

SOBRE A EVOLUÇÃO DE *ASCARIS LUMBRICOIDES* LINNAEUS, 1758, NA FASE LARVAR ENDOVULAR*

Paulo de Toledo ARTIGAS
Marlene Tiduko UETA

RESUMO: Ovos de *A. lumbricoides* colhidos em fezes humanas foram cultivados em solução de formol a 1%, em temperatura ambiente (27C). Foi observado, durante o decurso do experimento, que larvas L₁ aparecem, em média, após 12,7 dias; larvas L₂ surgem aos 15,7 dias e a segunda muda ocorre ao redor de 18,3 dias, ocasionando a formação da larva infectante L₃, que ainda permanece dentro do ovo. Ovos de culturas de 10 a 25 dias foram utilizados para infectar 80 camundongos albinos Swiss, machos e fêmeas. Os camundongos foram separados em 16 grupos de 5 indivíduos; os componentes desses grupos foram infectados, sucessivamente, dia a dia; o primeiro grupo com ovos de cultura de 10 dias, o segundo com ovos de 11 dias e, assim, sucessivamente, até o 16º grupo que recebeu ovos com 25 dias de cultura. A partir do terceiro dia pós-infecção, um camundongo, de cada um dos 16 grupos, foi sacrificado; isso foi feito em 5 dias subseqüentes, para cada grupo. Foi realizada, nos animais sacrificados, a necrópsia com finalidade parasitológica, visando a pesquisa de larvas. Larvas migrantes foram encontradas no fígado e pulmões nos camundongos dos grupos que receberam ovos com, pelo menos 18 dias de cultura. Tal resultado comprova, cabalmente, que somente os ovos com larvas L₃ são infectantes.

UNITERMOS: *Ascaris lumbricoides*, desenvolvimento do ovo, camundongo

INTRODUÇÃO

É, na verdade, muito curioso, em se tratando de um parasita extremamente freqüente e intensamente estudado, que não exista uniformidade entre os autores, no que se refere à evolução do *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758, na fase endovular.

Brumpt⁵, em seu tratado de Parasitologia, ao se referir ao desenvolvimento da larva do *Ascaris lumbricoides*, dentro do ovo, afirma que ela sofre uma, ou talvez duas mudas.

Há um trabalho de Henner⁶, citado por Araujo⁶, em que aquele pesquisador, ao infectar camundongos com ovos de *Ascaris suum*, observava que os seus roedores somente apareciam infectados quando as larvas endovulares já tinham realizado duas ecdises.

UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Parasitologia, Caixa Postal 6109, 13081, Campinas, SP, Brasil.

*Auxílio FAPESP

Recebido para publicação em 12/5/1988 e aceito em 3/11/1988.

Schacher⁹, com *Toxocara canis*, verificou, em pequeno percentual de larvas, em cultura de ovos, a presença de uma bainha cuticular se sobrepondo à cutícula da primeira ecdise. Schacher⁹, todavia, não interpretou o fato como demonstrativo da ocorrência da segunda ecdise, mas como uma cutícula intumescida e simulando duas camadas.

Thust¹⁰, utilizando microscopia eletrônica, relata a presença de uma segunda muda na larva endovular de *Ascaris lumbricoides*, que ocorreria em ovos, 18 a 20 dias após o início do desenvolvimento, conservados a temperatura de 28C.

Na década de 70, com as publicações de Araujo^{1, 2, 3, 4} e de Maung⁷, ficou bem comprovada a ocorrência da segunda ecdise intra-ovular em diferentes ascarídeos.

Outro aspecto que merece ser focalizado é o tempo necessário, no meio exterior, para que a larva intra-ovular do *A. lumbricoides* se torne efetivamente infectante.

Roberts⁸, em pesquisa que se tornou clássica e em que se fundamentam autores de livros de texto de Parasitologia, observou que os ovos larvados de *Ascaris lumbricoides* somente se tornam infectantes depois de, pelo menos, 20 dias de permanência no meio exterior.

Maung⁷ verificou em camundongos, que a infecção somente se positiva quando são utilizados ovos de cultura de 20 dias.

Ao dar início à presente pesquisa, era nosso escopo deixar bem confirmado qual o período, no meio exterior, necessário para que estivesse desenvolvida a larva infectante do *Ascaris* do homem e que, sem dúvida, a infecção do hospedeiro definitivo se processa com a ingestão da L₃.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultura de ovos

Fezes humanas, com ovos de *A. lumbricoides*, foram obtidos no Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Campinas, SP.

As fezes foram desmanchadas em água de torneira e processada a concentração de ovos, em cálices cônicos e através de peneira com malhas de 400µm. Uma vez concentrados, os ovos foram transferidos para uma solução de formol a 1% e mantidos na geladeira a aproximadamente 4C.

Inicialmente, foram feitas culturas em estufa a 27C e em temperatura ambiente (24-27C); como não tivesse sido observada diferença na formação das larvas, em um ou outro modo de agir, passou-se a utilizar somente culturas em meio ambiente.

