

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
NÚCLEO DE DOENÇAS INFECCIOSAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

MAYRA CUNHA FLECHER

**INFECÇÃO DE GERBILS (*Meriones unguiculatus*) COM *Toxocara canis*:
MIGRAÇÃO DE LARVAS E ESTUDO MORFOLÓGICO COM PESQUISA
IMUNOHISTOQUÍMICA DE ANTÍGENOS DE LARVAS NAS LESÕES**

VITÓRIA
2010

MAYRA CUNHA FLECHER

**INFECÇÃO DE GERBILS (*Meriones unguiculatus*) COM *Toxocara canis*:
MIGRAÇÃO DE LARVAS E ESTUDO MORFOLÓGICO COM PESQUISA
IMUNOHISTOQUÍMICA DE ANTÍGENOS DE LARVAS NAS LESÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção de título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadores:

Prof. Dr. Carlos Musso

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

VITÓRIA

2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Flecher, Mayra Cunha, 1980-

F593i Infecção de gerbils (*Meriones unguiculatus*) com *Toxocara canis* :
migração de larvas e estudo morfológico com pesquisa
imunohistoquímica de antígenos de larvas nas lesões / Mayra Cunha
Flecher. – 2010.

90 f. : il.

Orientador: Fausto Edmundo Lima Pereira.

Co-Orientador: Carlos Musso.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito Santo,
Centro de Ciências da Saúde.

1. *Toxocara canis*. 2. Toxocaríase. 3. Gerbillinae. I. Pereira, Fausto
Edmundo Lima. II. Musso, Carlos. III. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



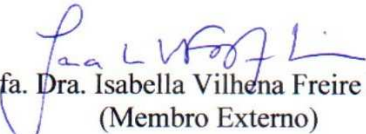
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS


PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO


A mestranda MAYRA CUNHA FLECHER, apresentou dissertação intitulada: “INFECÇÃO DE GERBILS (MERIONES UNGUICULATUS) COM *Toxocara Canis*: MIGRAÇÃO DE LARVAS E ESTUDO MORFOLÓGICO COM PESQUISA IMUNOHISTOQUÍMICA DE ANTÍGENOS DE LARVAS NAS LESÕES” em sessão pública, no dia 13 de abril de 2010, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

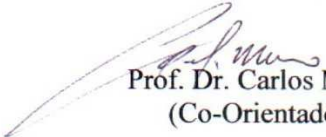
Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu, **APROVAR SEM RESTRIÇÕES**, a dissertação e habilitar a médica veterinária MAYRA CUNHA FLECHER, a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória-ES, 13 de abril de 2010


Prof. Dra. Isabella Vilhena Freire Martins
(Membro Externo)


Prof. Dra. Cinthia Furst Leroy Gomes
(Membro Interno)


Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
(Orientador)


Prof. Dr. Carlos Musso
(Co-Orientador)

DEDICATÓRIA

A meus pais que sempre me incentivaram a estudar, e me fizeram acreditar que quando gostamos de algo devemos fazê-lo com amor e dedicação pois, só assim, dará certo.

Ao meu marido que entendeu a importância da pós-graduação para minha vida profissional e me apoiou nas decisões.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Fausto que me concedeu a oportunidade de realizar o mestrado no Núcleo de Doenças Infecciosas, ensinando e orientando com muita dedicação, paciência e inteligência.

Ao professor Carlos Musso que sempre se pôs à disposição para me auxiliar a realizar procedimentos do experimento assim como, para esclarecer minhas dúvidas.

Agradeço também aos amigos que fiz durante os dois anos de mestrado no NDI, em especial a Marco André, Maria Carolina, Priscila, Thiago e Eliana que, além de me ajudarem nos procedimentos laboratoriais foram bons confidentes, tanto nos momentos alegres e descontraídos como, também, nos momentos de nervosismo e ansiedade.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação que contribuíram com o meu aprendizado durante esses dois anos de estudo.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela ajuda financeira durante a realização do mestrado.

RESUMO

Introdução. Nos últimos anos, os gerbils têm sido usados como modelo de Toxocaríase experimental, especialmente, para os estudos de lesões oculares e do Sistema Nervoso Central. **Objetivos.** Estudar a migração das larvas e as lesões, por meio de estudo imunohistoquímico, em gerbils infectados ou reinfectedados com *Toxocara canis*. **Métodos.** Gerbils foram infectados com 1.500 ovos embrionados de *T. canis* e eutanasiados 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas; 7, 15, 30 e 60 dias após a infecção. Intestino delgado e grosso, fragmentos do fígado e do encéfalo foram pressionados entre duas lâminas para a contagem de larvas, e o pulmão, digerido com solução de pepsina ácida para a contagem das larvas no sedimento. De todos os órgãos foram colhidos fragmentos, e fixados em formol tamponado para estudo histológico e imunohistoquímico das lesões, com utilização de um soro policlonal obtido em coelhos infectados com *T. canis*. Outro grupo de gerbils, previamente infectados foram reinfectedados, 30 dias após a primeira infecção, com 1.500 ou 1.000 ovos e sacrificados 4, 8, 48 e 72 horas, e 7, 15, 30 e 60 dias após a reinfecção sendo submetidos aos mesmos procedimentos dos animais com uma única infecção. **Resultados.** Os resultados mostraram que as larvas migraram nas primeiras 24 horas através do intestino delgado e ceco, a partir desse tempo elas começaram a ser observadas em grande número no fígado, apresentando concentração maior 48 horas após a infecção. Depois começaram a migrar para os pulmões e outros órgãos, reduzindo de número no fígado após uma semana de infecção, e voltando a aumentar após 15 dias, sendo ainda observadas até os 60 dias. Nos pulmões, as larvas foram abundantes após 72 horas, onde induziram grandes áreas de hemorragia, que reduziam em número progressivamente até 30 dias após a infecção. A partir de 96 horas, foram encontradas no encéfalo, onde predominaram até o fim do experimento. Nos animais reinfectedados houve um aumento na proporção de larvas contadas no fígado, em relação à primoinfecção, e redução delas no encéfalo. Nos animais que receberam uma infecção, as alterações morfológicas nos diferentes órgãos, exceto nos sistema nervoso, caracterizaram-se por inflamação discreta ou moderada com grande quantidade de eosinófilos e agregados frouxos de macrófagos e eosinófilos. No encéfalo as larvas foram observadas intactas, com reação inflamatória muito escassa. Nos animais reinfectedados, as lesões inflamatórias foram mais graves com granulomas epitelióides

bem organizados, muitos com larva no centro, inclusive com lesões graves na substância branca de cerebelo. A imunohistoquímica detectou em todos os órgãos, na infecção primária e na reinfecção, antígenos da larva nas áreas de exsudato inflamatório difuso, nos granulomas e ao redor das larvas. **Conclusão.** Os resultados mostraram que a migração das larvas no gerbil segue o padrão observado em camundongos e ratos com uma fase neurotrópica mais tardia, com concentração de larvas no sistema nervoso central. Na reinfecção há evidências de resposta imunitária adaptativa tipo TH2 (eosinofilia no exsudato inflamatório e granulomas eosinofílicos), com aumento da retenção de larvas no fígado retardando a sua chegada no encéfalo; embora os granulomas epitelióides nos animais reinfecção, às vezes, tivessem larvas no seu interior, não havia evidência de agressão a essa larvas.

Palavras-chaves: *Toxocara canis*. Toxocaraisis. Gerbils.

ABSTRACT

Introduction. In last years, the gerbils have been used as experimental model of toxocariasis, especially for studies of ocular lesions and central nervous system.

Objectives. To study the migration of larvae and lesions with immunohistochemical study in gerbils infected or re-infected with *Toxocara canis*.

Methods. Gerbils were infected with 1,500 embryonated eggs of *T. canis* and euthanized 4, 8, 12, 24, 48, 72 and 96 hours, 7, 15, 30 and 60 days after infection. Small and large intestine, liver and brain fragments were pressed between two slides for larvae counts, and lung, digested with acid pepsin solution for larvae counts in the sediment. Formalin fixed fragments of different organs were paraffin embedded for histology and immunohistochemistry, using anti-*Toxocara* polyclonal serum obtained from rabbits infected with *T. canis*. Previously infected gerbils were re-infected 30 days after the first infection, with 1,500 or 1,000 eggs and sacrificed 4, 8, 48 and 72 hours, 7, 15, 30 and 60 days after reinfection and underwent the same procedures for larvae counts and histology and immunohistochemistry studies.

Results. *Toxocara* larvae migrate within the first 24 hours through the small intestine and cecum; from that time they began to be observed in large numbers in the liver, reaching higher number at 48 hours after infection. Then they began to migrate to the lungs and other organs, decreasing the number in the liver after a week of infection, and increased again after 15 days, and still observed until 60 days. In the lungs, the larvae were abundant after 72 hours, which induced large areas of hemorrhage, and were reduced progressively until 30 days after infection. After 96 hours, larvae start to be found in the brain, where the larval burden increased progressively until the end of the experiment. In re-infected animals was an increase in the proportion of larvae counted in the liver in relation to the first infection, and reduction in the brain, at the same times post infection. In animals that received one infection, the morphological changes in various organs, except in the nervous system, characterized by mild or moderate inflammation with large numbers of eosinophils and loose aggregates of macrophages and eosinophils. In the brain larvae were found intact, with scarce or absent inflammatory reaction. In re-infected animals, inflammatory lesions were more severe in all organs, with well organized epithelioid granulomas, with or without larva. Central nervous system lesions were severe, mainly injury in the white matter and Purkinje cells of cerebellum. Immunohistochemistry detected in all organs from all

animals larval antigens in areas of diffuse inflammatory exudates, in granulomas and around intact larvae. **Conclusion.** The results showed that the *Toxocara canis* larval migration pattern in gerbils is similar to that described in mice and rats, with a neurotropic later stage, leading to concentration of larvae in the central nervous system. Lesions observed after reinfection showed evidence of a TH2 type adaptive immune response (eosinophils in the exsudate and epithelioid eosinophilic granulomas) that would be in relationship with retention of larvae in the liver, delaying their arrival to the brain. Although larvae were sometimes found inside epithelioid granulomas, there was not evidence that larvae were injured by inflammatory cells.

