

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**Caracterização do trânsito gastrintestinal e atuação da
acupuntura sistêmica em ratos infectados com
*Strongyloides venezuelensis***

LUANA DOS ANJOS RAMOS

Belo Horizonte
Minas Gerais, Brasil
2015

LUANA DOS ANJOS RAMOS

**Caracterização do trânsito gastrointestinal e atuação da
acupuntura sistêmica em ratos infectados com
*Strongyloides venezuelensis***

**Tese de Doutorado desenvolvida no
Laboratório de Fisiologia de Sistemas e
Toxicologia Reprodutiva, apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Parasitologia
da Universidade Federal de Minas Gerais,
UFMG, como requisito parcial para obtenção
do título de Doutor em Ciências.**

Área de concentração: Helminhos

Orientador: Profa. Dra. Madileine Francely Américo

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo T. Fujiwara

Belo Horizonte, MG

2015

COLABORADORES

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara - Co-orientador

Prof. Dr. Alan Lane de Melo

Prof. Dr. Vitor Matti

Prof. Dr. Pedro Henrique Gazzinelli

Universidade Federal de Mato Grosso

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Me. Aline French Vitorino

Mestranda Loyane Gama Almeida

Suporte Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Agradecimentos

Sempre e em tudo agradeço por essa oportunidade reencarnatória que tanto aprendizado e alegrias tem me proporcionado. Ao Criador, meu sincero MUITO OBRIGADA!

Se todos pudessem ser acolhidos com o amor e atenção que eu fui ao nascer, não haveriam orfanatos. E desde então tenho sido apoiada, compreendida, auxiliada e amada por todos os meus familiares. Meu pai Aparecido Ramos, minha mãe Maria do Socorro dos Anjos Ramos, André Luis dos Anjos Ramos, Valner dos Anjos Ramos, Tessa dos Anjos Ramos; agregados irmãos: Inajará Faria da Silva Ramos, Doralice Baptista Ramos, Adelar Rohden; Vitor Baptista dos Anjos Ramos e Beatriz dos Anjos Ramos Rohden, sobrinhos amados (por hora só esses..rs); à todos, MUITO OBRIGADA!

Aos amigos do Laboratório Fisiotox, em especial: Mestranda Loyane Almeida, Mestranda Maysa Bruno, Mestre Aline French Vitorino, graduanda Viviane Behenck e todas as Madilettes! Obrigada por aguentar minhas atrapalhadas e eventual “mau humor”. MUITO OBRIGADA!

À imensa família espiritual que sempre me apoia, amigos de aventura. Amigos da Nata: William e Isis Santos, Milena e Sidnei, Mônica Maria e Fernando Toledo, Vitor José (pai) e Lidia Maria (mamis), Ricardo e Denise Carmona, Ananda Carmona, Filippo Carmona e Amanda, Manuela e Angelo Dibal, Olivia Maria, Carla Zanetti, Ariane e Milton Toledo.

Às amigas de faculdade: Elícia Titonelli, Nara Felicidade, Leticia Munhoz, Andrea D'Ávanço, Vânia Casotti e Ariane.

Amigos de mestrado: Maria Alícia C. Sepulveda, Guilherme Cotomacci, Flávio Tampeline. Minha ex-orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Barreto Chaves

Família Araguaia: Profa. Dra. Paula Sousa Souto, Prof. Dr. Kleber E. Campos, Prof. Dr. Gustavo Volpato, Profa. Dra. Ana Paula Mórbio, Rosa Jacinto, Anderson Ramos, técnica Lusnaiara Rodrigues.

Sem vocês minha história seria outra! MEU MUITO OBRIGADA!

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas III da Universidade Federal de Minas Gerais, ao meu Co-orientador Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara e ao Prof. Dr. Alan Lane Melo por abrirem as portas e me mostrarem todo um universo "parasitológico" de possibilidades em pesquisa, possibilitando assim a conquista desse título e aprendizado.

Loyzita querida! Você foi minha companheira de experimento, e por que não dizer, de aventuras. Programar os experimentos para que caíam exatamente nos feriados que todos descansam como o Natal, é pra poucas!rs. Descobri em você uma amiga ponta firme e uma profissional exemplar. Com certeza esse doutorado seria muito sem graça e chato sem dividi-lo com você. Seja feliz em seus novos caminhos e conte sempre comigo em tudo!

