

MARIA FRANCISCA NEVES

Infecção por *Toxocara vitulorum* em bezerros búfalos
(*Bubalus bubalis*) com ênfase ao papel de mastócitos e
eosinófilos

1210001199



Ilha Solteira/SP
Fevereiro de 2001

MARIA FRANCISCA NEVES

**Infecção por *Toxocara vitulorum* em bezerros búfalos
(*Bubalus bubalis*) com ênfase ao papel de mastócitos e
eosinófilos**

Ilha Solteira/SP
Fevereiro de 2001



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ILHA SOLTEIRA
Curso de Pós-Graduação em Zootecnia

MARIA FRANCISCA NEVES

**Infecção por *Toxocara vitulorum* em bezerros búfalos
(*Bubalus bubalis*) com ênfase ao papel de mastócitos e
eosinófilos**

Orientador: Prof. Dra. Wilma Aparecida Starke Buzetti

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP, para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA - Área de concentração: Sistema de Produção Animal.



Ilha Solteira/SP
Fevereiro de 2001

Proc. 040/2001 - NPD 074/01

UNESP - "CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA"	
SERVIÇO TÉCN. DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO	
DATA DE CHEGADA	DATA DE TOMBAMENTO
02.07.01	30.07.01
RECEBIDA	RECEBIDA
Aquisição	Te. 1199
Classificação	N518.i
Valor	R\$10,00

5040500 - Produção Animal



"Infecção por *Toxocara vitulorum* em bezerros búfalos (*Bubalus bubalis*) com ênfase ao papel de mastócitos eosinófilos"

Maria Francisca Neves

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE
ILHA SOLTEIRA – UNESP COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ZOOTECNIA**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Wilma Buzetti

Prof^a Dr^a Wilma Aparecida Starke Buzetti - orientadora

Gervásio Henrique Bechara

Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara

Maria Conceição Zocoller Seno

Prof^a Dr^a Maria Conceição Zocoller Seno

**Ilha Solteira – SP
fevereiro de 2001**

Dedico

Aos meus pais, Franklin e Neusa Bernardo Neves
e às minhas irmãs Magda e Monica, pela
confiança, carinho, amor e estímulo
que sempre depositaram em mim.



AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meu caminho.

À Professora Doutora Wilma Aparecida Starke Buzetti, minha orientadora e amiga, que com dedicação, paciência e carinho sempre me auxiliou na execução deste trabalho. Fica guardado o exemplo de profissional e de pessoa. A você, o meu respeito e admiração!

À coordenação do Curso de Pós-Graduação.

Aos Professores Doutores do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira / UNESP – João Francisco Pereira Bastos, João Batista Alves, Antônio Fernando Bergamaschine, Olair José Isepon, Hélio Takachi Okuda, Milton Passipiéri, Luiz de Carvalho Landell, Edson Guilherme Vieira e Maria Conceição Zocoller Seno – pelo apoio amigo durante estes anos.

Aos Professores Doutores do Departamento de Matemática da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira / UNESP – Evaristo Bianchini Sobrinho, do Departamento de Ciência do solo e Engenharia Rural da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira / UNESP – Salatiér Buzetti e ao colega e amigo Marco Antônio Camilo de Carvalho pela colaboração na execução da análise estatística.

À amiga de curso Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro por compartilhar seus conhecimentos de histologia e pela amizade.



Aos funcionários da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira / UNESP – Aparecida Duarte Cardoso, Meiri Saiuri N. M. da Cruz e Zeneide Ribeiro Campos. Ao grande amigo João Paixão pela dedicação e paciência com que me auxiliou durante estes anos.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEP), pela ajuda nas necrópsias e na coleta de materiais.

Aos amigos de Pós graduação pelos momentos que passamos juntos.

A todos que contribuíram, direta e indiretamente para a realização e conclusão deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 <i>Toxocara vitulorum</i> : Aspectos gerais.....	4
3.2 Mastócitos: Aspectos gerais.....	7
3.3 Eosinófilos: Aspectos gerais.....	10
3.4 Papel de mastócitos e eosinófilos na infecção por helmintos.....	13
3.5 Quadro hematológico de búfalos.....	20

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Local.....	21
4.2 Animais.....	21
4.3 Delineamento experimental.....	21
4.4 Exames coprológicos: contagem de ovos por grama de fezes (OPG).....	22
4.5 Exames de sangue.....	22
4.6 Necropsia.....	23
4.7 Tratamento das amostras de tecidos.....	23
4.8 Coloração dos tecidos intestinais.....	24
4.9 Contagem de células.....	24
4.10 Contagem de parasitas.....	25
4.11 Delineamento estatístico.....	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1 Parâmetros parasitológicos.....	26
5.2 Alterações macroscópicas observadas nas necrópsias.....	28
5.3 Mastócitos no tecido intestinal.....	30
5.3.1 Duodeno.....	30
5.3.2 Jejunum.....	31
5.3.3 Íleo.....	31
5.4 Eosinófilos no tecido intestinal.....	38
5.5 Quadro hematológico.....	41
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9. ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Períodos de pré-patência, patência e pico do parasitismo por *Toxocara vitulorum* nos bezerros búfalos nascidos no ano de 2000.27

TABELA 2. Dados médios das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) e de contagens de *Toxocara vitulorum* adultos encontrados durante as necrópsias de bezerros búfalos dos grupos controles (n = 4) e dos grupos infectados (n = 4) nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo.29

TABELA 3. Outros nematódeos adultos identificados nas necrópsias de bezerros búfalos dos grupos controles com 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos grupos parasitados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo.30

TABELA 4. Dados médios das contagens de mastócitos nas diferentes regiões do intestino delgado; UVC (unidade vilo-cripta), SM (submucosa), M (muscular) e PP (placa de Peyer).37

TABELA 5. Dados médios de eosinófilos na mucosa do intestino delgado (UVC - unidade vilo-cripta).40

TABELA 6. Dados médios das contagens diferenciais relativas de células do sangue de bezerros búfalos controles e infectados por *Toxocara vitulorum* do nascimento aos 174 dias de idade.46



TABELA 7. Dados médios do hemograma de bezerros búfalos controles e infectados por <i>Toxocara vitulorum</i> do nascimento aos 174 dias de idade.	47
--	----



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Dados médios das contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de bezerros búfalos (n = 16) do nascimento aos 106 dias de idade, naturalmente infectados com *Toxocara vitulorum*.27

FIGURA 2. Número médio de ovos por grama de fezes (OPG) nos animais controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos bezerros búfalos infectados naturalmente com *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo (n = 4).28

FIGURA 3. Número médio de mastócitos na UVC (unidade vilo-crípta) do duodeno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$)32

FIGURA 4. Número médio de mastócitos na SM (submucosa) do duodeno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).33

FIGURA 5. Número médio de mastócitos na M (muscular) do duodeno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e

ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).33

FIGURA 6. Número médio de mastócitos na UVC (unidade vilo-crípta) do jejuno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).34

FIGURA 7. Número médio de mastócitos na SM (submucosa) do jejuno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).34

FIGURA 8. Número médio de mastócitos na M (muscular) do jejuno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).35

FIGURA 9. Número médio de mastócitos na UVC (unidade vilo-crípta) do íleo dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).35

FIGURA 10. Número médio de mastócitos na M (muscular) do íleo dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).36



FIGURA 11. Número médio de mastócitos no tecido conjuntivo ao redor das Placas de Peyer (PP) do íleo dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *T. vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).36

FIGURA 12. Número médio de eosinófilos na UVC (unidade vilo-cripta) do duodeno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).39

FIGURA 13. Número médio de eosinófilos na UVC (unidade vilo-cripta) do jejuno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).39

FIGURA 14. Número médio de eosinófilos na UVC (unidade vilo-cripta) do íleo dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).40

FIGURA 15. Valores médios das contagens relativas de eosinófilos do sangue dos bezerros búfalos infectados (I, $n = 4$ a 18) e de controles (C, $n = 2$ a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão ($1^* = 1$ dia de idade).42

FIGURA 16. Valores médios das contagens relativas de linfócitos do sangue dos bezerros búfalos infectados (I, $n = 4$ a 18) e controles (C, $n = 2$ a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão ($1^* = 1$ dia de idade).42

FIGURA 17. Valores médios das contagens relativas de neutrófilos do sangue dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão ($1^* = 1$ dia de idade).43

FIGURA 18. Valores médios das contagens de eritrócitos dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão ($1^* = 1$ dia de idade).43

FIGURA 19. Valores médios das contagens de leucócitos dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão ($1^* = 1$ dia de idade).44

FIGURA 20. Hematócrito dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão ($1^* = 1$ dia de idade).44

FIGURA 21. Volume corpuscular médio dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão da média ($1^* = 1$ dia de idade).45



RESUMO

Toxocara vitulorum é um nematódeo patogênico que parasita o intestino delgado de bezerros búfalos bem jovens. Para entender o desenvolvimento da resposta inflamatória na parede do intestino delgado durante o período patente da infecção, amostras de tecidos foram removidas de porções do duodeno, jejuno e íleo de bezerros búfalos naturalmente infectados com *T. vitulorum*, durante o período de ascensão, pico, declínio e ausência do parasitismo e de bezerros búfalos controles, não parasitados, na faixa etária de 30 e 50 dias de idade. Estes tecidos foram fixados em solução de Bouin e incluídos em parafina. Secções de 5 µm de cada tecido foram obtidas e coradas com corantes específicos para mastócitos (azul de Astra, pH 1-2) e para eosinófilos (vermelho Direct, pH neutro). Estas células foram contadas na lâmina própria de 30 unidades de vilo-crípta (UVC), na submucosa e na muscular para cada secção tecidual, num total de três secções para cada porção intestinal. Realizou-se também o hemograma destes animais a cada 15 dias, desde o nascimento, observando-se os eritrócitos, leucócitos, volume corpuscular médio e hematócrito. Os esfregaços de sangue foram corados com Giemsa e três contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas para cada animal. O grau parasitológico foi avaliado colhendo-se fezes semanalmente, do nascimento até 106 dias de idade. De acordo com os resultados obtidos no duodeno, a população de mastócitos aumentou duas vezes na mucosa (UVC) dos animais infectados, na fase de pico, enquanto no jejuno, este aumento foi de quatro vezes. Mastócitos na submucosa e na muscular do duodeno e do jejuno aumentaram, mas não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com os grupos controles. O número de mastócitos no íleo aumentou apenas ligeiramente em todas as camadas, mas não significativamente. Já para eosinófilos, foi observado um grande aumento na mucosa (UVC) do duodeno e do jejuno, nas fases de início ou ascensão, pico e declínio

ou expulsão (três a cinco vezes maior que o controle). Durante o período de declínio ou expulsão, o número de mastócitos também diminuiu, voltando a normalidade na ausência dos parasitas, mas o número de eosinófilos manteve-se ainda elevado nesta fase, declinando somente na fase de ausência dos parasitas. Foi observada também eosinofilia entre a segunda e a quinta quinzena de vida, enquanto que o número de linfócitos e neutrófilos permaneceu inalterado em relação ao controle. Os exames coprológicos semanais revelaram que os bezerros búfalos estavam infectados já aos 11 dias pós-nascimento e alcançavam o pico da infecção em torno de 45 dias de idade. Em seguida, os helmintos foram expulsos através das fezes dos hospedeiros entre 46 e 85 dias de idade. Pelos resultados obtidos, conclui-se que a infecção por *T. vitulorum* em bezerros búfalos provoca um aumento no número de mastócitos e eosinófilos no duodeno e no jejuno, nas fases de início ou ascensão, pico e declínio ou expulsão do parasitismo, provocando também uma eosinofilia durante todo o período em que os animais encontravam-se infectados. Estas células podem apresentar um papel protetor na expulsão destes parasitas pelos hospedeiros, participando do processo de cura espontânea.



ABSTRACT

Toxocara vitulorum is a pathogenic nematode from small intestine from very young buffalo calves. To understand the development of the inflammatory responses in the wall of the gut during the patent period of the infection, samples of tissues were removed from the duodenum, jejunum and ileum of buffalo calves naturally infected with *T. vitulorum*. These tissues were fixed in Bouin's solution and embedded in paraffin. Sections of 5 μ m of each tissue were obtained and stained with specific staining for mast cells (Astra blue, pH 1-2) and for eosinophils (Direct red, neutral pH). These cells were counted in 30 villus-crypt unit (VCU), submucosa and muscular layers of each tissue section. Blood samples were fortnightly collected from the birth to 174 days post-birth. Blood smears were prepared and stained with Giemsa for eosinophil, neutrophil, basophil and lymphocyte. Eritrocyte and leucocyte were counted, and the medium corpuscular volume and hematocrit were determined. The parasitological status of these animals, were evaluated through weekly fecal egg counts (EPG) from 1 to 106 days. According to the parasitological status of the animals by EPG counts, the parasitism was determined as having four phases: beginning or increasing; peak of egg shedding; decreasing or expulsion and absence or post-expulsion. In the duodenum, the mast cell population increased twice in the mucosa (VCU) of the infected animals, while in the jejunum, the number of mast cells was four times higher than the control levels, during the peak of parasitism. Mast cell numbers in the submucosa and muscular layers of the duodenum and jejunum increased, but there was no statistical difference when they were compared with the control levels. Mast cells in the ileum increased only lightly in all of the layers of the gut. Eosinophils had a great increase (three to five times) in the mucosa of the duodenum and jejunum during the peak and decreasing

phases of the infection. Eosinophilia was detected from the second to the fifth week, while lymphocyte and neutrophil numbers were not different statistically from the control groups. Weekly coprological examinations revealed that the buffalo calves were already infected at 11 days of age, reached a peak of this infection at 45 days and then expelled the parasites by the feces between 44 and 85 days. By conclusion, *T. vitulorum* infection elicited increased in the numbers of mast cells and eosinophils in the duodenum and jejunum, during the increasing, peak and decreasing periods of the parasitism, as well as eosinophilia. These cells may have an important defense role in the expulsion of the parasites by the host participating in the process of self cure.



1. INTRODUÇÃO

O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*), também conhecido como búfalo d'água, adapta-se perfeitamente em muitas condições ambientais. É um animal rústico, precoce e resistente a inúmeras doenças e pode prosperar perfeitamente em áreas tropicais úmidas. No entanto, apesar do búfalo se mostrar altamente resistente e ser menos atingido por doenças do que os bovinos, o meio em que vive favorece a manutenção e a disseminação de doenças parasitárias, principalmente em regiões de clima quente e úmido.