Keywords: *Toxocara canis*. Toxocariasis. Gerbils

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Número médio de larvas de <i>T. canis</i> contadas nos órgãos dos gerbils após infecção com 1.500 ovos	46
Figura 2 -	Porcentagem média de larvas <i>T. canis</i> contadas nos órgãos dos gerbils após infecção com 1.500 ovos	46
Figura 3 -	Número médio de larvas de <i>T. canis</i> contadas nos órgãos dos gerbils após reinfecção com 1.000 e 1.500 ovos	49
Figura 4 -	Porcentagem média de larvas <i>T. canis</i> contadas nos órgãos dos gerbils após reinfecção com 1.000 e 1.500 ovos	50
Figura 5 -	Exame direto de fragmentos do fígado pressionado entre duas lâminas após primoinfecção e reinfecção de gerbils com 1.500 ovos.....	50
Figura 6 -	Lesões macroscópicas nos pulmões em diferentes tempos após infecção de gerbils com 1.500 ovos	52
Figura 7 -	Lesões microscópicas no intestino e nos pulmões em diferentes tempos após primoinfecção de gerbils com 1.500 ovos larvados	53
Figura 8 -	Lesões microscópicas no fígado em diferentes tempos após primoinfecção de gerbils com 1.500 ovos larvados	55
Figura 9 -	Lesões macroscópicas nos rins em diferentes tempos após primoinfecção de gerbils com 1.500 ovos larvados.....	56
Figura 10 -	Lesões microscópicas nos rins, encéfalo e coração em diferentes tempos após primoinfecção de gerbils com 1.500 ovos larvados	58
Figura 11 -	Lesões microscópicas nos olhos e músculo esquelético em diferentes tempos após primoinfecção de gerbils com 1.500 ovos larvados	60
Figura 12 -	Lesões microscópicas no intestino, pulmões, fígado, rim encéfalo em diferentes tempos após reinfecção de gerbils com 1.000 e 1.500 ovos larvados	64
Figura 13 -	Lesões microscópicas no encéfalo, coração e músculo esquelético em diferentes tempos após reinfecção de gerbils com 1.000 e 1.500 ovos larvados	67
Figura 14 -	Reação imunohistoquímica nos cortes de órgãos em diferentes tempos após a primoinfecção e reinfecção de gerbils com 1.000 e 1.500 ovos larvados	70
Figura 15 -	Reação imunohistoquímica nos cortes de órgãos em diferentes tempos após a reinfecção de gerbils com 1.000 e 1.500 ovos	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NÚMERO MÉDIO (RELATIVO E ABSOLUTO) DE LARVAS DE <i>T. canis</i> CONTADAS EM GERBILS DE 4 A 96 HORAS APÓS A PRIMÓINFECÇÃO COM 1.500 OVOS	45
TABELA 2 - NÚMERO MÉDIO (RELATIVO E ABSOLUTO) DE LARVAS DE <i>T. canis</i> CONTADAS EM GERBILS SETE, 15, 30 E 60 DIAS APÓS A INFECÇÃO COM 1.500 OVOS	47
TABELA 3 - NÚMERO MÉDIO (RELATIVO E ABSOLUTO) DE LARVAS DE <i>T. canis</i> CONTADAS EM GERBILS DE QUATRO, OITO, 48 E 72 HORAS; SETE, 15, 30 E 60 DIAS APÓS A REINFECÇÃO COM 1.500 e 1.000 OVOS	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 INFORMAÇÕES HISTÓRICAS DO <i>Toxocara canis</i>	18
2.2 CICLO DE VIDA DO <i>Toxocara canis</i>	19
2.2.1 Infecção natural de canídeo	19
2.2.1.1 Infecção natural de canídeos por ingestão de ovos com larva infectante	19
2.2.1.2 Infecção de canídeos por ingestão de larva em tecidos de hospedeiros paratênicos	20
2.2.1.3 Infecção de canídeos por via transplacentária	20
2.2.1.4 Infecção de canídeos através da amamentação	21
2.2.2 Infecção natural de hospedeiros paratênicos	21
2.3 ESTUDOS EXPERIMENTAIS SOBRE A MIGRAÇÃO DA LARVA DE <i>Toxocara canis</i> EM HOSPEDEIROS PARATÊNICOS	22
2.4 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS NOS ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM <i>Toxocara canis</i>	31
2.4.1 Intestino	31
2.4.2 Fígado	31
2.4.3 Pulmões	32
2.4.4 Musculatura esquelética	33
2.4.5 Encéfalo e olhos	33
2.4.6 Outros órgãos	34
2.5 LESÕES EM ANIMAIS SUBMETIDOS À REINFECÇÃO	35
2.6 DETECÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE ANTÍGENOS DE <i>Toxocara</i> NOS TECIDOS	36
3 OBJETIVOS	37

4 METODOLOGIA	38
4.1 COLETA DE OVOS DE <i>Toxocara canis</i>	38
4.2 PREPARAÇÃO DOS OVOS PARA INFECÇÃO DOS GERBILS	38
4.3 MIGRAÇÃO DAS LARVAS DE QUATRO A 96 HORAS APÓS A PRIMOINFECÇÃO	39
4.3.1 Contagem de larva na luz do intestino	39
4.3.2 Contagem de larva na parede do intestino delgado, ceco e intestino grosso	40
4.3.3 Contagem de larvas no fígado e encéfalo	40
4.3.4 Contagem de larvas no pulmões	40
4.3.5 Pesquisa de larvas nos olhos	41
4.4 MIGRAÇÃO DAS LARVAS ENTRE SETE, 15, 30 E 60 DIAS APÓS A PRIMOINFECÇÃO	41
4.5 MIGRAÇÃO DAS LARVAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS À REINFECÇÃO	41
4.6 ESTUDO HISTOLÓGICO DOS DIFERENTES ÓRGÃOS	42
4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE LARVAS E DE ANTÍGENOS DE LARVA	42
4.7.1 Obtenção do soro policlonal anti-<i>Toxocara</i>	42
4.7.2 Método imunohistoquímico	43
5 RESULTADOS	44
5.1 MIGRAÇÃO DE LARVAS DE <i>Toxocara canis</i> ENTRE QUATRO E 96 HORAS APÓS A PRIMOINFECÇÃO	44
5.2 MIGRAÇÃO DAS LARVAS DE <i>Toxocara canis</i> NOS DIAS SETE, 15, 30 E 60 APÓS A PRIMOINFECÇÃO	47
5.3 MIGRAÇÃO DAS LARVAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS À REINFECÇÃO 30 DIAS APÓS A PRIMOINFECÇÃO	48
5.3.1 Animais eutanasiados quatro, oito, 48 e 72 horas; sete, 15, 30 e 60 dias após a reinfecção	51
5.3.2 Animais eutanasiados 96 horas após a reinfecção	51
5.4 ANATOMIA PATOLÓGICA DAS LESÕES DE GERBILS PRIMOINFECTADOS COM OVOS DE <i>Toxocara canis</i>	51

5.4.1	Intestino	51
5.4.2	Pulmões	51
5.4.3	Fígado	54
5.4.4	Rins	56
5.4.5	Encéfalo	57
5.4.6	Coração	57
5.4.7	Olhos e estruturas adjacentes	59
5.4.8	Músculo esquelético	59
5.5	ANATOMIA PATOLÓGICA DAS LESÕES DE GERBILS REINFECTADOS COM OVOS DE <i>Toxocara canis</i> 30 DIAS APÓS A PRIMOINFECÇÃO	61
5.5.1	Intestino	61
5.5.2	Pulmões	61
5.5.3	Fígado	62
5.5.4	Rins	62
5.5.5	Encéfalo	63
5.5.6	Coração	65
5.5.7	Olhos e estruturas adjacentes	65
5.5.8	Musculatura esquelética	65
5.6	DETECÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE ANTÍGENOS DE <i>Toxocara canis</i> NA PRIMOINFECÇÃO	68
5.6.1	Intestino	68
5.6.2	Pulmões	68
5.6.3	Fígado	68
5.6.4	Rins	69
5.6.5	Encéfalo	69

5.6.6	Coração	69
5.6.7	Olhos	69
5.7	DETECÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE ANTÍGENOS DE <i>Toxocara canis</i> NA REINFECÇÃO	71
5.7.1	Intestino	71
5.7.2	Pulmões	71
5.7.3	Fígado	71
5.7.4	Rins	72
5.7.5	Encéfalo	72
5.7.6	Coração	72
5.7.7	Olhos	72
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O *Toxocara canis* é um nematódeo intestinal de cães amplamente distribuído em todo o mundo. Mamíferos e aves podem ser hospedeiros paratênicos após a ingestão dos ovos de *T. canis* e por meio de ingestão de vísceras, principalmente fígado e músculos, que contenham a larva do parasita (URQUHART et al, 1998; BOWMAN et al, 2006). No homem, especialmente em crianças, após a ingestão acidental de ovos larvados e sua eclosão no intestino, as larvas migram para vários órgãos podendo causar quadros clínicos variáveis, classificados como: a) Toxocaríase Sistêmica que pode ser do tipo larva migrans visceral clássica ou incompleta; b) Toxocaríase Compartimentalizada, incluindo a larva migrans neurológica e larva migrans ocular; c) Toxocaríase Oculta ou Encoberta; d) Infecção Assintomática (PAWLOWSKI, 2001).

