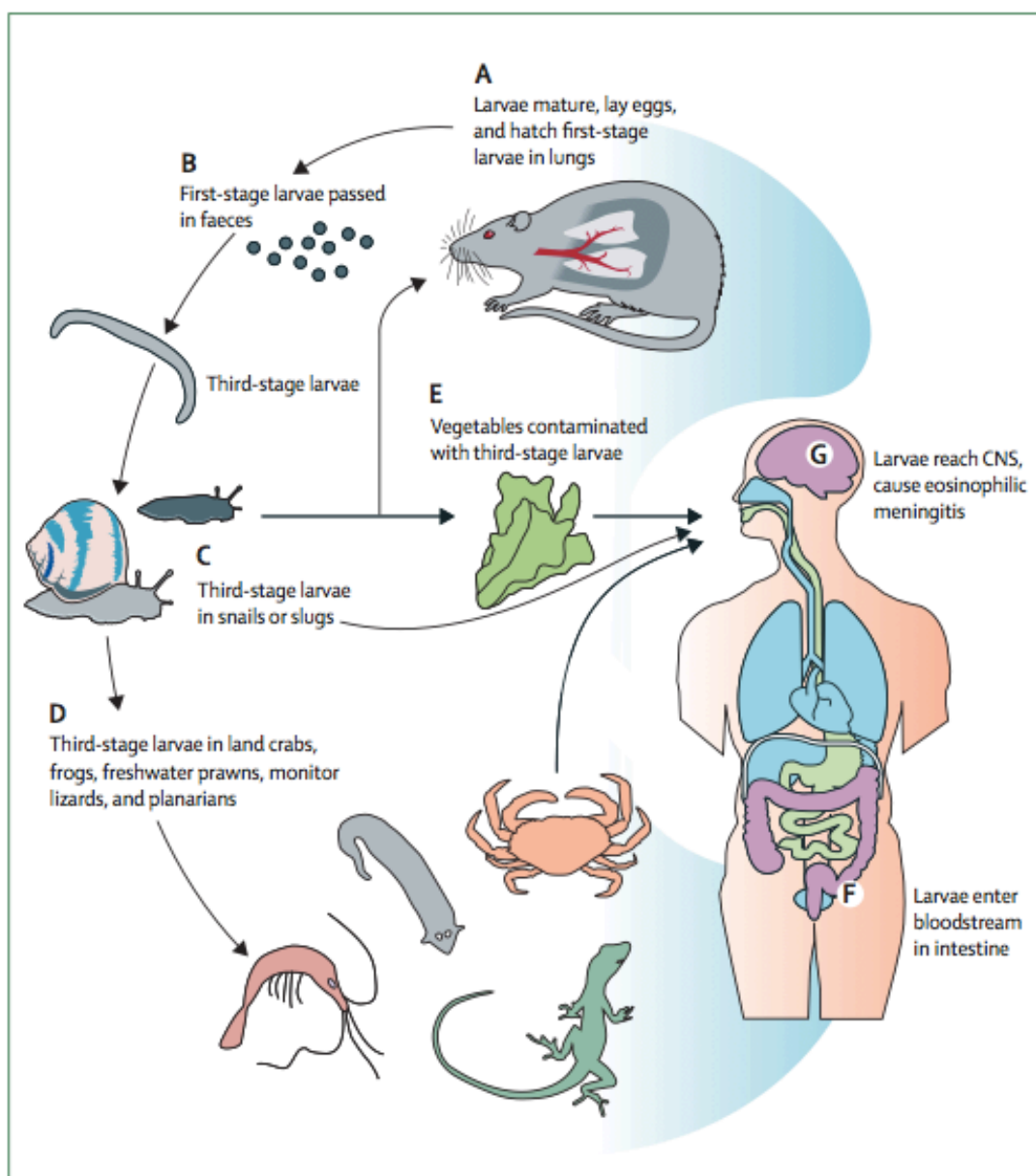


Figura 2 – Ciclo de vida de *Angiostrongylus cantonensis* (Fonte: Wang et al., 2008)

1.1.3 Distribuição

Segundo Wang et al. (2008), há registro de 2827 casos da infecção em 30 países. Locais caracterizados como regiões endêmicas abrangem os

continentes Americano, Africano, Asiático e Oceania (Fig. 3). No Brasil, foram relatados pela primeira vez três casos da doença no Espírito Santo e um caso em Pernambuco (Lima et al., 2009). Também já foram encontrados moluscos naturalmente infectados com larvas de *A. cantonensis* nos estados do Paraná, Rio de Janeiro, São Paulo e Santa Catarina (Caldeira et al., 2007; Maldonado et al., 2010).

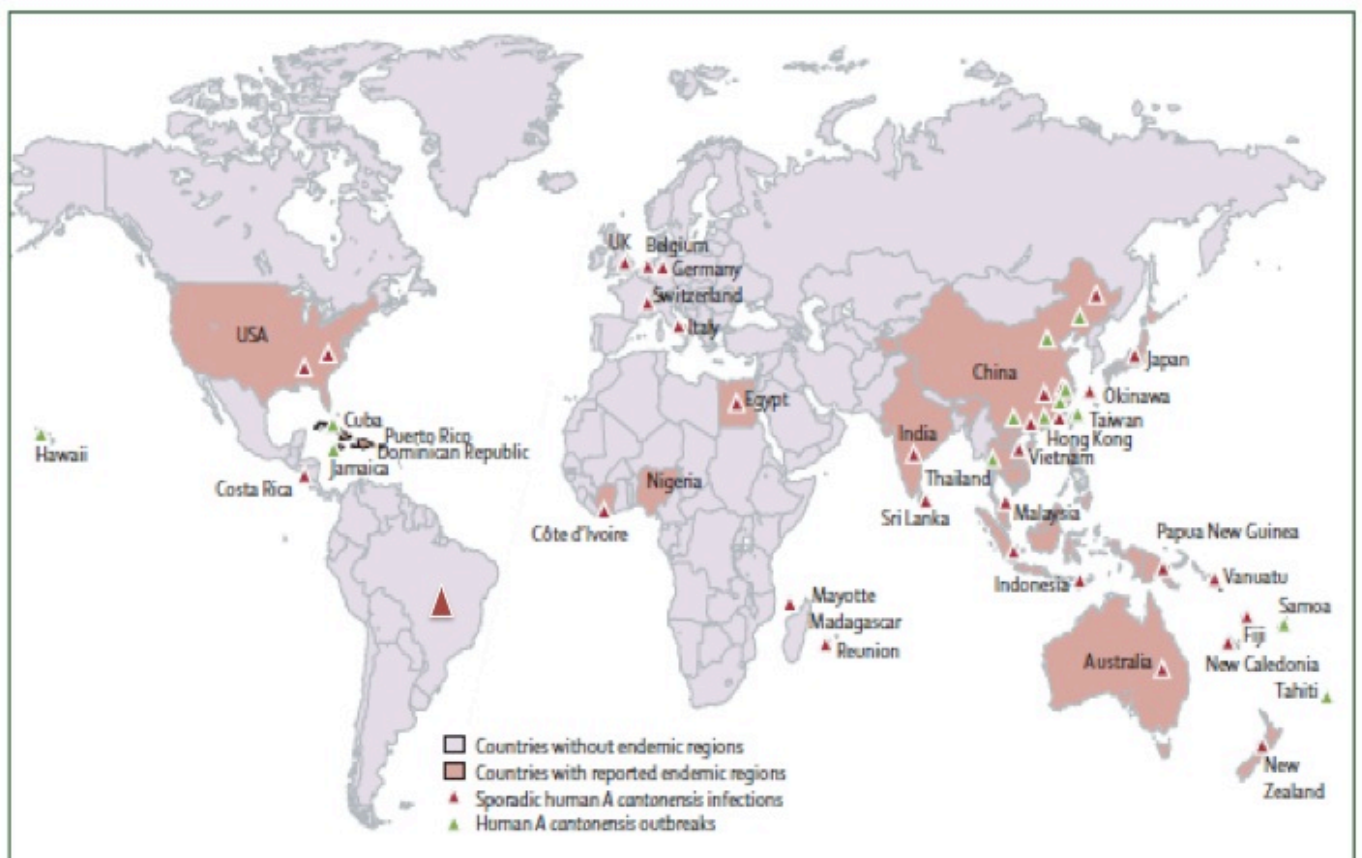


Figura 3 – Distribuição mundial de *Angiostrongylus cantonensis* (Fonte: Wang et al., 2008), com a inclusão do Brasil.

1.2. *Angiostrongylus costaricensis*

1.2.1 O parasito

Angiostrongylus costaricensis é outro nematódeo (Fig. 4) pertencente ao filo: Nematelminthes; classe: Nematoda; ordem: Strongylida; superfamília: Metastrongyloidea; gênero: *Angiostrongylus*; espécie: *costaricensis*, encontrado pela primeira vez em humano por Morera e Céspedes em 1971, na Costa Rica, em crianças, principalmente, que apresentavam granulomas com severa infiltração eosinofílica na cavidade abdominal. Os vermes machos medem de 15 mm a 18 mm de comprimento por 0,28 mm de largura (Santos, 1985) e as fêmeas medem de 24 mm a 27 mm (Morera & Céspedes, 1971). Tem como hospedeiros definitivos roedores silvestres como a espécie encontrada no Brasil *Oligorizomys nigripes*, a qual indivíduos infectados foram encontrados no Rio Grande do Sul (Graeff-Teixeira et al., 1990) e como hospedeiro intermediário moluscos da família Veronicellidae (Morera, 1985).



Figura 4 – Vermes de *Angiostrongylus costaricensis* visualizados nas artérias mesentéricas de roedor silvestre infectado experimentalmente com o nematódeo. No interior

da artéria observamos vermes fêmeas que possuem o intestino e o tubo espiralados, ao contrário dos machos que possuem os órgãos de forma retilínea (Fonte: Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS).

1.2.2 Ciclo de vida

As larvas de primeiro estágio são liberadas juntamente com as fezes de roedores infectados. Moluscos se alimentando dessas fezes permitem que essas larvas cheguem ao tecido fibromuscular, local onde sofrem a primeira muda durante o quarto dia de infecção, se transformando em larvas de segundo estágio. Entre o 11^o e o 12^o dia pós-infecção sofrem mais uma muda, tornando-se larvas de terceiro estágio, infectivas para os vertebrados, podendo ser eliminadas juntamente com o muco liberado pelos moluscos. A ingestão dessas larvas através da alimentação por frutas, verduras ou o próprio molusco, possibilita que essas larvas penetrem à parede do íleo-terminal, onde migram pelos vasos linfáticos mesentéricos, diferenciando-se em larvas de quinto estágio. Após cerca de uma semana, essas larvas de quinto estágio retornam ao intestino onde vão atingir a maturidade sexual, tornando-se vermes (Mota & Lenzi, 1995) (Fig. 5).