O ascaridideo *Toxocara vitulorum* é considerado um parasita patogênico e altamente prevalente para bubalinos jovens entre 15 e 120 dias de idade. Esta precocidade de infecção deve-se ao fato destes animais adquirirem as larvas infectantes através do colostro contaminado, logo após o nascimento. Estes ascaridideos são de grande porte e podem obstruir o lúmen do intestino delgado, ocasionando lesões inflamatórias traumáticas que podem predispor os animais a infecções secundárias por bactérias e, conseqüentemente, ocasionar diarreias. A prevalência desta espécie é alta nos rebanhos bubalinos do mundo todo e algumas vezes pode levar à morte os animais quando submetidos à subnutrição e a manejos inadequados.

No entanto, a literatura especializada reporta que os nematódeos parasitas intestinais raramente causam infecções fatais, mas que a longo prazo, debilitam os animais e alteram as funções normais e a estrutura intestinal. Além disso, observa-se também que os animais parasitados podem adquirir uma imunidade contra estes parasitas, tornando o ambiente intestinal impróprio para o desenvolvimento de algumas espécies de parasitas e assim eliminá-los para o meio exterior. Mastócitos e eosinófilos são células comumente associadas e aumentadas em número e em tamanho nas

infecções gastrointestinais causadas por helmintos e podem de alguma forma contribuir para a proteção do hospedeiro. No entanto, o papel destas células neste processo ainda permanece obscuro. Muitos trabalhos foram feitos para esclarecer o papel destas células no processo de expulsão dos nematódeos, mas a grande maioria dos experimentos, no entanto, foi realizado em animais de laboratório (ratos e camundongos) e alguns em ovinos, mas praticamente nada em búfalos. Além disso, pouco se conhece sobre as reações inflamatórias e imunológicas destes animais, a nível celular na mucosa intestinal, que favorecem a expulsão destes parasitas pelos hospedeiros. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo principal a quantificação e a relação de mastócitos e eosinófilos com a infecção por *T. vitulorum* e com o processo de expulsão do parasita pelos bezerros búfalos.



2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- Estudo das alterações patológicas, hematológicas e das flutuações populacionais de mastócitos e eosinófilos no processo inflamatório ocasionado pela infecção por *T. vitulorum* no tecido intestinal de bezerros búfalos durante as fases de início e ascensão, pico máximo de eliminação de ovos, declínio ou expulsão e ausência do parasitismo ou pós-expulsão.

2.2. Objetivos específicos

- Quantificação de mastócitos e eosinófilos na parede intestinal (mucosa, submucosa e muscular) do duodeno, jejuno e íleo.
- Avaliação do parasitismo dos bubalinos através de contagens de ovos por grama de fezes (OPG), identificação e contagens dos parasitas adultos do trato intestinal.
- Avaliação das lesões macroscópicas da mucosa intestinal.
- Avaliação do eritrograma e do leucograma.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Toxocara vitulorum*: Aspectos gerais

Toxocara vitulorum é um nematódeo de grande porte pertencente à família Ascarididae que parasita o intestino delgado de ruminantes (Smith, 1994) e principalmente de búfalos d'água (*Bubalus bubalis*) (Roberts, 1989). Patnaik e Pande (1963) listaram-o em primeiro lugar na ordem de prevalência e patogenicidade para bezerros búfalos bem jovens, nos primeiros quatro meses de vida.

T. vitulorum causa anorexia, diarreia ou constipação, desidratação e cólicas no hospedeiro, podendo levá-lo até a morte em alguns casos (Das e Singh, 1955). Este parasita é prevaiente para bezerros búfalos com até quatro meses de idade onde o pico máximo da infecção se dá em torno dos 30 aos 50 dias. A partir de então ocorre uma auto-cura onde os búfalos eliminam espontaneamente os parasitas com as fezes (Starke et al., 1983).

A transmissão do *T. vitulorum* aos bezerros búfalos ocorre principalmente através do colostro, sendo esta transmissão confirmada por diversos pesquisadores (Baruah et al., 1981; Roberts, 1990b e Starke et al., 1992). Já na transmissão pré-natal ainda existem algumas dúvidas, pois alguns pesquisadores não conseguiram comprová-la. Desta forma, Mia et al. (1975) não encontraram larvas em fetos e nem em animais desmamados logo ao nascer, mesmo quando provenientes de vacas búfalas infectadas natural ou experimentalmente.

Em geral, o ciclo de ascaridídeos no hospedeiro definitivo, pode iniciar-se pela ingestão de ovos com a larva infectante. As larvas eclodem no duodeno, penetram na mucosa, atingem os capilares linfáticos e/ou sanguíneos e migram pelo corpo do animal. Durante esta migração as larvas mudam de estágio (larva 3 para larva 4) no fígado,

chegam ao coração, pulmões e completam o ciclo retornando ao intestino onde atingem a maturidade sexual eliminando ovos pelas fezes do animal (Smith, 1994). No entanto, os detalhes desde a eclosão das larvas e sua migração do intestino para o fígado e pulmões, voltando para o intestino delgado pela via traqueal, são pouco esclarecidos para *T. vitulorum* (Murrel et al., 1997). Em investigações recentes, foi demonstrado que a larva que emerge do ovo, a infectante, é a larva de terceiro estágio (L3) (Araujo, 1972 e Fagerholm et al., 2000). Chauhan e Pande (1972), estudando o comportamento migratório do *T. vitulorum* em ratos albinos, verificaram que a eclosão destas larvas ocorria duas horas após a infecção na região intestinal e a primeira invasão larval pela parede do intestino ocorria já nas primeiras quatro horas. As larvas alcançavam o fígado em seis horas e os pulmões em dois a 15 dias pós-infecção. Esta rota da migração larval da parede do intestino para o fígado foi confirmada pela presença das larvas e de suas lesões.

Warren (1971) observou a migração e o desenvolvimento do *T. vitulorum* em hospedeiros naturais (búfalos) e experimentais (camundongos). Desta forma, vacas bovinas foram infectadas experimentalmente, com sucesso, através da ingestão de ovos infectantes deste parasita, pois detectou-se ovos nas fezes e larvas no colostro destes animais. Os bezerros alimentados com colostro/leite destas vacas infectadas experimentalmente adquiriram a infecção por *T. vitulorum*; mas aqueles que não mamaram, dentro de 24 horas após o nascimento, não desenvolveram esta infecção. Warren (1971) também observou que as larvas de *T. vitulorum* migravam para a glândula mamária nos bovinos e que os bezerros adquiriam a infecção através de suas mães após o nascimento. Além disso, não houve evidências de uma infecção direta ou infecção pré-natal dos bezerros, nem uma migração somática deste parasita nos bezerros examinados. Já o estudo da migração do *T. vitulorum* em camundongos, por Warren (1971), sugere que as larvas de *T. vitulorum* não fazem a migração traqueal nestes animais, entretanto, uma pequena quantidade de larvas são capazes de realizar a migração somática para a musculatura esquelética. Apesar disso, é evidente o desaparecimento de larvas no tecido dos camundongos, devido a morte, ou devido a diferentes rotas realizadas pelas larvas dentro do hospedeiro. Desta maneira, parece provável que a maioria das larvas de *T. vitulorum* em camundongos é destruída por reações teciduais do hospedeiro.

Roberts (1990a) constatou que o período pré-patente deste parasita variava de 22 a 28 dias, que o pico máximo da infecção ocorria aos 36 dias de idade e que o período



patente durava 35 dias em média. Além disso, os mesmos autores verificaram que a viabilidade dos ovos coletados nas fezes era de 92 a 97 %, e o comprimento destes parasitas nas necrópsias era de 15 a 31 cm para fêmeas e 10,6 a 20,4 cm para os machos adultos. Da mesma maneira, Starke et al. (1983) verificaram que bezerros búfalos aos 11 dias de idade já apresentavam ovos de *T. vitulorum* nas fezes e atingiam o pico de parasitismo em torno de 30 a 50 dias de idade. Mais tarde, Starke et al. (1993), examinando exemplares adultos de *T. vitulorum* em bezerros búfalos com idades de 1 a 80 dias observaram que os machos mediam de 15,0 a 27,5 cm e as fêmeas de 16,5 a 40,0 cm de comprimento. Roberts (1990b), estudando a dinâmica da infecção por *T. vitulorum*, observou que larvas infectantes marcadas radioativamente e administradas dentro do intestino delgado foram infectantes para búfalos em todas as idades. As larvas penetraram na mucosa do intestino delgado entre dois a oito horas depois da administração. Muitas larvas foram diretamente para o fígado através da veia porta, mas algumas penetraram nos nódulos linfáticos mesentéricos. Após 90 horas, algumas larvas migraram para os pulmões, e outras para a musculatura, cérebro, rins e nódulos linfáticos periféricos. Em búfalas prenhes, as larvas cresceram no fígado e pulmão até atingirem 500 a 600 μm de comprimento e em seguida migraram para a glândula mamária oito dias antes do parto. Na glândula mamária as larvas cresceram ainda mais, atingindo 1200 μm e passaram para o leite principalmente durante os primeiros sete dias após o parto. Confirmando estes dados, Starke et al. (1992) constataram a presença de larvas com 886 a 1700 μm de comprimento no colostro de 14 búfalas examinadas (70 %) no período entre o parto e o 26º dia pós-parto. Dos bezerros búfalos, 26,7 % encontravam-se parasitados nos primeiros 10 dias de vida, 66,7 % aos 20 e 100 % aos 30 dias.

Outras espécies de animais podem ser hospedeiros erráticos de larvas do gênero *Toxocara* levando a um quadro de larva migrans visceral que é causada pela migração aberrante do parasita no organismo destes hospedeiros (Roberts, 1993). Os parasitas *Toxocara canis* e *Toxocara cati* podem causar o mesmo em humanos (Beaver, 1956 e Soulsby, 1983). No entanto, ainda não existem evidências de que ovos embrionados de *T. vitulorum* possam infectar humanos, mas é possível que a larva migrans visceral pela ingestão de leite cru contaminado com larvas, ocorra em crianças do trópico úmido (Fernando et al., 1970), onde os ovos de *T. vitulorum* são abundantes no meio rural (Roberts, 1989).



Com relação a imunidade, Roberts (1993) relatou que vacas búfalas produzem anticorpos contra o antígeno excretor-secretor (ES) e somático de *T. vitulorum*. Os anticorpos passam para seus bezerros através do colostro, mas não os protegem contra a infecção causada por este helminto (Rajapakse et al., 1994a). No entanto, Amerasinghe et al. (1992) constataram imunidade humoral em camundongos após a imunização destes animais com os antígenos ES e somático de *T. vitulorum* após vários desafios com ovos infectantes deste parasita. A confirmação da existência de anticorpos específicos foi verificada *in vitro* incubando-se o soro de bezerros búfalos recém-nascidos com larvas de *T. vitulorum*, pela formação de precipitados orais e pela morte das larvas 72 horas após (revisado por Roberts, 1993). Rajapakse et al. (1994b) constataram imunidade humoral em ratos injetando-se nestes animais soro e colostro de vacas búfalas infectadas naturalmente com *T. vitulorum* pela redução do número de larvas nos tecidos destes animais.

Eosinofilia e sinais pulmonares no hospedeiro natural parasitado com *T. vitulorum* são, provavelmente, respostas imune celulares em decorrência da migração larval. Entretanto, as búfalas podem influenciar o grau do parasitismo de seus bezerros depois do parto (Roberts, 1993). Esta influência seria manifestada através de diferentes níveis de resistência adquirida observada, principalmente, na intensidade de reações inflamatórias e eosinofílicas ao redor das larvas migratórias no tecido do hospedeiro materno. A intensidade destas reações no hospedeiro materno poderia determinar a morte da larva ou a sua viabilidade e migração para a glândula mamária com conseqüente transmissão aos recém-nascidos (Casarosa, 1953; Abeydeera e Roberts, 1991).

3.2. Mastócitos: Aspectos gerais

Os mastócitos são células frequentemente encontradas no tecido conjuntivo e na mucosa de muitos órgãos. Eles são caracterizados por possuírem grandes e numerosos grânulos, com uma matriz de proteoglicana de coloração metacromática devido seu conteúdo de sulfato de glicosaminoglicana (GAG). Estas células também contêm histamina, e são elas as responsáveis pela maior parte destas aminas nos tecidos de mamíferos. Uma outra característica dos mastócitos é a presença de receptores com alta afinidade por IgE (FcεRI). Além da histamina, os mastócitos contêm ou produzem



outros compostos com ações biológicas que desempenham papéis de mediadores da inflamação (Enerbäck e Norby, 1990).

Os mastócitos também produzem citocinas como as interleucinas (IL): IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e o fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos/macrófagos (GM-CSF) (Stevens e Austen, 1989). A IL-3 e o GM-CSF são as principais citocinas que promovem a proliferação e a diferenciação de mastócitos. A IL-3 parece ser importante na proliferação precoce de mastócitos, enquanto GM-CSF, que é produzida por células estromais na medula óssea, atuam na diferenciação e maturação destas células (Metcalf et al., 1997). Além disso, IL-3 é uma importante citocina indutora da diferenciação e proliferação de mastócitos e está diretamente relacionada com respostas de mastócitos nas infecções parasitárias. Desta forma, quando anti-IL-3 era aplicada em camundongos parasitados com *Nippostrongylus brasiliensis* antes e durante a infecção experimental, ocorria uma redução de 40 a 50 % na população de mastócitos da mucosa intestinal, indicando a importância de IL-3 na proliferação destas células durante a infecção parasitária (Madden et al., 1991). Já a IL-4, Brown e Hural (1997) relataram a sua associação nos tecidos inflamados, tendo importante papel em regular a produção de anticorpos, a hematopoiese, a inflamação e as respostas imunes efetoras. Além de IL-4 estar relacionada com alergias, crescimento de tumores e susceptibilidade a certas doenças infecciosas, também pode exercer papel protetor na imunidade a alguns parasitas extracelulares (Brown e Hural, 1997). Os efeitos biológicos de IL-4 são mediados pela sua ligação a receptores de alta afinidade (IL-4R) encontrados na maioria das células da linhagem hematopoiética, incluindo mastócitos, eosinófilos, linfócitos B e T e basófilos, assim como da linhagem não hematopoiética (Lowenthal et al., 1988). A produção de IgE, por exemplo, depende da ligação de IL-4 a receptores (IL-4R) sobre a membrana de linfócitos B (Finkelman et al., 1991).