Nos hospedeiros paratênicos, após a ingestão dos ovos, as larvas liberadas penetram a parede do intestino delgado, ganham a circulação sanguínea e linfática, localizando-se no fígado para, em seguida, localizarem-se nos pulmões e, posteriormente, nos músculos e no encéfalo. Em camundongos e ratos, uma fase com predomínio de larvas no fígado e nos pulmões é seguida de uma fase miotrópica-neurotrópica, com localização nos músculos esqueléticos e sistema nervoso central. Em outras espécies pode haver variação na temporalidade da localização das larvas: por exemplo, em galinhas, elas permanecem longo tempo no fígado.

O estudo histológico em modelos experimentais, principalmente em camundongos e ratos, demonstram que durante a primeira semana após uma infecção primária, as larvas induzem uma reação inflamatória discreta, com presença de eosinófilos no exsudato, geralmente ao longo do seu trajeto. À medida que o tempo passa, essa inflamação no trajeto aumenta com formação de granulomas eosinofílicos que após quatro semanas podem ter aspecto de granulomas epitelióides, com eosinófilos, típicos de granulomas do tipo Th2. Alguns podem apresentar necrose eosinofílica central. Há desenvolvimento progressivo de eosinofilia periférica, e como visto em alguns experimentos, eosinofilia no lavado broncoalveolar. O aspecto histológico nos tecidos onde as larvas migram e a

eosinofilia periférica são compatíveis com o desenvolvimento de resposta imunitária adaptativa, do tipo Th2.

Vários animais têm sido utilizados para estudos experimentais sobre migração das larvas do *Toxocara canis*, sobre as lesões induzidas pela presença das larvas nos tecidos, e menos frequentemente, sobre algumas manifestações decorrentes da presença dessas migrando nos tecidos. Como será visto na revisão de literatura, camundongos são os hospedeiros paratênicos mais frequentemente utilizados. No entanto, ratos, coelhos, porcos, cobaias, galinhas, ovelhas e gerbils também têm sido usados em experimentos.

Nos últimos anos, os gerbils têm sido utilizados como modelo experimental para estudos de Toxocaríase ocular e do sistema nervoso central, pela frequência com que apresentam lesões oculares e neurológicas após a infecção. (TAKAYANAGI et al, 1999; ALBA-HURTADO et al, 2000; ZANANDRÉA et al, 2008; AKAO et al., 2003). Como existem poucos relatos sobre a migração larvar, sobre as lesões que acompanham as larvas migrantes nos tecidos e, especialmente, sobre o comportamento dos animais na reinfecção, planejou-se esta investigação com o objetivo de estudar a migração das larvas do *Toxocara canis* em gerbils, com estudo histológico e imunohistoquímico dos diferentes órgãos em animais que receberam uma infecção ou foram reinfectedados 30 dias após a primeira infecção.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFORMAÇÕES HISTÓRICAS DO *Toxocara canis*

No século XIX duas espécies de nematódeos ascaridóides que ocorriam em cães e gatos eram nomeadas de *Ascaris marginata* em cães e *Ascaris mystax* em gatos. Henring, em 1873 (apud SPRENT, 1958), concluiu que cães com menos de seis meses de idade, usualmente, abrigavam *A. marginata*, e cães mais velhos eram menos infectados. A identificação original do parasita, agora conhecido como *Toxocara canis*, é atribuída a Werner, em 1782. Entretanto, o ciclo evolutivo desse parasita somente foi estudado por Sprent em 1958 que em 1956 reviu a nomenclatura dos parasitas e esclareceu que as duas espécies que ocorriam em cães eram *Toxascaris leonina* e *Toxocara canis* (SPRENT, 1958).

A infecção humana com larvas de *Toxocara* foi evidenciada pela primeira vez por Wilder, em 1950, que observou larvas de *Toxocara canis* em lesões oculares de pacientes com endoftalmite e retinoblastoma. Posteriormente, Beaver, Snyder, Carrera, Dent e Lafferty, detectaram larvas de *Toxocara canis* em biópsias de três crianças com eosinofilia e estabeleceram que o homem também poderia ser hospedeiro do *Toxocara canis*, cujas larvas migrantes nos tecidos dariam origem ao quadro conhecido como larva migrans visceral, expressão usada em contraposição a já conhecida larva migrans cutânea (BEAVER et al, 1952). Embora extremamente improvável, foi mencionada a possibilidade da infecção de humanos com *T. canis* adultos pela ingestão de larvas de estágio avançado ou a partir de fezes de filhotes ou cães jovens (Bissure et al, 1966 apud BEAVER, 1969, p. 4).

O gênero *Toxocara* é um dos maiores na família Ascaridae, e o *Toxocara canis* e o *Toxocara cati* estão entre os parasitos mais comumente encontrados em cães e gatos, respectivamente (FOREYT, 2005; BOWMAN et al, 2006).

2.2. CICLO DE VIDA DO *Toxocara canis*

Toxocara canis adulto vive no intestino delgado dos mamíferos hospedeiros naturais (canídeos). O tamanho do parasita varia segundo os autores, podendo a

fêmea alcançar até dez (URQUHART et al, 1998), 15 (BOWMAN et al, 2006) ou 18 cm (REY, 2008) centímetros de comprimento, sendo o macho menor que a fêmea. Os vermes possuem três grandes lábios e um bulbo esofágico glandular localizado na junção do esôfago com o intestino (BOWMAN et al, 2006; REY, 2008). Os machos apresentam um processo digitiforme na cauda, o que o diferencia do *Toxascaris leonina* (URQUHART et al, 1998). As fêmeas produzem dois milhões de ovos por dia, entre a sétima e 28ª semana de vida (REY, 2008), que após serem eliminados e maturarem em temperaturas ideais por quatro semanas, são infectantes para cães e outros animais, inclusive o homem (URQUHART et al, 1998; BOWMAN et al, 2006). As larvas do *T. canis* presentes dentro dos ovos realizam duas ecdises, quando então se tornam infectantes, estando no terceiro estágio no momento em que são ingeridas, saem dos ovos e penetram a mucosa intestinal (ARAÚJO, 1972). Nenhuma evidência foi encontrada em camundongos infectados, experimentalmente, que as larvas cresçam ou sofram diferenciação, com exceção de leve desenvolvimento de células excretoras. Elas apresentam o comprimento médio de 357 a 445 micrômetros e largura média de 18 a 20 micrômetros, em tecido de camundongos infectados, experimentalmente, de 24 horas a 180 dias. (NICHOLS, 1956).

2.2.1. Infecção natural de canídeos

2.2.1.1. Infecção natural de canídeos por ingestão de ovos com larva infectante

Nos cães, após a ingestão e a eclosão dos ovos no intestino delgado, a larva infectante (L3) segue pela circulação sanguínea e, via fígado, para os pulmões. Nos animais mais jovens as larvas migram em maior quantidade para os pulmões de onde, via traquéia, chegam ao tubo digestivo. Um menor número de larvas pode se localizar em outros tecidos. Em animais adultos, as larvas tendem a permanecer na circulação e migram para os tecidos somáticos. A direção tomada no alvéolo é decisiva para determinar se a larva irá prosseguir em uma migração traqueal, se será deglutida, indo para os intestinos, com subsequente desenvolvimento até à maturidade sexual ou, em uma migração somática para permanecer como larva infectante nos tecidos do cão. Nos cães com mais de três meses, a migração

pulmão/traquéia é mais rara e, após seis meses quase cessa (GLICKMAN E SCHANTZ, 1981; KAYES, 1997; URQUHART et al, 1998; BOWMAN et al, 2006).

Fêmeas que transmitiram o parasita para os filhotes podem manter a infecção ao ingerirem ovos do parasita quando limpam os filhotes lambendo sua pele, onde ficam os ovos que foram eliminados com as fezes dos cães infectados (BEAVER, 1969; KAYES, 1997).

2.2.1.2 Infecção de canídeos por ingestão de larva em tecidos de hospedeiros paratênicos

Os hospedeiros definitivos podem se infectar pela ingestão de larvas contidas nos tecidos de hospedeiros paratênicos, que completam o ciclo (BEAVER, 1969; DESPOMMIER, 2003). Verocai (2008) estabeleceu a infecção patente de cães a partir da administração de larvas de *T. canis* recuperadas de tecidos de camundongos experimentalmente infectados. Este autor observou que o período pré-patente foi atingido em média com 41 dias, nos cães que receberam 60 ovos larvados e 48 dias após a infecção, nos que receberam 300 ovos larvados. Parasitas adultos foram recuperados, nas fezes, 39 dias após a infecção (Verocai, 2008).

2.2.1.3. Infecção de canídeos por via transplacentária

Fulleborn, em 1921(apud SPRENT, 1958, p.185) demonstrou que filhotes nascidos de cadelas infectadas durante a gestação por injeção subcutânea de larvas de *T. canis*, mostravam-se altamente infectados ao nascer. Logo após o nascimento, as larvas eram encontradas no fígado e pulmões; no segundo dia de vida eram vistas larvas móveis nos pulmões e nos intestinos; com seis dias as larvas apresentavam quatro milímetros de comprimento e aos 16 dias, 20 a 30 milímetros. Naturalmente, a infecção transplacentária da prole se faz a partir de larvas originadas de ovos ingeridos durante a gestação e que migraram diretamente para a placenta (SPRENT, 1958) ou, através de larvas dormentes existentes antes da gestação especialmente nos músculos, e que foram reativadas, provavelmente, por ação dos esteróides sexuais aumentados na gravidez (BEAVER, 1969; WEBSTER, 1958; KAYES, 1997; URQUHART et al, 1998). Admite-se que a mobilização de larvas adquiridas antes da gestação ocorra cerca de três semanas antes do parto, quando migram para o feto e se localizam, principalmente, no fígado, indo para os

pulmões exatamente antes do parto (GLICKMAN E SCHANTZ, 1981; URQUHART et al, 1998). No cão, o ciclo se completa quando as larvas seguem para o intestino delgado e ocorrem as mudas finais. A cadela, uma vez infectada, usualmente abriga larvas suficientes para infectar todas as ninhadas subsequentes (URQUHART et al, 1998).