Foram efetuadas, diariamente, durante 25 dias consecutivos, a partir do sexto dia de cultura, observações em microscopia direta e em contraste de fase, para se acompanhar o processo evolutivo da larva.

Uma vez verificada a presença de ovos larvados, eram eles submetidos à ligeira pressão, entre lâminas de vidro, para se provocar a ruptura da casca do ovo e a exteriorização da larva.

As larvas exteriorizadas foram examinadas dia a dia, para a constatação da presença de cutícula ou cutículas destacadas.

A verificação da sucessão de ecdises larvárias (L₁, L₂ e L₃), em função do tempo, é o resultado de observação, aproximada, de 100 ovos por dia, nos períodos citados; esta prática permitiu a informação sobre o "número médio de dias" necessário para a evolução do nematódeo.

Larvas, em fases sucessivas da experiência, foram fotografadas e medidas com auxílio da câmara clara.

2. Infecção de camundongos

Oitenta camundongos foram distribuídos em grupos de 5 e feita sua infecção, a partir do décimo dia de cultura de ovos, até o vigésimo quinto dia. Formaram-se, portanto, 16 grupos de camundongos infectados diariamente.

Foram utilizados camundongos jovens Swiss, machos e fêmeas, com peso aproximado de 15g. A infecção se fez com emprego de sonda fina de borracha, introduzida pelo esôfago. Cada camundongo recebeu cerca de 200 ovos.

A partir do terceiro dia pós-infecção, foram sacrificados os camundongos dos 16 grupos, sucessivamente em 5 dias, um em cada dia. Os animais foram colocados em ambiente saturado de éter e processada a pesquisa parasitológica, visando o encontro de larvas em migração. Nas necrópsias fez-se tal pesquisa no sangue, nódulos linfáticos, coração, intestino, fígado e pulmões.

Os órgãos examinados, à parte o sangue observado a fresco, entre lâmina e lamínula, eram dilacerados com estilete e pinça, em solução salina.

Positivada a presença de larvas, estas eram colhidas, procurando-se obter o maior número delas, em cálices cônicos. A seguir, as larvas eram fixadas em líquido de Railliet-Henry, a quente e, posteriormente, examinadas e medidas.

Atuando dessa maneira, foi possível verificar, com segurança, o número de dias exigidos para que a larva endovular se torne infectante e qual, efetivamente, é a larva infectante.

RESULTADOS

1. Cultura de ovos

O aparecimento de larvas se verificou na totalidade dos ovos. Ao fim de uma média de 12,7 dias de cultura, já eram observadas as primeiras larvas.

A primeira larva (L_1) é muito frágil e se esfacela com facilidade. Apresenta a cutícula lisa, desprovida de qualquer ectoformação; seu tubo digestivo ainda não está bem definido, sendo pouco precisa a diferenciação do esôfago e do intestino. Nota-se que a extremidade proximal é ligeiramente "aparada", tendendo para a condição de extremidade truncada (fig. 1). Verifica-se, ainda, na extremidade oral a presença de uma formação estiletiforme, mais quitinizada e que acompanha a cutícula, quando esta se destaca, ao aparecer a L_2 ; é ainda visível, quando a L_2 já se encontra definida; a cauda termina em ponta e é mais curta que a cauda da L_2 ou da L_3 .

A L_2 aparece, em média, ao redor de 15,7 dias, na cultura mantida em temperatura ambiente; a identificação de L_2 se comprova pela presença da cutícula da L_1 (fig. 2). A larva L_2 é mais robusta, resistindo melhor à compressão entre lâminas; é freqüente a presença, em sua extremidade proximal, de uma disposição em forma de calota. Na microscopia direta, ainda oferece dificuldade o exame da organologia interna; porém, em contraste de fase, já se destaca bem o esôfago diferenciado.

A L_3 começa a surgir, em média, aos 18,3 dias de cultura, em temperatura ambiente e tem como caráter essencial a presença das cutículas de L_1