O homem, ingerindo as larvas de terceiro estágio, pode desenvolver a infecção chamada de Angiostrongilíase Abdominal e apresentar doença, a qual é reconhecida a partir de quadros clínicos de abdômen agudo. Os vermes podem determinar lesões sobre o endotélio das artérias mesentéricas, além do desenvolvimento de reações inflamatórias associados aos ovos, larvas e produtos excretados por estes parasitos (Moreira & Céspedes, 1971; Morera, 1985). Como sintomas, os pacientes apresentam dores abdominais, febre, anorexia, mal-estar, náusea, vômitos, constipação ou diarreia (Graeff-Teixeira, 1987). Essa infecção também não possui tratamento efetivo (Mentz et al, 2004) e, a sua rápida evolução leva, muitas vezes, a exigir intervenção cirúrgica (Graeff-Teixeira, 1991).

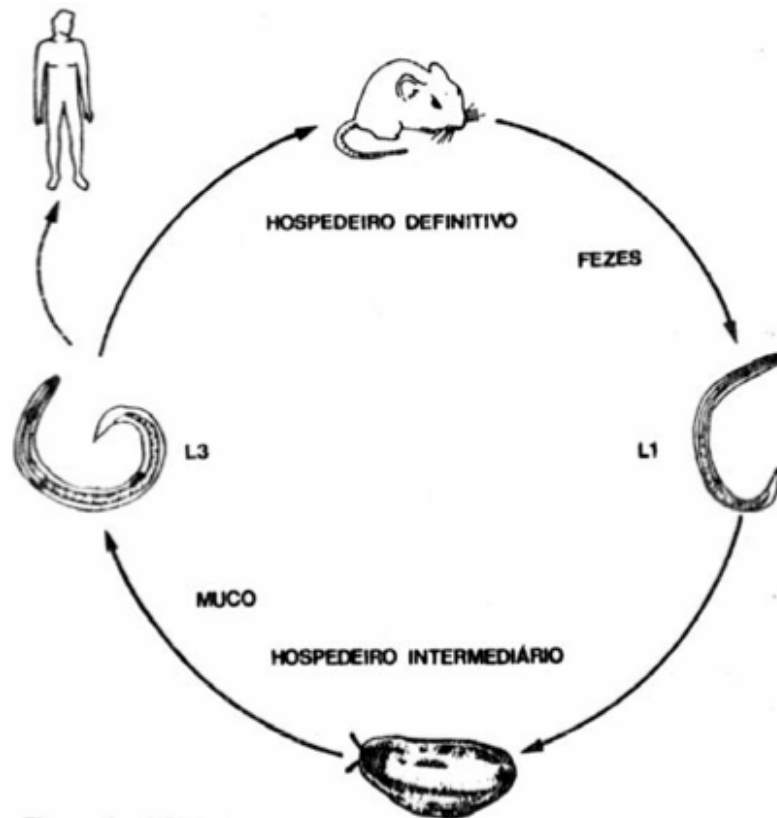


Figura 5 – Ciclo de vida do *Angiostrongylus costaricensis* (Fonte: Rey, 2001).

1.2.3 Distribuição

Esta infecção abrange a maioria dos países das Américas, do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, incluindo Brasil (Fig. 6) (Demo & Pessat, 1986; Morera, 1988; Mentz et al, 2004), no qual o estado que mais tem registros de ocorrência é o Rio Grande do Sul, onde foram registrados 27 casos de 1975 a 1984 (Graeff-Teixeira, 1991).

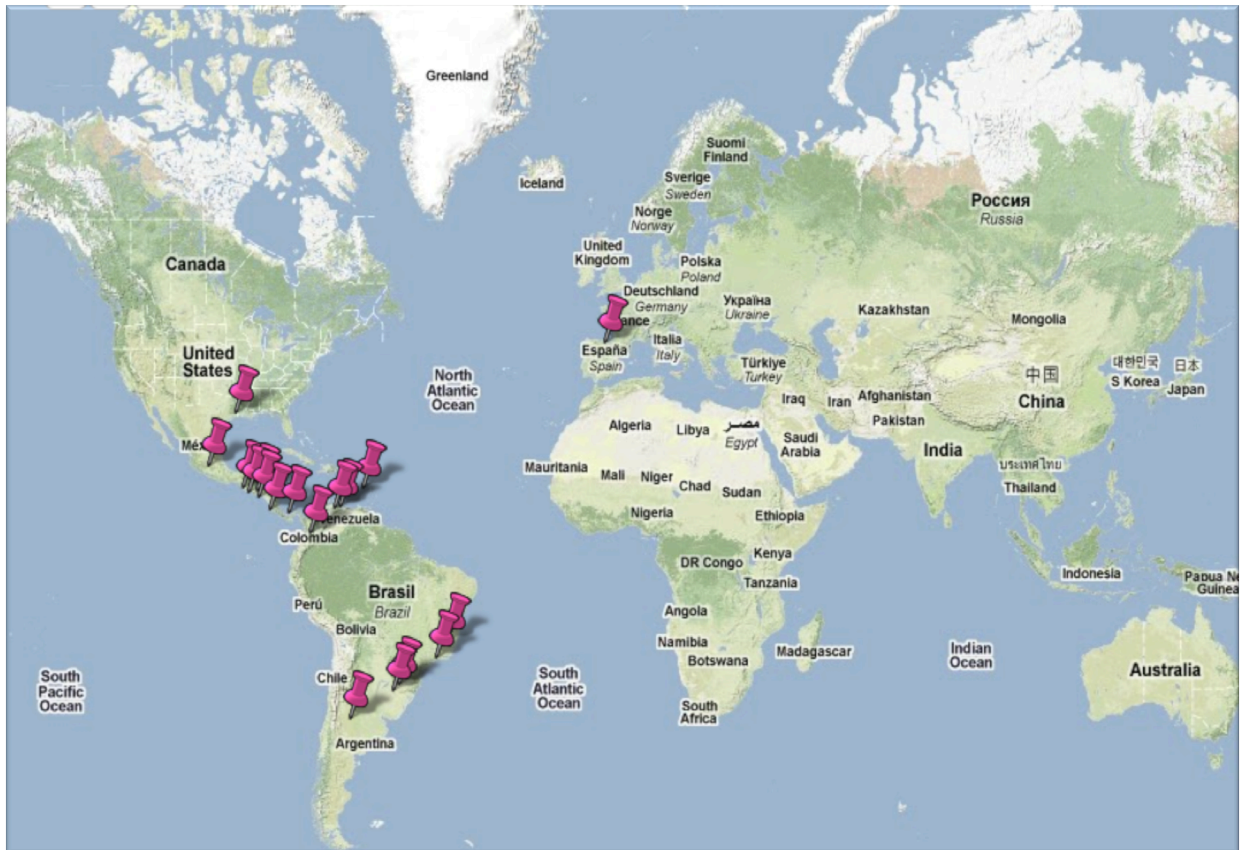


Figura 6 – Distribuição mundial de *Angiostrongylus costaricensis* (Fonte: cedido e produzido por Alessandra Morassutti, Grupo de Biologia Parasitária da PUCRS, 2010).

1.3 Serotonina

A serotonina é um neurotransmissor sintetizado a partir do aminoácido essencial L-triptofano. A serotonina (5-HT) desempenha um importante papel no sistema nervoso de vertebrados, com diversas funções, como a liberação de alguns hormônios, regulação do sono, temperatura corporal, apetite, humor, atividade motora e funções cognitivas (Feijó et al., 2011). Também é encontrada em invertebrados, onde foi relacionada com funções neurohumorais, como em nematódeos parasitos e de vida livre (Horvitz et al., 1982; Loer & Kenyon, 1993). Segundo estudos realizados por Terada et al (1982) a serotonina

Waggoner et al. (1998) investigaram mecanismos moleculares e neurais responsáveis por estabelecer e regular padrões temporais na oviposição do nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans*. A liberação dos ovos neste nematódeo ocorre através da contração de 16 músculos da vulva e do útero que são extensivamente ligados por junções, e, pelo menos 11 neurônios fazem as sinapses anatômicas com os músculos da liberação dos ovos. Horvitz et al. (1982) testaram colocar serotonina exógena na cultura de *C. elegans* e notaram três respostas comportamentais: primeiro, ela deprimiu a locomoção dos indivíduos; segundo, ela ativou o bombeamento da faringe, e, terceiro, ela estimulou a taxa de ovos liberados pelo útero. Waggoner et al. (1998) demonstrou que a serotonina, liberada por um par de neurônios motores serotoninérgicos (HSNs: hermaphrodite-specific neuron) requisitados para uma liberação de ovos eficiente, estimula esta liberação não através da excitação direta dos músculos, mas através da modulação de suas atividades de tal forma que eles entram em um estado de ativação no qual são mais suscetíveis de sofrer uma contração. De acordo com essa hipótese a frequência da liberação de aglomerados de ovos é determinada pela taxa de serotonina à qual é libertada para induzir este estado ativo. Este estudo comprovou que em animais deficientes de HSNs ao serem tratados com serotonina exógena induz a postura de ovos em um padrão semelhante à uma fase contínua e ativa; em animais mutantes deficientes de serotonina os períodos inativos foram significativamente maiores, entre cada postura.

Loer & Kenyon (1993) provaram outra resposta comportamental associada à serotonina em machos de *C. elegans*, onde identificaram a necessidade de serotonina para haver o enrolamento da cauda durante a cópula. Machos deste nematódeo possuem uma sequência de ações realizadas ao encontrar um hermafrodita de mesma espécie. Quando a superfície ventral da cauda do macho entra em contato com a superfície do hermafrodita, ele para, pressiona a cauda contra o hermafrodita e volta para o início do corpo deste. Ao chegar o fim do hermafrodita, ele faz uma curva ventral apertada para dentro de sua cauda e, assim, continua a deslizar por toda a superfície oposta de seu companheiro pretendido. Este comportamento de rotação pode ser repetido muitas vezes antes da vulva ser localizada e, então, a cópula iniciada. Neste estudo também foi observado que ao adicionar serotonina exógena a um macho provoca o enrolamento da cauda semelhante ao realizado normalmente durante a cópula, porém a concentração da serotonina precisa ser alta (a cutícula intacta destes nematódeos são notadamente impermeáveis) o que é uma boa razão para acreditar que este efeito é bem específico. Machos do gênero *Ascaris*, que possuem cinco neurônios serotoninérgicos macho-específicos no cordão nervoso ventral, também apresentaram o curvamento da cauda quando é injetado serotonina na cavidade posterior do corpo (Loer & Kenyon, 1993).

1.4 Inibição da oviposição

O composto nicarbazin já foi reportado por ter uma leve atividade contra o trematódeo causador da Esquistossomose, *Schistosoma mansoni*, e, uma investigação posterior mostrou que, em doses menores esse composto é extremamente eficaz na prevenção dos efeitos patológicos da esquistossomose, agindo contra a maturação e na função reprodutiva destes vermes, sendo suprimidas (Campbell & Cuckler, 1967). Araújo et al. (2002) testou lovastatina como droga inibidora da oviposição dos vermes da mesma espécie e esta também observou inibição na eliminação de ovos. Também em *S. mansoni* e com o mesmo propósito Morrison et al. (1986) e Chen et al. (1990) testaram a ação de mevinolin e também observou inibição na produção de ovos. A substância fenantrolina (0,5 -150 μM) também inibiu a produção de ovos de pares de vermes adultos *in vitro*, com uma redução de 98% a 50 μM (Day & Chen, 1998).