2.2.1.4. Infecção de canídeos através da amamentação

O cão lactente também pode infectar-se por ingestão da L₃ excretadas no leite durante as três primeiras semanas de lactação (URQUHART et al, 1998), com pico na segunda semana (GLICKMAN E SCHANTZ, 1981). No entanto, essas larvas ingeridas com o leite não migram no filhote após a infecção, sofrendo as mudas e originando os vermes adultos no intestino (URQUHART et al, 1998).

2.2.2 Infecção natural de hospedeiros paratênicos

Os ovos de *T. canis* podem também ser ingeridos por diferentes mamíferos, incluindo o homem, camundongos, ratos, macacos, ovinos e suínos dentre outros, e por aves, onde o parasita não completa o ciclo. Nesses hospedeiros as larvas penetram a parede do intestino delgado e, através da veia porta, vão para o fígado e pulmões, e usualmente seguem para outros tecidos do corpo (WOODRUFF, 1970). Sprent em 1955 (apud WOODRUFF, 1970) deduziu que o tamanho e o formato do corpo da larva determinavam em que vaso sanguíneo ela iria entrar. Uma vez nos vasos sanguíneos, a larva os deixam no ponto em que a luz se estreita, o que é indicado pela ocorrência de hemorragias (WOODRUFF, 1970). Apesar de Araújo (1972) comprovar, experimentalmente, que as larvas infectantes são de terceiro estágio, alguns autores admitem que existe controvérsia quanto ao seu estágio infectante (DESPOMMIER, 2003). Hospedeiros paratênicos também podem se infectar através do ato de canibalismo predatório. Esse meio de transmissão foi reproduzido, experimentalmente, em camundongos com a administração de fígado de porcos infectados com larvas de *T. canis* (SASMAL, ACHARYA E LAHA, 2008).

2.3 ESTUDOS EXPERIMENTAIS SOBRE A MIGRAÇÃO DA LARVA DE *Toxocara canis* EM HOSPEDEIROS PARATÊNICOS

Muitas espécies animais como macacos, porcos, galinhas, ratos, gerbils e, principalmente, camundongos têm sido utilizadas como modelo experimental para toxocaríase.

Macacos. A primeira observação sobre larva migrante do *T. canis* em macacos foi feita por Aljeboori, Stout e Ivey (1970) que infectaram 10 macacos baboons de dois a seis anos com um, cinco, dez e 20 ovos por grama de peso. Os animais foram reinfectados doze ou 16 semanas depois com a mesma dose. Esse estudo foi prejudicado devido a uma epidemia de tuberculose nos animais em experimentação e a maioria morreu entre os dias 13 e 32 após a reinfecção. Os autores relataram o achado de larvas no fígado, pulmões, cérebro e coração, quando descreveram granulomas com ou sem necrose, alguns com fibrose encapsulando larvas.

Glickman e Summers (1983) inocularam *Macaca fascicularis* (Macaca mulata) com 45.000 ovos de *T. canis* em dose única ou em três aplicações, observando os animais durante sete meses. Relataram o aparecimento de manifestações neurológicas (ataxia e nistagmo) em três animais. Não observaram lesões no globo ocular, nem anticorpos nos humores vítreo ou aquoso. Chamam a atenção para a hepatite granulomatosa, com granulomas epitelióides e eosinofílicos, também encontrados no sistema nervoso central.

A infecção de macacos, especialmente macacos Rhesus, tem sido usada para estudo de lesões oculares observando-se que, nas infecções com ovos larvados, essas lesões estão geralmente ausentes, e a sorologia é negativa nos humores aquoso e vítreo. No entanto, as inoculações de larvas por via arterial (carótida) ou intravítrea induzem lesões hemorrágicas e inflamatórias, com formação de granulomas que podem ser facilmente observados com oftalmoscopia. Relatou-se a presença de larvas móveis, sem reação inflamatória, até 15 meses após a inoculação intraocular ou por via carotídea (LUXENBERG, 1979; WATZKE, OAKS E FOLK, 1984)

Porcos. Helwigh, Lind e Nansen (1999), Taira et al (2003), e Sommerfelt et al (2004) inocularam 24, 70 e 18 porcos com 60.000, 50.000 e 100.000 ovos de *T.*

canis, respectivamente. Os animais foram sacrificados a partir do sétimo dia de infecção e foram obtidos resultados semelhantes nos três experimentos. A migração inicial foi detectada nos linfonodos mesentéricos no sétimo dia, sendo a primeira barreira no caminho das larvas; em seguida no fígado, sempre em menor quantidade que as encontradas nos linfonodos e pulmões. Nesses, as larvas foram recuperadas entre uma a três semanas após a infecção com um pico duas semanas; e, no cérebro, a partir de duas semanas após a infecção.

Sasmal, Acharya e Laha (2008) infectaram leitões (três dias de idade) com 50.000 ovos embrionados por via oral que foram eutanasiados nos dias um, três, sete, 15 e 30 após a infecção. Encontraram nas primeiras 24 horas maior quantidade de larvas na parede intestinal e em seguida no fígado e linfonodos mesentéricos; do dia três ao dia 30 após a infecção a quantidade de larvas recuperadas era maior no fígado, seguida pelos pulmões. Larvas nos músculos peitoral e da perna começaram a ser recuperadas a partir dos dias sete e 15, respectivamente, e no cérebro, a partir do dia sete, aumentando até o fim do experimento. Nesse mesmo experimento, camundongos foram alimentados com 5g de fígado dos porcos infectados que foram sacrificados no dia 15 após a infecção, quando a concentração de larva no fígado era maior. No dia dez após a infecção os camundongos foram eutanasiados e os órgãos foram examinados para a contagem de larvas, que foram encontradas no fígado, pulmões, coração, encéfalo e músculos, também com maior quantidade no fígado (SASMAL, ACHARYA e LAHA, 2008).

Em porcos, as larvas de *T. canis* são encontradas, inicialmente, em intestino e linfonodos mesentéricos, seguindo para o fígado e, posteriormente, para a musculatura e encéfalo, onde podem permanecer por longo período. Nessa espécie, encontra-se a maior quantidade de larvas nos linfonodos mesentéricos. Esses animais podem adquirir *T. canis*, naturalmente, e transmitir larvas infectantes para outros hospedeiros paratênicos como, camundongos e humanos, se esses ingerirem carne crua ou mal cozida.

Galinhas. Galvin (1964) infectou galinhas de quatro semanas de idade com 2.000 ovos embrionados e examinou somente o fígado dos animais entre 18 horas e 99 dias após a infecção observando que durante todo esse período era alta a quantidade de larvas encontradas no órgão. Posteriormente, galinhas e porcos

jovens foram infectados com 1.500 ovos e a eutanásia foi feita entre 16 horas e 142 dias após a infecção, quando todos os órgãos foram examinados. Até o fim do experimento a quantidade de larvas no fígado se mantinha alta. Nos pulmões as larvas foram encontradas em quantidade significativa nos primeiros quatro dias, seguidos pela musculatura, onde era visível até o dia 34; também algumas larvas foram vistas nos rins; no encéfalo, elas começaram a aparecer no segundo dia após a infecção, mas sempre em pequena quantidade.

Maruyama et al (1994) inocularam 1.500 ovos em galinhas e as sacrificaram nos dias um, três, seis, dez, 30 e 50. As larvas foram recuperadas, principalmente, no fígado e no músculo peitoral profundo. No fígado, a quantidade de larvas recuperadas se manteve alta em todos os dias, apresentando maior quantidade no dia um e, menor, no dia seis após a infecção. Lesões macroscópicas com pequenos pontos brancos foram detectadas no fígado a partir do dia seis após a infecção, mas desde o primeiro dia já se observava, microscopicamente, infiltração de linfócitos e com dez dias, nódulos granulomatosos com predomínio de linfócitos.

Taira, Permin e Kapel (2003), inocularam galinhas com 5.000, 10.000 e 20.000 ovos embrionados que foram sacrificadas nos dias um, três, e seis após a infecção. Na necropsia foram vistas petéquias e pontos brancos no fígado, e petéquias nos pulmões em todos os dias; no músculo peitoral também foram vistos de dois a onze pontos brancos. Na recuperação das larvas, mais de 87% estavam distribuídas no fígado e pulmões. No dia um as larvas predominavam no fígado, de onde migravam para os pulmões no terceiro dia após a infecção, quando aumentava o número de larvas nesse órgão. Porém, no dia seis o número de larvas no fígado voltava a aumentar, sugerindo que muitas delas retornavam ao órgão.

Como a quantidade de larvas de *T. canis* permanece alta no fígado de galinhas por longo tempo, a ingestão de fígado cru ou mal cozido proveniente de galinhas infectadas (e provavelmente de outras aves, como perus) é um dos meios da infecção de humanos, especialmente adultos, com o parasita (MARUYAMA, et al 1994; TAIRA, PERMIN E KAPEL, 2003).

Camundongos. Smith e Beaver (1953) administraram 200 ovos de *T. canis* a 15 camundongos que foram eutanasiados em vários intervalos até um ano após a infecção. Camundongos eutanasiados em duas semanas mostraram grande

quantidade de larvas no fígado, pulmões e rins. Entretanto, os eutanasiados de um a seis meses após a infecção, apresentavam a maior parte das larvas no encéfalo e na musculatura. Camundongos eutanasiados com dez meses apresentavam a maioria das larvas no cérebro.