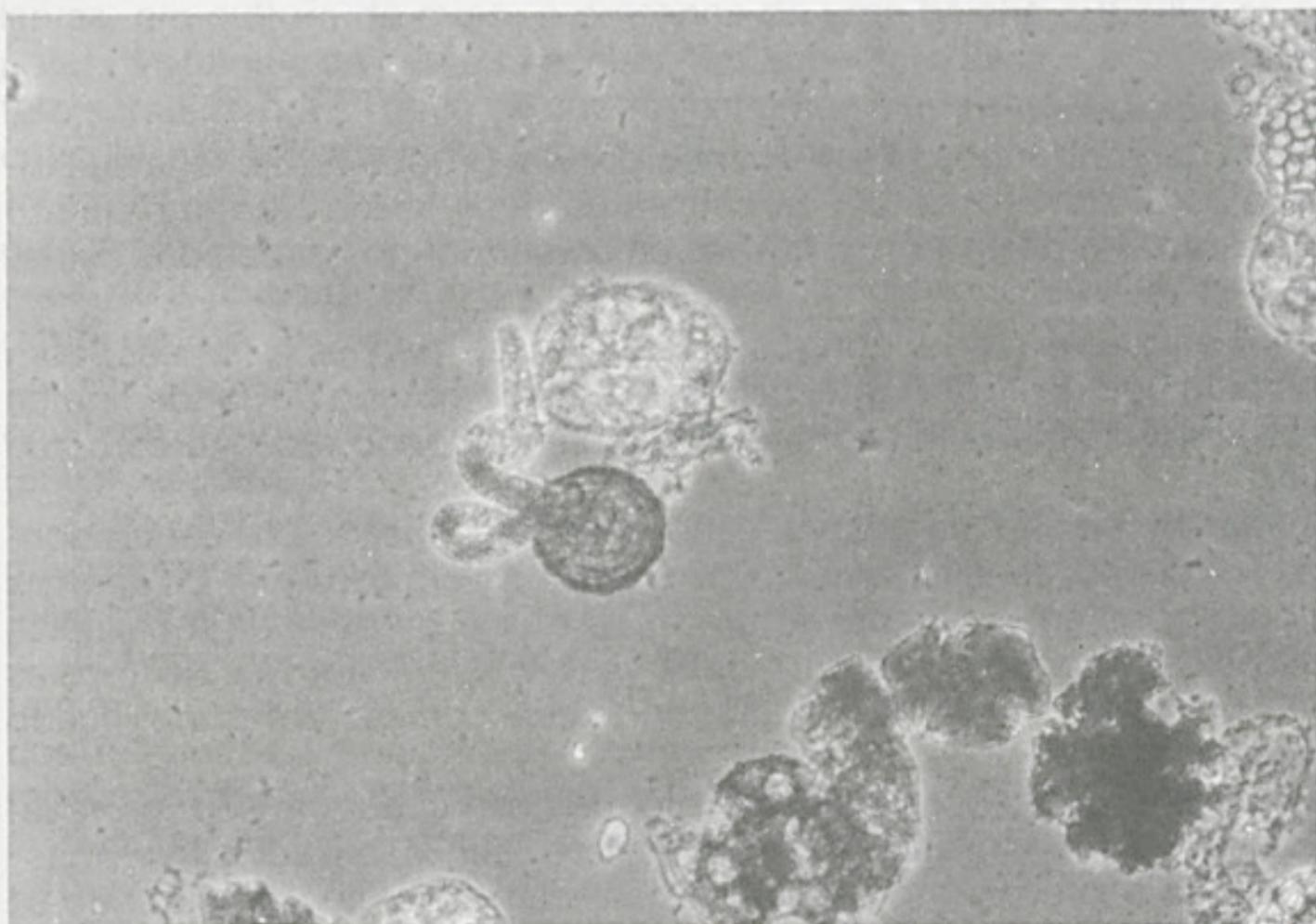


Figura 1 – Larva L₁ – Aumento 113x.

