

CAPÍTULO 2

Metodologias fenotípicas aplicadas à detecção de substâncias antiparasitárias e ao diagnóstico de resistência parasitária em nematoides gastrintestinais

Ana Carolina de Souza Chagas

É consenso entre os pesquisadores que o sucesso na implementação de programas de controle de nematoides para limitar o desenvolvimento da resistência depende intensamente da disponibilidade de métodos efetivos e sensíveis para sua detecção e seu monitoramento. Por conta disso, um número expressivo de técnicas *in vitro* para o diagnóstico da resistência tem sido desenvolvido nos últimos 30 anos (TAYLOR et al., 2002). Os testes *in vitro* são considerados economicamente mais acessíveis, mais rápidos e, em muitos casos, mais precisos e reprodutíveis do que os testes *in vivo* (COLES et al., 2006; HAZELBY et al., 1994; LACEY et al., 1990). Isso porque eles podem anular a interferência individual do hospedeiro no estabelecimento da infecção parasitária, cujo resultado pode ser falso positivo e falso negativo no teste de redução da contagem de ovos nas fezes (TRCOF) (item 11.4) (VARADY et al., 1996). Eles também podem anular a variação na farmacodinâmica do produto antiparasitário no hospedeiro (LACEY et al., 1990).

É possível avaliar *in vitro* a ação de substâncias ativas de vários grupos de antiparasitários sobre isolados de campo. Os resultados podem ser comparados com os resultados de isolados de referência (sensíveis e resistentes) e, assim, é possível determinar a DL_{50} (quantidade de substância necessária para provocar a morte de pelo menos 50% da população em estudo) anulando-se as interferências intertestes (CRAVEN et al., 1999). Muitos trabalhos têm obtido boa correlação entre o TRCOF e a DL_{50}

discriminatória para a resistência obtida nos testes *in vitro* (DÍEZ-BANOS et al., 2008; KAPLAN et al., 2007; KONIGOVA et al., 2003; LACEY et al., 1990; TAYLOR, 1990; TAYLOR et al., 2009; VARADY et al., 2006).

O teste de eclodibilidade de ovos (TEO) é recomendado pela Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (WAAVP) para o diagnóstico da resistência aos benzimidazóis, que inibem a embriogênese e a eclosão da larva. O princípio ativo de referência utilizado dentro do grupo é o tiabendazol, por ser mais solúvel em água (COLES et al., 1992; TAYLOR et al., 2002). Existem mais de 50 comunicações publicadas usando-se o TEO para a detecção da resistência aos benzimidazóis, bem como ao levamisol em tricostrongilídeos de ovinos e caprinos (VON SAMSON-HIMMELSTJERN et al., 2009). Consta que nem o TRCOF nem o TEO são capazes de detectar a resistência quando menos de 25% da população parasitária for resistente, mas, para níveis moderados e elevados de resistência, o TEO mostrou-se mais sensível do que o TRCOF (MARTIN et al., 1989; VARADY et al., 2006). Uma sugestão para aumentar a sensibilidade desse teste em situações de baixa resistência na população parasitária é utilizar a dose ou concentração mínima inibitória DL_{99}/LC_{99} , a qual poderia revelar proporções relativamente baixa de nematoides resistentes (VARADY et al., 2006). Embora ocorra variação de DL_{50} durante o período patente da infecção no hospedeiro (BORGSTEEDT e COUWENBERG, 1987), ainda assim ocorre diferença estatística para a DL entre isolados sensíveis e resistentes, pois a variação segue o mesmo padrão para os dois isolados (ALVAREZ-SANCHEZ et al., 2005).

O teste de desenvolvimento larvar (TDL) é considerado um teste sensível e prático, por favorecer, simultaneamente, a avaliação da eficácia de mais de um grupo químico, além de não depender de ovos não embrionados para a sua realização. Ele é comumente usado para o diagnóstico de resistência aos benzimidazóis, cuja ação foi comentada acima, e aos imidazotiazóis/tetraidropirimidinas. Neste último caso, o levamisol é o representante do grupo e age por paralisia espástica generalizada da musculatura (SANGSTER, 1996). O teste foi disponibilizado comercialmente (DrenchRite Microbial Screening Technologies) para uso em nematoides gastrintestinais.

de ovinos e caprinos e para diagnóstico da resistência parasitária aos benzimidazóis, aos imidazotiazóis/tetra-hidropirimidinas e às avermectinas/milbecinias (KAPLAN et al., 2007). Dependendo da metodologia adotada nesse teste, ele pode produzir curvas dose-resposta mais lineares para os grupos químicos de interesse (HUBERT; KERBOUEF, 1992).