Não poderia finalizar meus agradecimentos sem falar da amizade mais querida que conquistei ao longo desses anos. Com certeza, chegar em Barra do Garças sozinha sem saber o que me esperava foi muito difícil e requereu muita força, determinação e persistência. Mas esse caminho que trilho não seria possível sem contar com a amizade da minha também orientadora Madileine Francely Américo. Nesse tempo creio que amadureci, aprendi e compartilhei bons momentos com você. As amizades verdadeiras são sempre fiéis, são eternas por que são da alma.

Obrigada por me aturar e ter toda a paciência que tem tido comigo.

E ainda tantos outros aqui não citados.....Muito obrigada!

“A vida é mesmo uma caixinha de surpresas!”

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acp- Acupuntura

AS- Acupuntura Sistêmica

BAC- Biosusceptometria de Corrente Alternada

CUA- Campus Universitário do Araguaia

dpi- dias após a infecção

E36- Estômago 36

EA- Eletroacupuntura

Fisiotox- Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva

GI- gastrintestinal

HCL- hipoclorito

IL-4 - interleucina 4

IL-13 - interleucina 13

L1- larva rabditóide estágio 1

L2- larva rabditóide estágio 2

L3- larva filarióide estágio 3

L4- larva filarióide estágio 4

MGET- Tempo médio de esvaziamento gástrico

MCAT- Tempo médio de chegada do alimento ao ceco

MSITT- Tempo médio de trânsito intestinal

NK- *Natural Killer*

OPG- ovos por grama de fezes

PBS- phosphate buffer saline

PC6- pericárdio 6

S. venezuelensis- Strongyloides venezuelensis

S. stercoralis- Strongyloides stercoralis

Sham- acuponto falso

TGI- Trato Gastrintestinal

UFMT- Universidade Federal de Mato Grosso

VC12- vaso concepção 12

RESUMO

As helmintíases intestinais representam um grave problema de saúde pública mundial. As estrogiloidíases parecem alterar a motilidade do trato gastrointestinal (TGI) de forma ainda não completamente compreendida. Por outro lado, atualmente a medicina ocidental tem optado por alternativas de tratamento cada vez menos invasivas e com menos efeitos colaterais. Nesse sentido, a acupuntura ganhou notoriedade após estudos científicos confirmarem seus efeitos. Assim, este trabalho teve por objetivo: a) Avaliar o trânsito gastrointestinal após infecção com diferentes cargas de *S. venezuelensis* (400, 2000, 10000 larvas) em ratos; b) Analisar o efeito da acupuntura no trânsito gastrointestinal de ratos infectados com 2000 larvas de *S. venezuelensis*. As cepas de *S. venezuelensis* foram mantidas em gerbils, dos quais as fezes foram submetidas a coprocultura e posterior recuperação pelo método de Baerman-Morais. Após contagem das larvas, os grupos de infecção foram estabelecidos, e medidas prévias de motilidade gastrointestinal e peso das fezes foram realizadas para que os animais pudessem ser controles de si mesmos. Os parâmetros parasitológicos (ovos por grama de fezes, número de vermes e fecundidade), de motilidade gastrointestinal e o peso das fezes foram coletados de 3/3 dias, e no 21 dpi os animais foram mortos por decaptação. Para os experimentos de acupuntura foram feitas sessões eletroacupuntura de 20 min, nos mesmo dias preestabelecidos, nos pontos E36, VC12 e Sham (não acuponto, controle). Nossos resultados mostram haver uma significativa queda no peso das fezes no 9dpi que se correlaciona com pico de OPG. Para a menor carga de infecção (400L) um esvaziamento gástrico mais rápido foi associado a uma maior fecundidade, enquanto o trânsito gastrointestinal mais lento se correlacionou de forma negativa com o OPG. Por outro lado, no grupo 2000L o esvaziamento gástrico obteve uma correlação positiva com o numero de vermes. A única correlação encontrada no grupo 10000L ocorreu entre o esvaziamento gástrico e a chegada do alimento ao ceco. O aumento na carga parasitária reduz a correlação entre os parâmetros parasitológicos e o perfil de transito gastrointestinal, e os prejuízos motores permanecem mesmo após o termino da infecção. O tratamento de acupuntura no acuponto E36 resultou em uma menor contagem de ovos ao longo do experimento, mas um maior numero de vermes ao final dos 21 dpi e um aumento na fecundidade, enquanto o VC12 causou um maior pico de oviposição, lenificou o trânsito intestinal e acelerou o esvaziamento gástrico. Assim, tratamento da infecção por *S. venezuelensis* com acupuntura deve ser realizado com cautela em áreas endêmicas para estrogiloidíase, uma vez que pode ser favorável ao tanto ao parasito quanto ao hospedeiro.