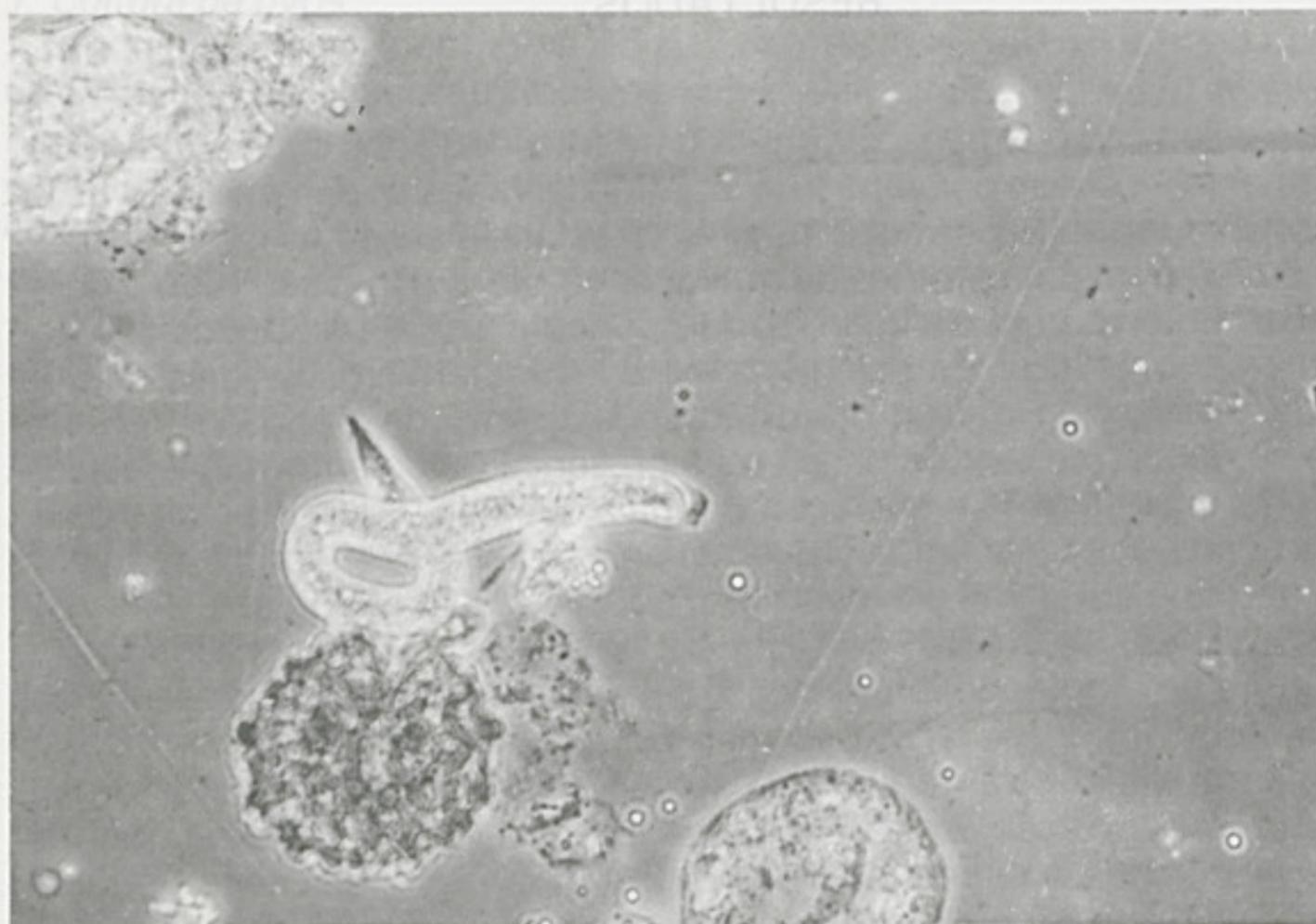


Figura 2 – Larva L₂, com uma cutícula descolada. Aumento 222x

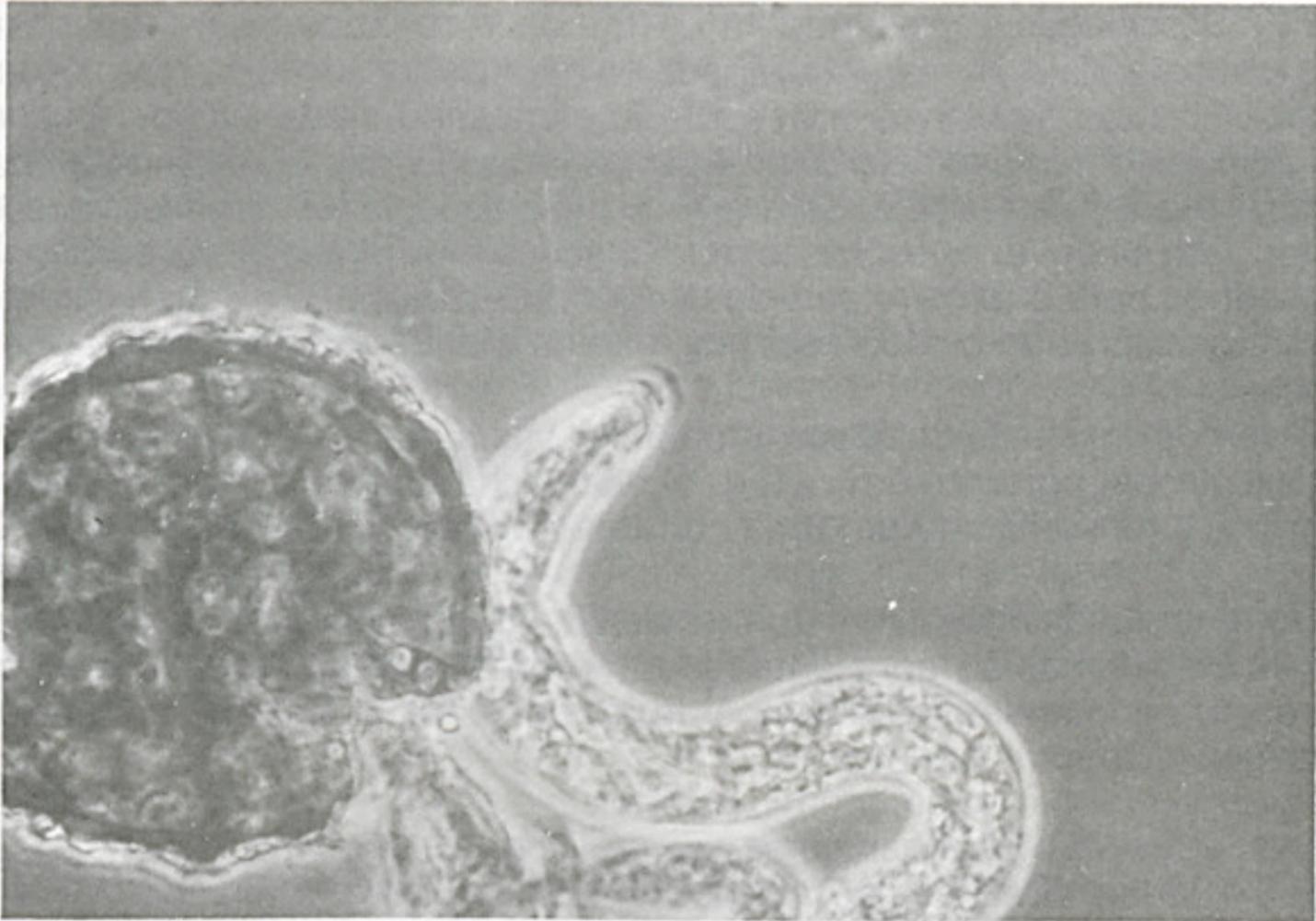


Figura 3 – Larva L₃, com duas cutículas descoladas. Aumento 463x.

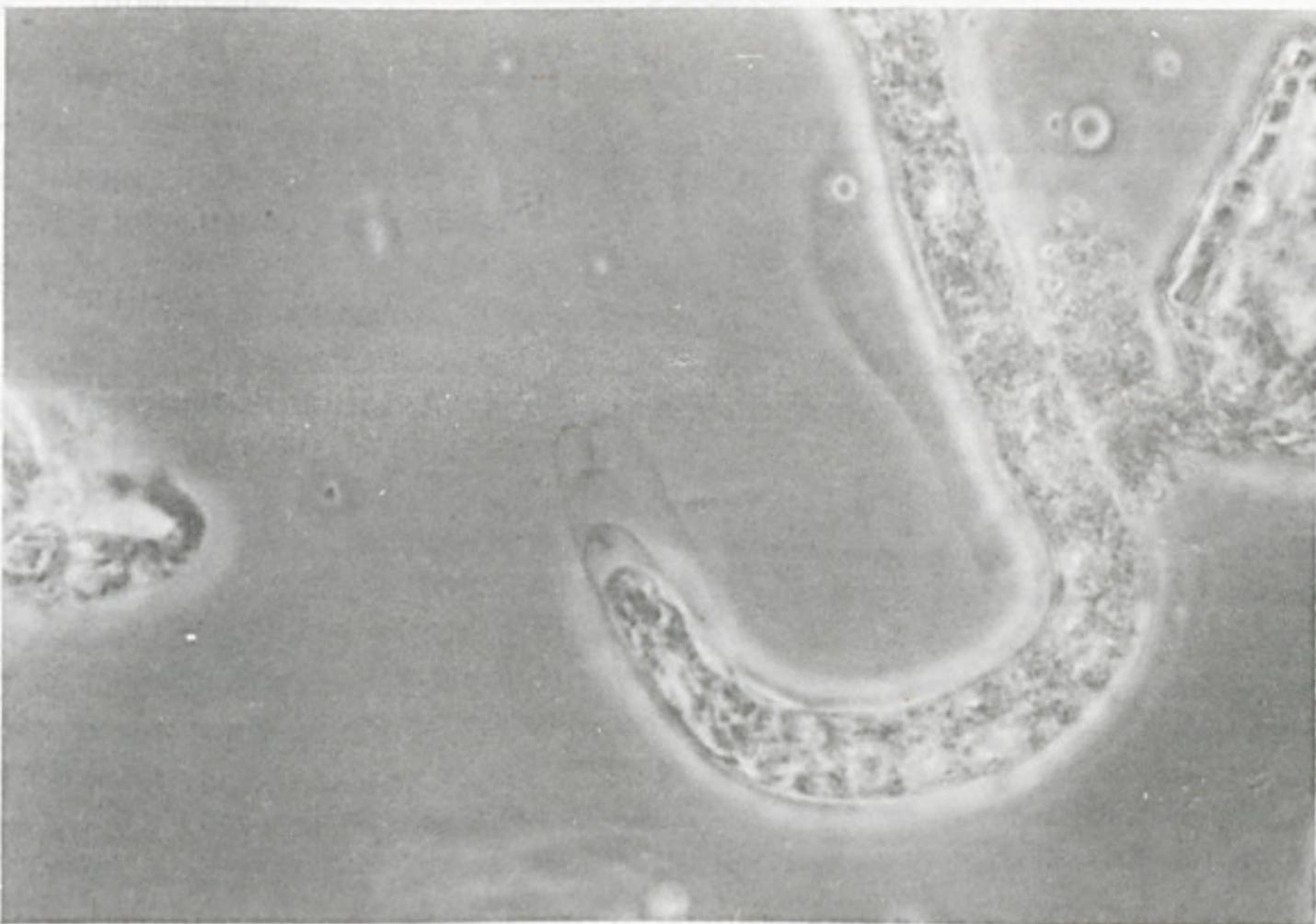


Figura 4 – Larva L₄, com três cutículas descoladas. Aumento 445x.

e de L₂, descoladas e "vestindo" a L₃ (fig. 3). A organologia interna desta larva é observada com maior facilidade na microscopia de fase, que põe em destaque o tubo digestivo, com esôfago e intestino diferenciados. Encontrou-se certa dificuldade em diferenciar as larvas L₂ das L₃, quando ambas se mostravam nuas, isto é, sem as cutículas descoladas das fases precedentes. Isto se deve, às escassas modificações morfológicas, na passagem do segundo para o terceiro estágio. Segundo Araujo², não existem caracteres diferenciais entre os dois estágios, exceto a evidência das cutículas descoladas.