Foi identificado, recentemente, o gene regulador ou fator transcricional específico denominado IL-4 STAT6, que é ativado após a estimulação das células por IL-4 em murídeos (Keegan et al., 1994 e Rothman et al., 1994). Além disso, IL-4 causa um aumento da adesão de linfócitos, eosinófilos e basófilos ao endotélio capilar resultando em uma migração transendotelial para o local inflamado. IL-4 é um fator quimiotático para mastócitos e induz a expressão de receptores IgE nestas células. Além disso, mastócitos produzem IL-4 em baixos níveis, estocando-a em seus grânulos secretórios. Após a ativação pela IgE, mastócitos aumentam a sua produção e as liberam para o meio extracelular (Brown e Hural, 1997). Mastócitos estão amplamente distribuídos

pelo corpo e estrategicamente localizados em proximidade direta com muitos alvos da ação desta citocina. Estes alvos incluem células endoteliais, brônquios, musculatura lisa, tecido conjuntivo e nervos. Desta forma, mastócitos podem exercer um papel central na iniciação e no comando das respostas de hipersensibilidades imediata e tardia (Gordon et al., 1991), onde IL-4 tem um importante papel neste processo. Mastócitos, por outro lado, permanecendo fixos em tecidos e podendo proporcionar alta concentração desta potente citocina, desempenham uma função central nas respostas imunes (Brown e Hural, 1997).

Existem subpopulações de mastócitos estrutural, biológica e funcionalmente distintas. Em espécies de roedores a mucosa gastrointestinal e outras mucosas contém um fenótipo de mastócito que é funcional e biologicamente diferente dos mastócitos encontrados em outros tecidos conjuntivos, assim como os da pele e peritônio. Estes dois tipos de células são comumente chamadas de mastócitos de mucosa (MMC) e mastócitos do tecido conjuntivo (CTMC) (Enerbäck e Norby, 1990). Existem diferenças fenotípicas entre estas células, como por exemplo o tamanho; os CTMC são bem maiores (10 a 20 μm) que os MMC (5 a 10 μm). Os MMC aumentam consideravelmente nas respostas imunes dependentes de linfócitos T como em certas infecções por parasitas intestinais e possuem a protease RMCP II (Mayrhofer e Fisher, 1979). Em contraste, os CTMC mostram pouca ou nenhuma dependência de linfócitos T, pois ocorrem em ratos atímicos em números semelhantes aos dos animais normais (Aldenberg e Enerbäck, 1985). A quantidade de histamina e serotonina (5-hidroxitriptamina – 5 HT) é bem mais elevada no CTMC do que no MMC. Somente os MMC contém prostaglandinas e leucotrienos. Somente o CTMC é degranulado pelo composto 48 / 80 e a substância P e possuem a protease RMCP I (Metcalf et al., 1997). Os grânulos metacromáticos de mastócitos peritoneais de ratos são compostos de GAG e grandes proteínas. Estes dois componentes granulares além de formar a matriz granulocítica são responsáveis pela conexão entre os componentes de baixo peso molecular, como a histamina e a serotonina (Enerbäck e Norby, 1990). Além disso, diferentes tipos de mastócitos humanos já foram isolados e estes também exibem variações em suas características, assim como no tamanho e estruturas citoplasmáticas dos grânulos, quantidades de mediadores estocados, sensibilidade à estimulação por várias substâncias e susceptibilidade a várias drogas. Talvez a principal diferença entre as subpopulações de mastócitos humanos seja a protease contida nos grânulos. Há evidências da presença de dois tipos de proteases. Alguns mastócitos humanos contém

altos níveis de triptase e quimase (MC^{TC}), outros contém somente a triptase (MC^T). Tendo conhecimento disso, pode-se acrescentar que quase nada se sabe sobre mastócitos de búfalos, visto que os experimentos relatados na literatura se restringem a estudos com ratos, camundongos e o homem.

A origem e a diferenciação dos mastócitos ocorrem na medula óssea. Células precursoras de mastócitos derivam do ramo mielóide, migram pela corrente sanguínea e entram nos tecidos onde são capazes de se diferenciarem morfológicamente em mastócitos. Um precursor comum pode diferenciar-se tanto em mastócito de mucosa como em mastócito do tecido conjuntivo (Enerbäck e Norby, 1990).

Mastócitos também desempenham importantes funções em reações inflamatórias contra helmintos no trato intestinal. O grande acúmulo destas células na mucosa intestinal durante certas infecções parasitárias está associado com a presença da imunoglobulina IgE específica contra o parasita em questão. A liberação de mediadores pelos mastócitos pode contribuir para a resposta inflamatória local. Estes mediadores podem causar a destruição do parasita, recrutando outras células efetoras como os eosinófilos, induzindo a hipersecreção de muco, alterando a contratilidade intestinal e o aumento do peristaltismo que interfere no processo de fixação do parasita e sua expulsão pelo hospedeiro (Nutman, 1993). A ativação de mastócitos e os mediadores liberados alteram o transporte de íons, como cloro através do epitélio intestinal, o qual pode contribuir para a expulsão do parasita. Interações mútuas entre nervos e mastócitos com liberação de histamina e neurotransmissores tem sido associada com as alterações de transportes iônicos e diarreias em animais infectados (Perdue et al., 1990).

3.3. Eosinófilos: Aspectos gerais

Os eosinófilos são originados na medula óssea (eosinófilos promielócitos) em pequena quantidade e são caracterizados pela presença de dois tipos principais de grânulos eosinofílicos: grandes grânulos cristalóides e pequenos grânulos primários. Os grânulos cristalóides são organelas altamente acidófilas, que podem conter mais da metade do total de proteínas existente na célula, consistindo de uma partícula biconvexa contendo no centro um cristalóide eletrondenso. O cristalóide é envolvido por uma matriz amorfa, que é limitada por uma membrana. Os grânulos com conteúdo cristalóide contem 4 proteínas principais: proteína básica principal (MBP), proteína catiônica

(ECP), peroxidase (EPO) e neurotoxinas (EDN) (revisado por Butterworth, 1977). A proteína MBP pode ativar o sistema de complemento, induzir a liberação de histamina de basófilos e mastócitos, estimular a liberação de enzimas dos neutrófilos e atrair plaquetas para o local da inflamação, que por sua vez secretam serotonina e outras substâncias bioativas que afetam a coagulação sanguínea pela neutralização da heparina (Levy e Kita, 1996). O grânulo primário contém enzimas como arilsulfatase, peroxidase, fosfatase alcalina e histaminase (Butterworth, 1977). O'Donnell et al. (1991) confirmaram *in vitro* que MBP induzia a liberação de histamina de basófilos humanos e de mastócitos peritoneais de ratos. Além disso, MBP está relacionada a mecanismos de morte de parasitas (Lewis et al., 1978). Como mediadores secundários, produzidos após a ativação de eosinófilos, incluem leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF) e outros mediadores lipídicos (Meeusen, 1999).

Os eosinófilos podem fagocitar uma variedade de partículas, incluindo bactérias, outros microorganismos e tecido morto. Mas sua capacidade de fagocitar complexos imunes é bem mais eficiente do que as que foram citadas. A fagocitose nestas circunstâncias é seguida pela degranulação do eosinófilo, pela fusão dos grânulos com os vacúolos fagocíticos (Ascher e Hirsch, 1963), e depois pela liberação de enzimas lisossomais dentro dos vacúolos (Cline et al., 1968).

Os eosinófilos podem secretar algumas citocinas e fatores de crescimento, incluindo interleucinas IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, TGF α e β (fator transformador do crescimento), GM-CSF e TNF α (fator de crescimento de tumor) (Moqbel et al., 1994). Estas citocinas são as principais substâncias mediadoras da hematopoiese e de respostas imunes, regulando a proliferação, diferenciação e as funções de várias células que constituem o sistema imune (Hirai et al., 1997). A IL-1 age nas respostas imunes do hospedeiro, apresenta sinergismo com outras citocinas, mas possui principalmente atividades no processo inflamatório agudo (Theodorou et al., 1994). A síntese local de IL-5 foi associada com a ativação de eosinófilos em tecidos inflamados (Sugane et al., 1996). Desta forma, IL-5 participa no processo de proliferação e diferenciação de precursores de eosinófilos, prolonga a sobrevivência destas células e é quimiotática para eosinófilos (Yamaguchi et al., 1988ab; Lopez et al., 1988). Além disso, IL-5 também é produzida por mastócitos (Bradding, 1993), que liberam esta citocina para o meio quando ativados pela IgE (Okayama et al., 1995) e desta forma atuando no recrutamento, ativação e sobrevivência de eosinófilos. Posteriormente, Okayama et al.

(1997) confirmaram também a secreção de IL-5, GM-CSF e TNF α por mastócitos estimulados por IgE, sugerindo um sinergismo na ação de mastócitos e eosinófilos por estas citocinas na degranulação de eosinófilos em um processo de hipersensibilidade imediata. A liberação das citocinas IL-3, GM-CSF e IL-5 por mecanismos autócrinos e/ou parácrinos de eosinófilos pode estar envolvida no recrutamento e na persistência da infiltração de eosinófilos na mucosa intestinal (Desreumaux et al., 1996). Outro fator que indica a cooperação de mastócitos e eosinófilos nos processos de hipersensibilidade é a presença do fator de quimiotaxia para eosinófilos na anafilaxia (ECF-A) liberado por mastócitos na hipersensibilidade imediata (Goetzel e Austen, 1975). C5a e C3a são componentes do complemento que exercem uma potente ação quimiotática de eosinófilos (Kay et al., 1973). Desta forma, eosinófilos são atraídos para o local da inflamação por uma reação de hipersensibilidade imediata pelo ECF-A acumulado pela degranulação dos grânulos de mastócitos e pelos componentes do complemento. Além disso, este fenômeno pode levar os eosinófilos a fagocitar o excesso de grânulos de mastócitos dispersos no tecido (Welsh et al., 1959) ou a liberar enzimas como a arilsulfatase (Orange et al., 1974) e inativação de SRS-A (substância de atividade lenta de anafilaxia), antagonizando os efeitos adversos e exagerados das hipersensibilidades imediatas (Wasserman et al., 1974 citado por Goetzel et al., 1975). IL-5 e IL-8 atuam na migração dos eosinófilos (Oliveira et al., 1996), IL-5 como também IL-3 e o GM-CSF induzem a eosinofilia em infecções helmínticas e podem ter um papel central na proliferação, diferenciação, sobrevivência e recrutamento de eosinófilos (Desreumaux et al., 1996). IL-3 e GM-CSF aumentam a degranulação e a quimiotaxia dos eosinófilos e estimulam sua migração intraepitelial (Hirai et al., 1997). Eosinófilos também têm a capacidade de produzir, armazenar e secretar IL-4, que desempenha importante papel nas respostas inflamatórias (Brown e Hural, 1997). TGF β são substâncias produzidas por eosinófilos capazes de modular a resposta imune e inflamatória pela inibição da proliferação e da ativação de linfócitos e macrófagos, e pela depressão da produção de citocinas por células imunes. Além disso, TGF β induz a apoptose de eosinófilos, inibe a degranulação nos tecidos e a proliferação destas células na medula óssea (Hirai et al., 1997). A citocina TGF β está também envolvida em processos fibróticos causando proliferação de fibroblastos e aumentando a secreção de colágeno (Kovacs, 1991), sugerindo sua participação na formação de granulomas.



Recentemente, Mishra et al. (1999) comprovaram que eosinófilos são normalmente residentes do trato gastrointestinal, como participantes da imunidade inata, principalmente, contra os parasitas. Eles expressam receptores do complemento que podem ser usados para mediar a citotoxicidade contra helmintos, imunomodular o processo inflamatório através de citocinas e manter a integridade tecidual. Os autores demonstraram ainda que eosinófilos dirigem-se para o trato gastrointestinal durante o desenvolvimento embrionário de camundongos, independentemente da flora intestinal, e atingem níveis comparáveis ao do animal adulto no período perinatal. No trato gastrointestinal, estas células são predominantemente moduladas por uma quimiocina denominada eotaxina, secretada por células mononucleares da lâmina própria, mesmo na presença de altos níveis de IL-5.

3.4. Papel de mastócitos e eosinófilos na infecção por helmintos

As helmintoses gastrointestinais estão associadas com o aumento do número de mastócitos de mucosa (MMC), células globulares na lâmina própria e no epitélio do trato gastrointestinal de roedores (Levy e Frondoza, 1983). Segundo Miller (1984), citado por Huntley et al. (1982), estudos em roedores infectados com *Nippostrongylus brasiliensis* têm mostrado que o aparecimento de MMC é imunologicamente mediado, mas suas funções na mucosa não tem sido bem esclarecidas.