Uma série de compostos esteroides que, aparentemente, perturbam os processos regulados por hormônios em insetos foram examinados quanto aos efeitos sobre a viabilidade e a produção de microfilárias em adultos da espécie de nematódeo *Brugia pahangi*, cultivadas *in vitro*. Os azasteroides, 25-azacoprostane e 25-azacholestane, inibiram a produção das microfilárias numa concentração de 5 ppm (partes por milhão), a primeira também exibiu atividade macrofilaricida nesta concentração. Os brassinosteroides examinados, inibiram a produção de microfilárias em 5 ppm, mas não afetam a viabilidade do verme. Azadiractina – composto extraído da árvore *Azadirachta indica* – também provou ser um inibidor significativo da liberação das microfilárias, mas sem efeito sobre a motilidade do verme ou viabilidade (Barker, 1989).

1.5 Substâncias

Das substâncias utilizadas neste trabalho:

1.5.1 Buspirona

É o princípio ativo de diversos medicamentos como Ansitec® e Buspar® utilizados como agente ansiolítico (Guimarães & Almeida, 2010). A Buspirona foi introduzida em 1986 com a expectativa de não apresentar os inconvenientes dos benzodiazepínicos como a sedação e sonolência (Guimarães & Almeida, 2010). Ela age como um agonista dos receptores pré-sinápticos 5HT_{1A} da serotonina, ou seja, possui afinidade por esses receptores, induzindo nestes respostas celulares e moleculares (Barros et al., 2010) que neste caso é a inibição da liberação da serotonina (Guimarães & Almeida, 2010). A Buspirona (8-[4-(4-pyrimidin-2-yl)piperazin-1-yl]butyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione) possui como fórmula química C₂₁H₃₁N₅O₂ (Fig. 7) (PubChem compound, 2012).

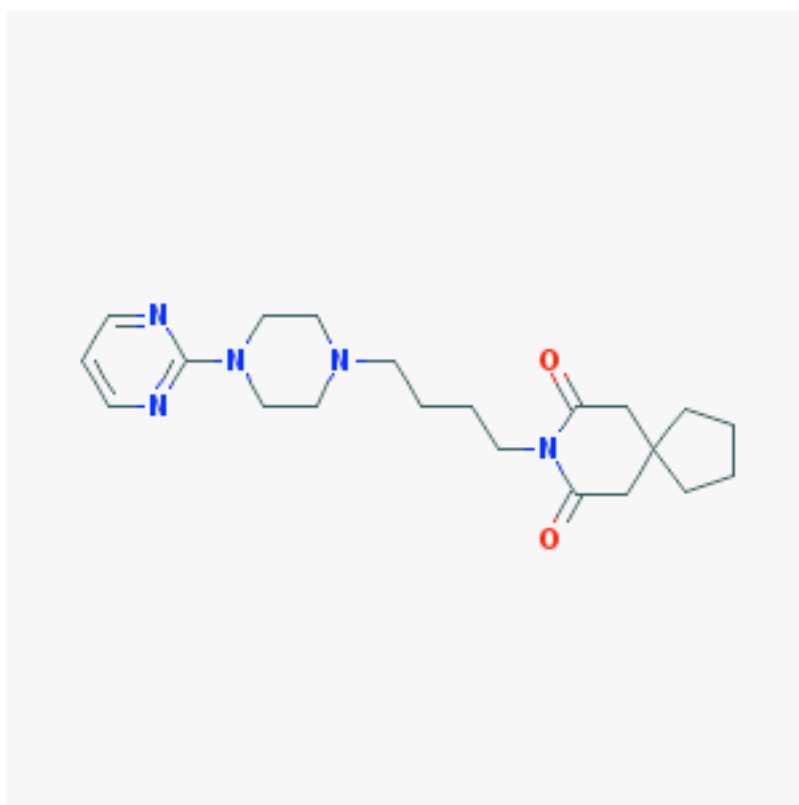


Figura 7 – Estrutura química da substância Buspirona (Fonte: PubChem compound, 2012)

1.5.2 Pizotifeno

É o princípio ativo do medicamento conhecido comercialmente como Sandomigran®, adequado ao tratamento da migrânea (Londero et al, 2010). Este fármaco age como um antagonista 5-HT₂ (Londero et al, 2010), ou seja, apresenta afinidade por este tipo de receptor mas ao combinar-se não gera ativação do mesmo impedindo a resposta do agonista (Barros et al, 2010). Além disso, pizotifeno apresenta ações anti-histamínica e anticolinérgica, bem como propriedades antidepressivas e sedativas (Londero et al, 2010). O Pizotifeno (4-(1-methyl-4-piperidylidene)-9,10-dihydro-4H-benzo[4,5]cyclohepta[1,2]thiophene), possui fórmula química representada por C₁₉H₂₁NS (Fig. 8) (PubChem compound, 2012).

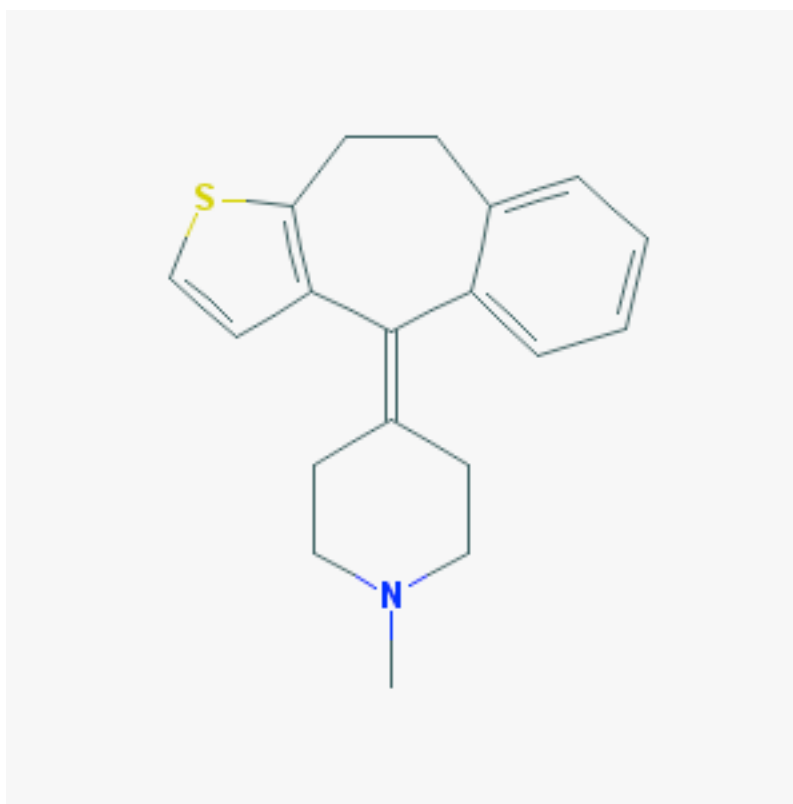


Figura 8 – Estrutura química da substância Pizotifeno (Fonte: PubChem compound, 2012).

1.6 Justificativa

As doenças parasitárias continuam a ser um dos principais problemas de saúde pública em diversos países tropicais em desenvolvimento. Essas doenças são responsáveis por um elevado grau de mortalidade e morbidade nestas regiões. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que o número atual de mortes devido a doenças parasitárias é cerca de 2,5 milhões em todo o mundo. As infecções parasitárias estão distribuídas globalmente, mas são particularmente endêmicas das zonas tropicais do globo, tendo como explicação um conjunto de fatores formado pelo clima, temperatura e umidade elevadas que são ideais para o crescimento de diferentes espécies de parasitos. Este conjunto de fatores associados com o baixo padrão de vida e a falta de saneamento básico e de higiene pessoal fornecem o ambiente ideal para a disseminação dos parasitos. Como controle para erradicar essas infecções temos a imunoterapia e as vacinas como ferramentas úteis, porém ainda estão em estágios iniciais de desenvolvimento. Disponível temos a quimioterapia como a principal ferramenta para o combate das doenças parasitárias nos seres humanos e animais domésticos (Sharma, 1997).

As infecções por helmintos teciduais apresentam uma mesma preocupação: com a morte repentina da população de vermes ocorre a liberação de uma série de antígenos que repercutem, no organismo humano, em reações inflamatórias piorando o estado clínico do paciente (Mentz et al., 2004). As infecções por angiostrongilídeos são exemplos desta situação de parasitismo tecidual.

Os ovos liberados no organismo humano possuem um papel fundamental em algumas patogenias, principalmente na angiostrongilíase abdominal e esquistossomose, gerando granulomas como resultado de reações inflamatórias. Ambas angiostrongilíases não apresentam, até o presente momento, uma droga com eficácia clínica comprovada (Pien & Pien, 1999; Mentz & Graeff-Teixeira, 2003). Com tudo isso, podemos refletir sobre a busca por uma substância capaz de reduzir e prevenir a morbidade nessas

doenças como alternativa dos tradicionais tratamentos vermícidias, ainda sem efeito sobre as angiostrongilíases. Estudos anteriores, baseados nos efeitos em *Schistosoma mansoni*, com derivados do mevinolin e fenantrolina não conseguiram demonstrar o efeito da inibição da oviposição em *Angiostrongylus costaricensis* (Mentz et al., 2006). Vale ressaltar que, ainda há pouca adaptação dos roedores de laboratório na infecção por *A. costaricensis* e, por isso, se faz necessário o uso de roedores silvestres de difícil obtenção e manipulação. Por estes motivos, tem-se a idéia de refinar estes testes experimentais para esta doença com o modelo de *A. cantonensis*, bem adaptado ao roedor *Rattus norvegicus*.

1.7 Objetivo

Estudar a inibição da oviposição de *Angiostrongylus cantonensis* e o efeito de uma substância agonista e outra antagonista da serotonina em modelo experimental.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais

Foram utilizados 28 roedores machos convencionais da espécie *Rattus norvegicus* (CREAL – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil) de 90 dias. Os animais passaram por um período de aclimação de duas semanas no Laboratório de Biologia Parasitária (PUCRS) e foram divididos em quatro grupos de quatro animais (Tabela 1). O experimento foi realizado em duplicata, resultando no total de 8 animais por grupo, com exceção dos roedores do grupo controle ambiental que foram os mesmos em ambos experimentos, pois não precisaram ser eutanasiados. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com ração comercial (NUVILAB, Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil), água *ad libitum* e iluminação com ciclo 12h/12h. Durante os dias de tratamento, os animais foram isolados e mantidos em caixas sob piso gradeado. Com o objetivo de contribuir para o bem-estar dos roedores, as gaiolas tiveram seu ambiente enriquecido, o que baseia-se na exposição dos mesmos à estímulos sensoriais gerados por objetos como folhas e rolos de papel (Frajblat et al., 2008). Este experimento foi realizado em duplicata e só teve início após a aprovação pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS de registro 10/00213.

