

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**Instituto De Ciências Biomédicas**  
**Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**Avaliação *in vitro* da atividade antihelmíntica da toxina BnSP-6 contra  
*Strongyloides venezuelensis* e seu rastreamento utilizando CdSe/CdS Magic  
Sized Quantum Dots**

JESSICA PEIXOTO RODRIGUES

Uberlândia - MG  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

R696a  
2017      Rodrigues, Jessica Peixoto, 1988  
Avaliação in vitro da atividade antihelmíntica da toxina BnSP-6  
contra Strongyloides venezuelensis e seu rastreamento utilizando  
CdSe/CdS Magic Sized Quantum Dots / Jessica Peixoto Rodrigues. –  
2017.  
52 p. : il.

Orientadora: Julia Maria Costa Cruz.  
Coorientador: Luiz Ricardo Goulart.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Strongyloides venezuelensis - Teses. 3.  
Estrongiloidíase - Teses. 4. - Teses. I. Costa-Cruz, Júlia Maria. II. Goulart,  
Luiz Ricardo. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
IV. Título.

---

CDU: 612.017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**Instituto De Ciências Biomédicas**  
**Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**Avaliação *in vitro* da atividade antihelmíntica da toxina BnSP-6 contra  
*Strongyloides venezuelensis* e seu rastreamento utilizando CdSe/CdS Magic  
Sized Quantum Dots**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Jéssica Peixoto Rodrigues

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julia Maria Costa-Cruz  
Orientadora

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho  
Co-orientador

Uberlândia - MG  
2017

*“Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.”*

*Romanos 11:36*

## **Dedicatória**

A Deus, o Criador de toda ciência, que com Graça e Amor infinitos me guiou até este momento. A Ele toda honra e toda Glória.

## **Agradecimentos**

*Aos meus pais José Rodrigues e Celma Rodrigues, pelos incontáveis e valiosos ensinamentos de toda a vida, pelos exemplos de perseverança e dedicação pessoal, familiar e profissional que me foram dados, pela educação e conhecimentos que me proporcionaram. Tudo que conquistei até aqui, devo a vocês.*

*À minha irmã Julianne Rodrigues, pelo eterno companheirismo. A vida não teria a mesma graça sem uma parceira de infância, adolescência, juventude, risadas, choros, bagunças, castigos, escolas, família, amigos, viagens, sogros e sogras (rsrs). Ninguém compartilhou comigo tantas vivências como você. Te Amo.*

*Às amigas queridas que caminharam comigo por toda a vida Paula Cristina, Priscila Nascimento. Em especial à Lesllie Miriam e Marília Dias, que se fizeram presentes nesta jornada. Vocês tornam meus dias mais alegres, minhas cargas mais leves e as tristezas mais passageiras. Fui agraciada por Deus em ter amigas tão preciosas em minha vida. Amo cada uma de modo especial.*

*Aos meus orientadores, Profa. Dra Julia Maria Costa Cruz e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, pela incrível oportunidade de desenvolvimento desta pesquisa, por todo o conhecimento compartilhado e pelo exemplo ético e responsável que transmitiram.*

*Profa. Dra. Veridiana Melo Rodrigues e toda a equipe do Laboratório de Bioquímica e Toxina de Animais, pela parceria e contribuições fundamentais para esta pesquisa.*

*Às professoras Dra. Silmara Marques Allegretti e Dra. Veridiana de Melo Rodrigues pela prontidão em aceitarem os convites para participação da banca de defesa. Muito obrigada!*

*Aos colegas, funcionários e amigos do Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses, pelo acolhimento, companheirismo e disposição que sempre tiveram para me ensinar os caminhos a serem percorridos nesta jornada. Cada um, de alguma forma, contribuiu para o alcance desta conquista. A todos, minha gratidão.*

*Aos demais colaboradores deste trabalho, Prof. Dr. Noélio Dantas, Profa. Dra. Anielle Christine Almeida Silva, Msc. Mariana Zoia e Msc. Larissa Prado Maia. Obrigada pelas parcerias, pelo trabalho e dedicação que empenharam em suas respectivas contribuições. Sou grata a Deus pelo privilégio de trabalhar com uma equipe tão competente e amigável.*

*Em especial, gostaria de agradecer à querida amiga Msc. Fernanda Van Petten Azevedo, que esteve ao meu lado desde o início desta caminhada. Não foi fácil, mas vencemos e permanecemos juntas até o fim. Amiga, não tenho palavras para te agradecer por toda dedicação a este trabalho. Sem dúvidas, você foi o melhor presente e merece todo reconhecimento. Obrigada pelas incontáveis vezes que me ouviu, me aconselhou e me incentivou com palavras de ânimo. Saiba que nunca vou me esquecer do que você fez por mim. Te amo!*

*À Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade de realizar este sonho e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.*

*A todos que contribuíram de alguma forma para meu crescimento durante esta etapa, meu muito obrigada!*

## Lista de abreviaturas

°C - graus celsius

% - porcentagem

CdS - sulfeto de cádmio

CdSe - seleneto de cádmio

CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais

CEP/UFU - Comitê de Ética em Pesquisa/UFU

cm - centímetros

CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono

DIC - *differential interference contrast* (contraste de interferência diferencial)

EDC - hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil )-N'-etilcarbodiimida

ELISA - *enzyme linked immunosorbent assay* (ensaio imunoenzimático ligado a enzima)

Fab – *fragment antigen binding* (fragmento de ligação do antígeno)

FTIR - *infra red Fourier transform* (infravermelho com transformada de Fourier)

GABA – ácido gama-aminobutírico

h - horas

HCl - ácido clorídrico

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência

HTLV-1 - vírus linfotrópico de células T humano tipo -1

ICBIM - Instituto de Ciências Biomédicas

IC50 - *inhibitory concentration* (concentração inibitória)

IR - *infra red* (infravermelho)

IS - índice de seletividade

IFAT - *immunofluorescence antibody test* (teste de imunofluorescência)



kDa - kiloDalton

LD50 - *lethal dose* (dose letal)

LIPS - *luciferase immunoprecipitation system* (imunoprecipitação luciferase)

MDC - monodansilcadaverina

mg - miligramas

mL- mililitros

mmol - milimol

MSQDs - *Magic-Sized Quantum dots*

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

N - número de equivalentes de soluto por litro de solução

NHS - N-hidroxissuccinimida

nm - nanômetros

PBS - *phosphate buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)

PCR - *polymerase chain reaction* (reação em cadeia polimerase)

PI - *propidium iodide* (iodeto de propídio)

PLA<sub>2</sub> - *phospholipase A<sub>2</sub>* (Fosfolipase A<sub>2</sub>)

RNA – ácido ribonucleico

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SDS - *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SHS – síndrome da hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis*

U - unidades

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

WB- *western blot*

µg – micrograma

µL – microlitro

## Sumário

Resumo .....	11
Abstract .....	13
1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Modo de transmissão e ciclo biológico de <i>Strongyloides stercoralis</i> .....	14
1.2 Epidemiologia, sintomas e diagnóstico da estrongiloidíase humana .....	16
1.3 Imunossupressão na estrongiloidíase .....	17
1.4 Tratamento da estrongiloidíase humana .....	19
1.5 Fosfolipase A <sub>2</sub> derivada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i> .....	22
1.6 Modelo experimental na estrongiloidíase .....	24
2. OBJETIVO GERAL .....	25
2.1 Objetivos Específicos .....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1 Aspectos Éticos .....	26
3.2 Obtenção de larvas filarioides e fêmeas partenogénicas de <i>S.</i> <i>venezuelensis</i> .....	26
3.3 Obtenção da PLA2 BnSP-6 .....	27
3.4 Cultivo de células Caco-2 .....	27
3.5 Ensaio de citotoxicidade .....	28
3.6 Ensaio de autofagia e de apoptose celular .....	29
3.7 Síntese dos CdSe/CdSe Magic-sized Quantum Dots (MSQD) .....	30
3.7 Bioconjugação BnSP-6-CdSe/CdS MSQD .....	30
3.8 Análise FT-IR .....	30
3.9 Detecção da BnSP-6 .....	31
3.10 Análise estatística .....	31
4. RESULTADOS .....	32
4.1 Citotoxicidade da BnSP-6 contra <i>S. venezuelensis</i> .....	32
4.2 BnSP-6 induz autofagia e apoptose celular em <i>S. venezuelensis</i> .....	34
4.3 Bioconjugação BnSP-6-CdSe/CdS MSQDs .....	36
4.4 Localização da BnSP-6 em larvas infectantes de <i>S. venezuelensis</i> .....	38
5. DISCUSSÃO .....	39
6. CONCLUSÕES .....	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## Resumo

A estrongiloidíase é uma parasitose causada por helmintos do gênero *Strongyloides*. Atualmente, a ivermectina é o fármaco de escolha para o seu tratamento, no entanto, os casos de falha terapêutica em pacientes imunossuprimidos foram relatados. A busca de novos medicamentos é um tópico importante da pesquisa biomédica. As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são enzimas que têm demonstrado potencial farmacológico contra tumores e bactérias. Este estudo mostra a ação da BnSP-6, uma PLA<sub>2</sub> derivada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, contra *Strongyloides venezuelensis* empregando CdSe/CdS *Magic-Sized Quantum Dots* (MSQD) como marcador de rastreamento. As células intestinais humanas (Caco-2), larvas infectantes e fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* foram cultivadas e tratadas por 72 h com diferentes concentrações de BnSP-6. A citotoxicidade foi avaliada utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). A autofagia e a apoptose celular foram avaliadas por marcação de fluorescência com monodansilcadaverina (MDC) e iodeto de propídio (PI), respectivamente. Para verificar a localização tecidual de ação, a BnSP-6 foi bioconjugada com CdSe/CdS MSQDs. As larvas infectantes foram tratadas com o bioconjugado, e a marcação foi monitorada por microscopia de fluorescência. A BnSP-6 mostrou alta citotoxicidade (70%) contra o parasito em uma concentração 12 vezes menor à ivermectina, e citotoxicidade de 30% contra as células intestinais humanas (Caco-2) na maior concentração utilizada. A autofagia e a apoptose tardia foram verificadas em ambas as formas evolutivas do parasito. A microscopia de fluorescência indicou que o bioconjugado foi localizado no

intestino da larva infectante após 24 horas, sugerindo absorção intestinal antes da ação citotóxica. Em suma, foi demonstrado que a BnSP-6 apresenta baixa citotoxicidade contra Caco-2, e é eficaz contra *S. venezuelensis*, sendo absorvida pelo intestino, induzindo autofagia e apoptose, indicando seu potencial como uma nova ferramenta para o tratamento da estrongiloidíase.