ABSTRACT

Intestinal helminth infections represent a serious public health problem worldwide, given the large number of parasites and parasitism. However, they are considered neglected because of absent high mortality, despite the significant morbidity. Strongyloidiasis appear to alter the motility of the gastrointestinal (GI) tract in a way that is not yet fully understood. Currently, Western medicine has search for alternatives treatments becoming less invasive with fewer side effects. Therefore, acupuncture gained notoriety by many scientific studies that have confirmed its effects. Several studies focusing on the TGI proved that activation of somato-autonomic pathways through points such as E36 and VC12, is responsible for the effect of acupuncture on motility. Thus, this study was divided into 3 stages: a) To evaluate the gastrointestinal transit after infection with different loads of *S. venezuelensis* (400, 2000, 10000 larvae) in rats; b) To analyze the effect of acupuncture on gastrointestinal transit of infected rats with 2000 larvae of *S. venezuelensis*. The strains of *S. venezuelensis* were kept in gerbils, of which the feces were submitted to fecal culture and subsequent recovery by Baerman-Morais method. After larvae counting, the infection groups were established, and previous measures of gastrointestinal motility and stool weight were performed so that the animals could be controls themselves. The parasitological parameters (eggs per gram of feces, number of worms and fecundity), gastrointestinal motility and stool weight were collected from 3/3 days, and at 21 dpi the animals were killed by decapitation. For acupuncture experiments, electroacupuncture sessions were made for 20 min, at the same established days, in E36, VC12 acupoints and Sham (not acupoint, control). There was a significant decrease on stool weight at 9 dpi, recovered in 18 dpi. For infection with lower load (400L) faster gastric emptying was associated with increased fertility, while the slower gastrointestinal transit was negatively correlated with EPG. On the other hand, the group 2000L presents gastric emptying obtained a positive correlation with the worms. Surprisingly, only one correlation was found in the group 10000L between gastric emptying and food arrival of the cecum. The increase in parasitic load reduces the correlation between the parasitological parameters and the gastrointestinal transit profile, and apparently the motors losses remain even after the end of the infection. The treatment at acupoint ST36 resulted in a lower egg count during the experiment, but a greater number of worms at the end of 21 dpi with high fecundity, while the VC12 caused a higher peak oviposition, slowed intestinal transit and accelerated the gastric emptying. So, the treatment of *S. venezuelensis* infections with acupuncture should be performed with caution in endemic areas for strongyloidiasis, since has benefits for host and parasit.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1	Aspectos morfológicos.....	5
Figura 2	Procedimento experimental.....	19
Figura 3	Recuperação de larvas L3.....	20
Figura 4	Contagem de ovos por grama de fezes (OPG) em câmara de McMaster.....	22
Figura 5	Pontos estabelecidos anatomicamente para medida de esvaziamento gástrico (1) e chegada do alimento ao ceco (2)	24
Figura 6	Punturação do acuponto E36 no membro posterior de rato Wistas.....	25
Figura 7	Punturação do não-acuponto Sham na cauda.....	26
Figura 8	Punturação do acuponto CV12 na linha sagital mediana.....	27
Figura 9	Contagem de ovos por grama de fezes.....	30
Figura 10	Contagem de vermes recuperados do intestino delgado.....	31
Figura 11	Fecundidade obtida pela relação entre o número de ovos/grama pelo número de vermes (fêmea).....	32
Figura 12	Tempo de esvaziamento gástrico.....	33
Figura 13	Tempo de chegada do alimento ao ceco.....	34
Figura 14	Tempo de trânsito do alimento pelo intestino delgado.....	35
Figura 15	Contagem de OPG para os grupos infectados com 2000 larvas não tratado (#); tratado com ponto falso Sham (*); tratado no acuponto E36 (§) e VC12 (¶).....	39