Tivemos ensejo de observar, uma única vez, uma larva com três cutículas descoladas, portanto em L₄ (fig. 4); este achado anormal, em nosso experimento, foi verificado em uma cultura em meio ambiente, ao fim de 21 dias.

Foram medidas larvas em cultura de 23, 28, 35 e 45 dias; os resultados de tais medidas estão apresentados na Tabela 1. Nesta Tabela, também aparecem dados relativos à temperatura ambiente, anotados no decorrer do desenvolvimento dos ovos.

TABELA 1

Medidas de larvas de *Ascaris lumbricoides* de cultura, em solução formulada a 1%, mantidas em temperatura ambiente.

(Medidas médias de 30 larvas em mm; temperatura média em C).

Temperatura ambiente média (C)	Nº de dias de cultura	medida do comprimento e largura (mm) (média aritmética)	tamanho mínimo e tamanho máximo (comprimento e largura)
26,9	23	0,2357 x 0,0131	0,1951 a 0,2682 comprimento x 0,0097 a 0,0146 largura
26,9	28	0,2414 x 0,0129	0,1951 a 0,2926 comprimento x 0,0097 a 0,0146 largura
26,7	35	0,2446 x 0,0132	0,1951 a 0,3414 comprimento x 0,0097 a 0,0170 largura
27,7	45	0,2373 x 0,0137	0,1951 a 0,2926 comprimento x 0,0097 a 0,0195 largura

2. Infecção de camundongos

Esta operação visou, sobretudo, comprovar ser, realmente, a L₃ a larva infectante.

Nos camundongos dos grupos 1 a 8, infectados com material de cultura de menos de 18 dias, foi constantemente negativo o encontro de larvas migrantes.

A partir das infecções com material de cultivo com 18 ou mais dias, os camundongos passaram a apresentar larvas migrantes no fígado. Na Tabela 2, estão assinaladas as larvas colhidas no fígado.

O encontro de larvas nos pulmões se verifica, e passa a ser constante a partir do quarto dia de pós-infecção; à medida que cresce o número de larvas nos pulmões, decresce o número de larvas no fígado; esta observação confirma, no camundongo, a passagem prévia das larvas do intestino para o fígado e deste órgão para o pulmão.

As larvas recolhidas do fígado medem, em média, 0,35mm a 0,92mm (Tabela 2); quanto mais tardia a colheita, maiores eram as larvas.

Nos pulmões, larvas colhidas no quarto dia pós-infecção mediam, em média, 0,51mm; no oitavo dia pós-infecção, atingiam a 1,29mm (Tabela 3).

Resumindo o aspecto biológico do experimento, é possível afirmar o seguinte: nos quarto e quinto dias pós-infecção é maior o número de larvas no fígado do que nos pulmões; as larvas pulmonares colhidas nos quarto e quinto dias pós-infecção são de tamanho semelhante ao das larvas hepáticas e vão se tornando maiores nos dias subseqüentes; as Tabelas 2 e 3 ilustram estas observações. Somente as inoculações com culturas de, pelo menos, 18 dias, em temperatura ambiente, ao redor de 24 a 27C, são positivas; culturas de menos de 18 dias, não dão ensejo à presença de larvas no camundongo.

No nosso experimento, o encontro de larvas no sangue, nódulos linfáticos, coração e intestino foi sempre negativo em todos os camundongos examinados.

DISCUSSÃO

São, decididamente, as tradicionais observações de Roberts⁸ que vêm servindo de suporte aos tratadistas, para as informações, em livros de texto. Tais informações, à luz das recentes pesquisas, destacando-se as de Araujo² e de Maung⁷ e as apresentadas nesta publicação, devem ser atualizadas, pois modificam a noção biológica de Roberts⁸, até agora consolidada, na sua aparência, como definitiva.

Roberts⁸ observou que a infecção experimental de camundongos somente se positiva quando os ovos de *A. lumbricoides* têm, pelo menos, mais de 18 dias de vida no meio ambiente.

Vários pesquisadores realizaram trabalhos em que estudaram a infecção experimental de camundongos com ovos de *A. lumbricoides*, visando, sobretudo, esclarecimentos sobre os estágios larvários; nem sempre foram bem-sucedidos. Mas, ficou comprovada a necessidade de um tempo mínimo de permanência dos ovos no meio exterior para que a infecção fosse positiva; neste período, no meio externo, desenvolve-se o processo larvário intra-ovular.