Burren (1968) administrou 2.000 ovos embrionados via oral, em camundongos de cinco a sete semanas de idade, sacrificando-os em intervalos de quatro horas, no período de uma a 72 horas após a infecção. Larvas foram recuperadas de uma a 32 horas da parede intestinal, de 16 a 48 horas em linfonodos mesentéricos e veia porta, de 16 a 60 horas no fígado, de 40 a 72 horas nos pulmões e de dois a 28 dias no encéfalo.

Burren (1971) administrou 1.000 ovos em camundongos que foram eutanasiados em intervalos de dois ou três dias a partir do dia dois ao dia 44 (104 camundongos), e do dia 119 ao dia 138 (42 camundongos), após a infecção. Em um total de 146 camundongos, todos tinham larvas no encéfalo e oito animais tinham larvas nos olhos (sete tinham uma larva em um olho e um, duas larvas). As larvas foram encontradas no cérebro, em número crescente, até o dia sete, e esse número permaneceu até o dia 44. Isso sugere que a migração das larvas nos hemisférios cerebrais é marcante de sete a 44 dias após a infecção. Em infecções antigas (119 a 138 dias), a migração parece ser reduzida.

Sugane e Oshima (1983) infectaram camundongos BALB/c-nu/+ com 500 ovos e, após seis semanas, reinfetaram-nos com o mesmo número de ovos. O número de larvas foi determinado nos órgãos dois, quatro e seis semanas após a reinfecção. Mais de 50% das larvas foram recuperadas no fígado de camundongos BALB/c-nu/+ reinfetados, e o número de larvas no encéfalo e no músculo esquelético após a reinfecção foi menor que o dos animais submetidos apenas à infecção primária, sugerindo que grande número de larvas ficaram aprisionadas no fígado. Também observou-se que camundongos BALB/c-nu/nu (atímicos) reinfetados apresentavam maior número de larvas no encéfalo e no músculo esquelético que os BALB/c-nu/+, indicando que a retenção das larvas no fígado pode ser T dependente.

Abo-Shehada, Al-Zubaidy e Herbert (1984), infectaram 22 camundongos de três meses de idade, com 5.000 ovos contendo larvas infectantes, e a cada hora dois camundongos foram eutanasiados até oito horas após a infecção e, também 14, 16 e 24 horas após. Uma hora depois, larvas foram encontradas no estômago, duas

horas após, no intestino delgado e, com três horas tinham alcançado o ceco. A maior quantidade de larvas foi encontrada no intestino delgado por volta de quatro a seis horas, e declinou a partir de 16 horas. Elas penetravam na parede de todo o intestino delgado, mas principalmente no íleo, com pico de quatro a oito horas após a infecção, reduzindo depois de 24 horas. A larva penetra entre as vilosidades, via cripta de Lieberkuhn, causando um pequeno orifício na parede intestinal. Algumas foram vistas penetrando em vasos linfáticos da submucosa, e um grande número foi observado nas placas de Peyer, de quatro a nove horas após a infecção; nos linfonodos mesentéricos foram observadas larvas nos primeiros dois dias da infecção.

Abo-Shehada e Herbert (1984) inocularam 50 camundongos de três meses de idade com 2.000 ovos e os eutanasiaram nos dias dois, três, seis, oito, 16, 35, 60, 90 e 120 após a infecção. Foram recuperadas larvas no fígado e pulmões no segundo e terceiro dia após a infecção e, a partir do sétimo dia, elas foram recuperadas no cérebro e na musculatura. Os animais eutanasiados de oito a 120 dias não apresentaram diferença significativa na recuperação das larvas na musculatura e encéfalo. Os autores concluíram que a fase visceral termina na primeira semana quando começa a fase miotrópica-neurotrópica.

Parsons e Grieve (1990) inocularam 36 camundongos com 125 ovos larvados de *T. canis* e após 28 dias os reinfetaram, com 500 ovos, infectando no mesmo momento camundongos controle que havia recebido somente salina no dia zero. Todos foram eutanasiados nos dias zero, um, dois, três, cinco e seis após a última infecção. Camundongos controle tiveram recuperação larvar em conteúdo intestinal de doze a 24 horas após a infecção, na parede intestinal de um a dois dias, no fígado o pico de contagem de larvas foi no primeiro dia, caindo gradualmente até o dia seis, e nesse período de cinco e seis dias a quantidade larvas no músculo esquelético aumentou. No encéfalo o início de aparecimento das larvas foi no terceiro dia, com pico no dia seis após a infecção (final da observação). Os camundongos reinfetados apresentaram um pico de recuperação das larvas no fígado no terceiro dia, mas o a contagem larvar foi maior quando comparado aos animais que receberam apenas uma inoculação e se manteve maior até o sexto dia. Foi observado que a retenção larvar no fígado começou com menos de cinco dias. Nesse mesmo experimento, dois grupos de camundongos receberam 125 ovos

infectantes e outro recebeu água; após 28 dias o grupo teste e o grupo que recebeu água (controle da reinfecção) foram inoculados com 500 ovos infectantes. Foi observado que a quantidade de larvas recuperadas no fígado dos animais reinfectados (grupo teste) foi muito maior que nos outros grupos controles no período de quatro a 16 semanas, mas essa diferença não ocorreu no encéfalo e musculatura esquelética. Desta forma, a retenção de larvas no fígado não protege o encéfalo e os músculos de camundongos sensibilizados e não houve nenhuma evidência de que a retenção de larvas resulte em morte larvar.

Abdo-Shehada, Al- Zubaidy e Herbert (1991) inocularam 1000 ovos embrionados em camundongos que foram reinfectados sete dias depois com a mesma dose; e inocularam 2000 ovos em outro grupo que não foi reinfectado. Todos os animais foram eutanasiados no dia 16. Os animais reinfectados apresentavam um significativo aumento no número de larvas retidas no fígado e uma significativa diminuição de larvas recuperadas no encéfalo.

Bradón, Cuéllar e Guillén (1994) inocularam 20 camundongos com 1000 ovos de *T. canis*, que foram eutanasiado no dia 63 e um ano após a infecção. Com 63 dias a maior parte das larvas foi encontrada no encéfalo, seguido da musculatura; raras larvas foram vistas em pulmão e fígado. Após um ano da infecção a maior quantidade de larvas também foi encontrada no encéfalo e musculatura. Entretanto, a porcentagem de larvas recuperadas na carcaça diminuiu discretamente e aumentou no encéfalo. Esse estudo indicou que no camundongo Balb/c o estabelecimento de larvas de *T. canis* nos órgãos, onde elas permanecem sem migrar para outros tecidos, é definitivo por volta da nona semana após a infecção.

Epe et al (1994) infectaram 40 camundongos com 1.000 ovos embrionados de *T. canis* que foram eutanasiados quatro, oito, doze, 17 e 21 semanas após a infecção. Em todas as semanas as larvas foram recuperadas, em maior quantidade, no encéfalo e na musculatura.

Farjat et al (1995) infectaram camundongos com 50, 100, 200 e 2000 ovos de *T. canis* e observaram que as larvas chegavam ao fígado entre dez e 15 horas e aos pulmões entre 26 e 32 horas após a infecção, com pico de recuperação nos dois órgãos em 48 horas; após esse período ocorreu uma diminuição gradativa na recuperação das larvas. Nos grupos infectados com 200 e 2.000 ovos ocorreu um novo aumento de recuperação das larvas por volta de 504 horas (21 dias) no fígado

e nos pulmões, que pode ser explicado por uma redistribuição dessas nos camundongos. Em animais infectados com 2.000 ovos a recuperação das larvas iniciou-se com 192 horas (oito dias) após a infecção e os infectados com 200 e 100 ovos a recuperação das larvas foi mais tardia 336 horas (14 dias).

Guardis et al (2002) infectaram 150 camundongos com 250 ovos embrionados e depois de 48 horas os animais foram sacrificados. A partir de quatro dias de infecção larvas foram encontradas no encéfalo, e a partir de 12 dias foram encontradas nos olhos, mantendo a positividade até o final do experimento (dia 60). A contagem das larvas era, significativamente, maior no encéfalo que nos globos oculares.

Pecinali et al (2005) infectaram 80 camundongos com 1.000 ovos de *T. canis* embrionados e observaram que nos dias um e quatro, após a infecção, as larvas predominavam no fígado, pulmões e rins, nesse último, sempre em menor quantidade. No sétimo dia as larvas foram contadas no encéfalo, mas ainda predominavam nos pulmões e fígado, onde foram encontradas até 30 dias após a infecção. A partir do 11^o dia, o número de larvas foi aumentando no encéfalo, no músculo esquelético e no coração. No 15^o dia a quantidade de larvas no encéfalo se igualou à quantidade de larvas do fígado e pulmões, e nos dias 21, 30 e 45 elas eram contadas em maior quantidade no encéfalo, coração e no músculo esquelético.

Camparoto et al (2008) infectaram 18 camundongos com baixa (200) e alta (1000) dose de ovos embrionados, e nos dias sete, 15 e 30 os animais foram eutanasiados para a contagem de larvas no fígado, pulmões, rins e encéfalo. Nos animais infectados com baixa dose, as larvas predominaram no encéfalo em todos os dias observados, havendo maior quantidade nos dias 15 e 30 após a infecção. Nos animais infectados com dose maior, elas predominaram nos dia sete, 15 e 30 no encéfalo, seguido de pulmões e fígado.

Wnukowska e Dzbenski (2008) infectaram camundongos com 350 ovos e os reinfectaram com a mesma dose após oito semanas para avaliar a resposta imunitária. Camundongos foram eutanasiados semanalmente, após a infecção ou a reinfecção e as larvas foram pesquisadas no encéfalo. No fim do experimento (16 semanas) não houve diferença significativa no número de larvas recuperadas, no encéfalo, mostrando que a imunidade montada contra o parasita reduziu a carga larvar da segunda infecção, já que não alterou o número de larvas já existentes da

primeira infecção no sistema nervoso central. Esses autores demonstraram, também que a primeira infecção induziu forte reposta blastogênica de linfócitos a antígenos de secreção e excreção do *Toxocara*, indicando desenvolvimento de imunidade celular contra o parasito.