Palavras-chave: *Strongyloides venezuelensis*, PLA<sub>2</sub>, BnSP-6, CdSe/CdS MSQD

## Abstract

### **BnSP-6: investigation of anthelmintic activity against *Strongyloides venezuelensis* and tracking using CdSe/CdS Magic Sized Quantum Dots**

Strongyloidiasis is a neglected parasitic disease caused by helminths of the genus *Strongyloides*. Currently, ivermectin is the drug of choice for its treatment, however, cases of therapeutic failure in immunosuppressed patients were reported. The search for new drugs is an important topic in biomedical research. Phospholipases  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) are enzymes that have shown pharmacological potential against tumors and bacteria. This study shows the BnSP-6 action, a PLA<sub>2</sub> derived from *Bothrops pauloensis* snake venom, against *Strongyloides venezuelensis*, employing CdSe/CdS magic-sized quantum dots (MSQD) as a tracking label. Human intestinal cells (Caco-2), *S. venezuelensis* infective larvae and parthenogenetic females were cultured and treated with different concentrations of BnSP-6. Cytotoxicity analysis was evaluated using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoline bromide (MTT). Autophagy and apoptosis were evaluated through fluorescence labelling with Monodansylcadaverine (MDC) and Propidium Iodide (PI) respectively. To verify the absorption site, BnSP-6 was bioconjugated with MSQDs. Larvae were treated with bioconjugate, whereas luminescence was monitored by fluorescence microscopy. BnSP-6 showed similar cytotoxicity at a concentration 12-fold lower than ivermectin. Autophagy and late apoptosis were verified in both evolutionary forms of the parasite. Fluorescence microscopy indicated that the bioconjugate was located in the infective larvae intestine after 24 hours, suggesting intestinal

absorption before cytotoxic action. In summary, we showed that BnSP-6 does not demonstrate cytotoxicity against Caco-2, and is effective against *S. venezuelensis*, being absorbed through the larvae intestine, inducing autophagy and apoptosis, indicating its potential as a new tool for strongyloidiasis treatment.

Keywords: *Strongyloides venezuelensis*, PLA<sub>2</sub>, BnSP-6, CdSe/CdS MSQD

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Strongyloides* pertence à classe Secernentea, ordem Rhabdiasoidea, família Strongyloididae, contém cerca de 50 espécies (DE LEY, BLAXTER, 2004) e são parasitos intestinais obrigatórios de vertebrados que infectam mamíferos, répteis, aves e anfíbios. Apenas duas espécies de *Strongyloides* infectam humanos, *Strongyloides stercoralis* e *Strongyloides fuelleborni*. A espécie *S. fuelleborni*, encontrada principalmente em primatas africanos, pode também infectar humanos (SADJADI, DAMODARAN, SHARIF, 2013).

*Strongyloides stercoralis*, foi identificado em 1876 em tropas francesas que retornavam da guerra no atual Vietnã. A nomenclatura (“Strongylus – arredondado; oides – semelhante; stercus – esterco) está relacionada ao ciclo de vida do parasito que possui uma fase estercoral e outra fase intestinal. Esse parasito gastrointestinal é responsável pela geohelmintíase estrongiloidíase, que atualmente infecta cerca de 30-100 milhões de indivíduos em 70 países (VINEY, 2017).

### 1.1 Modo de transmissão e ciclo biológico de *Strongyloides stercoralis*

*Strongyloides* spp., possui seis formas evolutivas com características morfológicas distintas: fêmeas partenogenéticas parasitas, fêmeas e machos de vida livre, ovos, larvas rabditoides e filarioides (COSTA-CRUZ, 2016), e apresenta ciclo de vida heterogênico incomum, devido à alternância entre formas parasitárias e adultos de vida-livre (VINEY, LOK, 2015).

A forma parasitária ocorre na mucosa do intestino delgado e apresenta somente fêmeas que se reproduzem por partenogênese. Larvas rabditóides

produzidas por essas fêmeas são eliminados nas fezes e podem desenvolver-se diretamente em larvas infectantes ou em adultos de vida-livre, que se reproduzem sexualmente e sua progênie desenvolve-se em larva infectante. A larva infectante que resulta das formas de vida-livre persiste no meio ambiente até encontrar um hospedeiro (VINEY, LOK, 2015).

A infecção humana é adquirida via transcutânea pelo contato com a larva filarioide infectante que está presente em solo contaminado. Na via pulmonar clássica, a larva filarioide entra na circulação sanguínea, migra para os pulmões onde se transforma em L4, ascende a árvore traqueobronquial, e alcança o intestino delgado após a deglutição. No intestino delgado, a larva se transforma em L5, para tornar-se fêmea adulta, que põe ovos na mucosa intestinal. As larvas rabditoides eclodem e são eliminadas nas fezes, no meio ambiente podem se tornar tanto larvas filarioides (ciclo direto) ou adultos de vida-livre (ciclo indireto) (COSTA-CRUZ, 2016).

A autoinfecção ocorre quando a larva filariforme penetra a mucosa intestinal ou a pele perianal para entrar novamente na circulação e migrar para os pulmões, completando o ciclo de vida sem estágios externos, denominado de autoinfecção que pode levar à hiperinfecção. A hiperinfecção pode resultar na disseminação da larva infectante através de vários órgãos e tecidos do hospedeiro. Na ausência de tratamento, autoinfecções subsequentes são possíveis, e podem ter consequências fatais para o hospedeiro (RAMANATHAN, NUTMAN, 2012; VINEY, LOK, 2015).



## 1.2 Epidemiologia, sintomas e diagnóstico da strongiloidíase humana

*Strongyloides stercoralis* é uma geo-helminíase classificada pela *World Health Organization* (2017) entre as doenças tropicais negligenciadas, sua prevalência global é diversa e heterogênea. Em países com configurações ecológicas e sócio-econômicas propícias à propagação de *S. stercoralis*, altas taxas de infecção, de até 60%, podem ser esperadas. A ocorrência de infecção por *S. stercoralis* no Brasil é de 5,5%, caracterizando o país como hiperendêmico para strongiloidíase (PAULA, COSTA-CRUZ, 2011).

A maior parte dos indivíduos são assintomáticos ou apresentam sintomas intermitentes, atingindo o intestino, pulmões e pele (BUONFRATE et al., 2013). A infecção aguda é causada pela invasão larval e migração e é caracterizada por irritação da pele no local de penetração da larva, seguido por irritação traqueal ou tosse seca e sintomas gastrointestinais, podendo haver comprometimento nutricional. Até 75% dos indivíduos apresentam eosinofilia periférica ou aumento de IgE total (VINEY, LOK, 2015).

Em indivíduos imunocomprometidos, a reprodução do parasito pode exceder à destruição do mesmo pelo sistema imune, levando à uma alta carga parasitária no intestino e consequente autoinfecção do hospedeiro. A autoinfecção pode desencadear a síndrome da hiperinfecção por *Strongyloides* (SHS), cujos principais sintomas incluem, febre, fadiga, apatia e mialgia, podendo levar à morte do hospedeiro (GERI et al., 2015; TOLEDO, MUNOZ-ANTOLI, ESTEBAN, 2015). A infecção por *S. stercoralis* em indivíduos imunocomprometidos pode evoluir para strongiloidíase disseminada, que ocorre quando a larva migra para outros órgãos além do pulmão e

intestino. Bacteremia pela migração da larva através da mucosa intestinal é comum na infecção disseminada (LIM et al., 2004; COSTA-CRUZ, 2016).

O diagnóstico definitivo da *estrongiloidíase* humana é usualmente realizado com base na detecção da larva nas fezes (LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014). A sensibilidade do exame de fezes para parasitos depende do método utilizado, no entanto, testes sorológicos possuem sensibilidade de 82-95% e especificidade de 84-92% e podem ser uma ferramenta importante no diagnóstico da *estrongiloidíase* (LIM et al., 2004). Para a detecção sorológica de anticorpos, tem sido utilizadas *immunofluorescence antibody test* (IFAT), *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA), *western blot* (WB), *luciferase immunoprecipitation system* (LIPS) (LEVENHAGEN, COSTA-CRUZ, 2014). Diagnóstico molecular como *polymerase chain reaction* (PCR) pode ser aplicado em associação com exames de fezes em estudos epidemiológicos para aumentar o diagnóstico de *estrongiloidíase* (PAULA et al., 2013).

### 1.3 Imunossupressão na *estrongiloidíase*

Com o uso generalizado de agentes imunossupressores e o aumento da migração de indivíduos provenientes de áreas endêmicas para *estrongiloidíase*, casos da síndrome de hiperinfecção tem sido relatados nos países industrializados, tornando necessária maior conscientização da classe médica para identificar e tratar esse parasito (RAMANATHAN; NUTMAN, 2012).

Por razões ainda desconhecidas, os corticosteróides têm uma associação relevante com o desenvolvimento da síndrome da hiperinfecção. A síndrome de hiperinfecção tem sido reportada independentemente da dose ou via de administração

de corticoesteróides, que mesmo em doses menores em pacientes imunocompetentes levaram à síndrome da hiperinfecção e até mesmo à morte (GOSH; GOSH, 2007). As malignidades hematológicas como o linfoma foram associadas à síndrome de hiperinfecção na ausência de uso de corticosteroides. (KEISER; NUTMAN, 2004).

Recentemente, foi relatado por Gupta et al. (2017), um caso de síndrome de hiperinfecção por *S. stercoralis*, após tratamento de longa duração com corticoesteróides em portador da hanseníase multibacilar. O paciente evoluiu com anemia, edema generalizado e eosinofilia periférica durante o tratamento imunossupressor para hanseníase. O diagnóstico foi confirmado por meio do exame histológico de biópsia duodenal que revelaram presença de alta carga parasitária de larvas infectantes de *S. stercoralis* dentro das criptas mucosas. A hiperinfecção por *S. stercoralis* é raramente relatada em pacientes com hanseníase devido a negligência de características clínicas inespecíficas. O estudo demonstra a necessidade de alto nível de suspeita clínica entre clínicos e dermatologistas que com frequência prescrevem altas doses de corticoesteróides no tratamento da hanseníase. A eosinofilia periférica inexplicada em indivíduos imunossuprimidos, associada a sintomas abdominais ou pulmonares deve ser considerada no diagnóstico diferencial da estrogiloidíase.

Por sua vez, a estrogiloidíase pode facilitar a replicação do vírus HTLV-1, como demonstrado por Ratner et al. (2007), houve um declínio considerável de RNA do HTLV-1 em um paciente tratado com ivermectina. A reinfecção por *S. stercoralis* após o tratamento indica provável infecção por HTLV-1 (HIRATA et al., 2006). O HTLV-1 aumenta a suscetibilidade à infecção por *S. stercoralis* como resultado de

níveis de IgE diminuídos e imunomodulação para resposta Th1, como observado em indivíduos imunocompetentes (SATO et al., 2002).

Guillamet et al. (2017), relata o caso de um paciente portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV), que apresentou diarreia crônica e eosinofilia persistentes ao tratamento com antibióticos. Biópsias intestinais revelaram fragmentos de larvas infectantes de *S. stercoralis* dentro das criptas mucosas. Os autores apontam para o subdiagnóstico da estrongiloidíase em pacientes infectados pelo HIV com diarreia persistente e eosinofilia.