Devido ao acúmulo de MMC na mucosa intestinal durante o período de expulsão de nematódeos do trato intestinal, acredita-se que estas células contribuem para este processo (Rothwell, 1989). Por outro lado, IFN γ e IL-12, mediados por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1), promovem a sobrevivência do parasita (Finkelman et al., 1997). A maioria dos trabalhos envolvendo mastócitos nas reações inflamatórias contra infecções por helmintos gastrointestinais parasitas foi realizada com roedores, evidenciando-se mastocitose e eosinofilia (Jarret e Miller, 1982; Dwinell et al., 1995 e Starke e Oaks, 1997). Desta forma, há evidências de que a ativação no local da infecção e a elevação dos níveis de produtos sistêmicos de mastócitos tem sido associadas com a expulsão de certos parasitas (Befus e Bienenstock, 1982 e Jarret e Miller, 1982). A infecção causada em ratos ou camundongos pelo *N. brasiliensis* tem servido como um excelente modelo para estudar a imunidade de mucosa e a evolução da infecção. A infecção experimental por este nematódeo em ratos adultos foi descrita, inicialmente,

por Taliaferro e Sarles (1939). Em uma infecção primária, aproximadamente todos os parasitas adultos foram espontaneamente expelidos do jejuno entre os dias 14 e 16 após a infecção. Em infecções subseqüentes, os parasitas foram expelidos muito mais rapidamente (Levy e Frondoza, 1983). Em outro trabalho com ratos, Miller e Jarret (1971) verificaram que a infecção por *N. brasiliensis* provocava uma mastocitose na mucosa intestinal, que era máxima por ocasião da expulsão dos parasitas. Além disso, durante este estágio os MMC migraram para o epitélio intestinal (Miller e Jarrett, 1971). Citocinas como IL-4 e IL-13 podem ter importante papel na imunidade protetora contra nematódeos parasitas, uma vez que estas citocinas são necessárias para promover a produção de anticorpos IgE que estimulam mastócitos a ativarem-se e a degranularem-se (Urban et al., 2000). Trabalhos recentes realizados com *Trichinella spirallis* e *N. brasiliensis* em camundongos, revelaram que a expulsão destes parasitas era dependente de IL-13 e IL-4, da presença de IL-4R e da ativação da molécula STAT6 (Urban et al., 1998 e McKenzie et al., 1998). Urban et al. (2000) demonstraram que há características comuns na ação das citocinas que promovem imunidade protetora contra *T. spirallis* e *N. brasiliensis*, mesmo sabendo que os mecanismos efetores que promovem a expulsão destes parasitas não sejam os mesmos. A expulsão de *T. spirallis*, ao contrário de *N. brasiliensis*, é dependente da ativação de mastócitos. Urban et al. (2000) verificaram que a ativação de STAT6 por IL-4 e IL-13 em mastócitos induzindo a mastocitose intestinal era necessária para expulsão de *T. spirallis*. Desta forma, embora IL-4 induzia a expulsão de *N. brasiliensis* na ausência de linfócitos B, T e mastócitos, mastócitos e linfócitos T eram necessários para a ativação de IL-4 na expulsão de *T. spirallis* (Urban et al., 2000). De acordo com Finkelman et al. (2000) a molécula STAT6 regula a produção de IL-4 por linfócito auxiliar (Th) e é necessária para a sobrevivência das células Th2 de memória. Por outro lado, Behnke et al. (1993) verificaram que quando camundongos eram simultaneamente infectados com *T. spirallis* e *Heligmosomoides polygyrus*, a expulsão de *T. spirallis* pelos hospedeiros era altamente afetada, devido a redução da mastocitose e a presença de baixos níveis de proteases de mastócitos no soro dos animais. Este estudo demonstrou que *H. polygyrus* era capaz de modular seletivamente a secreção de citocinas por linfócitos auxiliares do tipo 2 (Th2) no interior de nódulos linfáticos mesentéricos e consequentemente deprimir as respostas inflamatórias agudas para favorecer a sobrevivência e a manutenção do parasita dentro do hospedeiro. *H. polygyrus* deprime a imunidade homóloga e heteróloga e facilita a permanência de outros nematódeos intestinais (Barriga e Myser, 1987). Da mesma

forma, em bovinos, a infecção por *Ostertagia ostertagi* tem sido associada com acúmulo de eosinófilos na mucosa do abomaso, mas sem associação direta com proteção do hospedeiro contra este parasita (Claerebout e Vercruysse, 2000).

Por outro lado, Nawa et al. (1994) realizando uma revisão sobre os mecanismos efetores da expulsão dos helmintos intestinais, verificaram que os mastócitos intestinais e as células caliciformes eram altamente seletivos neste processo. Os mastócitos pareciam agir mais efetivamente contra *Strongyloides sp* e as células caliciformes contra *N. brasiliensis*. Por outro lado, Winter et al. (1997) acompanharam as respostas imunes celulares de cordeiros contra a infecção primária por *Nematodirus battus*, com ênfase ao período de expulsão destes helmintos pelos hospedeiros. Verificaram então, que a mastocitose e o aumento de eosinófilos no tecido eram coincidentes com a expulsão dos parasitas pelos hospedeiros, principalmente durante o período inicial deste processo. No entanto, eosinófilos apresentavam-se em contagens relativamente baixas durante o período da infecção, mas aumentavam durante a expulsão até atingir o pico no período em que os parasitas já tinham sido expelidos. Por outro lado, Rothwell et al. (1993), verificaram uma correlação inversa entre a eosinofilia sangüínea e a contagem de ovos nas fezes de cordeiros infectados repetidamente com *T. colubriformis*, confirmando a associação entre a resistência aos parasitas e a eosinofilia.

Bischoff et al. (1996) quantificaram mastócitos e eosinófilos na lâmina própria por métodos histoquímicos e imunohistoquímicos em pacientes sofrendo de síndrome de Crohn's ou cólica ulcerativa. Os anticorpos contra os grânulos de proteína triptase e quimase sugeriram que a diminuição no número de mastócitos foi devida à sua degranulação. Os dados mostrando alteração na população de mastócitos e eosinófilos em pacientes com doenças inflamatórias do intestino indicaram que ambos os tipos de células estavam envolvidos na patogênese da inflamação intestinal.

Mastócitos e eosinófilos são fontes potentes de mediadores inflamatórios, assim como, histamina, enzimas proteolíticas, proteínas catiônicas e metabólitos do ácido aracdônico, e ambos os tipos celulares são encontrados freqüentemente em barreiras gastrointestinais (Befus et al., 1985).

Recentemente, Eversole et al. (1999) verificaram aumento do número de eosinófilos na lâmina própria e no epitélio da mucosa intestinal na infecção por *N. brasiliensis* em camundongos. Estes eosinófilos migraram na lâmina própria, à medida que a infecção progredia, da cripta para o vilo, em direção a região subepitelial, e daí atravessavam a lâmina basal para a região intraepitelial. Durante esta migração, os

eosinófilos aumentavam de tamanho e estendiam o citoplasma, mas não degranulavam. Este estudo sugeriu que esta migração de eosinófilos para a área intraepitelial, seria uma tentativa destas células exercerem uma ação citotóxica direta contra os parasitas adultos no lúmen intestinal.

Parsons et al. (1993) demonstraram que a eosinofilia no sangue e no tecido era bastante consistente em animais infectados com larvas de *T. canis*. A hipereosinofilia, com níveis de eosinófilos circulantes bastante altos, chegando a atingir 50% a mais que o normal, também foi observada em humanos infectados com *T. canis*. O mecanismo responsável por estas respostas eosinofílicas em toxocaríoses é desconhecido, mas parece estar direcionada contra os produtos excretor-secretores (ES) da larva. Os antígenos ES também estão envolvidos no mecanismo de aderência de eosinófilos à cutícula da larva em áreas do fígado altamente infiltradas por eosinófilos como consequência da migração larval (revisado por Parsons et al., 1993). Além disso, a incubação de larvas infectantes de *T. canis* com soro imune de ratos e enriquecidos com populações de eosinófilos, resultaram na aderência e degranulação de eosinófilos sobre a cutícula da larva (Lombardi et al., 1990). O aprisionamento de larvas por eosinófilos dentro do fígado também tem sido descrito em ratos sensibilizados com larvas de *T. canis* (Parsons e Grieve, 1990a). Exames histopatológicos do fígado após a infecção, mostrou que eosinófilos podem ter um papel importante no aprisionamento destas larvas. No entanto, nem todas as larvas aprisionadas foram mortas e algumas persistiram por no mínimo três meses após a infecção dentro de granulomas fortemente infiltrados por eosinófilos. Este estudo indicou que os eosinófilos não tiveram um papel efetivo preponderante na morte destas larvas (Parsons e Grieve, 1990b).

Desreumaux et al. (1996) observaram que em pacientes com eosinofilia gastroentérica, a IL-3, o GM-CSF e a IL-5 apresentaram papel importante no recrutamento e na ativação de eosinófilos. A IL-5 é uma citocina muito importante na regulação eosinofílica contra larva de *T. canis* em camundongos (Parsons et al., 1993 e Sugane et al., 1996), *N. brasiliensis*, *Schistosoma mansoni* e *T. canis* (Takamoto e Sugane, 1993). IL-5 regula a eosinopoiese e a diferenciação de eosinófilos na medula óssea (Sanderson et al., 1988). A ausência da eosinofilia seguida pela infecção parasitária em hospedeiros atímicos foi interpretada como um processo imune dependente de linfócitos T (Colley e James, 1979). Entretanto, no caso de toxocaríose, camundongos atímicos ou desprovidos de linfócitos T por tratamentos com anticorpos anti-linfócitos, desenvolveram eosinofilia sanguínea e tecidual após infecção com *T.*

canis (Kayes e Oaks, 1980; Sugane e Oshima, 1982 e Parsons et al., 1989). Por outro lado, no caso de *T. canis*, pode existir adicionalmente um mecanismo de liberação de citocinas linfócito-T-independente, possivelmente por mastócitos, regulando a resposta de eosinófilos a certos parasitas (Nawa et al., 1987). Sabe-se que mastócitos produzem IL-5, GM-CSF e TNF α em respostas aos estímulos dependentes de IgE (Okayama et al., 1997) e fator de quimiotaxia para eosinófilos na anafilaxia (ECF-A) (Goetzl et al., 1975). No entanto, eosinófilos produzem enzimas como fosfatases D, arilsulfatase, histaminases e outras que antagonizam os efeitos exagerados das aminas de mastócitos no local inflamado modulando desta forma a inflamação, principalmente nas hipersensibilidades do tipo I (a que ocorre no processo de expulsão dos parasitas intestinais) (Butterworth, 1977). Além disso, há sugestões de que os eosinófilos fagocitam complexos de antígeno-anticorpo e degradam muitos dos mediadores elaborados nas respostas de hipersensibilidade imediata, assim como histamina, fatores de ativação de plaquetas e substância de ação lenta de anafilaxia (Sugane e Oshima, 1980). Assim, eosinófilos poderiam participar em parte com uma resposta de defesa contra os parasitas mas também com uma resposta adaptativa secundária controlando os efeitos prejudiciais das reações mediadas por IgE/mastócitos (Butterworth, 1977).

Vários experimentos conduzidos com ovinos parasitados com diferentes parasitas gastrointestinais, também revelaram que mastócitos liberam importantes mediadores inflamatórios como uma resposta protetora contra parasitas. Mastócitos de mucosa e leucócitos globulares foram comumente isolados de abomaso de ovinos normais e desafiados com *Ostertagia circumcincta*. No entanto, Huntley et al. (1984) concluíram, através de estudos morfométricos, que mastócitos após prolongada ativação antigênica migravam para o epitélio da mucosa gástrica e sofriam alterações granulares, os quais foram reconhecidos, como leucócitos globulares.

Huntley et al. (1986) isolaram de mastócitos de ovinos uma protease semelhante a quimiotripsina com atividade esterase, com peso molecular entre 19 e 25 Kd. Esta protease, denominada por protease de mastócitos de ovinos (SMCP) era liberada por mastócitos de ovinos após o parasitismo por *Haemonchus contortus* e *Ostertagia circumcincta* (Huntley et al., 1987).

Posteriormente, Jones et al. (1992) isolaram MMC do intestino delgado de ovinos imunizados contra *T. colubriformis* e confirmaram que a protease SMCP era liberada destes mastócitos após a incubação com antígenos deste parasita. Além da



protease, Jones e Emery (1991) observaram que ovinos imunizados contra *T. colubriformis* apresentavam altos níveis de mediadores inflamatórios (prostaglandina F, leucotrienos (C4), tromboxanos (B2) e histamina) no conteúdo intestinal, onde prostaglandinas estavam presentes em níveis mais altos. Estes resultados indicaram que estes mediadores podiam desempenhar importante papel na expulsão dos parasitas. Tromboxanos aumentam a agregação de plaquetas, prostaglandinas-E tem efeito na dilatação de vasos sanguíneos aumentando a permeabilidade vascular; os leucotrienos B4, são quimiotáticos para neutrófilos e aumentam permeabilidade vascular, enquanto os C4, D4 e E4 estimulam a contração muscular e também aumentam permeabilidade vascular (Tizard, 1996).

Huntley et al. (1992) verificaram que a protease SMCP, liberada de mastócitos de ovinos resistentes ao *H. contortus*, estava associada com a não habilidade das larvas infectantes em se estabelecerem dentro da mucosa do abomaso. A perda desta resistência estava associada com o tratamento com corticosteróides, onde houve significativa redução no número de mastócitos e de níveis de protease no muco.

McClure et al. (1992) estudando também o processo de auto-cura de ovinos infectados por *T. colubriformis*, verificaram que a maioria das larvas era expulsa pelo hospedeiro imunizado no primeiro dia após a infecção. Esta expulsão estava associada com a presença de leucócitos globulares e aumento do nível de anticorpos específicos anti-*T. colubriformis* (IgG1 e IgG2) no muco intestinal. A expulsão subsequente dos parasitas adultos que se estabeleceram nestes animais, ocorreu entre 3 e 14 dias pós-infecção e estava associada com aumento de anticorpo IgA e IgG2 anti-*T. colubriformis* no muco, infiltração local de linfócitos T e necrose epitelial. Posteriormente, Jones et al. (1994) e Douch et al. (1996) enfatizaram que os mediadores inflamatórios liberados por mastócitos (SMCP, histamina e PAF) produziam inibição da migração larval de *T. colubriformis in vitro*. Além disso, estes mediadores encontravam-se em alta concentração no muco intestinal, justamente ao redor da época em que ocorria o declínio na contagem de ovos deste parasita nas fezes, em uma infecção primária e após o desafio em animais já imunes. Estes resultados sugeriram mais uma vez que mastócitos e seus mediadores inflamatórios tinham importante papel na expressão da imunidade e expulsão dos parasitas pelo animal. Além da resposta imune celular ocorrida durante a rejeição de parasitas intestinais, uma resposta imune-humoral também podia estar associada. Desta forma, Winter et al. (1997) verificaram que ovinos eram capazes de produzir altos níveis de anticorpos específicos contra *N. batatus*,



principalmente durante o período de expulsão destes helmintos pelos animais 21 dias pós-infecção. Friend et al. (2000) estudando a fase de recuperação de camundongos infectados por *T. spirallis*, verificaram que após a expulsão dos parasitas ocorria uma involução da mastocitose e da eosinofilia tecidual a nível de mucosa intestinal. Fato também constatado por Starke e Oaks (1999) com *Hymenolepis diminuta* em ratos. A diminuição na população destas células ocorreu primeiramente devido ao processo de apoptose local, mas em pequena porcentagem (cerca de 3 %) (Starke e Oaks, 1999); mas principalmente, pela migração dos eosinófilos para os linfonodos mesentéricos e dos mastócitos para o baço (Friend et al., 2000). No baço, estes mastócitos apresentavam o núcleo segmentado possivelmente devido ao processo de envelhecimento celular, para serem em seguida, destruídos por macrófagos. Por outro lado, a maioria dos eosinófilos encontrava-se nos linfonodos sofrendo o processo de apoptose e sendo em seguida fagocitado por macrófagos (Friend et al., 2000).