Verificou-se, neste trabalho, a seqüência biológica da larva do *A. lumbricoides*: o ovo é eliminado do hospedeiro sem apresentar diferenciação da futura larva; esta se corporifica ao fim de, aproximadamente, 12,7 dias (L₁); ao fim de 15,7 dias, aparece a L₂; ao redor de 18,3 dias, se positiva a L₃ — caracterizada pela presença de duas cutículas, reliquat de L₁ e L₂.

TABELA 2

Medidas (comprimento x largura) em mm das *Ascaris lumbricoides*, colhidas no fígado de camundongos, em dias subseqüentes de pós-infecção. Os números representam a média de 10 larvas (exceto nos assinalados).

Grupo	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia
9	—	0,0 x 0,0 ⁽⁵⁾	0,6015 x 0,0308 ⁽³⁾	0,9268 x 0,0439 ⁽¹⁾	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0
10	—	0,4633 x 0,0223	0,6682 x 0,0284	0,7145 x 0,0397	0,7743 x 0,0353 ⁽⁴⁾	—
11	0,3194 x 0,0170	0,4389 x 0,0243 ⁽²⁾	0,6438 x 0,0289	0,7536 x 0,0358	0,7072 x 0,0377	—
12	0,3487 x 0,0190	0,4633 x 0,0238	0,6023 x 0,0304	0,7121 x 0,0341	0,8609 x 0,0441	—
13	0,3170 x 0,0165	0,4902 x 0,0282	0,6633 x 0,0350	0,7097 x 0,0336	0,7877 x 0,0397	—
14	0,3243 x 0,0192	0,4438 x 0,0245	0,6072 x 0,0314	0,7584 x 0,0407	—	0,9975 x 0,0499
15	0,3950 x 0,0207	0,5462 x 0,0277	0,7267 x 0,0331	—	0,8731 x 0,0387	0,9219 x 0,0392
16	0,3975 x 0,0197	0,5023 x 0,0248	—	0,8975 x 0,0392	0,8902 x 0,0414	0,8316 x 0,0404
\bar{x}	0,3503 x 0,0186	0,4782 x 0,0250	0,6447 x 0,0311	0,7818 x 0,0381	0,8155 x 0,0394	0,9170 x 0,0431

(1) medida de uma única larva

(2) média de 2 larvas

(3) média de 3 larvas

(4) média de 4 larvas

(5) ausência de larvas

TABELA 3

Medidas (comprimento x largura) em mm das larvas de *Ascaris lumbricoides*, colhidas no pulmão de camundongos, em dias subseqüentes de pós-infecção. Os números representam a média de 10 larvas (exceto nos assinalados).

Grupo	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia
9	—	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	1,5121 x 0,0829 ⁽¹⁾
10	—	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	0,5438 x 0,0199	1,0487 x 0,0492	1,2397 x 0,0658 ⁽⁴⁾
11	0,0 x 0,0 ⁽⁵⁾	0,0 x 0,0	0,0 x 0,0	0,8755 x 0,0438	0,8041 x 0,0460	—
12	0,0 x 0,0	0,2926 x 0,0195 ⁽¹⁾	0,7438 x 0,0304 ⁽²⁾	0,8536 x 0,0487	0,9389 x 0,0548	—
13	0,0 x 0,0	0,5853 x 0,0292 ⁽¹⁾	0,7365 x 0,0377	0,8097 x 0,0431	1,0292 x 0,0565	—
14	0,0 x 0,0	0,7560 x 0,0377 ⁽²⁾	0,4999 x 0,0267 ⁽²⁾	0,8487 x 0,0409	—	1,2975 x 0,0684
15	n.m. ⁽³⁾	0,4023 x 0,0170 ⁽²⁾	0,6829 x 0,0357 ⁽³⁾	—	0,9950 x 0,0514	1,4853 x 0,0709
16	0,0 x 0,0	n.m. ⁽¹⁾	—	0,9414 x 0,0428	0,9999 x 0,0526	0,9121 x 0,0477
\bar{x}	—	0,5090 x 0,0258	0,6657 x 0,0326	0,8121 x 0,0398	0,9693 x 0,0517	1,2893 x 0,0671

(1) medida de uma única larva

(2) média de 2 larvas

(3) média de 3 larvas

(4) média de 6 larvas

(n.m.) não medido

(5) ausência de larvas

Uma vez formada a L₃, esta não necessita de um período de amadurecimento para se tornar infectante. Não obstante, constatou-se que larvas L₃ de mais idade, por exemplo 63 dias, chegam ao fígado dos camundongos 24 horas após a ingestão do ovo. Tal verificação está de acordo com a de Maung⁷, de que larvas de culturas mais velhas eclodem, no tubo digestivo de camundongos, mais precocemente. A L₃ liberada do ovo no tubo digestivo do camundongo, despoja-se das cutículas e se localiza no fígado, 24 a 72 horas após a ingestão do ovo; do fígado passa para o pulmão, onde atinge dimensão avantajada (no presente experimento, até 1,29mm), de onde se transfere, via árvore brônquica, traquéia, esôfago, estômago, para o intestino delgado.