Embora a estrongiloidíase seja comumente uma infecção crônica e clinicamente assintomática, a imunossupressão farmacológica ou patológica pode aumentar consideravelmente a carga parasitária, levando à síndrome da hiperinfecção e disseminação, podendo ser letal quando não identificada. Para evitar esses agravos, todas as pessoas infectadas cronicamente devem ser tratadas. (RAMANATHAN; NUTMAN, 2012).

#### **1.4 Tratamento da estrongiloidíase humana**

O tiabendazol foi, por muito tempo, o medicamento de escolha para tratar a estrongiloidíase. No entanto, não se encontra disponível devido aos fortes efeitos colaterais causados. O albendazol, um agente antihelmíntico de amplo espectro possui baixa eficácia contra *S. stercoralis*. Atualmente, a ivermectina é a melhor opção terapêutica para o tratamento da estrongiloidíase, com taxas de cura de 70% a 85% de pacientes cronicamente infectados (IGUAL-ADELL et al., 2004; LUVIRA, WATTHANAKULPANICH, PITTISUTTITHUM, 2014; PANIC et al., 2014).

A ivermectina pertence à família das lactonas macrocíclicas descoberta na

década de 1970 e utilizada no tratamento de nematódeos e artrópodes em animais. Possui ação contra endoparasitos e ectoparasitos. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição de neurotransmissores através da potencialização da ação do ácido gama-aminobutírico (GABA) e permeabilidade da membrana ao cloro, provocando ataxia e morte do parasito (MEREDITH e DULL, 1998)

O tratamento de pacientes é obrigatório na fase crônica, antes das formas SHS e disseminada se desenvolverem. Pacientes com possibilidade de exposição prévia ao parasito, oriundos de áreas endêmicas ou em situações de higiene e saneamento precárias, devem ser triados antes do tratamento com corticóides, quimioterapia ou transplante (BUONFRATE et al., 2013).

No entanto, a ivermectina não se encontra disponível em todos os países em que a doença tem altas taxas de prevalência (STUART et al., 2009), e tem apresentado graves efeitos adversos, como por exemplo, encefalopatia em indivíduos susceptíveis (BOURGUINAT et al., 2010; MENDES et al, 2017).

Uma pesquisa realizada na República Democrática do Congo, abrangendo os anos de 2009 a 2013, avaliou a ocorrência de efeitos adversos no sistema nervoso central e periférico após a administração em massa de ivermectina no tratamento da oncocercose e loíase. Os dados do sistema de farmacovigilância foram analisados e sugerem que a ivermectina tenha sido responsável por estes efeitos adversos em 52 pacientes tratados (NZOLO et al., 2017)

Além disso, tem sido reportado falhas terapêuticas em pacientes co-infectados com vírus linfotrópico de células T humano tipo -1 (HTLV-1) devido a alterações na resposta imune, diminuindo o nível de citocinas e imunoglobulinas responsáveis pelo perfil de resposta imunológica Th2 contra *S. stercoralis*. Nestes casos, o uso da ivermectina não é o suficiente para manter as taxas de cura em pacientes crônicos,

tornando-os ainda mais susceptíveis às formas mais graves da doença (CARVALHO, DA FONSECA PORTO, 2004; BOURGUINAT et al., 2010; MENDES et al, 2017).

Cepas de geohelmintos resistentes à medicamentos antihelmínticos foram identificadas após anos de tratamento em massa para o controle de parasitoses (VERCRUYSSSE et al., 2011). Um estudo realizado entre Novembro de 2015 e Abril de 2016 na Etiópia, utilizando equinos infectados com *Strongyloides* sp. demonstrou alta susceptibilidade à resistência à ivermectina. Os autores relataram que a resistência se deve à sobrevivência de larvas rhabditoides no intestino grosso após o tratamento (SEYOUM et al., 2017). Outro fator importante para o aumento da resistência à ivermectina, é sua liberação nas fezes de animais tratados, mantendo contato contínuo com geo-helmintos liberados no solo, os quais, tornam-se mais resistentes à sua ação farmacológica.

Pesquisas tem sido conduzidas para avaliar a eficácia e segurança da ivermectina em comparação a outros anti-helmínticos. Barda et al. (2017), realizou testes *in vitro* comparando a ivermectina e miodexina no tratamento contra *S. stercoralis*. Não foi observada diferença significativa no potencial de ação anti-helmíntico de ambos os fármacos, no entanto, a miodexina apresentou-se como alternativa mais segura em relação à ivermectina, sendo potencial terapêutico para estrongiloidíase.

Nesse contexto, Mendes et al. (2017), destacaram os desafios encontrados na busca de novos fármacos contra *S. stercoralis*, apresentando os compostos e metodologias recentemente utilizados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Os autores referiram taxas irregulares de cura em pacientes tratados com ivermectina e ausência de consenso quanto à dosagem e duração do tratamento, apontando para a

necessidade urgente do desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para esrongiloidíase.

### **1.5 Fosfolipase A<sub>2</sub> derivada da peçonha de *Bothrops pauloensis***

Peçonhas de serpentes são um recurso natural biológico que têm sido utilizados para a pesquisa de novos fármacos, uma vez que contêm diferentes compostos ativos representados por metaloproteinases, fosfolipases A<sub>2</sub>, hialuronidases, serina proteinases e outros (RODRIGUES et al., 2004; ZOUARI-KESSENTINI et al. 2013; AZEVEDO et al., 2016).

Um exemplo clássico de fármaco derivado de peçonhas, é o captopril, um dos medicamentos mais utilizados no manejo clínico da hipertensão que atua como inibidor da enzima conversora de angiotensina. Foi isolado da peçonha de *Bothrops jararaca*, em 1960 (HAYASHI, CAMARGO, 2005).

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (EC 3.1.1.4) pertencem à superfamília PLA<sub>2</sub> estão distribuídas em 15 grupos e diversos subgrupos, incluindo enzimas Ca<sup>+2</sup> dependentes, estimuladoras do fator de ativação plaquetária, lisossomais, citosólicas e secretadas (SCHALOSKE, DENNIS, 2006).

As PLA<sub>2</sub> secretadas compreendem uma classe de enzimas capazes de hidrolisar substratos específicos, como fosfolípidos. Estas enzimas são proteínas pequenas com peso molecular que varia de aproximadamente 13-18 kDa, têm 119 a 143 resíduos de aminoácidos, contendo de 5 a 8 pontes dissulfureto e apresentam estruturas que são parcialmente conservadas (DENNIS et al., 2011; ZOUARI-KESSENTINI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015).

As PLA<sub>2</sub> secretadas são moléculas muito interessantes tanto do ponto de vista

biológico como estrutural, e são responsáveis por alguns efeitos tóxicos e /ou farmacológicos incluindo efeitos miotóxicos, neurotóxicos, anticoagulantes, antiplaquetários, hipotensivos, hemolíticos e outros, contudo, baixas concentrações de suas isoformas têm sido eficazes contra bactérias, parasitas e tumores (TEIXEIRA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2004; NUNES et al., 2013; AZEVEDO et al., 2016).

Nunes et al. (2013), relataram os efeitos antiparasitários da BnSP-7, uma PLA<sub>2</sub> homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*, contra *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, apresentando ação citotóxica contra as formas promastigotas, com IC<sub>50</sub> de 59,7 µg/mL. Houve inibição da proliferação de 60-70% do parasito nas concentrações de 50-100 µg/mL da toxina após 96 horas de tratamento.

Outro estudo realizado por Borges et al. (2016) reportaram os efeitos antiparasitários da BnSP-7 contra *Toxoplasma gondii*. Os resultados demonstraram efeitos anti-toxoplasma com baixas doses da PLA<sub>2</sub> (1,56 a 25 µg/mL) sugerindo o potencial desse recurso biológico como nova ferramenta terapêutica para a toxoplasmose. Considera-se, portanto, essa PLA<sub>2</sub> como ferramenta importante no desenvolvimento de novos fármacos anti-parasitários.

Aproximadamente 27% da peçonha de serpente de *B. pauloensis* consiste em PLA<sub>2</sub> de acordo com estudos proteômicos, representados por diferentes isoformas (RODRIGUES et al., 2012). As isoformas Lys49 e Asp49-PLA<sub>2</sub> foram isoladas e analisadas bioquimicamente e estruturalmente como descrito por Rodrigues et al. (1998).

As evidências bibliográficas indicam que BnSP-6, uma PLA<sub>2</sub>-Lys-49, exerce uma atividade antitumoral com ação citotóxica e inibição da adesão celular em células de tumor de mama (MDA-MB-231) e baixa citotoxicidade em células de mama não



cancerígenas (MCF10-A), sugerindo preferência por alvos em células cancerosas (AZEVEDO et al., 2016).

A BnSP-6 atua estimulando o processo de autofagia e apoptose celular, além de causar aumento na expressão gênica de supressores de tumor (BRCA2 e TP53), sugerindo um potencial anti-metastático. Esses resultados mostram que a BnSP-6 apresenta potencial para desenvolvimento de novas terapias contra o câncer (AZEVEDO et al., 2016).

Portanto, considera-se que as isoformas de PLA<sub>2</sub> secretadas derivadas de peçonhas, tem potencial farmacológico em concentrações subtóxicas, e novos estudos devem ser realizados utilizando diferentes microorganismos patogênicos como alvos.

## **1.6 Modelo experimental na estrogiloidíase**

*Strongyloides venezuelensis* é um nematódeo parasito de ratos que tem sido utilizado como modelo experimental para estudo da relação parasito-hospedeiro em estrogiloidíase humana e /ou animal (MARRA et al., 2011).

O estudo das formas evolutivas do parasito no microambiente *in vivo* de roedores permanece um desafio devido à migração das larvas no organismo do hospedeiro (AHMED, 2014).

Estudos *in vitro* tem sido utilizados para *drug testing* e *drug screening* contra *S. venezuelensis*, na busca por alternativas terapêuticas para a estrogiloidíase. (CORDEIRO et al., 2010; LEGARDA-CEBALLOS et al., 2016a; LEGARDA-CEBALLOS et al., 2016b)

## 2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo verificar a atividade *in vitro* da fosfolipase A<sub>2</sub> homóloga BnSP-6 contra *Strongyloides venezuelensis*.

### 2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar testes *in vitro* com a BnSP-6 contra larvas infectantes e fêmeas partenogenéticas.
- ✓ Avaliar a citotoxicidade pelo método quantitativo colorimétrico 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) em células intestinais (Caco 2), em larvas infectantes e fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* tratadas com diferentes concentrações BnSP-6.
- ✓ Avaliar mecanismos de morte celular utilizando marcadores de autofagia (MDC) e de necrose celular (PI).
- ✓ Realizar a bioconjugação da BnSP-6 com CdSe/CdS MSQD.
- ✓ Verificar o local de ação da BnsP-6 por fotoluminescência através da marcação da fosfolipase com CdSe/CdS MSQD.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Aspectos Éticos

A manutenção da cepa de *S. venezuelensis* em *Rattus norvegicus* Wistar foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU-Brasil) sob o protocolo de registro 075/08 (CEUA/UFU). Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões recomendados pela CEUA/UFU.