No entanto, algumas espécies de helmintos gastrointestinais induzem a proliferação e o recrutamento de células efectoras para o local parasitado, mas os parasitas não são expelidos pelos hospedeiros. Exemplo disso, são os parasitas *H. diminuta* em certas cepas de ratos (Starke e Oaks, 1999), *H. polygyrus* e *Trichuris muris* em camundongos (Finkelman et al., 1997). Recentes estudos com roedores infectados com *T. spirallis*, *H. polygyrus*, *N. brasiliensis* e *T. muris* tem proporcionado importantes informações a cerca dos mecanismos imunes protetores contra nematódeos gastrointestinais. Destes estudos, Finkelman et al. (1997) destacam em uma revisão 4 generalizações: 1. linfócitos T CD4⁺ são células críticas para a proteção do hospedeiro; 2. IL-12 e IFN γ produzidos por linfócitos Th1 inibem a imunidade protetora; 3. IL-4, produzida por linfócitos Th2 pode: a) ser necessária para a proteção do hospedeiro, b) limitar a severidade da infecção, ou c) induzir mecanismos protetores redundantes, e 4. que algumas citocinas que são produzidas em resposta a infecção gastrointestinal podem falhar em induzir a proteção do hospedeiro contra alguns parasitas. Ainda segundo Finkelman et al. (1997), os hospedeiros podem apresentar habilidades para reconhecer características de certos parasitas e estimular uma resposta protetora efetiva. Por outro lado, os hospedeiros podem também organizar um conjunto de mecanismos de defesa contra os parasitas, mesmo se não necessários para protegê-los contra esse particular parasita e desta maneira causando danos ao hospedeiro infectado.

3.5. Quadro hematológico de búfalos

Filho et al. (1972) visando conhecer o quadro hematológico de búfalos normais adultos efetuaram o hemograma completo de 23 búfalos da raça Jaffarabadi, nascidos no Brasil, em regime de criação extensiva e obtiveram os seguintes resultados: eritrócitos 9×10^6 a $10 \times 10^6 \text{ mm}^3$ (média $9,6 \times 10^6$); hemoglobina 11,8 a 13,7 % (média 12,8 %); volume corpuscular médio (VCM) 33 a $93 \mu^3$ (média 36); hematócrito 32 a 37 % (média 34 %); leucócitos 15.860 a 17.554 / mm^3 (média 16.700); neutrófilos 31 a 39 % (média 35,9); eosinófilos 10,5 a 15 % (média 13); linfócitos 41 a 51 % (média 46).

Takarkhede et al. (1973) estudaram os parâmetros fisiológicos e biológicos do sangue de 20 bezerros búfalos machos, com 6 a 12 meses de idade e encontraram os seguintes valores médios: eritrócitos $6,8 \times 10^6/\text{mm}^3$; hemoglobina 11,65 gm %; leucócitos 13.036 / mm^3 ; neutrófilos 30,45 %; linfócitos 64,05 %; eosinófilos 1,3 % e hematócrito 30,08 %.

Singh e Malik (1977) examinaram o quadro hematológico de sete bezerros búfalos machos. Primeiramente com alimento disponível e depois retirando a alimentação para verificar se ocorria mudanças nos exames. Observaram um significativo aumento nas taxas de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito nos dias em que estes animais estavam jejuando, e as diferenças entre o grupo controle e experimental não foram estatisticamente significantes.

Omar e Barriga (1991) infectaram por sucessivas vezes fêmeas de coelhos com ovos embrionados de *T. vitulorum* e observaram que cada infecção era seguida de alterações hematológicas com o aumento dos níveis de eosinófilos periféricos logo aos 15 dias após a primeira infecção; um moderado aumento no número de basófilos logo após cada infecção; e a diminuição nos níveis de monócitos, que poderia estar relacionada com a morte ou a expulsão dos parasitas dos hospedeiros.



4. MATERIAL E MÉTODOS.

4.1. Local.

Este experimento foi conduzido na Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEP), do Campus de Ilha Solteira / UNESP, situada no Município de Selvíria (MS), à margem direita do rio Paraná.

4.2. Animais.

Foram utilizados bezerros búfalos, mestiços (Mediterrâneo x Murrah), nascidos de fevereiro a abril de cada ano (98, 99 e 2000), que permaneceram juntos com as mães em um piquete de 12 ha formado com *Brachiaria brizantha* e por um lago. As búfalas não foram ordenhadas durante todo o período de execução do trabalho e os bezerros foram desmamados naturalmente.

4.3. Delineamento experimental.

Os animais foram divididos em seis grupos sendo dois grupos controles não parasitados e quatro grupos parasitados, com quatro animais em cada grupo.

Antes do parto, as búfalas foram colocadas em piquetes próximos ao curral para facilitar a observação. As búfalas, cujos bezerros pertenciam aos grupos controles não parasitados, foram desverminadas uma semana antes e no mesmo dia do parto com fosfato de levamisol na dose de 3,75 mg / Kg pv (20 ml). Os bezerros dos grupos controles foram desverminados no dia do nascimento e semanalmente com o mesmo

anti-helmíntico e na mesma dose e foram tratados para coccidiose com medicamentos à base de sulfa. As fezes foram colhidas semanalmente para exames coprológicos. Os animais controles ($n = 4$) foram então separados em dois grupos: um grupo controle com 30 dias (C30) e outro com 50 dias de idade (C50).

As mães e os bezerros pertencentes aos grupos parasitados não foram desverminados. Após o nascimento, as fezes foram colhidas para exames coprológicos semanais. Os animais parasitados ($n = 4$) foram então separados de acordo com OPG em quatro grupos: 1) compreendendo animais desde o início da eliminação dos ovos nas fezes e até alcançarem o pico (fase de início e ascensão – ASC); 2) quando os animais atingiam o pico máximo de eliminação de ovos nas fezes (fase de pico - PICO); 3) quando a quantidade de ovos começava a declinar (fase do declínio ou expulsão - DECL) e a fase de expulsão do parasita quando os ovos não eram mais encontrados nas fezes por até um mês consecutivo (fase de ausência ou pós-expulsão - AUS). Os animais dos grupos, controles e parasitados, foram mantidos com suas mães até o sacrifício.

4.4. Exames coprológicos: contagens de ovos por grama de fezes (OPG).

Após o nascimento e, em seguida, semanalmente, as fezes para os exames coprológicos foram colhidas diretamente do reto de cada animal e foram transportadas para o laboratório em sacos plásticos devidamente identificados. Para a realização destes exames foram utilizados aproximadamente 16 animais naturalmente infectados.

As contagens dos ovos de nematódeos por grama de fezes (OPG) foram realizadas em câmara McMaster conforme a técnica preconizada por Gordon & Whitlock (1939) modificada por Whitlock (1948).

4.5. Exames de sangue.

O sangue foi colhido da jugular em frascos com anti-coagulante EDTA sal dissódico (10 %) e o esfregaço de sangue feito no momento da colheita. A colheita de sangue foi realizada a cada 15 dias, do nascimento dos animais controles ($n = 2$ a 6) e infectados ($n = 4$ a 18) até a idade de 174 dias. A coloração foi feita com o corante



Giemsa para contagem diferencial de leucócitos segundo Neto et al. (1981). Além disso, contagens globais de eritrócitos, leucócitos, hematócrito e volume corpúscular médio foram realizadas no contador automático de células (Celm R CC-550 com impressora 626).

4.6. Necrópsias.

Os animais foram previamente anestesiados com Xilazina 2 % (dose = 0,25 a 1,50 ml/100 Kg IM) e Ketalar (dose = 0,15 ml /Kg IM). Após o animal estar completamente anestesiado este foi posicionado em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta. Os intestinos foram identificados segundo Sisson et al. (1986), o duodeno tendo início no piloro, sua parte cranial passando dorsalmente para a superfície visceral do fígado, onde forma uma curva com o formato de um “S”, o jejuno formando numerosas espirais próximas, ao redor da borda do mesentério, e o íleo que é definido como a parte terminal do intestino delgado, da borda livre da prega ileocecal até o óstio ileocecal; sua parte cranial é aderida ao ceco e cólon e penetra na junção do ceco e do cólon, obliquamente na superfície medial. Após serem devidamente identificados, cada porção do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foi seccionada; o duodeno na sua região cranial ou mediana, o jejuno em sua região cranial e mediana e o íleo próximo da prega íleo-cecal, porém preferencialmente onde o enovelado dos parasitas era perceptível. Em seguida procedeu-se a retirada dos segmentos. Os segmentos seccionados foram de aproximadamente 15 cm e abertos no sentido longitudinal. Estes segmentos foram lavados em salina tamponada (1,93g de NaHCO_3 , 0,37g de KCl e 14,4g de NaCl) e transferidos abertos para uma folha de isopor umedecida com salina tamponada e em temperatura ambiente. Em seguida, com auxílio de bisturi, segmentos de dois a três cm foram seccionados, colocados abertos em papel cartão e transferidos imediatamente para o fixador. O fixador utilizado foi a solução de Bouin.

4.7. Tratamentos das amostras de tecidos.

As amostras de tecidos permaneceram no fixador por 12 horas e, em seguida, foram transferidas para frascos com álcool etílico a 70% após prévio enxague de três a quatro vezes neste álcool. As amostras permaneceram em álcool até posterior



processamento. Os tecidos foram desidratados através de passagens sucessivas em etanol 70, 80, 90 e 100 % , diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos em parafina.

As amostras de tecidos intestinais, em blocos de parafina, foram seccionadas em micrótomo (5 μ m) e montadas em lâminas de vidro através da técnica histológica padrão.

4.8. Coloração dos tecidos intestinais.

As secções teciduais foram montadas em lâminas de microscópio, hidratadas através de passagens sucessivas por xilol e etanol 100, 95, 90, 75, 70% e, em seguida, coradas.

Para exames morfológicos, as secções intestinais foram coradas pela hematoxilina eosina (H.E.) e para as contagens de mastócitos e eosinófilos, utilizou-se as técnicas de coloração específica pelo Azul de Astra e “Direct Red”, respectivamente, segundo Duffy et al. (1993).

Após a coloração, os tecidos foram desidratados com etanol e xilol e montados entre lâmina e laminula com bálsamo do Canadá.

4.9. Contagem de células.

A quantificação de mastócitos e eosinófilos foi feita na mucosa para cada unidade de vilo-cripta (UVC), escolhendo-se as vilosidades que mais se igualavam em altura e largura. Para a quantificação na submucosa e no músculo, contavam-se as células de uma área que apresentava a mesma largura correspondente do vilo e da cripta. Foram observadas um total de 30 UVCs (três lâminas) para cada segmento intestinal (duodeno, jejuno e íleo), as contagens foram feitas em microscópio óptico em aumento de 400 vezes. No íleo, as células presentes no tecido conjuntivo que recobre as placas de Peyer também foram contadas de acordo com a largura da vilosidade em questão. Estas contagens foram realizadas a “duplo cego”.



4.10. Contagem de parasitas.

Logo após a retirada dos fragmentos teciduais e de colocá-los no fixador, o intestino delgado restante (duodeno, jejuno e íleo) foi lavado em salina tamponada e suas paredes raspadas para a retirada do conteúdo. Este material foi colocado em cálice de sedimentação de um litro, o volume foi completado com água e deixado em repouso por três horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e o sedimento recolhido. Esta lavagem foi feita por duas ou três vezes consecutivas. O material sedimentado nos cálices foi fixado em formalina morna a 10% e os parasitas presentes neste conteúdo foram identificados e contados com auxílio do microscópio estereoscópico e óptico.

Os nematódeos adultos de *T. vitulorum* visualizados na necrópsia foram colhidos, contados e acondicionados em vidros com álcool a 70%.

4.11. Delineamento estatístico.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, com seis grupos: dois grupos controles com animais não infectados (C30 e C50) e quatro grupos de animais naturalmente infectados durante as fases de ascendência, pico, declínio e ausência do parasitismo. Em três porções do intestino delgado, duodeno, jejuno e íleo, foram realizadas as avaliações das contagens de mastócitos e de eosinófilos na unidade vilo-crípta (UVC), submucosa (SM) e muscular (M). As placas de Peyer foram analisadas somente no íleo. Foram estudados quatro animais em cada grupo (repetição). Para a verificação das médias foi utilizado o Teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Para os exames diferenciais de leucócitos e para o hemograma, também foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial com dois grupos (tratamentos): controles ($n = 2$ a 6) e infectados ($n = 4$ a 18), sendo observados em diferentes épocas (no nascimento e da primeira a 11^o quinzena). Para o estudo das médias também utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.



5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros parasitológicos

O grau de parasitismo por *T. vitulorum* dos bezerros búfalos foi avaliado através das contagens de ovos por grama de fezes (OPG).

Através de amostras de fezes examinadas semanalmente do nascimento aos 106 dias de idade, observou-se que os animais iniciaram o parasitismo pré-patente em torno de 11 a 37 dias ($27,6 \pm 7,1$); atingiram o pico ao redor de 37 a 62 dias após o nascimento ($49 \pm 9,5$). O período de patência variou de 65 a 104 dias ($78 \pm 15,4$). Após o pico, o número de ovos começou a cair, até que se tornassem ausentes nos animais à partir dos 85 dias de idade (Figura 1 e Tabela 1). Assim, constatou-se que este parasitismo apresentou uma curva com quatro fases: início e ascensão (ASC - fase 1) que compreendeu o período entre 11 e 37 dias; pico máximo da contagem de ovos nas fezes (PICO - fase 2) compreendendo entre 35 e 62 dias; declínio ou expulsão do parasita (DECL - fase 3) entre 44 e 78 dias em média e ausência ou pós-expulsão (AUS - fase 4) a partir de 85 dias de idade em média (Figura 2). O número do OPG médio e da contagem média de *T. vitulorum* adulto para cada fase do parasitismo encontra-se na Tabela 2.

TABELA 1. Períodos de pré-patência, patência e pico do parasitismo por *Toxocara vitulorum* nos bezerros búfalos nascidos no ano de 2000.