Figura 16	Contagem do número de vermes no 21°dpi para os grupos infectados com 2000 larvas não tratado (#); tratado com ponto falso Sham (*); tratado no acuponto E36 (§) e VC12 (¶).....	40
Figura 17	Fecundidade no 21°dpi para os grupos infectados com 2000 larvas não tratado, tratado com ponto Sham, acupontos E36 e VC12.....	41
Figura 18	Tempo de esvaziamento gástrico para o tratamento de acupuntura.....	42
Figura 19	Tempo de chegada do alimento ao ceco para o tratamento de acupuntura.....	43
Figura 20	Tempo de trânsito do alimento pelo intestino delgado para o tratamento de acupuntura.....	44
Figura 21	Peso das fezes para os diferentes grupos de tratamento.....	45
Tabela 1	Peso das fezes (g) no período analisado de infecção com 400, 2000 e 10000 larvas.....	36
Tabela 2	Coeficiente de correlação (r) entre os parâmetros parasitológicos e de motilidade gastrintestinal.....	37
Tabela 3	Coeficiente de correlação de Pearson (r) obtido entre os parâmetros parasitológicos e o perfil de trânsito gastrintestinal para o tratamento de acupuntura.....	46

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Nematóides parasitos intestinais.....	1
1.2.	Helmintos Intestinais.....	1
1.3.	Strongyloides spp.....	1
1.3.1.	Epidemiologia.....	2
1.3.2.	Ciclo Biológico.....	4
1.4.	Trânsito Gastrintestinal.....	6
1.4.1.	Avaliação do Trânsito.....	7
1.4.1.1.	Biosusceptometria de Corrente Alternada.....	7
1.5.	Acupuntura Sistêmica.....	8
1.5.1.	Acupuntura Sistêmica e Motilidade Gastrintestinal.....	9
2-	JUSTIFICATIVA.....	13
3-	OBJETIVOS.....	16
3.1.	Objetivo Geral.....	16
3.2.	Objetivo Específico.....	16
3.2.1	Parte 1.....	16
3.2.2	Parte 2.....	17
4-	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1.	Procedimento Experimental.....	18
4.2.	Parasito.....	19
4.2.1.	Indução ao Parasitismo.....	19
4.2.2.	Contagem de Ovos e Vermes.....	20
4.3	Biosusceptometria de Corrente Alternada	22
4.3.1.	Medida do Trânsito Gastrintestinal.....	23
4.4.	Tratamento com Acupuntura.....	24
4.5.	Análise dos dados e Análise estatística.....	27
5-	RESULTADOS.....	29

5.1.	Avaliação do trânsito gastrointestinal após infecção com diferentes cargas de <i>S. venezuelensis</i> (400, 2000, 10000 larvas) em ratos.....	29
5.1.1.	Análise Parasitológica.....	29
5.1.2.	Análise do Trânsito Gastrointestinal.....	32
5.1.3.	Análise Comparativa entre os Parâmetros.....	36
5.2.	Efeito da acupuntura (E36, VC12 e Sham) no trânsito gastrointestinal de ratos infectados com <i>S. venezuelensis</i>	38
5.2.1.	Análise Parasitológica.....	38
5.2.2.	Análise da Motilidade Gastrointestinal.....	41
5.2.3.	Análise Comparativa entre os Parâmetros.....	45
6-	DISCUSSÃO.....	47
6.1.	Avaliação do trânsito gastrointestinal após infecção com diferentes cargas de <i>S. venezuelensis</i> (400, 2000, 10000 larvas) em ratos.....	47
6.2.	Efeito da acupuntura (E36, VC12 e Sham) no trânsito gastrointestinal de ratos infectados com <i>S. venezuelensis</i>	51
7-	CONCLUSÕES.....	56
7.1.	Parte I.....	56
7.2.	Parte II.....	57
8-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
9-	ANEXOS.....	70