#### 3.2 Obtenção de larvas filarioides e fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis*

A cepa de *S. venezuelensis* (Brumpt) foi isolada do roedor selvagem *Bolomys lasiurus* (Abril 1986). Esta linhagem foi mantida em *Rattus norvegicus* Wistar, experimentalmente infectado, no Laboratório de Diagnóstico de Parasitoses - UFU, Minas Gerais, Brasil.

As fezes obtidas de ratos Wistar infectados com *S. venezuelensis* foram homogeneizadas em carvão animal e mantidas em cultura por 3 dias a 28°C. Em seguida, as larvas filaróides foram recuperadas pelo método de Rugai et al. (1954) e lavadas 3 vezes com solução salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffer Saline - PBS) contendo 100 U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich Co., São Paulo, Brasil) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich Co., São Paulo, Brasil).

Após a eutanásia dos animais infectados, o intestino delgado foi coletado para a recuperação de fêmeas partenogenéticas. O tecido foi lavado com PBS, cortado transversalmente e colocado, com auxílio de uma peneira, sobre o cálice de

sedimentação contendo PBS aquecido a 45°C e incubado durante 3 h a 37°C. As fêmeas e as larvas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

As larvas infectantes e as fêmeas partenogenéticas foram mantidas separadamente em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em condições de cultura padrão (37°C, 95% de ar umidificado e 5% de CO<sub>2</sub>) em placa de 96 poços (100 larvas/poço e 50 fêmeas/poço).

### **3.3 Obtenção da PLA<sub>2</sub> BnSP-6**

As amostras de peçonha de serpente de *B. pauloensis* foram coletadas no estado de São Paulo e purificadas no Laboratório de Bioquímica e Toxinas da UFU e cedidas para esta pesquisa.

Resumidamente, foi realizada cromatografia de troca iônica, identificando diferentes pontos isoelétricos, um dos quais denominado Lys-49-BnSP-6, foi recromatografado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa e analisados por SDS-PAGE. O grau de pureza da amostra foi confirmada por espectrometria de massas conforme (AZEVEDO et al., 2016).

### **3.4 Cultivo de células Caco-2**

A linhagem celular epitelial de cólon humano (Caco-2) foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ, Brasil). As células foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco, Thermo Fisher, São Paulo, Brasil),

suplementado com soro fetal bovino a 10% (Cultilab, Campinas, Brasil) e gentamicina a 1% (Sigma-Aldrich), 95% de ar humidificado e 5% de CO<sub>2</sub> até à confluência.

Após 80% de confluência as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (1x10<sup>4</sup> células/poço) em triplicata e mantidas *overnight* para adesão nas mesmas condições de cultura.

### 3.5 Ensaio de citotoxicidade

As células foram tratadas com BnSP-6 a 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,56 µg/mL, em triplicata, durante 72 h. Larvas infectantes foram tratadas com BnSP-6 nas concentrações de 50, 25 e 12,5 µg/mL e as fêmeas partenogenéticas nas concentrações de 100, 50, 25 µg/mL por 72 h como teste de *screening*. Para controle positivo, foi utilizada ivermectina diluída em água destilada (316 µg/mL) de acordo com a descrição de Rebollo, Taira e Ura (2003).

Após o tratamento das células e das formas evolutivas do parasito foi adicionado 20 µL de solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) a 5 mg/ml (Sigma-Aldrich Co., São Paulo, Brasil) e incubado durante 4 h a 37°C. Posteriormente, foi adicionado em cada poço 100 µL de PBS contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e 0,01N de ácido clorídrico (HCl), e incubado por 18 h a 37°C. Os valores de absorbância foram obtidos na leitora de microplacas a 570 nm (Multiskan GO Thermo Scientific, São Paulo, Brasil).

A citotoxicidade foi expressa em % de células ou parasitos mortos em relação ao controle não tratado. Após os testes de citotoxicidade foram escolhidas as concentrações de BnSP-6 a serem utilizadas nos demais testes, sendo, 25 µg/mL para as larvas infectantes e 50 µg/mL para fêmeas partenogenéticas.

Calculou-se o valor de concentração inibitória (IC50) para as células Caco-2 e a dose letal para as larvas infectantes (LD50) por análise de regressão sigmoidal. Calculou-se o Índice de Seletividade (IS) para comparar a atividade anti-helmíntica e a citotoxicidade celular:

$$IS = \frac{IC50 \text{ da célula de mamífero}}{LD50 \text{ do parasite}}$$

### **3.6 Ensaio de autofagia e de apoptose celular**

Os vacúolos autofágicos foram marcados com monodansilcadaverina (MDC, Sigma-Aldrich Co., São Paulo, Brasil) e os núcleos das células apoptóticas foram marcados com iodeto de propídio (PI, Sigma-Aldrich Co., São Paulo, Brasil).

Larvas infectantes e fêmeas partenogenéticas foram tratadas com 25 µg/mL e 50 µg/mL de BnSP-6, respectivamente, conforme padronização descrita. Após o tratamento as larvas infectantes foram lavadas com PBS e centrifugadas a 3600 rpm durante 5 min à temperatura ambiente, e, as fêmeas partenogenéticas foram lavadas com PBS e centrifugadas à temperatura ambiente a 1000 rpm durante 1 min.

Posteriormente, foram incubados em 100 µL de PBS contendo 0,05 mmol/L de MDC e 2 µL/mL de PI à temperatura ambiente durante 1 hora. Após a incubação, os parasitos foram novamente lavados com PBS e as microplacas foram analisadas por microscopia de fluorescência (EVOS FI Imaging System, Thermo Fisher, São Paulo, Brasil).

### 3.7 Síntese dos CdSe/CdS *Magic-sized Quantum Dots* (MSQD)

Os CdSe/CdS MSQD foram sintetizados no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores do Instituto de Física da UFU, de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2014) e cedidos para esta pesquisa.

### 3.7 Bioconjugação BnSP-6-CdSe/CdS MSQD

A bioconjugação foi realizada como descrito por Malgorzata et al. (2013) com modificações. Foram adicionados 0,5 mg de CdSe/CdS MSQDs e 450  $\mu\text{L}$  de BnSP-6 (1500  $\mu\text{g/mL}$ ) em 1 mL de tampão borato contendo 50  $\mu\text{L}$  de solução de Hidroclorato de N-(3-dimetilaminopropil )-N'-etilcarbodiimida (EDC) (2,05 mmol) e 50  $\mu\text{L}$  de N-hidroxissuccinimida (NHS) (0,24 mg). A solução resultante foi então incubada *overnight* no escuro, depois, foi centrifugada duas vezes a 3600 rpm por 5 minutos.

### 3.8 Análise FT-IR

A bioconjugação foi confirmada com base nos espectros infravermelhos (IR) registrados à temperatura ambiente utilizando um espectrofotometro IR *Fourier Transform* (FT-IR) (Vertex 70, Bruker Optik, Atibaia, Brasil). A amostra foi depositada no interferofotômetro e após a leitura, os espectros foram obtidos pelo cálculo da transformada de Fourier entre 800 e 2000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.9 Detecção da BnSP-6

Para investigar a localização tecidual da toxina, as larvas infectantes foram incubadas com o bioconjugado CdSe/CdS *MSQD*-BnSP-6 na concentração de 25 µg/mL, em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C e analisadas após 24 h, enquanto ainda estavam viáveis, utilizando microscópio de fluorescência (EVOS FI Imaging Sistem, Thermo Fisher, São Paulo, Brasil).

### 3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., EUA). O teste paramétrico utilizado foi One-way ANOVA com comparações múltiplas. Para correção, o pós-teste de Geisser-Greenhouse foi utilizado. Os dados foram considerados significativos quando o valor de *p* era inferior a 0,05.