Tabela 1 – Constituição dos grupos de animais conforme a situação de infecção e/ou tratamento

Grupos	Dados
1. Controle Negativo (ambiental)	Não infectados e não tratados
2. Controle Positivo	Infectados e não tratados
3. Pizotifeno	Infectados e tratados com Pizotifeno
4. Buspirona	Infectados e tratados com Buspirona

2.2 Infecção e manutenção do ciclo de *Angiostrongylus cantonenses* em laboratório:

O ciclo do parasito é mantido no laboratório desde 1997 com o isolado “Akita” (cedido pelo grupo do Prof. Dr. Kentaro Yoshimura, da Escola Médica da Universidade de Akita, Japão). As larvas L3 infectantes para os vertebrados foram isoladas dos caramujos da espécie *Biomphalaria* spp. através da digestão artificial (3 indivíduos com 30 dias de infecção foram triturados e colocados em tubos com Pepsina (Sigma P-7125) (0,03%) em solução de 0,7% HCl mantidos a 37 °C por 2 horas; o material resultante foi passado pelo Método de Baermann (1917) para a recuperação das larvas de terceiro estágio). 100 L3 foram inoculadas por meio de canulação esofágica em cada indivíduo dos grupos 2, 3 e 4, previamente anestesiados através da inalação de Isoflurano (Cristália - Itapira, SP - Brasil).

2.3 Recuperação das Larvas de Primeiro Estádio:

Após cerca de 42 dias pós-infecção os animais foram separados e colocados em caixas com piso gradeado para que as fezes caíssem no fundo da caixa e assim ficassem retidas embaixo da grade, em contato com papel umedecido para não secar, mantendo as larvas de primeiro estágio vivas. Durante 10 dias, os animais foram pesados e trocados de caixas para que suas fezes fossem recolhidas, pesadas e submetidas ao Método de Baermann (Baermann, 1917), para a recuperação das L1, por 16 horas. O material sedimentado foi analisado em microscópio óptico para a contagem das larvas.

2.4 Tratamento

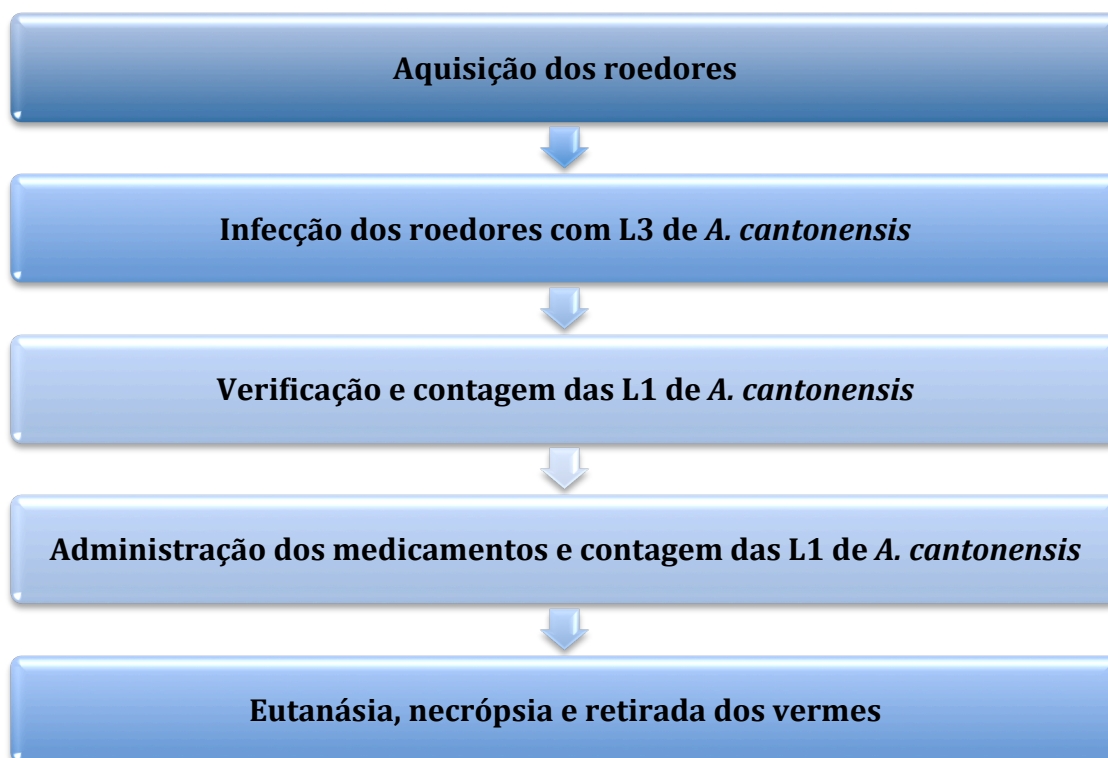
Os animais dos grupos experimentais infectados com *A. cantonensis* por cerca de 42 dias, foram submetidos, durante os 10 dias, a um tratamento realizado via canulação esofágica em uma concentração de 0,03mg/mL de acordo com Moser et al. (1990), resultando em 0,06 mg de cada

medicamento diluídos em 0,5 ml água mineral qsp Desta solução foram administrados 0,5 ml para cada animal. O grupo 3 foi tratado com a substância Pizotifeno (Pharmanostra – Anápolis, GO) e o grupo 4 com a substância Buspirona (Pharmanostra – Anápolis, GO).

2.5 Recuperação dos vermes

Após os 10 dias de tratamento, os roedores foram eutanasiados por depressão anestésica. Foram, então, retirados seus pulmões e coração para a recuperação dos vermes de cada roedor, que foi realizada sob estereomicroscópio e com o auxílio de pinças. Os vermes foram contados e separados de acordo com o sexo. Ainda sob o estereomicroscópio, estes vermes foram medidos com o auxílio de uma ocular milimetrada.

2.6 Fluxograma da metodologia experimental



3 Resultados

3.1 Larvipostura diária nas fezes

De acordo com o ciclo da infecção, os roedores parasitados começaram a liberar as larvas de primeiro estágio em torno de 42 dias de infecção, pois não foram todos os roedores que iniciaram a eliminação de larvas em 42 dias pós-infecção. Durante os 10 dias de observação, o número de larvas por grama de fezes variou bastante, sem, entretanto mostrar alguma diferença significativa entre o grupo Controle Infectado e os dois grupos tratados (Fig. 9). O número médio total de L1 observadas no grupo Controle foi de 37.934, no o grupo Buspirona 10.658 e no grupo Pizotifeno 6.658.

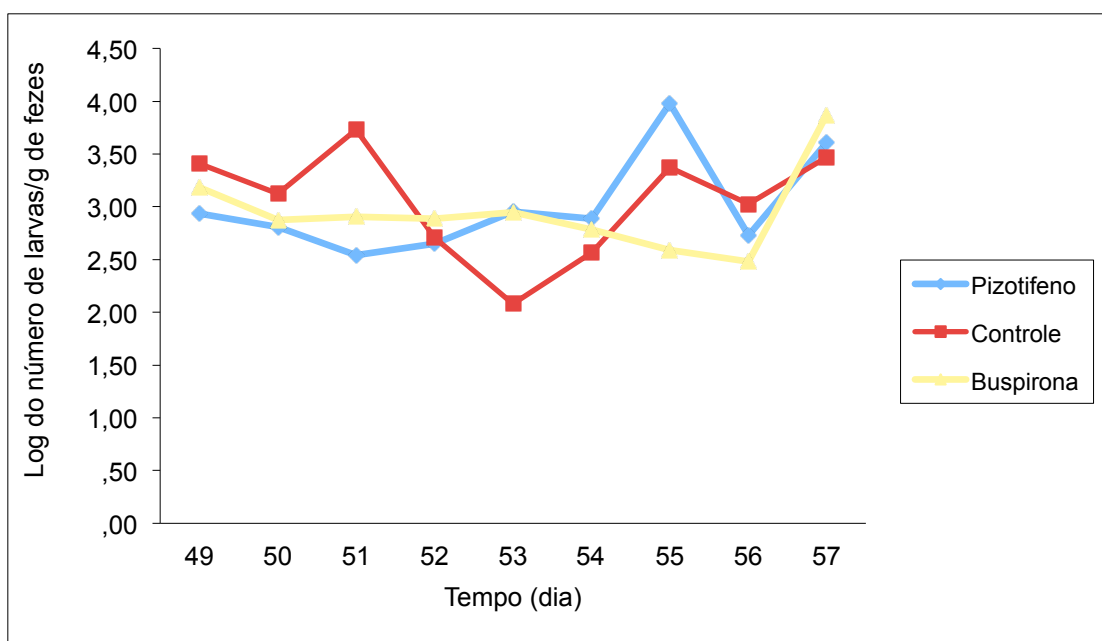


Figura 9 – Ocorrência da larvipostura em roedores infectados com L3 de *Angiostrongylus cantonensis*

3.2 Número de vermes encontrados durante a necropsia dos roedores

Após a necropsia, os vermes retirados das artérias pulmonares e coração dos roedores foram separados de acordo com o sexo e contados (Tab. 2). O número total de vermes retirados foi de 373 indivíduos. A análise

do número de vermes retirados dos roedores de cada grupo foi realizada pelo teste ANOVA e não mostrou nenhuma diferença significativa (Fig. 10). Foi verificado, também, se havia diferença entre o número de fêmeas e machos analisados, separadamente, pelo teste Qui-quadrado onde o resultado não apontou nenhuma diferença significativa (Fig. 11).