	Períodos		
	Pré-patência	Pico	Patência
M ± DP	27,64 ± 7,1	49 ± 9,5	78 ± 15,4
Amplitude	11 - 37	37 - 62	65 - 104

M = média
DP = desvio padrão

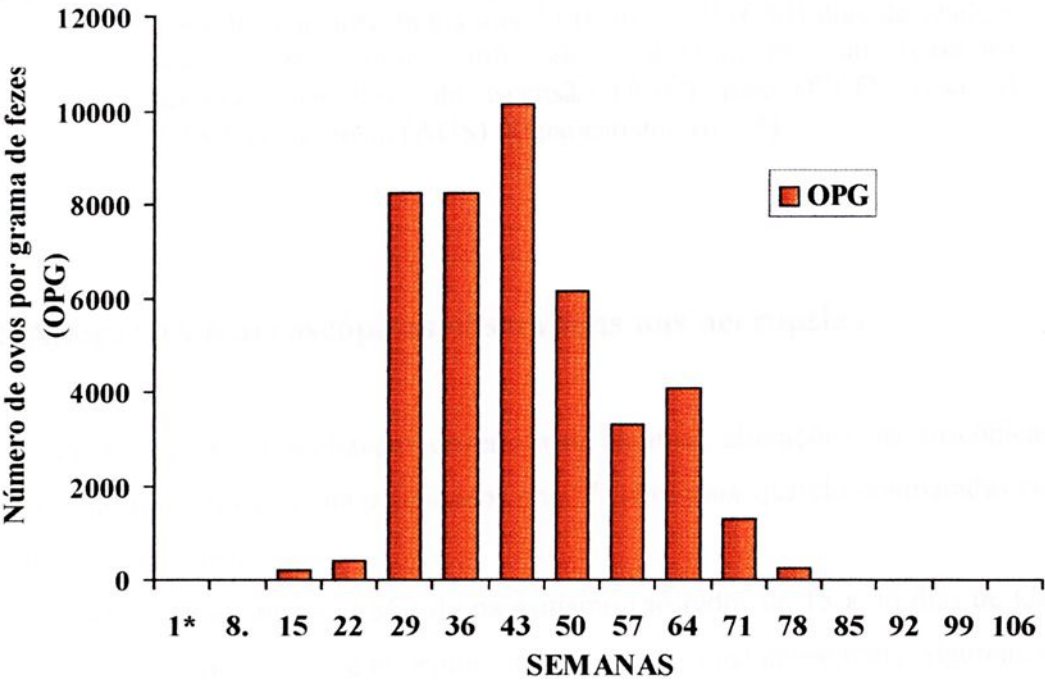


FIGURA 1. Dados médios das contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de bezerros búfalos (n = 16) do nascimento aos 106 dias de idade, naturalmente infectados com *Toxocara vitulorum*, no ano de 2000.

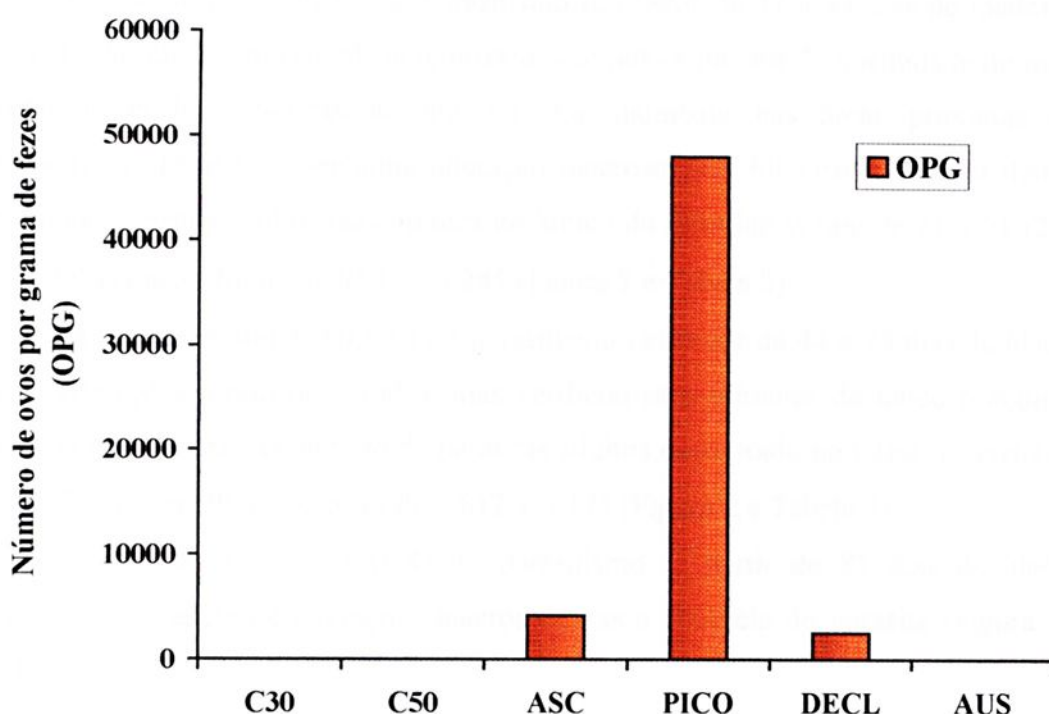


FIGURA 2. Número médio de ovos por grama de fezes (OPG) nos animais controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos bezerros búfalos infectados naturalmente com *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo (n = 4).

5.2. Alterações macroscópicas observadas nas necrópsias

Pelas necrópsias realizadas observou-se algumas alterações macroscópicas na mucosa intestinal dos animais parasitados com *T. vitulorum* quando comparadas com a dos animais controles.

Na fase de ascensão (ASC) do parasitismo (ao redor de 15 a 36 dias de idade), observou-se que no duodeno e no jejuno, a mucosa intestinal apresentava algumas áreas esbranquiçadas e outras hemorrágicas, principalmente próximas às áreas onde os parasitas estavam presentes. Observou-se também um leve aumento na quantidade de muco no interior do lúmen. O íleo apresentava-se sem alterações. O número médio de parasitas adultos encontrados no lúmen intestinal variou de 3 a 20 (10 ± 8) e o OPG médio foi de $4\,150 \pm 3\,566$ (Figura 2 e Tabela 2).

Na fase de pico (PICO) do parasitismo (ao redor de 37 a 43 dias de idade), as alterações da mucosa intestinal caracterizaram-se pelo aumento da quantidade de muco e pelas áreas hemorrágicas na mucosa, especialmente nas áreas próximas dos enovelados de parasitas. Nenhuma alteração macroscópica foi visualizada no íleo. O número de parasitas adultos encontrados no lúmen do intestino variou de 11 a 51 (27 ± 18) e o OPG médio foi de $46\,950 \pm 29\,245$ (Figura 2 e Tabela 2).

Na fase de declínio (DECL) do parasitismo (ao redor de 44 a 78 dias de idade), poucas alterações foram observadas, mas verificou-se a presença de muco e algumas regiões com petéquias. O número de parasitas adultos encontrado no intestino variou de 0 a 2 (0.5 ± 1) e o OPG médio foi de $1\,812 \pm 3\,175$ (Figura 2 e Tabela 2).

Na fase de ausência (AUS) do parasitismo (a partir de 85 dias de idade), constatou-se ausência de alterações macroscópicas e ausência do parasita (Figura 2 e Tabela 2).

Além do *T. vitulorum*, os animais encontravam-se parasitados pelos seguintes parasitas: *Strongyloides papillosus*, *Cooperia punctata* e *Cooperia pectinata* (Tabela 3).

TABELA 2. Dados médios das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) e de contagens de *Toxocara vitulorum* adultos encontrados durante as necrópsias de bezerros búfalos dos grupos controles (n = 4) e dos grupos infectados (n = 4) nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo.

Grupos	OPG	Número de parasitas adultos (machos e fêmeas)	
		Média $\pm$ DP	Variação
C30	0	0	0
C50	0	0	0
ASC	4.150 ± 3.566	3 - 20	10 ± 8
PICO	46.950 ± 29.245	11 - 51	27 ± 18
DECL	1.812 ± 3.175	0 - 2	$0,5 \pm 1$
AUS	0	0	0

DP = Desvio Padrão

C30 = Controle, animais não infectados aos 30 dias de idade (controle).

C50 = Controle, animais não infectados aos 50 dias de idade (controle).



TABELA 3. Outros nematódeos adultos identificados nas necrópsias de bezerros búfalos dos grupos controles com 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos grupos parasitados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo.

Grupos	Número Médio de Nematódeos Adultos								
	<i>Strongyloides papillosus</i>			<i>Cooperia pectinata</i>			<i>Cooperia punctata</i>		
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duoden	Jejuno	Íleo	Duoden	Jejuno	Íleo
				o			o		
C30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C50	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ASC	54	55	0	0	0	0	0	0	0
PICO	21	62	0	0	0	0	0	0	0
DECL	28	43	0	0	0	0	0	0	0
AUS	0	38	0	0	2	0	4	0	0

5.3. Mastócitos no tecido intestinal

De acordo com os dados das contagens de mastócitos da mucosa intestinal de bezerros búfalos pôde-se observar a presença destas células em todas as camadas da parede intestinal, como na mucosa, representada pela UVC (unidade vilo-cripta), SM (submucosa) e M (muscular) do duodeno, jejuno e íleo, tanto dos animais naturalmente infectados por *T. vitulorum*, como nos não infectados (controles). No entanto, a população de mastócitos foi maior nos animais infectados, principalmente no duodeno e no jejuno (Figuras 3 a 11 e Tabela 4).

Os dados das análises estatísticas encontram-se nas Tabelas 8, 9 e 10 (Anexo).

5.3.1. Duodeno

No duodeno, principal local do parasitismo por *T. vitulorum* em bezerros búfalos, constatou-se que foi na lâmina própria da mucosa (UVC), que as contagens de mastócitos apresentaram as maiores alterações. Em relação ao grupo controle (não parasitado), houve um leve aumento da população destas células durante a aquisição e

ascensão do parasitismo, mas aumento significativo ocorreu somente quando os animais encontravam-se no pico, coincidindo também com as maiores contagens de OPG e maior número destes helmintos adultos no intestino, este fato pode ser confirmado pela análise do coeficiente de correlação que demonstrou ser positiva e significativa ($r = 0,98$) (Figuras 2 e 3 e Tabelas 2 e 4).

Coincidentemente com o declínio do OPG nas fezes e dos helmintos adultos no intestino, observou-se que o número de mastócitos também declinou na mucosa, atingindo o nível do controle após a expulsão destes parasitas pelas fezes do animal (fases de declínio e ausência) (Figuras 2 e 3 e Tabelas 2 e 4).

Com relação à submucosa e muscular, houve um leve aumento de mastócitos, que declinou após a eliminação dos parasitas. No entanto, estas alterações não foram significativas em relação ao controle (Figuras 4 e 5 e Tabela 4).

5.3.2. Jejuno

Da mesma forma que no duodeno, *T. vitulorum* também foi encontrado parasitando o jejuno, mas somente na porção inicial do mesmo. No jejuno, houve um aumento considerável no número de mastócitos durante o pico do parasitismo, mas que declinou abruptamente durante a expulsão do parasita pelo hospedeiro (fase do declínio). Este número de células voltou a normalidade quando os animais já não encontravam-se mais parasitados, esta relação de células com o OPG foi confirmada pela análise do coeficiente de correlação que demonstrou ser positiva e significativa ($r = 0,92$) (fase da ausência) (Figuras 2 e 6 e Tabelas 3 e 4).

Na submucosa e muscular houve uma alteração do número de mastócitos, mas não significativamente, durante as fases de ascensão, pico, declínio e ausência (Figuras 7 e 8 e Tabela 4).

5.3.3. Íleo

O íleo (Figuras 9, 10 e 11 e Tabela 4), compreendendo a terceira porção do intestino delgado, local onde o parasita *T. vitulorum* não foi encontrado em nenhum animal necropsiado, a flutuação da população de mastócitos na lâmina própria (UVC) e

muscular não foi significativa, desde a fase de ascensão até à fase de ausência do parasitismo dos animais.

Na submucosa do íleo encontram-se grandes placas de Peyer, que se estendem da musculatura lisa circular e longitudinal até às criptas de Lieberkühn. O tecido conjuntivo que compõe a submucosa se estende por entre as placas de Peyer, tornando-a uma estrutura alongada e estruturada. Os mastócitos que encontravam-se neste tecido conjuntivo foram contados (Figura 11 e Tabela 4). Apesar do número de mastócitos neste local, encontrar-se relativamente elevado (44,6 a 72,0), a diferença entre os grupos não foi significativa.

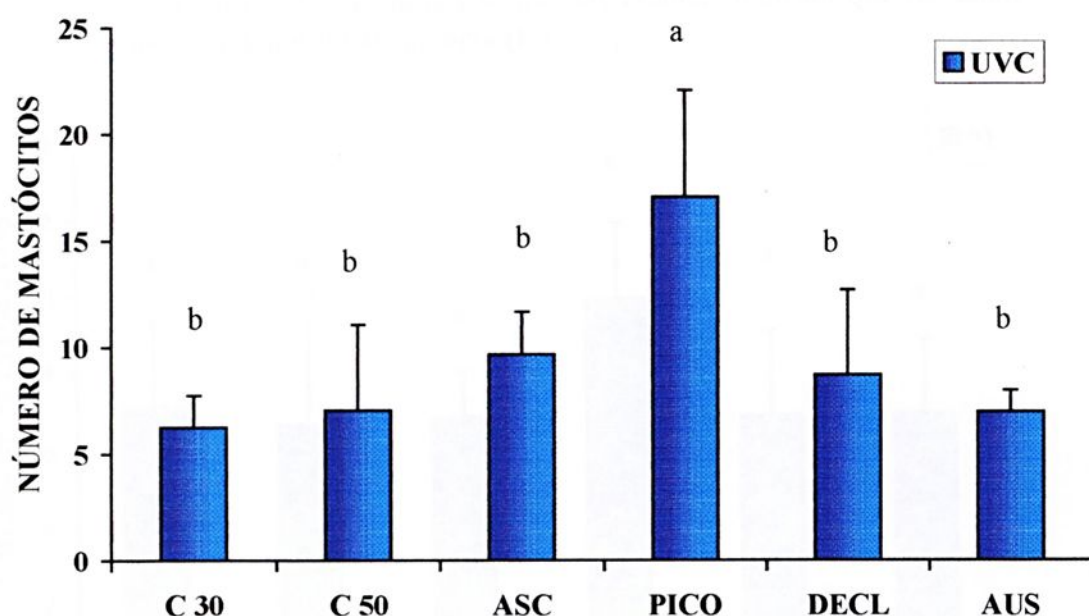


Figura 3. Número médio de mastócitos na UVC (unidade viló-cripta) do duodeno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