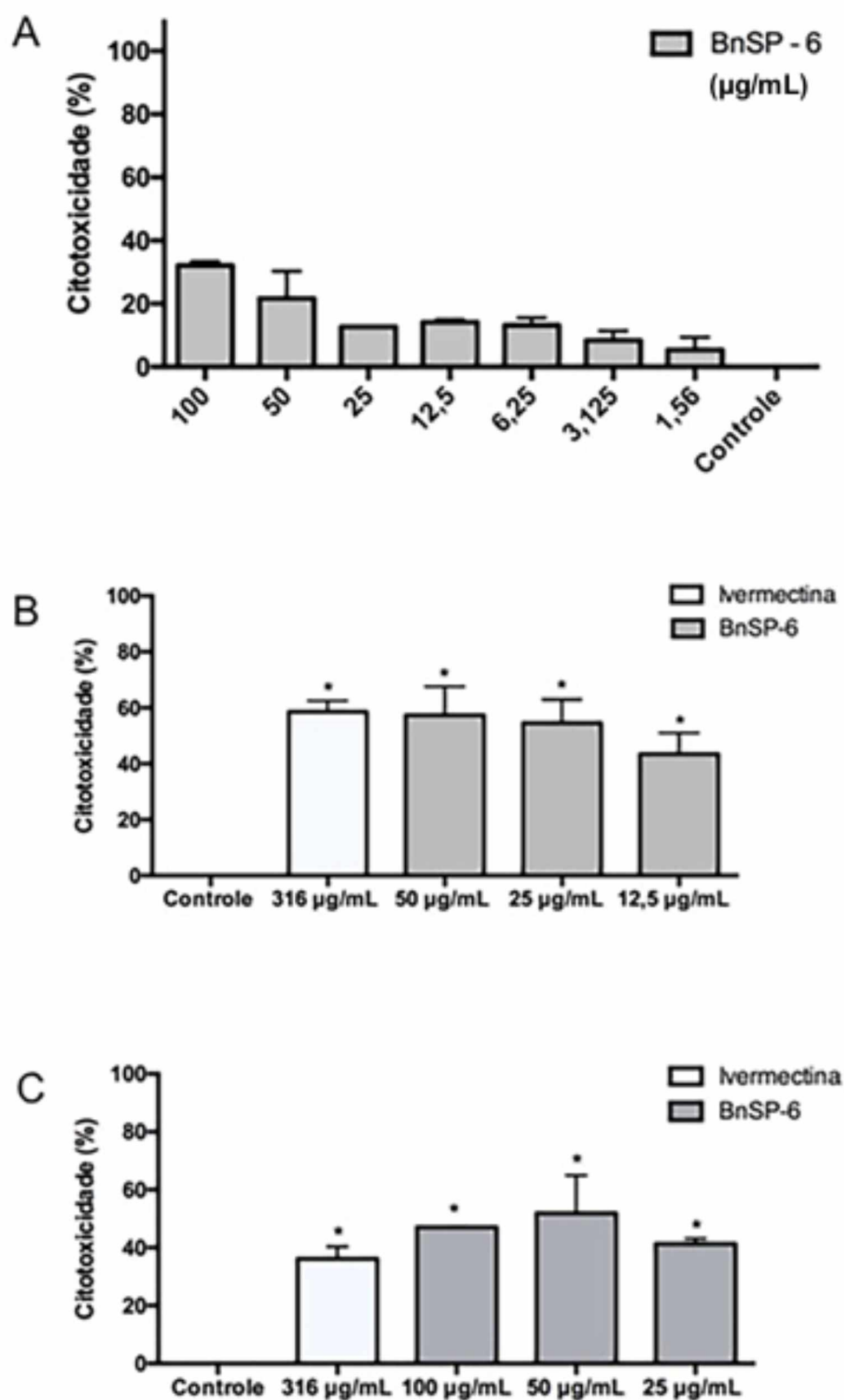


## 4. RESULTADOS

### 4.1 Citotoxicidade da BnSP-6 contra *S. venezuelensis*

O ensaio de citotoxicidade foi realizado como um teste de *screening* com diferentes concentrações de BnSP-6. O resultado encontrado foi de aproximadamente 30% de citotoxicidade em células colorretais epiteliais humanas (Caco-2) na maior concentração utilizada (100 µg/mL) e, o IC50 para Caco-2 foi de 270,8 µg/mL (Figura 1A). Para larvas infectantes, obteve-se 60% de citotoxicidade na concentração de 25 µg/mL, sendo a DL50 de 13,91 µg/mL para larvas (Figura 1B). Entre as fêmeas partenogênicas a citotoxicidade foi de cerca de 40% a 50 µg/mL (Figura 1C). Não houve diferença estatística significativa quando se compararam diferentes concentrações de BnSP-6 com a dose padrão de ivermectina. O Índice de Seletividade para BnSP-6 foi de 19,46.

Para os demais testes foram escolhidas as concentrações que apresentaram menor citotoxicidade para a célula Caco-2. Observou-se que para as larvas infectantes, não houve diferença estatística significativa entre as concentrações de 25 e 50 µg/mL, no entanto, houve diferença significativa para a célula Caco-2 entre as mesmas, assim, a concentração de escolha foi de 25 µg/mL. O mesmo é observado para fêmeas partenogênicas referente às concentrações de 50 e 100 µg/mL, portanto, foi escolhida a concentração de 50 µg/mL.



**Figura 1.** Efeito citotóxico da BnSP-6 na linhagem de célula intestinal humana, Caco-2 **(A)**, larvas infetantes de *S. venezuelensis* **(B)** e fêmeas partenogênicas de *S. venezuelensis* **(C)**. Controle: células, larvas e fêmeas não tratadas. Os valores dos eixos X representam concentrações em µg/mL. \*Diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e o controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com BnSP-6 e ivermectina.

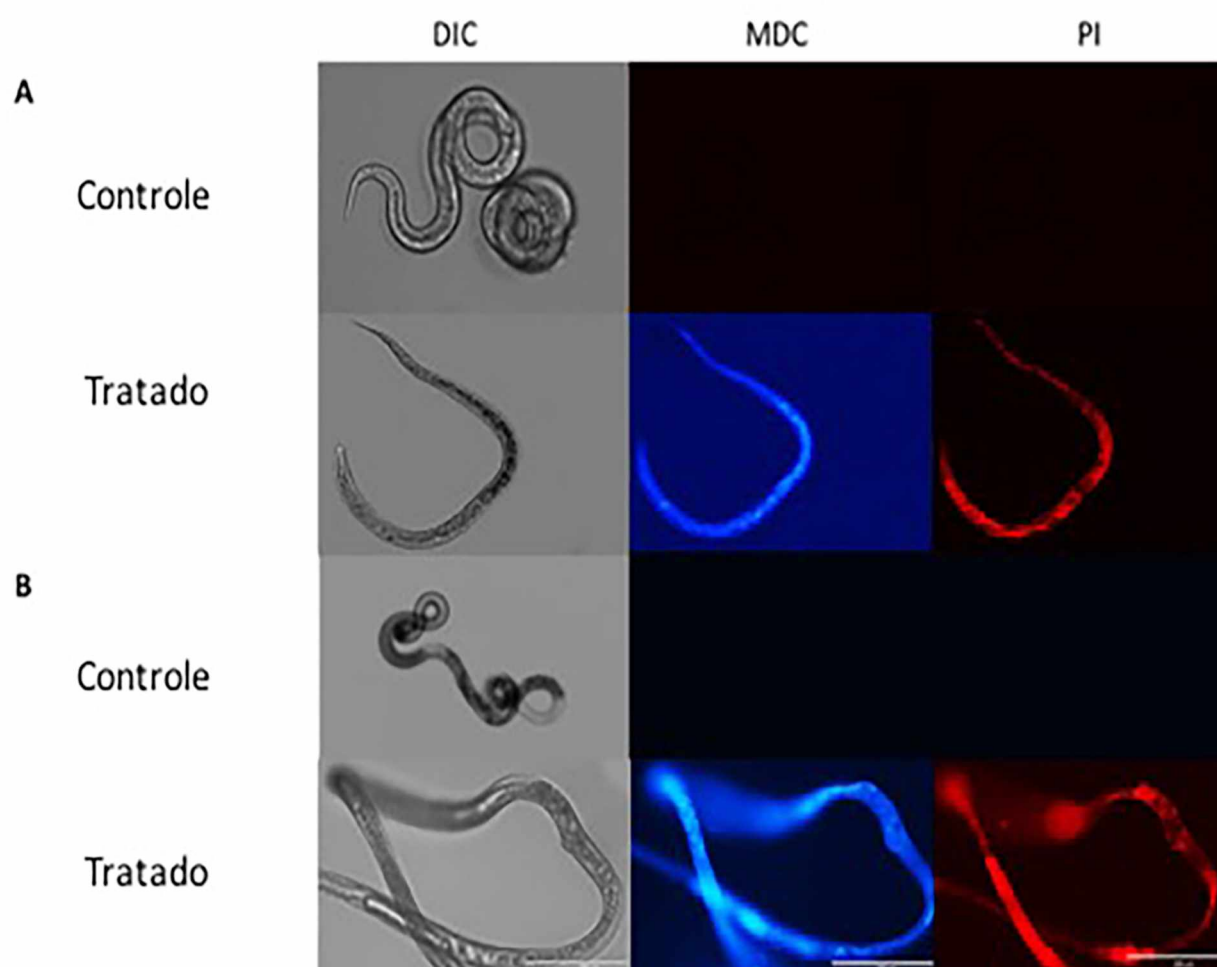
#### **4.2 BnSP-6 induz autofagia e apoptose celular em *S. venezuelensis***

A Figura 2 demonstra que houve marcação de fluorescência com MDC e PI tanto em larvas quanto em fêmeas tratadas com BnSP-6 em concentrações padronizadas previamente.

Na marcação com MDC, observou-se a formação de vacúolos autofágicos, que atuam digerindo estruturas celulares no processo de morte celular.

A apoptose tardia foi detectada pelo marcador nuclear fluorescente PI, sugerindo alterações nucleares características dos estágios tardios de apoptose celular.

Os controles não apresentaram marcação de fluorescência, visto que, não houve morte do parasito. Estes resultados indicam que a BnSP-6 induz os mecanismos de morte por meio de autofagia e apoptose celular tardia em *S. venezuelensis*.



**Figura 2.** Autofagia e apoptose induzida por BnSP-6 em *S. venezuelensis*. (A) Larvas infectantes de *S. venezuelensis* tratadas com BnSP-6 a 25 µg/mL. (B) Fêmeas partenogenéticas de *S. venezuelensis* tratadas com BnSP-6 a 50 µg/mL. DIC, contraste de interferência diferencial; MDC, marcação com monodansilcadaverina; PI, marcação com iodeto de propídio. Controle: parasito não tratado. Ampliação: 200x.

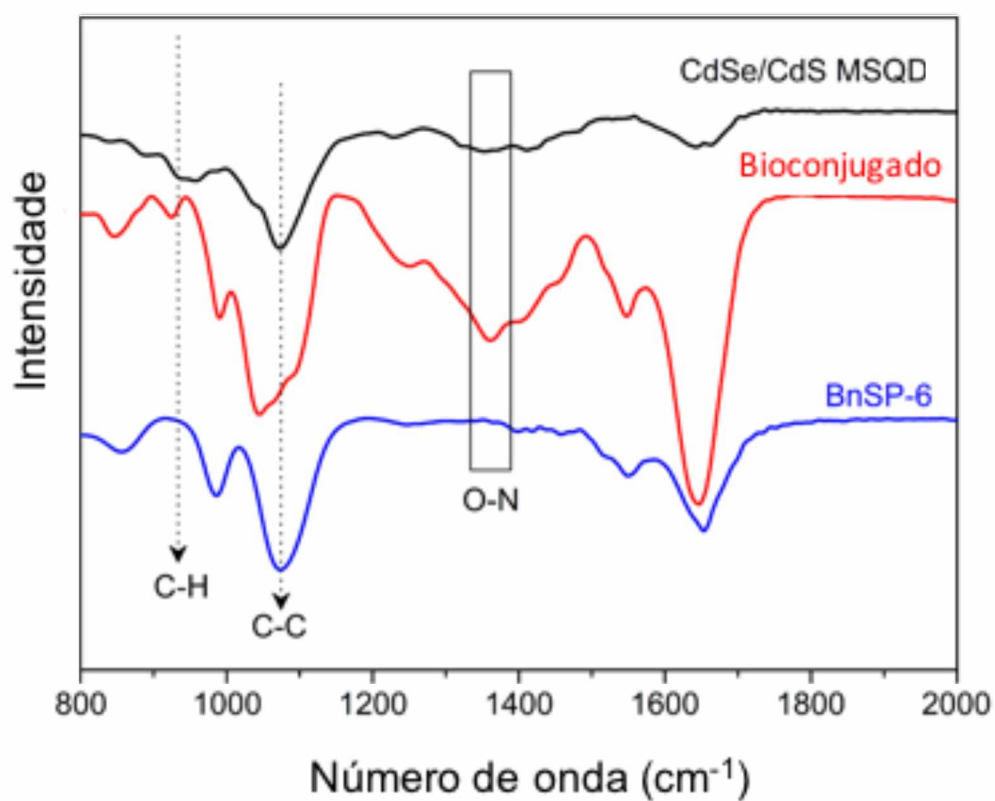
### 4.3 Bioconjugação BnSP-6-CdSe/CdS MSQDs

A Figura 3 representa os espectros de FT-IR dos CdSe/CdS *MSQDs*, da BnSP-6 e do bioconjugado CdSe/CdS *MSQDs*-BnSP-6.

No espectro do bioconjugado, houve a identificação de uma banda adicional a  $1360\text{ cm}^{-1}$ , a qual não apareceu nos espectros dos *MSQD* ou da BnSP-6, indicando a ligação entre as moléculas.