Tabela 2 – Número de vermes retirados dos roedores durante a necropsia

Grupo	Fêmeas	Machos	Total
Controle	59	40	99
Pizotifeno	83	64	147
Buspirona	86	41	127
Total			373

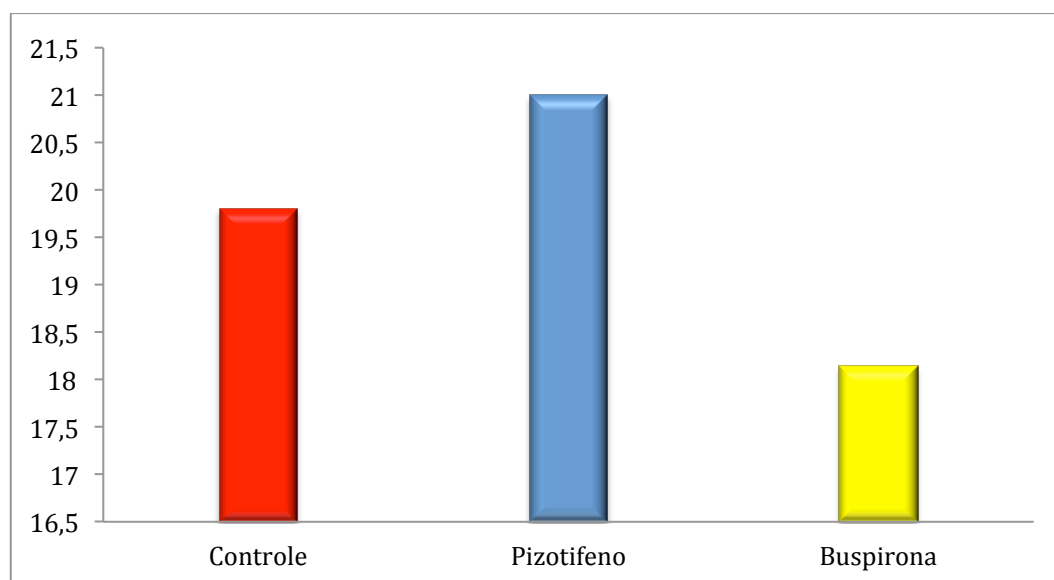


Figura 10 – Número médio de vermes retirados na necropsia para cada indivíduo infectado com *Angiostrongylus cantonensis*

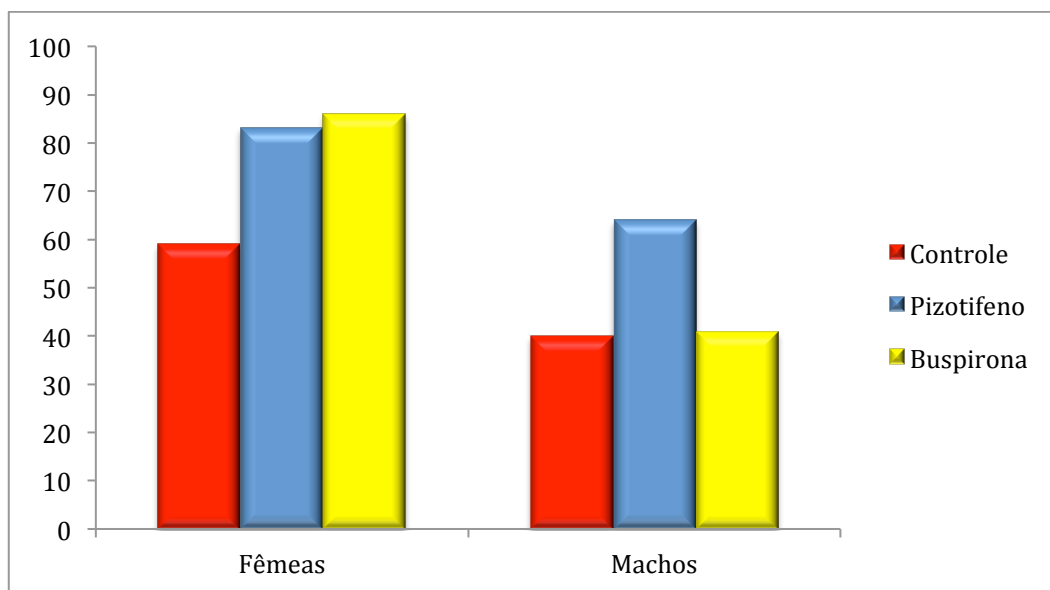


Figura 11 – Número de vermes separados pelo sexo de acordo com cada grupo experimental

3.3 Medida corporal dos vermes fêmeas de *Agiostrongylus cantonensis*

As fêmeas medidas apresentaram um tamanho variando de 12,2 mm a 23,0 mm (Fig. 12). Ao realizar o teste ANOVA foi detectada uma diferença significativa entre dois grupos. Utilizando os testes de Tukey e de Bonferroni constatou-se que a diferença significativa apontada foi entre os grupos Pizotifeno e Controle.

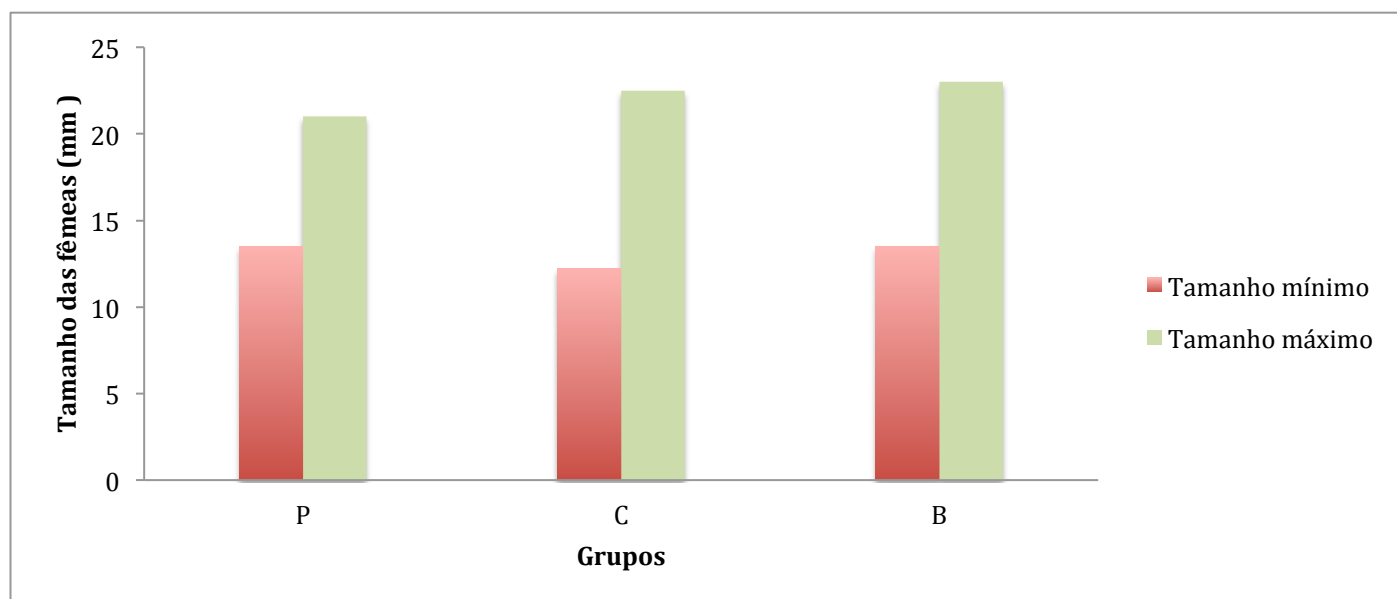


Figura 12 – Tamanho dos vermes fêmeas dos grupos Controle, Pizotifeno e Buspirona

3.4 Sintomas da infecção nos roedores

Os roedores começaram a apresentar os sintomas característicos da infecção com cerca de 10 dias quando apresentaram respiração ruidosa. Em torno de 30 dias, o comportamento de alguns animais se modificou, com menor atividade e observação de, pelos ouriçados. A partir de 40 dias pós infecção, começaram a aparecer disfunções motoras em alguns indivíduos e eliminação de sangue nos olhos e nariz, e os animais começaram a morrer. Depois de 53 dias alguns indivíduos tratados com Buspirona não defecaram durante três dias. O comportamento modificado, os pelos ouriçados e as mortes não ocorreram nos animais do grupo Controle Ambiental.

Os pesos dos roedores (Fig. 13) foram analisados durante o período do tratamento para uma comparação com os animais do Controle Ambiental. Os dados coletados foram analisados previamente para verificar a existência de uma provável causa de variação entre os experimentos, a ser considerada. Foi realizado, então, o teste t de Student para todas as datas dos

experimentos e os valores de p se mostraram elevados, sugerindo que a união dos experimentos pudesse ser realizada. Apesar da aparente diferença nos desvios-padrão dos pesos entre os grupos, a hipótese de homogeneidade de variâncias pode ser aceita ao nível de 1%. Para testar a veracidade das diferenças, foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis que reiterou o resultado de nenhuma diferença significativa entre os grupos. Salienta-se que o teste de Tukey (não equivalente a ANOVA) produziu o mesmo resultado. Realizando uma análise mais sofisticada, através do teste ANOVA com medidas repetidas, o resultado foi bastante similar ao anterior.

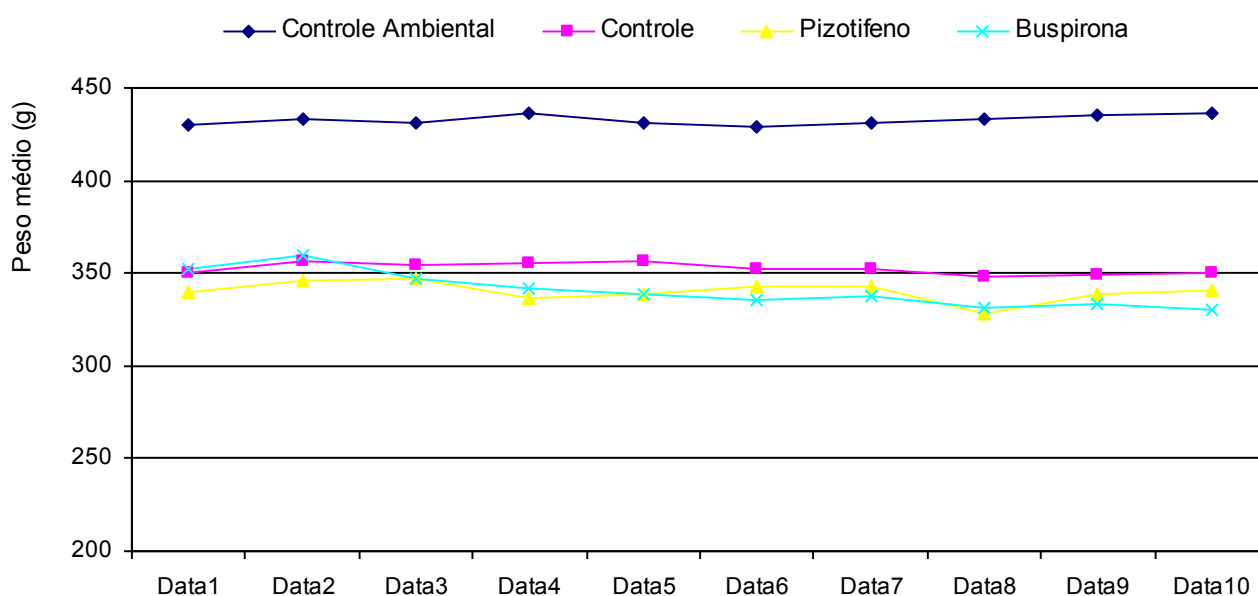


Figura 13 – Comparação dos pesos dos indivíduos de cada grupo experimental

A análise de sobrevivência foi realizada comparando os três grupos experimentais e o controle ambiental (roedores não infectados). A partir de análise pelo teste de Kaplan Méier observamos que não há diferença significativa entre os 4 grupos (Fig. 14).