Ollero et al (2008) inocularam 60 camundongos com seis, doze, 50, 100, 200 e 1000 ovos embrionados de *T. canis*, eutanasiados nos dias três, cinco, sete, nove, onze, 13, 15, 17, 19, 40, 80 e 120. Larvas foram observadas no encéfalo desses animais no primeiro dia, independente da dose. A partir do quinto dia o número de larvas recuperadas aumentou, principalmente, nos camundongos infectados com as doses mais altas (200 e 1.000 ovos). Poucas foram recuperadas nos olhos. Nesse mesmo experimento, 55 camundongos foram infectados com 200 e 1.000 ovos embrionados, e reinfetados, semanalmente, por quatro semanas com 50 e 250 ovos, respectivamente. Observou-se que a recuperação de larvas no encéfalo já no primeiro dia foi maior que nos animais que receberam uma simples dose. Quando animais infectados com dose única foram comparados aos que receberam múltiplas doses, observou-se uma maior recuperação de larvas no encéfalo desses últimos, mas não houve diferença significativa na recuperação das larvas nos olhos, apenas ocorreu um retardo na chegada das larvas ao órgão.

Resumindo, as inoculações de *Toxocara canis* em camundongos demonstram que a migração é bifásica, com a fase miotrópica-neurotrópica mais tardia, e que a reinfecção aumenta a retenção das larvas no fígado, embora não se tenha demonstrado que essa retenção seja seguida de uma eliminação destas larvas.

Ratos. O rato tem sido pouco utilizado para estudos de migração de larvas do *T. canis*, embora o tenha sido para estudos dos efeitos da infecção sobre a força de contração muscular (CHIEFFI et al, 2009), sobre o comportamento de mastócitos (CARLOS et al, 2006), sobre a atividade de óxido nítrico sintetase (ESPINOZA et al, 2002), sobre a quimiotaxia de eosinófilos (OKADA et al, 1996), sobre lesões cardíacas induzidas por eosinofilia (SCHAFFER, DIMAYUGA E KAYES, 1992), sobre as lesões histológicas induzidas pelas larvas (MOSSALAM, ATALLAH E HOSNEY, 1972) e sobre o comportamento (OLSON E ROSE, 1966).

O único relato sobre a migração das larvas em ratos, experimentalmente infectados, foi feito por Lescano, Queiroz e Chieffi (2004) que infectaram 21 *Rattus*

norvegicus com 500 ovos embrionados de *T. canis*, e a eutanásia foi realizada nos dias três, cinco, oito, dez, 15, 30 e 60 após a infecção. O maior número de larvas no fígado foi encontrado nos dias três e cinco; nos pulmões a maior quantidade de larvas foi encontrada no dias cinco e oito, com redução até o dia 60. Na musculatura, a maioria delas foi encontrada no dia cinco, mas foram observadas até o dia 60; no encéfalo, elas foram encontradas desde o dia 15 até o dia 60 após a infecção.

Gerbils. Poucos estudos de migração de larvas do *T. canis* têm sido feitos em gerbils.

Alba-Hurtado et al (2000), infectaram 45 gerbils com 1000 ovos embrionados e os animais foram eutanasiados no dias zero, cinco, um, três, cinco, dez, 20, 30, 40 e 60 após a infecção para a recuperação de larvas nos olhos. Dos dias cinco a 60, 90% dos animais apresentavam larvas nos olhos.

Cho et al, (2007) inocularam 1.000 ovos de *T. canis* em gerbils de dois e três meses. Larvas foram recuperadas nos intestinos até 24 horas após a infecção; no fígado elas começaram a aparecer com 24 horas, alcançando o pico no quinto dia e reduzindo a partir do 20º dia; nos pulmões e no coração alcançaram o pico com três dias e, com sete dias nenhuma larva foi encontrada; no encéfalo começaram a ser encontradas com cinco dias e mantiveram quantidade crescente até o fim do experimento (21 dias); na retina, uma larva foi observada com 14 dias após a infecção.

Alba-Hurtado et al (2009) inocularam 45 gerbils 80-90 dias com 1.000 ovos embrionados de *T. canis*. Os animais foram eutanasiados em zero, meio, um, três, cinco, dez, 20, 30, 40 e 60 dias após infecção. Foram contadas as larvas no fígado, pulmões, rins, esôfago, estômago, intestinos, encéfalo, baço, coração, pele e carcaça. De doze a 24 horas larvas foram recuperadas no intestino. No fígado, as larvas foram recuperadas de 12 horas ao dia 20, com pico no quinto dia após a infecção; nos pulmões as larvas foram encontradas em grande quantidade do dia três ao dia cinco, e no dia 20 larvas não foram mais encontradas; no encéfalo, as larvas começaram a aparecer no dia três com predomínio a partir do dia 20; do dia dez ao dia 60 foi recuperada uma grande quantidade de larva na carcaça. Os pulmões e a carcaça foram os locais onde apresentaram maior número de larvas.

Os gerbils apresentam padrão de distribuição das larvas semelhante ao de camundongos. No início (até 24 horas) as larvas predominam no intestino, seguindo para o fígado e pulmões e, posteriormente, em torno de três a cinco dias elas já podem ser encontradas no encéfalo, mas após uma semana a 15 dias, passam a predominar no cérebro e na musculatura (fase miotrópica-neurotrópica).

2.4 ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS NOS ANIMAIS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Toxocara canis*

2.4.1 Intestinos

Reação inflamatória composta de linfócitos e eosinófilos na lâmina própria e submucosa foi descrita em camundongos infectados (BURREN, 1968; ABO-SHEHADA, AL-ZUBAIDY E HERBERT, 1984). Relatou-se o encontro de larvas nas vilosidades, na submucosa, na muscular própria e penetrando o peritônio, sem que existisse infiltrado celular. No entanto, eosinófilos foram relatados no trajeto das larvas. Lesões peritoneais, com agregados de linfócitos foram também descritas (ABO-SHEHADA, AL-ZUBAIDY E HERBERT, 1984).

2.4.2 Fígado

Em camundongos, nos cortes de fígado, na primeira semana, larvas são vistas na veia hepática e central e muitas migrando, ativamente, dentro do parênquima hepático (ABO-SHEHADA E HERBERT, 1984; ABO-SHEHADA, AL-ZUBAIDY E HERBERT, 1984). Isso sugere que a maioria delas penetre no fígado pela veia porta, migrando para os lóbulos. As larvas podem, também, penetrar no fígado diretamente pela cavidade peritoneal mas, segundo Burren (1968), não se evidenciaram lesões nos tecidos adjacentes ao fígado. Nesse período inicial, não há relato pelos autores de infiltrado celular relacionados às larvas, mas se descreve presença de infiltrado de leucócitos nos espaços porta e, às vezes, penetrando nos lóbulos (BURREN, 1968; PECINALI et al, 2005). Infiltrados focais de mononucleares têm sido descritos até 30 dias após a infecção, diminuindo a seguir até 90 dias.

Nesse período, larvas não foram observadas. Quando apareceram granulomas, o tecido hepático em torno estava, geralmente, normal (ZYNGIER, 1974; WNUKOWSKA E DZBENSKI, 2008).

Larvas rodeadas por fibroblastos e eosinófilos, e hipertrofia de células de Kupffer e células endoteliais nos sinusóides foram descritas em camundongos 30 dias após a infecção (MOSSALAM, ATALLAH E HOSNEY, 1972; PECINALI et al, 2005).

Lesões semelhantes às observadas no fígado de camundongo têm sido descritas no fígado de cobaias, ratos e galinhas infectados com o *Toxocara canis* (MOSSALAM, ATALLAH E HOSNEY, 1972).

2.4.3 Pulmões

Em camundongos, a partir do segundo dia tem sido relatado infiltrado inflamatório linfocitário com alguns eosinófilos nos septos e tecido peribrônquico. No sétimo dia, grandes áreas de infiltrado celular confluem e, no décimo dia há difuso envolvimento do parênquima pulmonar com áreas de hemorragia alternando com áreas de infiltrado de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. No 21º dia, denso infiltrado celular, lembrando tecido linfóide, hemorragia, edema e numerosos cristais de Charcot-Leyden nos brônquios. Moderado infiltrado inflamatório até o 60º dia. Aos 90 dias, os pulmões podem ter aspecto normal ou apresentar áreas de infiltração difusa de macrófagos, com presença de cristais de Charcot Leyden (MOSSALAM, ATALLAH E HOSNEY, 1972; ZYNGIER, 1974; PECINALI et al, 2005; PINELLI et al, 2007). Nos pulmões, no exame histológico, larvas podem ser observadas desde o terceiro dia, com frequência, associadas aos focos de inflamação e hemorragia (BURREN, 1968; ABO-SHEHADA E HERBERT, 1984). Granulomas eosinofílicos foram observados em camundongos nos dias 11 e 30 após a infecção (PECINALI et al, 2005).

Em gerbils, lesões hemorrágicas são vistas nos pulmões nos dias três, cinco, sete, e 14 após a infecção, desaparecendo gradativamente (CHO et al, 2007).