De acordo com Colthup, Daly e Wiberley (1990), esta banda é característica da vibração de alongamento O-N. Este resultado confirma que os grupos hidroxila de CdSe/CdS *MSQD* foram acoplados à BnSP-6 por ligação covalente estável.

Além disso, também foi observado que os modos vibratórios de bandas C-H e C-C correspondentes à BnSP-6 permaneceram semelhantes no bioconjugado, demonstrando que o acoplamento não afetou radicalmente a estrutura 3D da toxina, bem como sua estabilidade.



**Figura 3.** Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) de MSQD CdSe/CdS, BnSP-6 e o bioconjugado CdSe/CdS MSQD-BnSP-6 à temperatura ambiente.

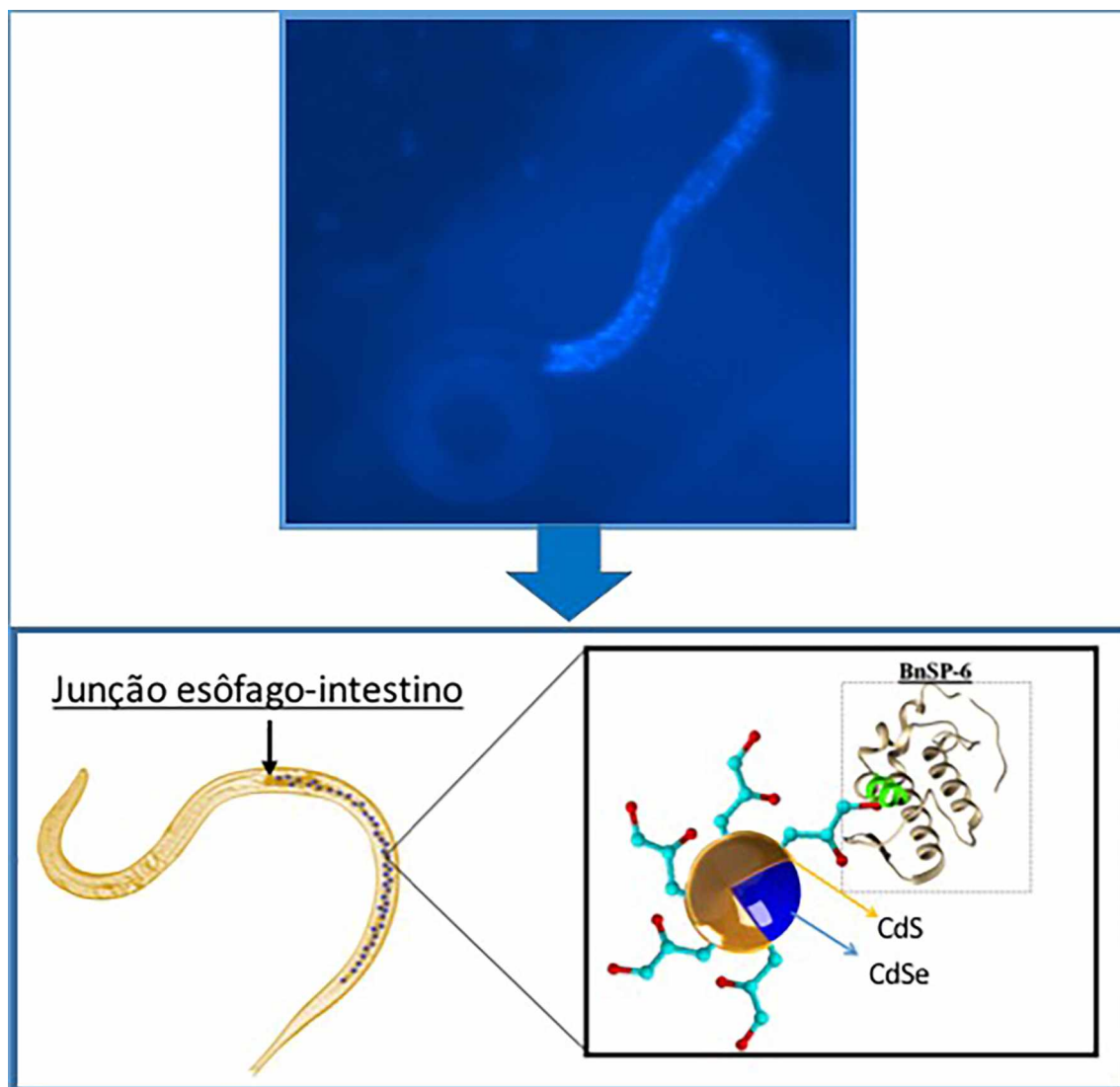
#### 4.4 Localização da BnSP-6 em larvas infectantes de *S. venezuelensis*

Para investigar a localização tecidual da BnSP-6, as larvas infectantes de *S. venezuelensis* foram incubadas com o bioconjugado *MSQD*-BnSP-6 CdSe/CdS e a luminescência foi monitorada. Após 24 h de incubação, as imagens de microscopia de fluorescência indicaram que o bioconjugado estava localizado no intestino das larvas ainda viáveis.

A Figura 4 ilustra a localização do bioconjugado *MSQD*-BnSP-6 CdSe/CdS em relação às estruturas morfológicas do parasito, a seta indica o local da junção esôfago-intestino, demonstrando que a marcação está concentrada na região intestinal da larva infectante.

A ilustração também apresenta a estrutura molecular tridimensional do bioconjugado CdSe/CdS *MSQD*-BnSP-6, demonstrando a composição dos *MSQD*, sendo o núcleo composto por CdSe e a casca composta por CdS, bem como, a estrutura da BnSP-6 ligada covalentemente ao *MSQD*.

A marcação intestinal observada na larva infectante ainda viável, sugere que a atividade da toxina seja desencadeada por absorção intestinal do parasito após 24 h de incubação.



**Figura 4.** Imagem de microscopia indicando a localização tecidual do bioconjugado CdSe/CdS MSQDs-BnSP-6 na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  em larvas infectantes de *S. venezuelensis*. Ampliação: 200x. Abaixo, esquema representando a estrutura molecular e a ligação covalente do bioconjugado CdSe/CdS MSQD-BnSP-6. Seta: junção esôfago-intestino de larvas infectantes.



## 5. DISCUSSÃO

A estrongiloidíase permanece uma das helmintíases mais negligenciadas e tem uma prevalência subestimada. Atualmente, a ivermectina é o fármaco de escolha, no entanto, tem apresentado falhas terapêuticas em pacientes imunossuprimidos, bem como em imunocompetentes (MENDES et al., 2017; OLSEN et al., 2009). As falhas terapêuticas ocorrem devido ao ciclo de auto-infecção do parasito associado à condição imunossupressora do hospedeiro (MENDES et al., 2017).

O ciclo de autoinfecção promove a cronicidade da doença e a hiperinfecção e, se não for devidamente diagnosticado e tratado, pode levar à disseminação do parasito para outros órgãos do hospedeiro (BUONFRATE et al., 2013). O parasito disseminado pode causar bacteremia ou mesmo septicemia em pacientes imunossuprimidos, isso ocorre devido ao carregamento de bactérias para diferentes órgãos além do habitat natural do intestino (MONTES et al, 2009; RODRIGUEZ, ABRAHAM, WILLIAMS, 2015;)

Além disso, não há consenso sobre a dose e a duração do tratamento, que apresenta taxas de cura irregulares entre 55-100%. Outros fármacos também foram utilizados, como o tiabendazol, embora seu uso tenha sido desencorajado por profissionais de saúde devido a efeitos colaterais gastrointestinais e neurológicos (BISOFFI et al., 2013; LUVIRA, WATTHANAKULPANICH, PITTISUTTITHUM 2014; PANIC et al., 2014; MENDES et al., 2017).

Mendes et al. (2017) realizaram uma revisão da literatura sobre fármacos testados contra a estrongiloidíase. Os autores destacaram a falta de estratégias para tratamentos mais eficientes no manejo das formas graves da doença. Portanto, o tratamento da estrongiloidíase continua sendo um desafio para a prática clínica. Neste

contexto, é notória a necessidade de desenvolvimento de medicamentos de suporte em novas estratégias de tratamento da doença, como indicado por Bisoffi et al. (2013).

Estudos têm demonstrado que as toxinas de serpente possuem potencial de ação farmacológica antitumoral, bem como, antibacteriana e antiprotozoário (ZOUARI-KESSENTINI et al. 2013; NUNES et al., 2013; SUDHARSHAN, DHANANJAYA, 2015; CORREA et al., 2016; AZEVEDO et al., 2016).

Recentemente, demonstrou-se o efeito antihelmíntico de uma toxina catiônica derivada da peçonha de cascavél proveniente da América do Sul. Dal Mas et al. (2016), mostraram a ação da crotamina, um pequeno peptídeo catiônico derivado da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, contra o nematodeo *Caenorhabditis elegans*.

A BnSP-6, uma PLA<sub>2</sub> Lys-49, isolada a partir da peçonha de *B. pauloensis* por Rodrigues et al. (1998), apresenta ação citotóxica e inibição da adesão celular em células tumorais. No presente estudo foi demonstrado o efeito anti-helmíntico da BnSP-6 contra *S. venezuelensis*, sendo o primeiro avanço quanto ao potencial uso terapêutico de uma fosfolipase derivada de peçonha de serpente contra um nematodeo.

Conforme demonstrado, esta PLA<sub>2</sub> induz atividade citotóxica contra larvas infectantes de *S. venezuelensis* e tem uma eficácia 12 vezes superior quando comparada com a ivermectina. Sua ação contra o parasito adulto obteve eficácia reduzida em concentrações mais elevadas, porém não houve diferença estatisticamente significativa em comparação à ivermectina.

Além disso, a BnSP-6 apresentou baixa toxicidade contra células intestinais humanas Caco-2, sugerindo que a toxina tenha ação específica contra o parasita. Esta diferença pode ser elucidada pelo mecanismo de mitose celular e o rápido crescimento das células de tecido humano utilizadas neste estudo, enquanto que as

larvas infectantes e as fêmeas partenogenéticas têm capacidade reprodutiva limitada e conseqüentemente menor resistência à ação citotóxica da BnSP-6.

A pesquisa de novos fármacos contra a strongiloidíase tem sido alvo de estudos recentes. Neste contexto, Legarda-Ceballos et al. (2016b), realizaram um estudo *in vitro* utilizando edelfosina, que apresentou actividade anti-helmíntica contra *S. venezuelensis* a uma concentração de 24 µg/mL. No entanto, a edelfosina apresentou citotoxicidade significativa em macrófagos na mesma concentração.

Legarda-Ceballos et al. (2016a), utilizando aminoálcoois e diaminas contra larvas de *S. venezuelensis*, também mostraram atividade anti-helmíntica, embora fosse menos eficaz que a ivermectina. No presente estudo, observou-se ação citotóxica da BnSP-6 na concentração de até 12,5 µg/mL, e baixa citotoxicidade para as células intestinais humanas Caco-2.