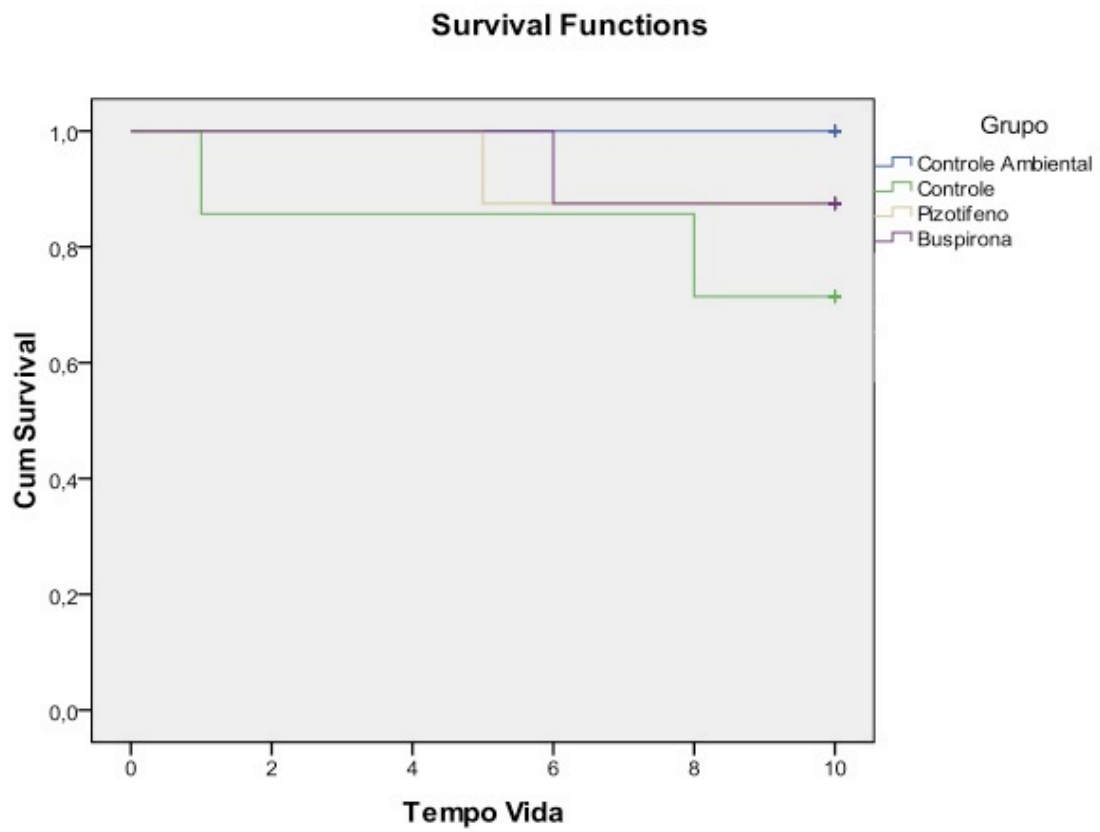


Figura 14 – Taxa de mortalidade dos roedores dos grupos controles e dos grupos tratados com Pizotifeno e Buspirona.

4 Discussão:

Infecções zoonóticas são responsáveis por mais de 60% das doenças infecciosas humanas. Algumas das zoonoses mais importantes e bem conhecidas são causadas por helmintos ou vírus, incluindo espécies de nematódeos, cestódeos e trematódeos (Robinson & Dalton, 2009).

Os mecanismos de resposta imune nas infecções helmínticas são múltiplos devido ao tamanho e à diversidade metabólica dos parasitos. A resposta imune tem um papel fundamental na defesa do nosso organismo contra essas infecções parasitárias, entretanto, existem evidências que em muitas infecções, os principais aspectos patológicos não estão ligados diretamente com o parasito, podendo decorrer de uma resposta imunológica anormal (Machado et al., 2004), aos elementos resultantes do sucesso reprodutivo do agente parasitário como ovos, larvas e também pela sua morte em local intravascular, que acaba liberando alergênicos no organismo humano, sendo o que determina a reação inflamatória (Morera, 1985; Olds *et al*, 1999; Mentz e Graeff-Teixeira, 2003). É necessário que todos estes fatores sejam levados em conta para que ocorra o tratamento adequado destas infecções.

Infecções teciduais são difíceis de tratar em virtude da localização dos parasitos, protegidos de mecanismos de defesa, tais como o aumento do peristaltismo e consequente eliminação de enteroparasitos. Também a dificuldade de disponibilização de medicamentos em áreas compartimentalizadas ou tecidos com alterações no sistema circulatório. São exemplos bem conhecidos destas situações desfavoráveis ao tratamento medicamentoso: a Hidatidose, a Cisticercose, a Toxocaríase, a Estrongiloidiase, a Triquinose e a Esquistossomose.

Echinococcus granulosus é um cestóide cujo estágio larval causa equinococose cística (CE) no gado, animais selvagens e seres humanos. CE é adquirida pela ingestão de ovos, provenientes de fezes de hospedeiros definitivos (cães, lobos e outros carnívoros), que abrigam o verme em seu

intestino delgado (Rojo-Vasquez et al. 2011). A Hidatidose está entre as doenças parasitárias mais negligenciadas. O desenvolvimento de novas drogas e outras modalidades de tratamento recebe pouca atenção (da Silva, 2010). Não existe tratamento ideal para esta infecção e qualquer medida para tratamento é complexa e precisa ser baseada no tipo de cisto. Essas medidas abrangem cirurgia para a retirada do cisto, prescrição de medicamento e tratamento percutâneo. Dentre os medicamentos, foi comprovado que apenas Benzimidazoles não possuem efeito em cistos de tamanho grande e com muito líquido. Albendazol é a droga de escolha para o tratamento medicamentoso, e, secundariamente, Praziquantel também é utilizado (Brunetti et al., 2010). Estudos demonstram que o tratamento é longo, menos de três meses o efeito obtido não é o ideal (Junghanns et al., 2008).

A Cisticercose é outra doença parasitária, na qual o agente causal em porcos e seres humanos é o cisticerco da *Taenia solium*, que pode se alojar em cérebro, músculo e ventrículos. Considera-se que existem mais de 50 milhões de pessoas infectadas no mundo, endêmica no México, América Central e América do Sul, África, Ásia e Índia. É considerada a mais importante doença neurológica infecciosa no mundo inteiro para suas manifestações clínicas (Malagón, 2009). A neurocisticercose é a mais comum doença do sistema nervoso central, que por muito tempo foi tratada cirurgicamente, hoje, porém albendazol e praziquantel são os medicamentos de escolha que eliminam e reduzem o número e o tamanho dos cisticercos. Um problema com este tratamento medicamentoso é que as respostas dos pacientes não são universais, e estão associadas com uma alta frequência de reações adversas, provavelmente em decorrência da morte das formas parasitárias no organismo (Garg, 1997).

Toxocaríase é o termo clínico aplicado a infecção humana causada por *Toxocara canis* ou *T. cati*, entretanto, têm como hospedeiros definitivos cães e gatos, respectivamente, onde vivem no lúmen do intestino, quando adultos. As manifestações clínicas dominantes associadas com toxocariasis são classificadas de acordo com os órgãos afetados. Existem duas principais síndromes: larva migrans visceral (LMV), que engloba doenças associadas

com os órgãos maiores, e larva migrans ocular (LMO), na qual os efeitos patológicos toxocaríase no hospedeiro estão restritas ao olho e ao nervo óptico. Conseqüências patológicas são, em grande parte, dependente da morte das larvas que pode provocar o aparecimento de reações de hipersensibilidade. A inflamação se manifesta como granulomas eosinofílicos. Albendazole é a droga de escolha e o tratamento dura cerca de 5 dias sendo que pode ser combinada com corticoides para o alívio dos sintomas alérgicos (Despommier, 2003).

A Estrongiloidiase é uma infecção endêmica em regiões tropicais e subtropicais mais pobres do mundo, afetando cerca de 100 milhões de pessoas em 70 países. O causador da infecção é o nematódeo *Strongiloides stercoralis* que possui um ciclo de vida complexo que permite provocar a auto-infecção no hospedeiro (Corti et al., 2011). Tem-se o início da infecção quando as larvas presentes na terra penetram na pele de alguém que esteja andando de pés descalços. Essa infecção parece ter três níveis de resposta imune: pessoas que conseguem montar a resposta imune efetiva, conseguindo erradicar a infecção; pessoas que formam imunoglobulinas específicas circulantes, capazes de conter a infecção, mas sem erradicar, tornando esta infecção crônica; e pessoas infectadas cronicamente que sofreram uma diminuição drástica da imunidade celular permitindo ao parasito se multiplicar repetidamente e com abundância (Síndrome de Hiperinfecção) que é freqüentemente letal. No tratamento, aqueles pacientes tratados com doses altas de corticóides se tornam pré-dispostos à Síndrome de Hiperinfecção, pois tais hormônios geram a apoptose de células TH2, reduzem, drasticamente, o número de eosinófilos, inibem a resposta dos mastócitos e, ao metabolizar-se, geram os ecdisteróides não anabólicos, substâncias capazes de estimular a multiplicação e as mudas das larvas intestinais (Carrada-Bravo, 2008). Doenças intercorrentes como HTLV-1 e infecção pelo HIV, transplante de órgãos, e outras doenças infecciosas como Kala azar podem aumentar o risco da Síndrome de Hiperinfecção em pacientes com estrongiloidíase. Estima-se que esta síndrome ocorre em 1,5 a 2,5% dos pacientes com estrongiloidíase (Vadlamudi et al., 2006). As drogas de escolha para este tratamento são tiabendazol, mebendazol, albendazol e

ivermectina. Entretanto, possuem uma efetividade variável contra este organismo. O tempo de tratamento pode chegar a 28 dias (Carrada-Bravo, 2008).

Triquinose é uma zoonose induzida por vermes do gênero *Trichinella*, é causada pelo consumo de carne crua ou mal cozida de vários tipos de animais e tem uma prevalência mundial de aproximadamente 11 milhões (Pozio et al., 2003). A maioria das infecções humanas são causadas acidentalmente pela espécie *Trichinella spiralis*. A doença é, atualmente, tratada com vários derivados de benzimidazole, como o mebendazol, albendazol e flubendazol. No entanto, nenhum desses medicamentos são considerados totalmente eficaz contra as larvas encistadas ou larvas de *T. spiralis*, devido à sua baixa biodisponibilidade. Além disso, alguns desses medicamentos também são contraindicados durante a gravidez e não recomendados em crianças menores que 3 anos. Assim, novas drogas e eficazes contra triquinose são necessárias para ajudar a prevenir e controlar esta importante doença zoonótica (Yadav & Temjenmongla, 2012).