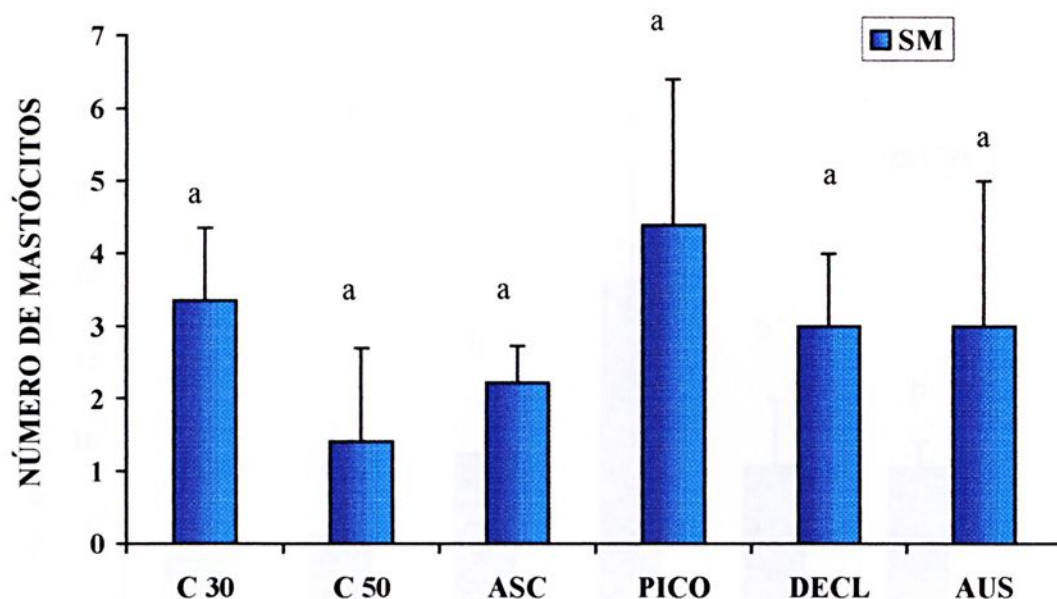


Figura 4. Número médio de mastócitos na SM (submucosa) do duodeno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

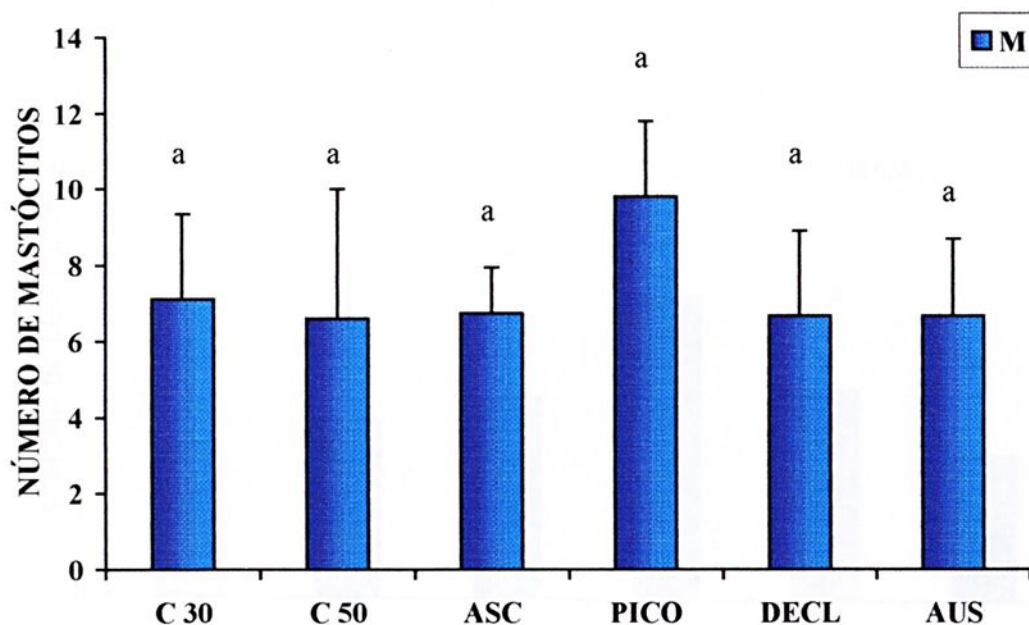


Figura 5. Número médio de mastócitos na M (muscular) do duodeno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

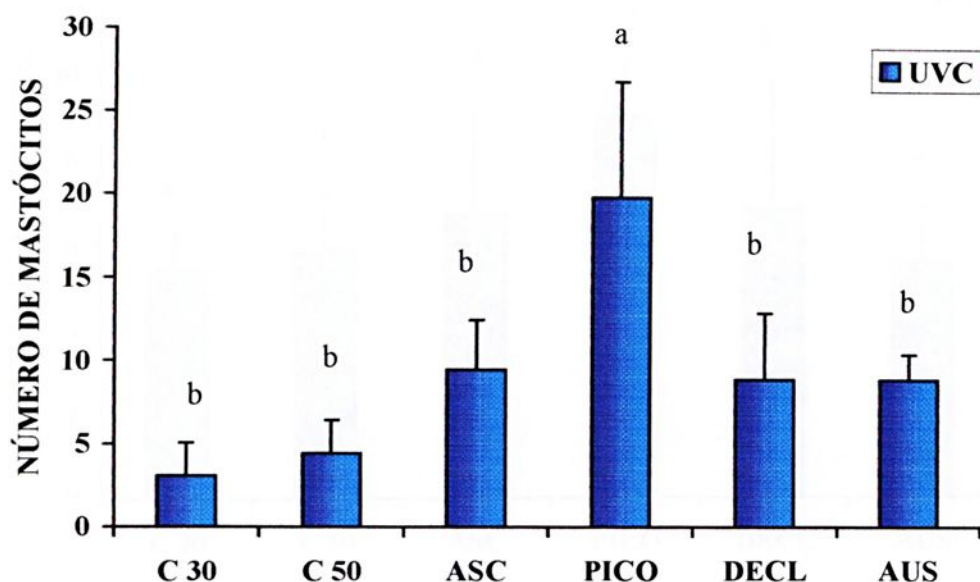


Figura 6. Número médio de mastócitos na UVC (unidade vilo-crypta) do jejuno dos bezerros búfalos controles aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

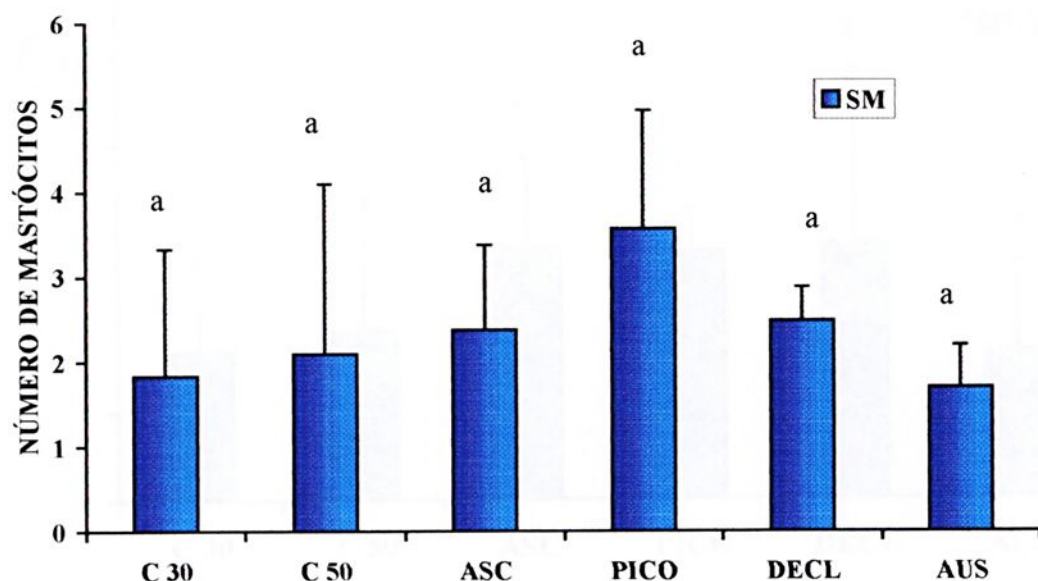


Figura 7. Número médio de mastócitos na SM (submucosa) do jejuno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

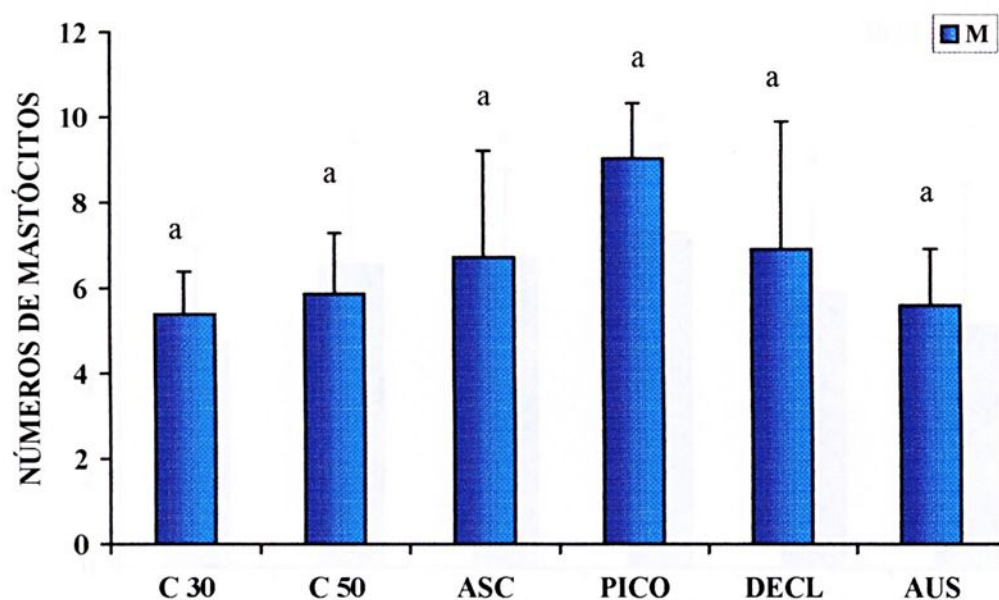


Figura 8. Número médio de mastócitos na M (muscular) do jejuno dos bezerros búfalos controles aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

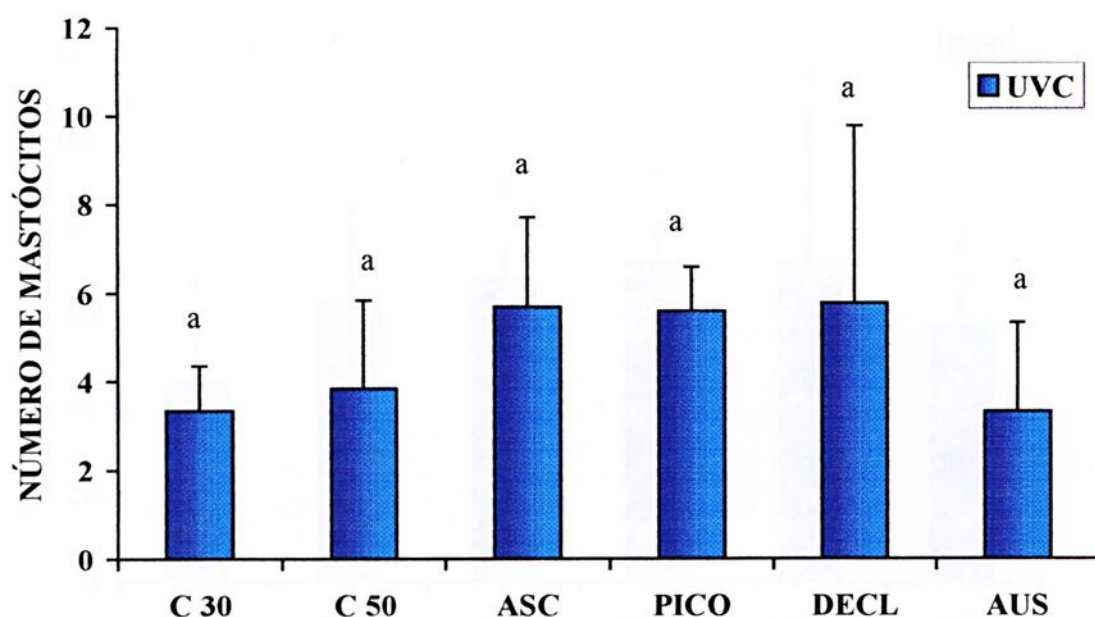


Figura 9. Número médio de mastócitos na UVC (unidade vilo-crípta) do íleo dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

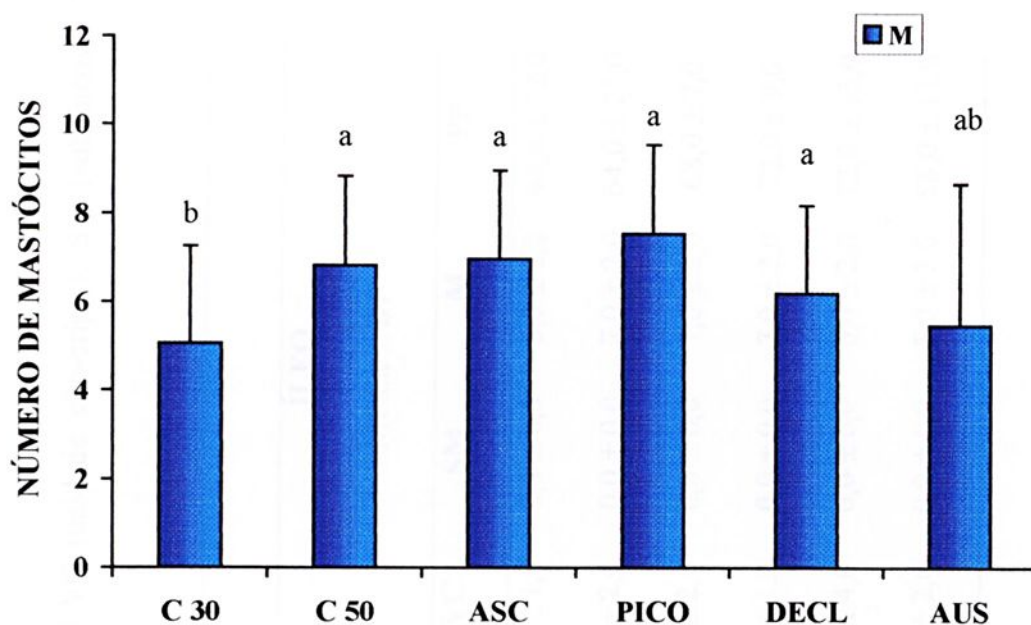


Figura 10. Número médio de mastócitos na M (muscular) do íleo dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