Um composto bioativo derivado do latex de *Carica papaya*, a papaína, tem apresentado ação anti-helmíntica contra *S. venezuelensis*. A papaína purificada apresentou ação dose-dependente eficaz contra ovos e larvas infectantes em estudos *in vitro*, sugerindo potencial alternativa terapêutica na strongiloidíase. No entanto, são necessários ensaios para avaliação da citotoxicidade da papaína em linhagens de células humanas (MORAES et al., 2017).

Após os testes de *screening* para escolha da concentração ideal de tratamento para o parasito, foi avaliado o potencial da toxina para induzir a morte celular por diferentes abordagens, tais como autofagia e apoptose.

A autofagia é um tipo de morte celular programada em que a marcação com MDC evidencia o processo autofágico induzido pela BnSP-6, sugerindo um papel significativo da autofagia no processo de morte celular do parasito. Por outro lado, a marcação com PI em larvas infectantes e fêmeas partenogenéticas sugere uma

resposta tardia semelhante à apoptose no mecanismo de morte celular induzido pela BnSP-6 contra *S. venezuelensis*.

Como demonstrado por Azevedo et al. (2016), a BnSP-6 apresentou ação tóxica contra as células de cancer de mama e também induziu autofagia e apoptose celular. Além disso, Ruano et al. (2012), demonstraram que os mecanismos apoptóticos envolvidos na morte de *S. venezuelensis* são devidos à produção de óxido nítrico pelo parasito. Portanto, esses resultados elucidam os mecanismos de ação citotóxica da BnSP-6 contra *S. venezuelensis*.

Após verificar a ação da BnSP-6 contra *S. venezuelensis*, foi investigada a localização tecidual da BnSP-6 no parasito. Para isso, foram utilizados CdSe/CdS MSQD bioconjugados com a BnSP-6 como marcadores de rastreamento. A bioconjugação foi confirmada pela análise FT-IR, demonstrando uma ligação O-N do tipo covalente. Sabe-se que a BnSP-6 tem a sua atividade citotóxica na porção C-terminal (RODRIGUES et al., 2015), assim é possível afirmar que a bioconjugação não interferiu na ação citotóxica desta PLA<sub>2</sub>.

A escolha de CdSe/CdS MSQD como marcador de rastreio baseou-se na estabilidade da luminescência e biocompatibilidade. Silva et al. (2016) comprovaram a biocompatibilidade dos CdSe/CdS MSQD, tornando-os mais seguros e biocompatíveis.

A marcação fluorescente concentra-se na porção intestinal do parasito, que foi identificada por análise morfológica de larvas viáveis 24 horas após a incubação. Sugere-se, portanto, que o bioconjugado tenha sido absorvido no intestino do parasito antes da sua ação citotóxica, que foi observada somente após 72 h de tratamento.

Os CdSe/CdS MSQDs foram recentemente utilizados na detecção de células de câncer de mama (SILVA et al., 2016). Os MSQD foram conjugados com um

anticorpo Fab específico de cancer da mama para a detecção de células cancerígenas, sendo utilizado como uma ferramenta de diagnóstico em aplicações biológicas.

Este estudo apresenta a utilização dos *MSQD* na pesquisa de novos fármacos, além de demonstrar outro tipo de bioconjugação via grupos hidroxila, indicando os possíveis mecanismos de absorção do parasita. Este *MSQD* é uma ferramenta inovadora para auxiliar nas técnicas de imagem, e pode ser utilizado como um dispositivo de rastreamento para pesquisa de novos fármacos. De acordo com Biswas et al. (2012), as toxinas nanoconjugadas são potenciais ferramentas para o desenvolvimento e a liberação de fármacos, portanto, outras aplicações podem ser desenvolvidas utilizando a bioconjugação de BnSP-6 com CdSe/CdS *MSQD*.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ A PLA<sub>2</sub> derivada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, BnSP-6, apresenta atividade anti-helmíntica contra *S. venezuelensis in vitro*.
- ✓ A BnSP-6 apresentou ação citotóxica em concentração 12 vezes menor que a ivermectina, e possui baixa citotoxicidade contra células intestinais humanas Caco-2.
- ✓ A morte celular do parasito foi evidenciada pela marcação de vacúolos autofágicos e células apoptóticas.
- ✓ A localização do bioconjugado da CdSe/CdS MSQDs-BnSP-6, indica que a toxina seja absorvida no intestino do parasito antes de sua ação tóxica.
- ✓ A BnSP-6 deve ser considerada como um novo potencial farmacológico para o tratamento da estrogiloidíase.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, N. H. Cultivation of parasites. **Tropical Parasitology**, v. 4, p. 80–89, 2014.
- AZEVEDO, F. V. P. V.; LOPES, D. S.; GIMENES, S. N. C.; ACHÊ, D. C.; VECCHI, L.; ALVES, P. T.; GUIMARÃES, D. O.; RODRIGUES, R. S.; GOULART, L. R.; RODRIGUES, V. M.; YONEYAMA, K. A. G. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA 2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 671-677, 2016.
- BARDA, B.; SAYASONE, S.; PHONGLUXA, K.; XAYAVONG, S.; KEODUANGSY, K.; ODERMATT, P.; PUCHKOV, M.; HUWYLER, J.; HATTENDORF, J.; KEISER, J. Efficacy of moxidectin versus ivermectin against *Strongyloides stercoralis* infections: a randomized, controlled noninferiority trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 2017, p. cix278, 2017.
- BISOFFI, Z.; BUONFRATE, D.; MONTRESOR, A.; REQUENA-MENDEZ, A.; MUNOZ, J.; KROLEWIECKI, A. J.; GOTUZZO, E.; MENA, M. A.; CHIODINI, P. L.; ANSELMINI, M.; MOREIRA, J.; ALBONICO, M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. e2214, 2013.
- BISWAS, A.; GOMES, A.; SENGUPTA, J.; DATTA, P.; SINGHA, S.; DASGUPTA, A. K.; GOMES, A. Nanoparticle-conjugated animal venom-toxins and their possible therapeutic potential. **Journal of Venom Research**, v. 3, p. 15-21, 2012.
- BORGES, I. P.; CASTANHEIRA, L. E.; BARBOSA, B. F.; DE SOUZA, D. L. N.; DA SILVA, R. J.; MINEO, J. R.; TUDINI, K. A.; RODRIGUES, R.S.; FERRO, E.A.; RODRIGUES, V. M. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A 2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**, v. 119, p. 84-91, 2016.
- BOURGUINAT, C.; KAMGNO, J.; BOUSSINESQ, M.; MACKENZIE, C. D.; PRICHARD, R.K.; GEARY, T. G. Analysis of the *mdr-1* gene in patients co-infected with *Onchocerca volvulus* and *Loa loa* who experienced a post-ivermectin serious adverse event. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 28-32, 2010.
- BUONFRATE, D.; REQUENA-MENDEZ, A.; ANGHEBEN, A.; MUÑOZ, J.; GOBBI, F.; VAN DEN ENDE, J.; BISOFFI, Z. Severe strongyloidiasis: a systematic review of case reports. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 1-10, 2013.
- COLTHUP, N.; DALY, L.; WIBERLEY, S. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**, 3 ed., San Diego: Elsevier, 1990, p. 339-354.
- CARVALHO, E. M.; DA FONSECA PORTO, A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. **Parasite Immunology**, v. 26, p. 487-497, 2004.

CORDEIRO, L. N.; ATHAYDE, A. C. R.; VILELA, V. L. R.; COSTA, J. G. M.; SILVA, W. A.; ARAÚJO, M. M.; RODRIGUES, O. G. Efeito *in vitro* do extrato etanólico das folhas do melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.12, p.421-426, 2010.

COSTA-CRUZ, J. M. *Strongyloides stercoralis*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; ALMEIDA VITOR, R. W. **Parasitologia Humana**, 13 eds., Rio de Janeiro: Atheneu, 2016. p. 313-323.

CORREA, E. A.; KAYANO, A. M.; DINIZ-SOUSA, R.; SETUBAL, S. S.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; MATOS, N. B.; ALMEIDA, J. R.; RESENDE, L. M.; MARANGONI, S.; DA SILVA, S. L.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A. Isolation, structural and functional characterization of a new Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops neuwiedi* urutu with bactericidal potential. **Toxicon**, v. 115, p. 13-21, 2016.

DAL MAS, C.; MOREIRA, J. T.; PINTO, S.; MONTE, G. G.; NERING, M. B.; OLIVEIRA, E. B.; GAZARINI, M. L.; MORI, M. A.; HAYASHI, M. A. Anthelmintic effects of a cationic toxin from a South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 116, p. 49-55, 2016.

DE LEY, P.; BLAXTER, M. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. In COOK, R.; HUNT, D. J. **Nematology Monographs and Perspectives**, 2 ed., Leiden: E.J. Brill, 2004, p. 633-653.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y. H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 6130-6185, 2011.

GERI, G.; RABBAT, A.; MAYAUX, J.; ZAFRANI, L.; CHALUMEAU-LEMOINE, L.; GUIDET, B.; AZOULAY E.; PÈNE, F. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome: a case series and a review of the literature. **Infection**, v. 43, p. 1-8, 2015.

GHOSH, K.; GHOSH, K. *Strongyloides stercoralis* septicaemia following steroid therapy for eosinophilia: report of three cases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, p. 1163–1165, 2007.

GUILLAMET, L. J. V.; SAUL, Z.; MILJKOVIC, G.; VILCHEZ, G. A.; MENDONÇA, N.; LILLO, N.; PINTO, M.; BAIG, A.; GOURINENI, V.; GANGCUANGCO, L. M. *Strongyloides stercoralis* infection among human immunodeficiency virus (hiv)-infected patients in the united states of america: a case report and review of literature. **The American Journal of Case Reports**, v. 18, p. 339-346, 2017.

GUPTA, V.; BHATIA, S.; MRIDHA, A. R.; DAS, P.; KHANNA, N. *Strongyloides stercoralis* hyperinfection: An often missed but potentially fatal cause of anemia and hypoalbuminemia in leprosy patients on long-term steroid therapy. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 18, p. 339-346, 2017.



HAYASHI, M.A.F.; CAMARGO, A.C.M. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, v. 45, p. 1163–1170, 2005.

HIRATA, T.; UCHIMA, N.; ISHIMOTO, K.; ZAHA, O.; KINJO, N.; HOKAMA, A.; SAKUGAWA, H.; KINJO, F.; FUJITA, J. Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, p. 246–249, 2006.

IGUAL-ADELL, R.; OLTRA-ALCARAZ, C.; SOLER-COMPANY, E.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, P.; MATOGO-OYANA, J.; RODRÍGUEZ-CALABUIG, D. Efficacy and safety of ivermectin and thiabendazole in the treatment of strongyloidiasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 5, p. 2615-2619, 2004.