A Esquistossomose causada por *Schistosoma mansoni* é uma doença endêmica em todo o mundo de importância em termos de saúde pública, afeta grandes áreas geográficas em vários países. No Brasil, sua prevalência é estimada em 8-10 milhões de pessoas infectadas, e cerca de 30 milhões de pessoas vivendo em áreas de transmissão que estão, atualmente, em situação de risco da doença (Ferrari et al., 2003). As lesões patológicas observadas no ser humano infectado são de acordo com a produção de ovos pelas fêmeas do parasito (Vandewaa et al., 1989). Atendendo o papel central do ovo na patologia desta doença, Vandewwa e colaboradores (1989) testaram mevinolin como um potente inibidor da produção de ovos e, os resultados indicaram a habilidade deste medicamento em interferir nesta etapa da reprodução.

Para a meningite eosinofílica, O tratamento usual da meningite eosinofílica é o combate dos sintomas com o uso de corticosteróides utilizados para pacientes que apresentam forte inflamação, devido a presença das larvas de 5º estágio no cérebro. Em pacientes que apresentam

severa dor de cabeça pode ser realizada a punção do líquido cefalorraquidiano para o alívio da pressão. Albendazol é o fármaco de escolha contra as larvas de *A. cantonensis*. Outros medicamentos como tiabendazol, 1-tetramisol, mebendazol, avermectina B1a, ivermectina, flubendazol e milbemicin também se mostraram eficazes (Maki, & Yanagisawa, 1986; Hwang & Chen, 1988). Embora os valores destes medicamentos foram determinados por técnicas convencionais, não se sabe o local em que seus mecanismos de ação agem. Entretanto, foi identificado que o mecanismo larvicida destes medicamentos foram considerados capazes de aumentar as lesões cerebrais inflamatórias, de forma que ainda é controverso o uso destes medicamentos (Wang et al., 2006).

Também, para a infecção de *Angiostrongylus costaricensis* não há medicamento eficiente que a combata. Estudos em roedores da espécie *Sigmodon hispidus* infectados com *A. costaricensis* mostram que dietilcarbamazina, tiabendazol e albendazol ao invés de matar os parasitos, fazem seus movimentos ficarem mais acelerados tornando as lesões da infecção mais severas ao cessar o tratamento (Morera & Bontempo, 1985).

Ao longo dos anos, vários testes foram feitos na tentativa de encontrar alguma substância capaz de tratar o prevenir a infecção e o desenvolvimento das doenças causadas por esses parasitos (Graeff-Texeira et al., 2009). Uma importante alternativa seria a de encontrar um medicamento eficiente para o controle da reprodução destes animais, uma vez que, no caso da infecção por *A. costaricensis*, os ovos e larvas são elementos centrais na inflamação intestinal decorrente desta parasitose (Rodrigues, 1997; Mentz et al., 2006).

O sistema nervoso de helmintos parasitos é considerado um excelente alvo para a intervenção quimioterapêutica. A maioria dos anti-helmínticos em uso atualmente, como a ivermectina, atua interagindo com receptores de neurotransmissores e causa o rompimento da sinalização neuronal (El-Shehabi et al., 2012).

Coincidindo com a hipótese que deu origem ao presente trabalho, outros estudos recentes com *Schistosoma mansoni* sugerem que as aminas biogênicas (adrenalina, serotonina, noradrenalina, dopamina) podem ser

particularmente adequadas para o desenvolvimento de drogas anti-esquistossomóticas (Abdulla et al., 2009; Taft et al., 2010) por isso, realizou-se os testes experimentais com duas substâncias interferentes para com a serotonina (Pizotifeno e Buspirona), uma vez que a melhor amina caracterizada, que é mioexcitatória em todas as espécies de vermes chatos estudados até à hoje (El-Shehabi et al., 2012).

O modelo experimental para este estudo foi o *Angiostrongylus cantonensis*, uma vez que pode-se observar maior adaptação entre este parasito com seu hospedeiro definitivo, maior liberação de larvas nas fezes e maior facilidade de manuseio dos vermes devido ao seu tamanho. O experimento *in vivo*, organizado em grupos, utilizou o hospedeiro definitivo *Rattus norvegicus* infectado com *A. cantonensis*. O número de larvas recuperadas das fezes dos animais dos dois grupos infectados e tratados com os medicamentos e do grupo de animais que foram apenas infectados foram comparados e, através da análise estatística, mostrou não existir nenhuma diferença significativa, que possibilite um possível tratamento contra a ovipostura do nematódeo em estudo.

O número de vermes retirados dos roedores na necropsia assim como o número apenas de vermes fêmeas e apenas de vermes machos também, quando analisados estatisticamente, não demonstraram nenhuma diferença significativa.

A medida dos vermes fêmeas mostrou uma diferença significativa entre o grupo Pizotifeno e o restante, onde foi detectado menor tamanho dos indivíduos sem, entretanto, interferir na atividade reprodutiva do parasito. Não conhecemos explicação para a redução do tamanho das fêmeas submetidas à essa substância, o que pode ser objeto de futuros estudos.

É necessário um conhecimento do metabolismo do nematódeo associado a produção de ovos para que se possa identificar alvos moleculares passíveis de manipulação para um efeito claro e consistente de inibição da oviposição e, para isso, os estudos de sequenciamento genômico e transcriptômico são fundamentais. Permanece com interesse a ideia alternativa de controlar um elemento importante da patogenese (oviposição)

evitando o risco do uso de substâncias com ação letal sob os vermes adultos e, assim, o agravamento das lesões.

5 Conclusão:

- Não há evidências do efeito inibitório ou estimulatório da oviposição das substâncias Pizotifeno e Buspirona em roedores infectados;
- A substância Pizotifeno prejudicou o desenvolvimento pleno dos vermes fêmeas;
- Experimentos com administração de substâncias e avaliação do resultado final, ou “experimentos tipo caixa-preta”, que desconhecem os passos intermediários de controle da atividade reprodutora, não são promissores para a identificação de substâncias inibidoras da oviposição.
- O aprofundamento dos estudos sobre a regulação da atividade reprodutora em nematódeos é indispensável para identificação de novos alvos terapêuticos visando a inibição da atividade reprodutora.

6 Referências

ABDULLA M-H., RUELAS D.S., Wolff B., SNEDECOR J., Lim K-C., et al. **Drug Discovery for Schistosomiasis: Hit and Lead Compounds Identified in a Library of Known Drugs by Medium-Throughput Phenotypic Screening.** PLoS Negl Trop Dis 3(7): e478, 2009

ALICATA, J.E. **Biology and distribution of the rat lungworm, *Angiostrongylus cantonensis*, and its relationship to eosinophilic meningoencephalitis and other neurological disorders of man and animals.** Adv Parasitol; 3: 223-248, 1965.

ARAÚJO N., KOHN A., de OLIVEIRA Á. A. e KATZ N. ***Schistosoma mansoni*: ação da lovastatina no modelo murino.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.35 no.1 Uberaba Jan./Feb. 2002.

BAERMANN G. **Eine eifache Methode Zur Auffindung von Anklyostomum (Nematoden) larven in Erdproben.** Geneesk.Tijdschr.Ned.-Indie 57:131-137, 1917.

BARKER G. C. **Effects of potential inhibitors on *Brugia pahangi* in vitro: macrofilaricidal action and inhibition of microfilarial production.** Table of Contents. Volume 99, Issue 03, 1989.

BARROS, H.M.T. et al. **Farmacodinâmica.** In: BARROS, E.; BARROS, H.M.T. **Medicamentos na prática clínica.** Porto Alegre: Artmed, 2010.

BRUNETTI E. **Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans.** Acta Tropica 114 1–16. 2010.

CALDEIRA R.L., et al. **First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 102(7): 887-889, November 2007.

CAMPBELL W.C., CUCKLER A.C. **Inhibition off egg production of *Schistosoma mansoni* in mice treated with nicarbazin.** Journal of Parasitology 53: 977-980, 1967.

CARRADA-BRAVO T. ***Strongyloides stercoralis*: Ciclo vital, cuadros clínicos, epidemiología, patología y terapéutica** Rev Mex Patol Clin, Vol. 55, Núm. 2, pp 88-110, Abril - Junio, 2008.

CHEN H.T. **A new pulmonary nematode of rats, *Pulmonema cantonensis* ng, nsp from Canton.** Ann Parasitol; 13: 312–17 (in French), 1935.

CHEN G.Z., FOSTER L., BENNETT J.L. **Antischistosomal action of mevinolin evidence that 3-hydroxi-methylglutaryl-coenzyme a reductase activity *Schistosoma mansoni* is vital for parasite survival.** Naunin-Schmiedebergs-Archives-Pharmacology 342: 477-482, 1990.

CORTI M. et al. **Infección por *Strongyloides stercoralis*: estudio epidemiológico, clínico, diagnóstico y terapéutico en 30 pacientes.** Rev Chil Infect; 28 (3): 217-222. 2011.

DAY T. A., CHEN G.-Z. **The metalloprotease inhibitor 1,10-phenanthroline affects *Schistosoma mansoni* motor activity, egg laying and viability.** Table of Contents, Volume 116, Issue 04. 1998.

DEMO, O.J. & PESSAT, O.A.N. - **Angiostrongilosis abdominal. Primer caso humano encontrado en Argentina.** Prensa méd. argent., 73: 732-738, 1986.

DESPOMMIER D. **Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects.** CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, p. 265–272 Vol. 16, No. 2; Apr. 2003.

EL-SHEHABI F., TAMAN A., MOALI L. S., EL-SAKKARY N., RIBEIRO P. **A Novel G Protein-Coupled Receptor of *Schistosoma mansoni* (SmGPR-3) Is Activated by Dopamine and Is Widely Expressed in the Nervous System.** Plos Neglect Trop Dis. Volume 6, Issue 2, e1523. February 2012.

FEIJÓ F. de M., BERTOLUCI M. C., REIS C. **Serotonina e controle**

hipotalâmico da fome: uma revisão. Rev Assoc Med Bras; 57(1):74-77, 2011.

FERRARI M.L.A., Coelho P.M.Z., Antunes C.M.F., Tavares C.A.P., & da Cunha A.S.. **Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of Schistosoma mansoni infection: a controlled trial.** Bulletin of the World Health Organization 81 (3), 2003.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V. L. L. and RIVERA, E. A.B.. **Ciência em animais de laboratório.** *Cienc. Cult.* [online]. vol.60, n.2, pp. 44-46, 2008.

GARG R.K. **Drug treatment of neurocysticercosis.** Natl Med J India. Jul-Aug;10(4):173-7, 1997.

GRAEFF-TEIXEIRA, C . **Angiostrongyliasis. An Underdiagnosed Disease.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 1987.

GRAEFF-TEIXEIRA C., et al. **Identificação de roedores silvestres como hospedeiros de *Angiostrongylus costaricensis* no sul do Brasil.** Rev, Inst. Med. Trop. São Paulo; 32 (3): 147-150, maio-junho, 1990.