2.4.4 Musculatura esquelética

Kayes e Oaks (1978) reproduziram marcante miosite em camundongos infectados com 1000 ovos de *T. canis*. No dia onze foram vistas, macroscopicamente, lesões brancas exsudativas que, microscopicamente, eram polimiosite com infiltrado inflamatório principalmente de eosinófilos e neutrófilos e algumas células mononucleares; raros granulomas foram encontrados. No dia 14 foram vistos granulomas com grande quantidade de eosinófilos. Nos dias 25 e 35, após a infecção, os granulomas eram semelhantes ao do dia 14, alguns circundados por fibroblastos, mas larvas não foram encontradas nos granulomas. Nos dias 70 e 77 os granulomas diminuíram em quantidade e tamanho, e apresentavam cápsula colagenosa organizada com células epitelióides.

Alguns autores relataram o encontro de raras larvas no músculo esquelético até 90 dias após a infecção (ZYNGIER, 1974). Larvas encapsuladas em tecido fibroso têm sido descritas (BURREN, 1968).

2.4.5 Encéfalo e olhos

Larvas sem infiltrado inflamatório, infiltrado inflamatório acompanhando trajeto de larvas e infiltrados inflamatórios perivasculares têm sido descritos no encéfalo de camundongos em períodos iniciais da infecção (BURREN, 1968). Em períodos mais avançados da infecção (20 e 30 dias), têm sido descritas lesões semelhantes, mas com presença de hemorragia na piamater e focos de satelitose, neuronofagia e proliferação glial (MOSSALAM, ATALLAH E HOSNEY, 1972). Em períodos mais tardios (terceiro mês após infecção), ao lado da presença de larvas, lesões desmielinizantes no cérebro e cerebelo têm sido descritas (DOLINSKY et al, 1985; EPE et al, 1994).

Akao et al (2003), infectaram 57 gerbils com 1.000 ovos embrionados de *T. canis*. Alguns animais que viveram mais de 50 dias infectados apresentaram anormalidades neurológicas incluindo movimento em círculo na mesma direção, dificuldade em manter a posição normal da cabeça, paraplegia de membros posteriores. Nenhuma alteração patológica foi encontrada ao redor da rota de migração da larva ou no parênquima do encéfalo, que foram identificadas pela

coloração usando anticorpo monoclonal contra antígeno excretório e secretório (ES) de *T. canis*. Entretanto, muitas alterações degenerativas foram encontradas no cerebelo, incluindo perda de células de Purkinje e de fibras nervosas.

Alba-Hurtado et al (2000) após inocularem gerbils com 1.000 ovos embrionados observou histologicamente, entre o dia dez e 60 após a infecção, que 46% tinham um ou mais larvas associadas às lesões oculares. Antes de cinco dias nenhuma lesão foi observada. Entre os dias dez e 20 alguns animais apresentaram larvas na coróide sem infiltrado inflamatório e, em outros órgãos, eram encontradas no processo ciliar associado à hemorragia. No dia 30 os olhos mostraram larvas e infiltrado neutrofílico no processo ciliar, edema e hemorragia de retina. No dia 40 foram encontradas larvas nos olhos e intensa resposta inflamatória na retina, edema, extensa hemorragia, e alguns olhos apresentavam reação granulomatosa com larva. No dia 60, lesões granulomatosas com necrose central na retina e no processo ciliar, hemorragia e marcante infiltrado de linfócitos e monócitos na retina e no humor aquoso.

Zanandréa et al (2008) infectaram gerbils com baixa dose de ovos embrionados de *T. canis* (100 ovos) e observou que as lesões oculares começaram a aparecer na primeira semana e, com 4 semanas, estavam presentes em 80% dos animais, sendo as lesões hemorrágicas da coróide e da retina as mais frequentes. Microscopicamente, as lesões consistiam de áreas focais de hemorragia na retina e coróide, algumas vezes com macrófagos preenchidos de hemossiderina, infiltrados focais de neutrófilos e eosinófilos na esclera e íris, vasculite focal e dacrioadenite com eosinófilos e granuloma eosinofílico em um animal. A larva de *T. canis* foi observada na retina de um animal, mas sem células inflamatórias.

2.4.6 Outros órgãos

Larvas têm sido observadas no córtex renal de camundongos a partir do quinto dia (ABO-SHEHADA E HERBERT, 1984) e entre os túbulos renais sem nenhuma reação tecidual próxima às larvas, 30 dias após a infecção. Em ratos, as larvas são rodeadas por cápsula de tecido fibroso nos dias dez e 30 após a infecção e, com 30 dias, granulomas e eosinófilos são proeminentes ao redor das larvas (MOSSALAM, ATALLAH E HOSNEY, 1972).

2.5 LESÕES EM ANIMAIS SUBMETIDOS À REINFECÇÃO

O fenômeno em que larvas se acumulam no fígado de camundongos infectados, denominado de captura ou “trapping”, é descrito em animais reinfectedos (SUGANE E OSHIMA, 1983; PARSONS E GRIEVE, 1990; ABDO-SHEHADA, AL-ZUBAIDY E HERBERT, 1991).

Segundo Sugane e Oshima (1983), camundongos reinfectedos com larvas de *T. canis* apresentam maior número de larvas retidas no fígado quando comparados aos infectados uma única vez com a mesma dose. Isso se deve à formação de granulomas com grande número de eosinófilos e com cápsula fibrosa ao redor, o que pode impedir o movimento da larva pelo fígado.

Animais imunizados com vacinas de antígenos de fêmeas adultas, antígenos excretório/secretório de larvas, sobrenadante de cultura de L2 e ovo irradiado, mostraram, após a infecção ou reinfecção, maior número de pontos brancos no fígado e poucas petéquias nos pulmões, quando comparados a animais infectados não imunizados, infectados uma vez. Além disso, foi observada na histopatologia, infiltração linfocítica ao redor de locais da penetração da larva no íleo, formando um estágio inicial do granuloma. No fígado também foram observados granulomas. Isso sugeriu um mecanismo protetor que reduziu a penetração intestinal da larva (ABDO-SHEHADA, AL-ZUBAIDY E HERBERT, 1991).

Camundongos reinfectedos após oito semanas da infecção primária apresentaram larvas no exame histopatológico de cortes seriados do fígado, o que não foi observado no grupo da infecção primária, avaliado no mesmo período. Granulomas bem estruturados foram descritos em torno de larvas, alguns com fibrose periférica (WNUKOWSKA E DZBENSKI, 2008).

De modo geral, as lesões observadas nos animais reinfectedos são mais extensas, com formação de granulomas epitelióides, ricos em eosinófilos, do tipo Th2.

2.6 DETECÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE ANTÍGENOS DE *Toxocara* NOS TECIDOS

Em humanos, a imunohistoquímica pode ser um método de auxílio para identificar o parasita em alguns casos com granuloma eosinofílico suspeitos de granulomas produzidos por *Toxocara* sp. (BRITO et al, 1994; KAPLAN, GOODMAN E ISHAK, 2001; MUSSO et al, 2007). O soro anti-*Toxocara* utilizado nos estudos humanos foi sempre um soro policlonal obtido de coelhos infectados com o parasito.

Imunohistoquímica realizada em amostras de fígado humano com granulomas ricos em eosinófilos mostraram reação positiva dentro de macrófagos, em áreas de restos necróticos, nas células epitelióides e multinucleadas, espaço porta e ao redor de vasos sanguíneos (BRITO et al, 1994; KAPLAN, GOODMAN E ISHAK, 2001; MUSSO et al, 2007). Granulomas sem a larva também apresentavam reação positiva. Essa larva poderia ter sido morta ou migrado para fora do granuloma (KAPLAN, GOODMAN E ISHAK, 2001; MUSSO et al, 2007).

Reação positiva para antígenos de *T. canis* foi relatada no íleo do dia um até o dia 28 em ovelhas infectadas com 10.000 ovos de *T. canis*. No fígado, a reação foi forte nos granulomas e também presente em áreas portais e no interior de alguns lóbulos. Nos pulmões, a reação foi positiva em células epiteliais dos bronquíolos. Nos mesmos animais, no encéfalo não foram observadas reações positivas para o antígeno do parasita (ALDAWEK et al, 2002). Em gerbils infectados com 1000 ovos de *T. canis* foi observada reação positiva ao redor de larvas migrando pelo encéfalo (AKAO et al, 2003).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo infectar, experimentalmente, gerbils com 1.500 ovos embrionados de *T. canis* e estudar:

- 1) A migração das larvas no período quatro, oito, doze, 24, 48, 72, 96 horas e sete, 15, 30 e 60 dias após a infecção;
- 2) A migração das larvas em gerbils quatro, oito, doze, 48, 72 horas e sete, 15, 30 e 60 dias após a reinfecção de animais 30 dias após a primeira infecção;
- 3) A morfologia das lesões no intestino, fígado, pulmões, rins, sistema nervoso, músculo esquelético e cardíaco, com métodos histológico e imunohistoquímico utilizando um soro policlonal anti-*Toxocara* nos animais infectados e reinfecados.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (n° 007/2008).

4.1 COLETA DE OVOS DE *Toxocara canis*

Fêmeas adultas de *T. canis* foram obtidas de cães filhotes, vermifugados com Piperazina (125g a 180g/Kg) e em necropsias realizadas no Centro de Controle de Zoonose (Vitória e Serra – ES) e no setor de Patologia do Centro Universitário Vila Velha. As fêmeas foram conservadas em solução de ácido sulfúrico a 0,1N. Duas incisões foram realizadas em cada extremidade dos nematóides que foram comprimidos para a retirada dos ovos. Esses foram colocados em solução de ácido sulfúrico a 0,1N e filtrados em coador de náilon, sendo mantidos em frasco de vidro coberto com gaze, protegidos da luz e deixados em temperatura ambiente por seis semanas. Semanalmente, esses ovos foram observados ao microscópio óptico para avaliar os estágios larvais.