KEISER, P.B.; NUTMAN, T.B. Strongyloides stercoralis in the Immunocompromised Population. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 208–217, 2004.

KURIAKOSE, K.; CARPENTER, K.; WANJALLA, C.; PETTIT, A. Case of *Strongyloides* hyperinfection syndrome. **BMJ Case Reports**, v. 2017, p. 1-2 , 2017.

LEGARDA-CEBALLOS, A. L.; LÓPEZ-ABÁN J.; DEL OLMO E.; ESCARCENA R.; BUSTOS L.A.; ROJAS-CARABALLO J.; VICENTE B.; FERNÁNDEZ-SOTO P.; SAN FELICIANO A.; MURO A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of 2-aminoalkanol and 1, 2-alkanediamine derivatives against *Strongyloides venezuelensis*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 364-372, 2016.

LEGARDA-CEBALLOS, A. L.; ROJAS-CARABALLO J.; LÓPEZ-ABÁN J.; RUANO A. L.; YEPES E.; GAJATE C.; MOLLINEDO F.; MURO A. The alkylphospholipid edelfosine shows activity against *Strongyloides venezuelensis* and induces apoptosis-like cell death. **Acta Tropica**, v. 162, p. 180-187, 2016.

LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, v. 135, p. 33–43, 2014.

LIM, S.; KATZ, K.; KRAJDEN, S.; FUKSA, M.; KEYSTONE, J. S.; KAIN, K. C. Complicated and fatal *Strongyloides* infection in Canadians: risk factors, diagnosis and management. **Canadian Medical Association Journal**, v.171, p. 479-484, 2004.

LUVIRA, V.; WATTHANAKULPANICH, D.; PITTISUTTITHUM, P. Management of *Strongyloides stercoralis*: a puzzling parasite. **International Health**, v. 6, p. 273-281, 2014.

MALGORZATA GESZKE-MORITZ, H. P., MAREK MURIAS, LAVINIA BALAN,; MICHAL MORITZ, J. L. A. R. S. Thioglycerol-capped Mn-doped ZnS quantum dot bioconjugates as efficient two-photon fluorescent nano-probes for bioimaging. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1. p. 698-705, 2013.

MARRA, N. M.; CHIUSO-MINICUCCI, F.; MACHADO, G. C.; ZORZELLA-PEZAVENTO, S. F. G.; FRANÇA, T. G. D.; ISHIKAWA, L. L. W.; AMARANTE, A. F.

T.; SARTORI, A.; AMARANTE, M. R. V. Migratory route of *Strongyloides venezuelensis* in lewis rats: comparison of histological analyses and PCR. **Experimental Parasitology**, v. 127, p. 334-339, 2011.

MENDES, T.; MINORI, K.; UETA, M.; MIGUEL, D. C.; ALLEGRETTI, S. M. Strongyloidiasis current status with emphasis in diagnosis and drug research. **J Parasitology Research**, v. 2017, p. 5056314, 2017.

MEREDITH, S. E. O.; DULL, H. B. Onchocerciasis: the first decade of Mectizan™ treatment. **Parasitology Today**, v. 14, p. 472-474, 1998.

MONTES, M.; SANCHEZ, C.; VERDONCK, K.; LAKE, J. E.; GONZALEZ, E.; LOPEZ, G.; TERASHIMA, A.; NOLAN, T.; LEWIS, D. E.; GOTUZZO, E.; WHITE, A. C., JR. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. e456, 2009.

MORAES, D.; LEVENHAGEN, M. A.; COSTA-CRUZ, J. M.; NETTO, C.; RODRIGUES, R. M. In vitro efficacy of latex and purified papain from *Carica papaya* against *Strongyloides venezuelensis* eggs and larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, p. e7, 2017.

NEVES, D. P.; MELO, A. L. de; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**, 12 ed., São Paulo: Atheneu, 2016.

NUNES, D. C.; FIGUEIRA M. M.; LOPES D. S.; DE SOUZA D. L.; IZIDORO L. F.; FERRO E. A.; SOUZA M.A.; RODRIGUES R. S.; RODRIGUES V. M.; YONEYAMA K. A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. 140, p. 844-854, 2013.

NZOLO, D.; ANTO, F.; HAILEMARIAM, S.; BAKAJIKA, D.; MUTEBA, D.; MAKENGA, J. C.; MESIA, G.; NSIBU, C.; MAPUNZA, S.; TONA, G. Central and peripheral nervous system disorders following ivermectin mass administration: a descriptive study based on the democratic republic of congo pharmacovigilance system. **Drugs-Real World Outcomes**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

OLSEN, A.; VAN LIESHOUT, L.; MARTI, H.; POLDERMAN, T.; POLMAN, K.; STEINMANN, P.; STOTHARD, R.; THYBO, S.; VERWEIJ, J. J.; MAGNUSSEN, P. 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.

PANIC, G.; DUTHALER, U.; SPEICH, B.; KEISER, J. Repurposing drugs for the treatment and control of helminth infections. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, p. 185-200, 2014.

PAULA, F. M.; COSTA-CRUZ, J. M. Epidemiological aspects of strongyloidiasis in Brazil. **Parasitology**, v. 138, p.1331–1340, 2011.

PAULA, F. M.; SITTA, R. B.; MALTA, F. M.; GOTTARDI, M.; CORRAL, M. A.; GRYSCHKE, R. C.; CHIEFFI, P. P. Parasitological and molecular diagnosis in experimental *Strongyloides venezuelensis* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 141-143, 2013.

RAMANATHAN, R.; NUTMAN, T. B. *Strongyloides stercoralis* infection in the immunocompromised host. **Current Infectious Disease Reports**, v. 10, p.105–110, 2012.

RATNER, L.; GRANT, C.; ZIMMERMAN, B.; FRITZ, J.; WEIL, G.; DENES, A.; SURESH, R.; CAMPBELL, N.; JACOBSON, S.; LAIRMORE, M. Effect of treatment of *Strongyloides* infection on HTLV-1 expression in a patient with adult T-cell leukemia. **American Journal of Hematology**, v. 82 p. 929–931, 2007.

REBOLLO, C. D. E.; TAIRA, N.; URA, C. Larvicidal effects of serial chemicals on *Strongyloides* infective larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 118, p. 165-168, 2003.

RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA J.; FONSECA F. P.; DE LA TORRE P.; HENRIQUE-SILVA F.; SANZ L.; CALVETE JJ.; RODRIGUES V. M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2707-2720, 2012.

RODRIGUES, V. M.; SOARES A. M.; MANCIN A. C.; FONTES M. R.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; GIGLIO J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 121, n. 3, p. 215-222, 1998.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI S.; CAMBRAIA RS.; DE ARAÚJO A. L.; MALTA-NETO N. R.; HAMAGUCHI A.; FERRO E. A.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; GIGLIO J. R.; SOARES A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A 2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V. M.; LOPES, D. S.; CASTANHEIRA, L. E.; GIMENES, S. N.; NAVES DE SOUZA, D. L.; ACHE, D. C.; BORGES, I. P.; YONEYAMA, K. A.; RODRIGUES, R. S. *Bothrops pauloensis* snake venom toxins: the search for new therapeutic models. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 670-684, 2015.

RODRIGUEZ, E. A.; ABRAHAM, T.; WILLIAMS, F. K. Severe strongyloidiasis with negative serology after corticosteroid treatment. **American Journal of Case Reports**, v. 16, p. 95-98, 2015.

RUANO, A. L.; LOPEZ-ABAN, J.; GAJATE, C.; MOLLINEDO, F.; DE MELO, A. L.; MURO, A. Apoptotic mechanisms are involved in the death of *Strongyloides venezuelensis* after triggering of nitric oxide. **Parasite Immunol**, v. 34, p. 570-580 2012.

RUGAI, E.; MATTON, T.; BRISOLA, A. P. Nova técnica para isolar larvas de

nematoides das fezes: Modificação do método de Baermann. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 14, p. 5-8, 1954.

SADJADI, S. A.; DAMODARAN, C.; SHARIF, M. *Strongyloides stercoralis* infection in transplanted patients. **American Journal of Case Reports**, v. 14, p. 205-209, 2013.

SATOH, M.; TOMA, H.; SATO, Y.; TAKARA, M.; SHIROMA, Y.; KIYUNA, S.; HIRAYAMA, K. Reduced efficacy of treatment of strongyloidiasis in HTLV-1 carriers related to enhanced expression of IFN-gamma and TGF-beta1. **Clinical Experimental Immunology**, v. 127, p. 354-359, 2002.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SEYOUUM, Z.; ZEWDU, A.; DAGNACHEW, S.; & BOGALE, B. Anthelmintic resistance of strongyle nematodes to ivermectin and fenbendazole on cart horses in gondar, northwest ethiopia. **Biomed Research International**, v. 2017, p. 5163968, 2017.

SILVA, A. C.; SILVA, M. J.; DA LUZ, F. A.; SILVA, D. P.; DE DEUS, S. L.; DANTAS, N. O. Controlling the cytotoxicity of CdSe magic-sized quantum dots as a function of surface defect density. **Nano Letters**, v.14, p. 5452-5457, 2014.

SILVA, A. C.; FRESCHI, A. P.; RODRIGUES, C. M.; MATIAS, B. F.; MAIA, L. P.; GOULART, L. R.; DANTAS, N. O. Biological analysis and imaging applications of CdSe/CdS<sub>x</sub>Se<sub>1-x</sub>/CdS core-shell magic-sized quantum dot. **Nanomedicine**, v.12, p. 1421-1430, 2016.

STUART, M.C., KOUIMTZI, M., HILL, S.R. WHO model formulary. **World Health Organization**, Geneva, pp. 644, 2009.

SUDHARSHAN, S.; DHANANJAYA, B. L. Antibacterial potential of a basic phospholipase A<sub>2</sub> (VRV-PL-VIIIa) from *Daboia russelii pulchella* (Russell's viper) venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, p. 1, 2015.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

TOLEDO R.; MUNOZ-ANTOLI C.; ESTEBAN J. G. Chapter Five - Strongyloidiasis with emphasis on human infections and its different clinical forms. **Advances in Parasitology**, v. 88, p. 165-241, 2015.

VERCRUYSSSE, J.; ALBONICO, M.; BEHNKE, J. M.; KOTZE, A. C.; PRICHARD, R. K.; MCCARTHY, J. S.; MONTRESOR, A.; LEVECKE, B. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 1, p. 14-27, 2011.

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

VINEY M.E., LOK J.B. The biology of *Strongyloides* spp. **WormBook**, ed. The *C. elegans* Research Community, 2015, p.1-17.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em:  
[http://www.who.int/intestinal\\_worms/disease/en/](http://www.who.int/intestinal_worms/disease/en/). Acesso em 22 de junho de 2017.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; EL AYEB, M.; LUIS, J.; MARRAKCHI, N. Antitumoral potential of Tunisian snake venoms secreted phospholipases A2. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 391389, 2013.