As larvas começam a aparecer no fígado poucas horas após a ingestão oral; permanecem neste órgão de 5 a 7 dias; no sétimo dia, neste experimento, ainda eram encontradas larvas em número razoável.

CONCLUSÃO

1. É no meio externo, ao fim de cerca de 18,3 dias, que se processa a segunda ecdise larvar, dando origem à larva L₃.
2. O ovo de *A. Lumbricoides* torna-se infectante somente quando contém uma larva que sofreu duas mudas. Assim, à semelhança do que acontece com os nematódeos em geral, a larva infectante do *A. lumbricoides* é a L₃.
3. A larva L₃, após diferenciação, está imediatamente apta para infectar o hospedeiro definitivo. Não obstante, larvas L₃ de culturas mais velhas são encontradas, em condição experimental, no fígado de camundongos, mais precocemente.

ABSTRACT: Eggs of *A. lumbricoides* obtained from human feces were cultured in 1% formaldehyde solution at room temperature (27°C). It was observed that during this period L₁ larvae were formed inside the egg after 12,7 days in average. L₂ larvae appeared in 15,7 days and the second molt occurred in about 18,3 days, causing the formation of infective L₃ larvae, which also remained within the egg. Cultured eggs, 10 to 25 days old were then used to infect 80 young albino Swiss mice, males and females. The mice were divided in 16 groups of 5 animals, and each group was infected once. The infection was performed daily and the first group was infected with 10 day-old eggs. The last group (16) received 25 day-old eggs. Since the third day after infection, one individual of the group was killed each day consecutively for five days and larvae were searched in a parasitological necropsy. Wandering larvae were found in the liver and lungs only in those groups infected with eggs cultured for at least 18 days. These results showed that only the eggs which have L₃ larvae are infective to the host.

KEYWORDS: *Ascaris lumbricoides*, egg development, mice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAUJO, P. Considérations sur la deuxième mue des larves d'Ascarides parasites de serpents. *Ann. Parasitol. (Paris)*, 46:605-612, 1971.
2. ARAUJO, P. Observações pertinentes às primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* e *Toxocara canis*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 14:83-90, 1972.
3. ARAUJO, P. Observations sur le cycle biologique de d'Ascaride *Polydelphis quadrangularis* (Schneider, 1866) parasite du serpent crotale. *Ann. Parasitol. (Paris)*, 47:91-120, 1972.
4. ARAUJO, P. & BRESSAN, M.C.R.V. Considérations sur la deuxième mue des larves d'*Ascaridia galli*. *Ann. Parasitol. (Paris)*, 52:531-537, 1977.
5. BRUMPT, E. Précis de Parasitologie. 6. ed., Vol. I. Paris, Masson et Cie., 1949. 1042 p.
6. HENNER, A. apud ARAUJO, P. Fase migratória tecidual de *Ascaris suum* Goeze, 1782: estudo experimental relativo a modificações cuticulares de suas larvas. São Paulo, 1973. Tese de Livre-Docência – Instituto de Ciências Biomédicas da USP.
7. MAUNG, M. The occurrence of the second moult of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *Int. J. Parasitol.*, 8:371-378, 1978.
8. ROBERTS, F.H.S. The large roundworms of pigs, *Ascaris lumbricoides* L., 1758. The Animal Health Station, Yeerongpilly, 1934. 81 p. (Bulletin n. 81).

ARTIGAS, P. de T & UETA, M.T. Sobre a evolução de *Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758, na fase larvar endovular. **Mem. Inst. Butantan**, 51 (1): 15-24, 1989.

9. SCHACHER, J.F. A contribution to the life history and larval morphology of *Toxocara canis*. *J. Parasitol.*, 43:599-612, 1957.
10. THUST, R. Submikroskopische Untersuchungen über die Morphogenese des Integumentes von *Ascaris lumbricoides* L., 1758. *Z. Wiss. Zool., Abt. A*, 178:1-39, 1968.

TABLE 3

ABSTRACT: Eggs of *A. lumbricoides* obtained from human feces were cultured in 1% formalin/0.5% sodium hypochlorite solution at room temperature (25°C). It was observed that during the period of 10 days, larvae were formed in the egg. At 12.7 days in average, 20 larvae appeared in 10.5 days and the second molt occurred in about 18.3 days, causing the formation of infective L3 larvae, which also remained within the egg. Cultured eggs, 19 to 25 days old were then used to infect 60 young albino Swiss mice - males and females. The mice were divided in 10 groups of 6 animals, and each group was weighed daily. The infection was determined daily and the first group was infected with 10 day-old eggs. The last group (10) received 25 day-old eggs. Since the third day after infection, one individual of the group was killed each day consecutively for five days and larvae were sectioned in a parasitological laboratory. Working larvae were found in the liver and lungs only in three groups infected with eggs cultured for at least 18 days. These results showed that only the eggs which have L3 larvae are infective to the host.

KEYWORDS: *Ascaris lumbricoides*, egg development, mice.