4.2 PREPARAÇÃO DOS OVOS PARA INFECÇÃO DOS GERBILS

Após os ovos embrionados adquirirem o estágio larval adequado (L3), foi feita a contagem no microscópio óptico na objetiva de 10x. Do frasco que continha a solução de ovos retirou-se 50µl e colocou-se em lâmina de vidro. A lâmina foi coberta com lamínula para efetuar a contagem de ovos presentes nesses 50µl. A partir do resultado da contagem, separou-se a quantidade de solução para um total de aproximadamente 1.500 ovos. A solução com os ovos foi mantida em repouso para a sedimentação dos ovos durante seis a 12 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e adicionava-se aproximadamente, 500µl de água. Essa solução foi administrada, oralmente, através de uma agulha de gavagem a 59 gerbils de um mês e meio a dois meses de idade. Os animais foram mantidos em

gaiolas de plástico, que eram limpas a cada 4 dias, e recebiam água e ração adequada.

4.3 MIGRAÇÃO DAS LARVAS DE QUATRO A 96 HORAS APÓS A PRIMÓINFECÇÃO

Após inoculação de gerbils (n=23) 1.500 ovos, esses foram eutanasiados através de anestesia (pentobarbital intraperitoneal 80mg/kg) ou em câmara de CO₂, quatro, oito, doze, 24, 48, 72, 96 horas após a infecção. Às quatro e oito horas foram eutanasiados quatro animais em cada hora, sendo que em um dos animais todo o intestino foi coletado para análise histopatológica. Nos demais intervalos foram eutanasiados e necropsiados três animais. O intestino delgado, o intestino grosso, o fígado e os pulmões foram coletados para a contagem das larvas de quatro a 96 horas, e o cérebro e o cerebelo foram coletados para a contagem de larvas de 24 a 96 horas. O restante dos órgãos utilizados para a contagem e os demais órgãos (rins, estômago, coração, olhos e carcaça) foram acondicionados em frascos com formol 10% tamponado (tampão de fosfato, pH 7.2).

4.3.1 Contagem de larvas na luz do intestino

Antes da remoção do intestino foi realizada a ligadura separando as porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), ceco e cólon. As porções foram separadas e lavadas com água e o conteúdo foi depositado em cálices de sedimentação, identificados para cada porção intestinal. Após 24 horas de repouso, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento colocado entre duas lâminas de vidro medindo 5 cm x 7,5 cm para a contagem das larvas ao microscópio óptico com a objetiva 10x.

4.3.2 Contagem de larvas na parede do intestino delgado, ceco e intestino grosso

Após a lavagem, todo intestino foi aberto com auxílio de uma tesoura cirúrgica. e fragmentos medindo de 2 a 3 cm foram colocados entre duas lâminas de vidro medindo 5 cm x 7,5 cm, as quais foram presas por fita adesiva. Um pequeno fragmento foi separado para análise histopatológica, e o restante do intestino foi utilizado para a contagem larvar. A contagem das larvas foi feita na objetiva 10x de um microscópio óptico.

4.3.3 Contagem de larvas no fígado e encéfalo

O fígado foi retirado da cavidade abdominal e pesado. Fragmentos de diferentes lobos foram cortados e pesados. Cada fragmento foi pressionado entre duas lâminas de microscopia medindo 5 cm x 7,5 cm e examinados em microscópio óptico para a contagem das larvas. O restante do fígado foi acondicionado em frasco de formol a 10% tamponado. O número total de larvas no fígado foi calculado pelo peso total do órgão X número de larvas encontradas nos fragmentos/ pesos dos fragmentos examinados.

O cérebro e o cerebelo foram separados em um hemisfério e pressionados entre duas lâminas de microscopia medindo 5 cm x 7,5 cm para a contagem de larvas ao microscópico. O outro hemisfério foi acondicionado em frasco de formol a 10% tamponado. O resultado da contagem de larvas era multiplicado por dois para se obter o total de larvas no encéfalo.

4.3.4 Contagem de larvas nos pulmões

O pulmão esquerdo foi separado para a realização de digestão com solução de pepsina e ácido clorídrico. O pulmão foi cortado em fragmentos menores e adicionado em solução de pepsina ácida pH 1,1 a 1,2 (2,6 g de pepsina – atividade biológica 1:10.000 + 5,0 g NaCl + 7,0 ml de HCl + 493 ml de água deionizada) preparada a 37°C e mantido por três a quatro horas. Posteriormente, foi centrifugado a 1200g/10 minutos. Como o pulmão é de difícil digestão, restos pulmonares ainda

foram triturados com tesoura, na solução de pepsina. Centrifugou-se novamente, a 1200g/10 minutos, o sedimento foi colocado em duas lâminas de microscopia medindo 5 cm x 7,5cm e presas por fita adesiva para a contagem das larvas.

4.3.5 Pesquisa de larvas nos olhos

Os olhos foram mantidos em formol para fixação até serem examinados. Depois foram cortados e divididos em câmara anterior e posterior, e examinados em microscópio estereoscópio para a pesquisa de larvas e lesões.

4.4 MIGRAÇÃO DAS LARVAS ENTRE SETE, 15, 30 E 60 DIAS APÓS A PRIMÓINFECÇÃO

Os animais (n=12) foram infectados com 1.500 ovos de *T. canis* embrionados, diluídos em 500µl de água como descrito em 4.2. Nos dias sete, 15, 30, 60 após a infecção, três animais foram eutanasiados, em grupos, com uso de CO₂. Nesses grupos não foi feita a contagem de larvas no intestino já que, com quatro dias de infecção, elas não são observadas em nenhum segmento do tubo digestivo. Para a contagem de larvas no fígado, pulmões e encéfalo foi utilizado o mesmo método descrito em 4.3.

4.5 MIGRAÇÃO DAS LARVAS EM ANIMAIS SUBMETIDOS À REINFECÇÃO

Gerbils infectados (n=24) com 1.500 ovos embrionados foram reinfectedados com a mesma dose, 30 dias após a primeira infecção. Dois animais foram sacrificados após quatro horas e um animal, 8 horas após a reinfecção; três animais foram sacrificados em 48 horas e 72 horas, sete, 15 e 30 dias após a reinfecção. Como os animais infectados com 1.500 ovos morriam, aproximadamente aos 40 dias, um grupo foi reinfectedado com 1.000 ovos para ser eutanasiado 60 dias após a reinfecção. A metodologia utilizada para a contagem de larvas no intestino, fígado e no encéfalo foi a mesma descrita em 4.3.2 e 4.3.3.

4.6 ESTUDO HISTOLÓGICO DOS DIFERENTES ÓRGÃOS

Realizou-se a necropsia de todos os animais, e os órgãos (intestino, fígado, pulmões, rins, coração, músculo esquelético, encéfalo), incluindo a carcaça foram coletados e colocados em formol tamponado, a 10%. Após a fixação foram processados e incluídos em parafina. Cortes seriados de 5µm foram corados em hematoxilina e eosina.

4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE LARVAS E DE ANTÍGENOS DE LARVA

4.7.1 Obtenção do soro policlonal anti-Toxocara

O soro policlonal foi obtido em coelho após quatro inóculos quinzenais de 5.000 ovos (Smith et al 1982). Uma semana após o último inóculo foi feita a punção cardíaca para coleta de sangue, usando um tubo com vácuo. Após a coagulação, foi centrifugado a 2500 rpm e o soro transferido para tubo de falcon, mantido a -20° C até à realização da precipitação de imunoglobulinas.

Para realizar a precipitação, o soro foi centrifugado a 3000g por 30 minutos. Posteriormente, transferido para um becker, adicionado de um ímã e colocado no agitador magnético. Sob agitação, adicionou-se um volume igual de solução saturada de sulfato de amônio (313g de sulfato de amônio em um litro de água destilada), lentamente com uma pipeta, para atingir a concentração final de 50%. Após adicionar o sulfato de amônio, a solução resultante foi mantida a 4°C por seis a doze horas. Após esse período, a solução foi centrifugada a 3000g por 30 minutos descartando-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso com PBS, até 30 a 50% do volume inicial. Essa solução, que continha as imunoglobulinas precipitadas foi, então, transferida para um saco de diálise e dialisada durante 12 horas, com três trocas do PBS. A solução de anticorpo foi removida do saco de diálise e centrifugada novamente. O sobrenadante foi colocado em tubos eppendorf e mantido congelado a -20° C até o momento da utilização.

4.7.2 Método imunohistoquímico

Foi utilizado o método avidina-biotina-peroxidase, com kits comerciais (Dako®).

Os cortes histológicos foram montados em lâminas silanizadas, colocadas em estufa a 58°C durante uma noite e, posteriormente, desparafinizadas durante 20 minutos em xilol, passadas em banhos sucessivos de álcool absoluto e álcool hidratado e, finalmente, hidratadas em água destilada e lavadas duas vezes em tampão PBS (pH 7,4). Para o bloqueio de peroxidase endógena, os cortes foram incubados com água oxigenada (peróxido de hidrogênio) por dez minutos, sendo lavadas em PBS pelo mesmo tempo.

Depois de lavados em tampão PBS, os cortes histológicos foram incubados a 4°C durante a noite com o anticorpo primário anti-*Toxocara* (oriundo do coelho infectado), diluído a 1:300 em PBS. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS, o excesso de umidade removido com papel absorvente e, em seguida, tratados com anticorpo secundário do kit (anti-IgG de coelho biotilado), diluído conforme instruções do fabricante. O volume utilizado de anticorpo secundário foi suficiente para cobrir todo o corte em cada lâmina. Após 30 minutos, na temperatura ambiente, os cortes foram lavados com PBS. Em seguida, foram incubados com Streptoavidina-peroxidase durante 10 minutos e, posteriormente, lavados em PBS. Os cortes foram submetidos à diaminobenzidina (substrato) durante 10 minutos, controlando no microscópio a intensidade de reação nas lâminas utilizadas como controle positivo. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavados, desidratados rapidamente, diafanizados e montados em bálsamo do Canadá.