As lactonas macrocíclicas agem na atividade faríngea, paralisando os músculos que controlam a faringe, além de causar paralisia somática da musculatura, que inibe a motilidade dos nematoides (GILL et al., 1995). Isso indica que o teste de migração de larvas infectantes em ágar pode oferecer uma visão clara do estado da resistência a esse grupo químico, em virtude do estímulo de movimentação. Pesquisas demonstram que o teste de inibição da migração larvar (TIML) permite a observação das larvas aptas a atravessar uma malha (RABEL et al., 1994); entretanto, o uso associado de uma camada de ágar como barreira mostrou-se muito eficiente na detecção da resistência às macrolactonas, exclusivamente para *H. contortus* (D'ASSONVILLE et al., 1996); e o teste mostrou-se mais sensível ao permitir o diagnóstico da resistência em populações nas quais apenas 10% dos nematoides eram resistentes (KOTZE et al., 2006). O estabelecimento de curva dose-dependente para a ivermectina em isolados de *H. contortus* (MOLENTO; PRICHARD, 2001; PONCE et al., 2009) poderá servir como base para o estabelecimento de intervalos de doses em futuros testes, a serem realizados por laboratórios no Brasil. Entretanto, ao se optar por esse teste como padrão, as avaliações deverão ser criteriosas, visto que a paralisia pode ser reversível e, no caso de alguns compostos anti-helmínticos, pode ocorrer uma relação dose-resposta não linear (WALLER; PRICHARD, 1986).

Também por causa do seu mecanismo de ação, o teste de inibição da alimentação larvar (TIAL) tem sido avaliado para as lactonas macrocíclicas e para os imidazotiazóis. A inibição da alimentação e do crescimento ocorre em concentrações de anti-helmínticos de 10 a 100 vezes menores que a necessária para inibir a motilidade, demonstrando ser esse teste bastante sensível. Álvarez-Sánchez et al. (2005) verificaram o modelo de variação da CL_{50} durante o período patente da infecção em ovinos infectados com iso-

lados de nematoides gastrintestinais sensíveis e resistentes à ivermectina e ao levamisol. O mesmo padrão de valores menores no início do período e depois de 70 a 90 dias foi detectado. Entretanto, a diferença da CL_{50} entre os isolados sensíveis e resistentes a cada droga manteve-se significativa durante todo o período, indicando que essa técnica pode ser uma alternativa prática para a detecção da resistência.

Os testes supracitados, além do teste de eliminação da cutícula larvar, têm sido também utilizados na avaliação de espécies vegetais com atividade anti-helmíntica, para identificar novos bioativos (ALONSO-DÍAZ et al., 2008; BAHUAUD et al., 2006; BRUNET et al., 2008; BRUNET; HOSTE, 2006; PAOLINI et al., 2004). No caso do teste de eliminação da cutícula larvar, leva-se em consideração o ciclo de vida dos tricostrongilídeos, em que a primeira fase da invasão do hospedeiro pela L_3 é representada pelo estabelecimento da larva, que ocorre em duas etapas sucessivas: eliminação da cutícula e penetração na mucosa digestiva. Várias espécies vegetais ricas em taninos estão associadas à redução do estabelecimento das larvas infectantes, e estudos têm sido realizados para esclarecer o processo de associação/penetração de larvas na mucosa, por meio de testes complementares, como o Método do Desafio Direto (JACKSON et al., 2004). No teste de eliminação da cutícula, as substâncias são avaliadas em concentrações bastante elevadas, dada a resistência natural da L_3 , por causa de suas duas cutículas.

Em geral, todos os protocolos a seguir podem ser utilizados como técnicas para a avaliação da atividade anti-helmíntica de qualquer substância, seja extrato vegetal, seja substância natural isolada, ou, ainda, substância sintética. As concentrações deverão ser ajustadas conforme a natureza da substância, e a escolha do protocolo mais adequado dependerá do objetivo do estudo. Os testes poderão ser realizados com ovos, L_1 e L_3 , e o resultado dependerá do mecanismo de ação da substância-teste. As regras básicas de higiene e segurança em laboratório deverão ser seguidas (item 11.1), pois são fundamentais para a obtenção de resultados confiáveis.



Em futuro próximo, esses testes poderão ser utilizados não só para investigar novos compostos, como também para substituir os animais para o monitoramento do grau de eficácia de anti-helmínticos comerciais. Com isso, pode-se reduzir o número de animais utilizados em testes, evitando, assim, seu sofrimento. É indispensável a participação de um investigador para emitir um laudo de eficácia das técnicas descritas neste manual, com o objetivo de respaldar os dados contidos na bula do medicamento veterinário. Os resultados poderão ser validados e anexados ao corpo do processo pelas autoridades de registro e certificação nacional.