GRAEFF-TEIXEIRA, C. **Histopathological Criteria For Diagnosis Of Abdominal Angiostrongyliasis.** Parasitology Research, ALEMANHA, v. 77, p. 606-611, 1991b.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SILVA, A.C. A. da ; YOSHIMURA, K. . **Update on eosinophilic meningitis and its clinical relevance.** Clinical Microbiology Reviews, v. 22, p. 322-348, 2009.

GUIMARÃES, J.F.; ALMEIDA, E.A. **Ansiolíticos e Hipnóticos.** In: BARROS, E.; BARROS, H.M.T. **Medicamentos na prática clínica.** Porto Alegre: Artmed, 2010.

HORVITZ H.R. et al. **Serotonin and octopamine in the nematode *Caenorhabditis elegans*.** Science, Vol. 216, 28; May, 1982.

HWANG K.P., CHEN E.R. **Larvicidal effect of albendazole against *Angiostrongylus cantonensis* in mice.** Am J Trop Med Hyg; 39: 191–5, 1988.

JUNGHANSS, T., da SILVA A M. HORTON, J., CHIODINI, P.L., BRUNETTI, E. **Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives.** Am. J. Trop. Med. Hyg. 79, 301–311. 2008.

LIMA A.R., et al. **Alicata disease: neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil.** Arq Neuropsiquiatr 67: 1093-1096. 2009.

LOER C. M. and KENYON C. J. **Serotonin-Deficient Mutants and Male Mating Behavior in the Nematode *Caenorhabditis elegans*.** The Journal of Neuroscience, 73(12): 5407-6417, December, 1993.

LONDERO, R.G. et al. Antimigranosos. In: BARROS, E.; BARROS, H.M.T. **Medicamentos na prática clínica.** Porto Alegre: Artmed, 2010.

MACHADO P. R. L. et al. **Mecanismos de resposta imune às infecções.** An bras Dermatol, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez. 2004.

MALAGÓN V. J. **Pediatric neurocysticercosis.** Medicina (B Aires); 69(1 Pt 1):114-20., 2009.

MALDONADO JÚNIOR A. et al. **First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.105 no.7 Rio de Janeiro Nov. 2010.

MAKI J., YANAGISAWA T. **Studies on anthelmintic effects of flubendazole and mebendazole on the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* in mice and rats.** J Parasitol; 72: 512–6, 1986.

MENTZ M.B. GRAEFF-TEIXEIRA C. . **Drug trials for treatment of human angiostrongyliasis.** Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 1-5, 2003.

MENTZ, M.B.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. & GARRIDO, C.T. - **Treatment with mebendazole is not associated with distal migration of adult *Angiostrongylus costaricensis* in the murine experimental infection.** Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 46(2):73-75, 2004.

MENTZ, M. B. ; DALLEGRAVE, E. ; AGOSTINI, A. A. GRAEFF-TEIXEIRA C. **Phenanthroline, lovastatin and mebendazole do not inhibit oviposition in the murine experimental infection with *Angiostrongylus costaricensis*.** Parasitology Research, v. 1-4, p. 1432-1955, 2006.

MORERA, P. & CÉSPEDES, R. **Angiostrongilosis abdominal.** Una nueva parasitosis humana. Acta Médica Cost., 14(3): 159-73, 1971.

MORERA, P. **Abdominal angiostrongyliasis: a problem of public health.** Parasit. today, 1:173-175, 1985.

MORERA, P. **Angiostrongilíase abdominal. Um problema de Saúde Pública?** Rev. Soc. bras. Med. trop., 21: 81-83, 1988.

MORERA, P. & BONTEMPO, I. - **Acción de algunos antihelmínticos sobre *Angiostrongylus costaricensis*.** Rev. méd. Hosp. nac. Niños (Costa Rica), 20: 165- 174, 1985.

MORRISON D.D., VANDE WAA E.A., BENNETT J.L. **Effects of steroids and steroid synthesis inhibitors on fecundity of *Schistosoma mansoni* in vitro.** Journal of Chemical Ecology, Volume 12, N° 8, 1901-1908, 1986.

MOSER P.C. et al. **Characterization of MDL 73005EF as a 5-HT_{1A} selective ligand and its effects in animal models of anxiety: comparison with buspirone, 8-OH-DPAT and diazepam.** Br J Pharmacol; 99:343-349, 1990.

MOTA E. M. & LENZI H.L. **Angiostrongylus costaricensis life cycle: a new proposal.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 90 (6): 707-709, nov/dec, 1995.

OLDS G.R. et al. **Double-blind, placebo-controlled study of concurrent administration of albendazole and praziquantel in school children with schistosomiasis and geohelminths.** Journal of Infectious diseases; 179: 996-1003, 1999.

PIEN F. D. & Pien B. C. **Angiostrongylus cantonensis Eosinophilic Meningitis.** International Journal of Infectious Diseases / Volume 3, Number 3: 161-163, 1999.

POZIO, E.; GOMEZ M. A. M.; DUPOUY-CAMET, J. **Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis.** Expert Review of Anti-Infective Therapy, Volume 1, Number 3, pp. 471-482(12) September 2003.

Pub Chen Chemical Structures. **Buspirone - Compound Summary.** National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA 8/10/11. Acesso em Janeiro de 2012.

Pub Chen Chemical Structures. **Pizotifen - Compound Summary.** National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA 8/10/11. Acesso em Janeiro de 2012.

Pub Chen Chemical Structures. **Serotonin - Compound Summary.** National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA 8/10/11. Acesso em Janeiro de 2012.

REY, L. Parasitologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 856 p. 2001.

ROBINSON M.W., DALTON J.P. **Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiases.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Sep 27;364(1530):2763-76, 2009.

RODRIGUES, R. **Anatomia Patológica da Angistrongilose Abdominal.** 1997. 113 pp. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Patologia – Anatomia Patológica) – Universidade Federal Fluminense, UFF, Brasil. 1997.

ROJO-VAZQUEZ F.A., et al. **Cystic echinococcosis in Spain: current situation and relevance for other endemic areas in Europe.** PLoS Negl Trop Dis. Jan 25;5(1):e893, 2011.

SANTOS, C.P. **Redescricao de *Angiostrongylus (Parastrongylus) costaricensis* isolado de um novo hospedeiro silvestre, *Proechimys* sp. na Venezuela (Metastrongyloidea: Angiostrongylidae).** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 80: 81-83. 1985.

SHARMA S. **Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs.** Pharmaco Chemistry Library v 25 Elsevier Science 1997

da SILVA A.M. **Human echinococcosis: a neglected disease.** Gastroenterol Res Pract. pii: 583297. Epub 2010 Aug 31, 2010.

SINAWAT S., et al. **Ocular angiostrongyliasis: clinical study of three cases.** Eye 22, 1446–1448, 2008.

SLOM T.J., et al. **An outbreak of eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* in travelers returning from the Caribbean.** N Engl J Med, Vol. 346, No. 9, February 28, 2002.

TAFT A.S., NORANTE F.A., YOSHINO T.P. **The identification of inhibitors of *Schistosoma mansoni* miracidial transformation by incorporating a medium- throughput small-molecule screen.** Exp Parasitol 125: 84–94. 2010.

VANDEWAA E. A., MILLS G., CHEN Guo-Zhong, FOSTER L. A., BENNETT J. L. **Physiological role of HMG-CoA reductase in regulating egg production by *Schistosoma mansoni*.** American Physiological Society; 618-624, 1989.

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

YADAV A. K., Temjenmongla. **Efficacy of *Lasia spinosa* leaf extract in treating mice infected with *Trichinella spiralis*.** Parasitol Res 110:493–498, 2012.

WANG Lian-Chen et al. **Pathological changes in the brains of rabbits experimentally infected with *Angiostrongylus cantonensis* after albendazole treatment: histopathological and magnetic resonance imaging studies.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57, 294–300, 2006.

WANG Qiao-Ping. et al. **Human angiostrongyliasis.** The Lancet: Infectious Diseases; vol 8 621-630, 2008.

WAGGONER L. E. et al. **Control of Alternative Behavioral States by Serotonin in *Caenorhabditis elegans*.** Neuron, Vol. 21, 203–214, July, 1998.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Valores de p para o número de L1 coletadas durante os dias de tratamento entre os grupos Controle, Buspirona e Pizotifeno. Dados logaritimizados e analisados pelo teste ANOVA.

Dias pós-infecção	49	50	51	52	53	54	55	56	57
Significância	0,826	0,846	0,035	0,892	0,235	0,827	0,072	0,691	0,741

APÊNDICE B – Teste ANOVA para comparação do número de vermes encontrados por roedor.

	N	Mean	Std. Deviation	Valor de p
Grupo				
Controle	5	19,8000	14,37707	0,914
Pizotifeno	7	21,0000	15,25341	
Buspirona	7	18,1429	7,24405	
Total	19	19,6316	11,94064	

APÊNDICE C – Teste Qui-quadrado para comparação entre os grupos em relação ao número de vermes machos e fêmeas.

gGRUPO * Sexo Crosstabulation					
			Sexo		Total
			F	M	
gGRUPO	Controle	Count	59	40	99
		% within gGRUPO	59,6%	40,4%	100,0%
	Pizotifeno	Count	83	64	147
		% within gGRUPO	56,5%	43,5%	100,0%
	Buspirona	Count	86	41	127
		% within gGRUPO	67,7%	32,3%	100,0%
Total	Count	228	145	373	
	% within gGRUPO	61,1%	38,9%	100,0%	

APÊNDICE D – Teste ANOVA para comparação do tamanho dos vermes fêmeas.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31,005	2	15,503	5,377	,005
Within Groups	686,177	238	2,883		
Total	717,182	240			

APÊNDICE E – Teste de Tukey indicando a diferença de tamanho entre os grupos Controle e Pizotifeno.

	N	Mean	Std. Deviation	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
				Lower Bound	Upper Bound		
P	96	18,687	1,3094	18,422	18,953	13,5	21,0
C	59	19,595	1,7456	19,140	20,050	12,2	22,5
B	86	19,162	2,0192	18,729	19,595	13,5	23,0
Total	241	19,079	1,7287	18,859	19,298	12,2	23,0

APÊNDICE F - Teste ANOVA para comparação dos pesos dos roedor de cada grupo.

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio</i>	<i>Valor de p</i>
Controle Ambiental	6	6,50	8,92	0,082
Controle	5	-11,00	26,87	
Pizotifeno	7	-1,71	22,18	
Buspirona	7	-30,29	35,17	
Total	25	-9,60	27,88	

APÊNDICE G – Teste de Tukey para a comparação dos pesos dos roedores de cada grupo.

Tukey HSD ^{a,b}		
Grupo	N	Subset for alpha = 0.05
		1
Buspirona	7	-30,2857
Controle	5	-11,0000
Pizotifeno	7	-1,7143
Controle Ambiental	6	6,5000
Sig.		,085

APÊNDICE H – Teste ANOVA com medidas repetidas para a comparação dos pesos dos roedores de cada grupo.

Effect		Valor de p
grupo		0,012
dias	Wilks' Lambda	,372
dias * Ggrupo	Wilks' Lambda	,082