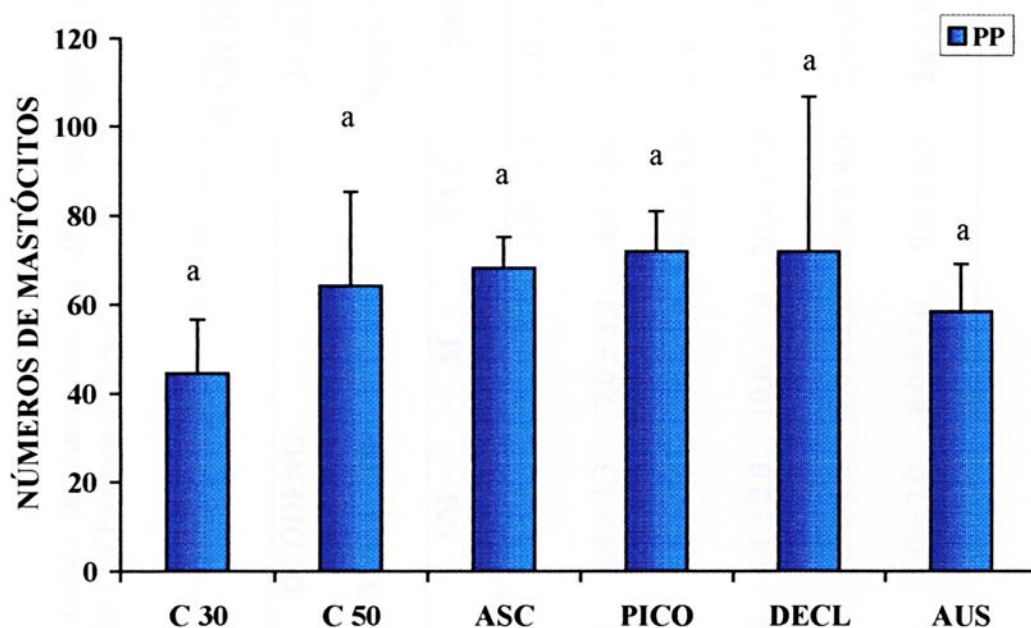


Figura 11. Número médio de mastócitos no tecido conjuntivo ao redor das Placas de Peyer (PP) do íleo dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

TABELA 4. Dados médios de mastócitos nas diferentes regiões do intestino delgado; UVC (unidade vilo-crípta), SM (submucosa), M (muscular) e PP (placa de Peyer).

MASTÓCITOS										
GRUPOS	DUODENO			JEJUNO			ÍLEO			
	Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP			
	UVC	SM	M	UVC	SM	M	UVC	SM	M	PP
C30	6,5 ± 1,6	3,3 ± 1,1	7,1 ± 2,2	3,0 ± 2,0	2,0 ± 1,5	5,0 ± 1,1	3,4 ± 1,0	0,3 ± 0,5	5,0 ± 2,2	44,6 ± 12,0
C50	7,0 ± 4,0	1,4 ± 1,3	7,0 ± 3,4	4,0 ± 2,0	2,0 ± 2,0	6,0 ± 1,4	4,0 ± 2,4	0,0 ± 0,0	7,0 ± 2,0	64,0 ± 21,0
ASC	10,0 ± 2,2	2,2 ± 0,5	7,0 ± 1,0	9,0 ± 3,0	2,4 ± 1,0	7,0 ± 2,5	6,0 ± 2,0	0,0 ± 0,0	7,0 ± 2,0	68,0 ± 7,0
PICO	17,0 ± 5,0	4,4 ± 2,0	10,0 ± 2,0	20,0 ± 7,0	4,0 ± 1,4	9,0 ± 1,3	6,0 ± 1,2	0,0 ± 0,0	7,0 ± 2,0	72,0 ± 9,0
DECL	9,0 ± 4,0	3,0 ± 1,0	7,0 ± 2,0	9,0 ± 4,0	2,5 ± 0,5	7,0 ± 3,0	6,0 ± 4,0	0,0 ± 0,0	6,0 ± 2,0	72,0 ± 35,0
AUS	7,0 ± 1,0	4,0 ± 2,0	6,0 ± 2,0	9,0 ± 1,5	2,0 ± 0,6	6, ± 1,0	3,0 ± 2,0	0,0 ± 0,0	5,0 ± 3,0	58,0 ± 11,0



5.4. Eosinófilos no tecido intestinal

Eosinófilos, também importantes na defesa do hospedeiro contra os parasitas, foram encontrados em números alterados, mas somente na lâmina própria (UVC) do duodeno, jejuno e do íleo. Eosinófilos não foram observados na submucosa e muscular (Figuras 12, 13 e 14 e Tabela 5).

Tanto no duodeno como na primeira porção do jejuno (local do parasitismo), houve um aumento abrupto no número de eosinófilos já a partir da ascensão do parasitismo, fato que pôde ser comprovado pelo cálculo do coeficiente de correlação que demonstrou ser positivo e significativo (duodeno $r = 0,74$ e jejuno $r = 0,70$). Este aumento foi máximo durante o pico, com leve decréscimo por ocasião do declínio e retornando a normalidade com a ausência de parasitas no trato intestinal (Figuras 2, 12 e 13 e Tabela 5).

No íleo, embora não sendo o local de parasitismo, ocorreu um leve aumento desta célula na lâmina própria (UVC) durante as três fases, ou seja, ascensão, pico e declínio do parasitismo, mas retornando a normalidade quando os animais não mais encontravam-se parasitados (Figura 14 e Tabela 5).

Os dados das análises estatísticas encontram-se nas Tabelas 8, 9 e 10 (Anexo).

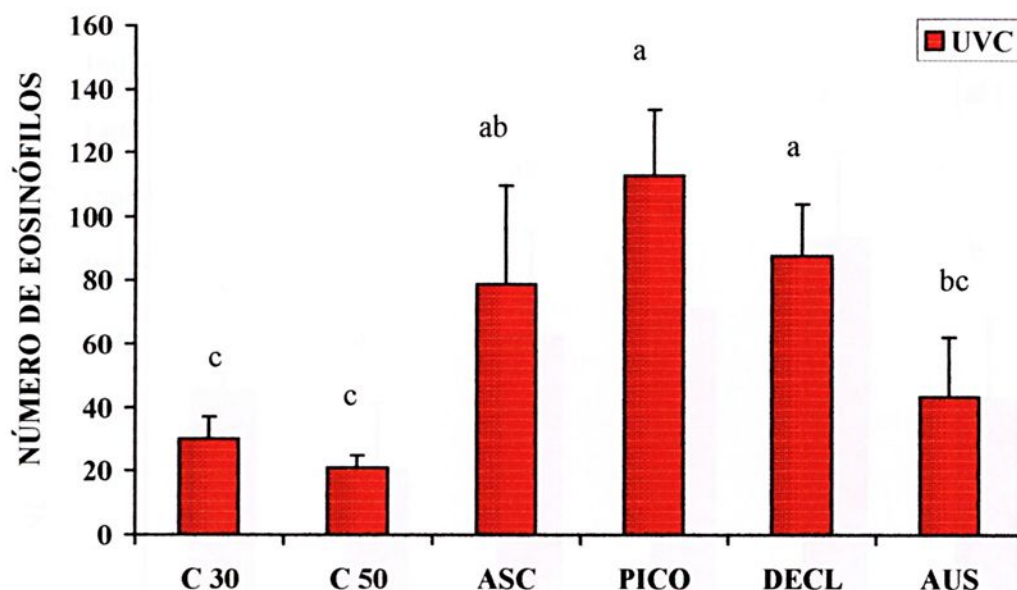


Figura 12. Número médio de eosinófilos na UVC (unidade vilo-crypta) do duodeno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

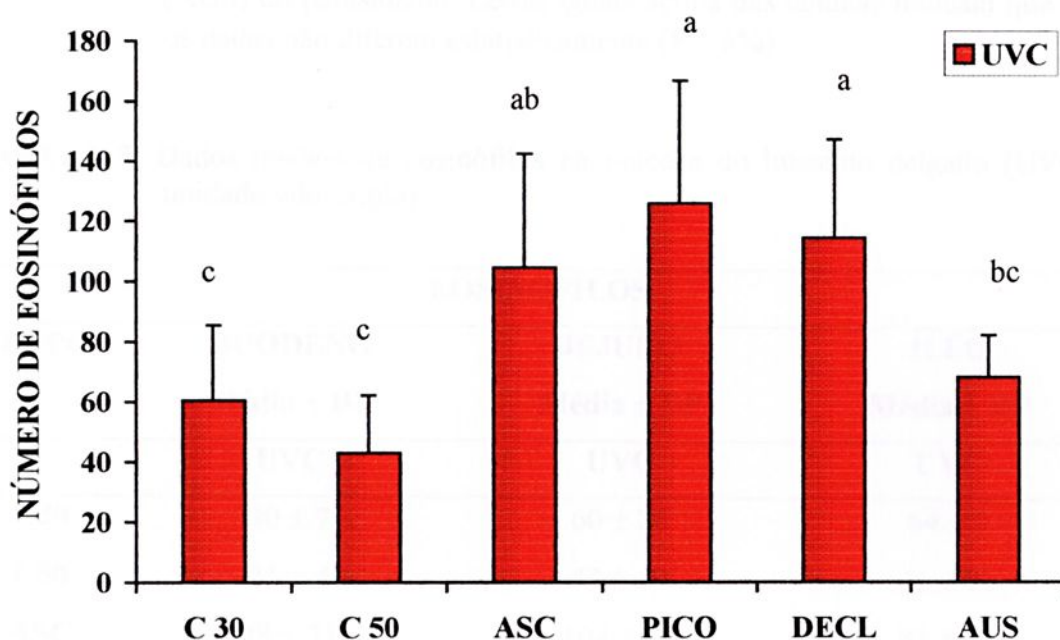


Figura 13. Número médio de eosinófilos na UVC (unidade vilo-crypta) do jejuno dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

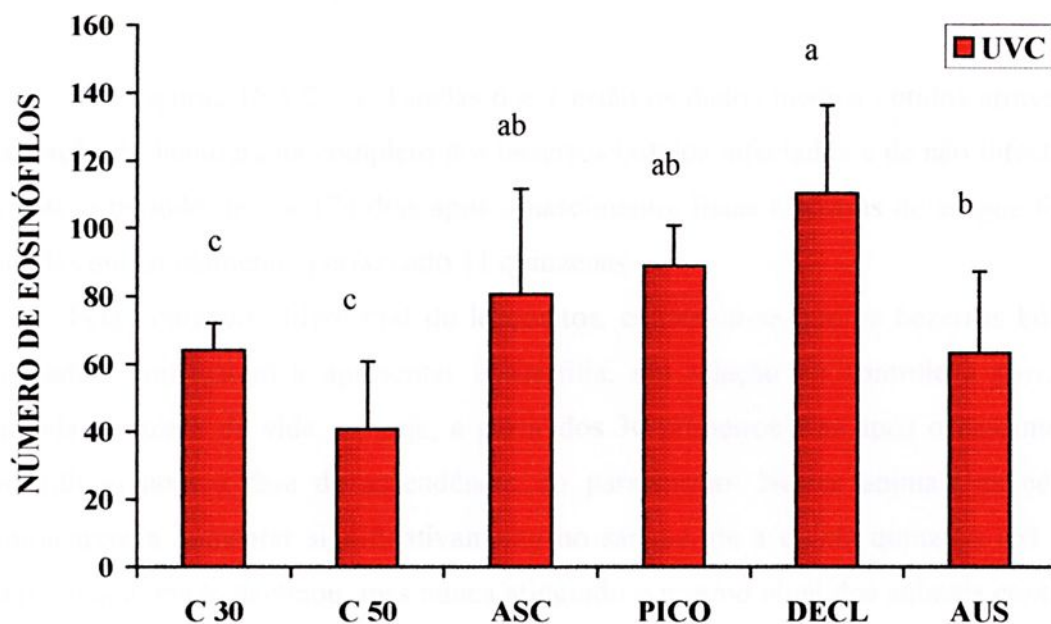


Figura 14. Número médio de eosinófilos na UVC (unidade vilo-crípta) do íleo dos bezerros búfalos controles não infectados aos 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade e nos infectados por *Toxocara vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo. Letras iguais acima das colunas indicam que os dados não diferem estatisticamente ($P < 5\%$).

TABELA 5. Dados médios de eosinófilos na mucosa do intestino delgado (UVC - unidade vilo-crípta).

EOSINÓFILOS			
GRUPOS	DUODENO	JEJUNO	ÍLEO
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
	UVC	UVC	UVC
C30	30 ± 7	60 ± 26	64 ± 9
C50	21 ± 4	43 ± 19	41 ± 20
ASC	78 ± 31	104 ± 39	81 ± 32
PICO	113 ± 22	126 ± 61	89 ± 12
DECL	99 ± 17	114 ± 33	111 ± 26
AUS	43 ± 19	68 ± 14	63 ± 24

DP = desvio padrão; C30 = animais não infectados aos 30 dias de idade (controle); C50 = animais não infectados aos 50 dias de idade (controle).

5.5. Quadro hematológico

Nas Figuras 15 a 21 e Tabelas 6 e 7 estão os dados médios obtidos através da realização do hemograma completo dos bezerros búfalos infectados e de não infectados durante o período de 1 a 174 dias após o nascimento. Estas amostras de sangue foram colhidas quinzenalmente, perfazendo 11 quinzenas.

Pela contagem diferencial de leucócitos, constatou-se que os bezerros búfalos infectados, começaram a apresentar eosinofilia, em relação ao controle a partir da segunda quinzena de vida, ou seja, a partir dos 30 primeiros dias após o nascimento, coincidindo com a fase de ascendência do parasitismo. Nestes animais as células continuaram a aumentar significativamente no sangue até a quinta quinzena (63 - 78 dias), quando então declinou, mas nunca atingindo o mesmo nível dos animais controles (Figuras 15 e Tabela 6).

Os níveis de linfócitos (Figura 16) e neutrófilos (Figura 17) apresentaram diferenças significativas apenas na quinta, sétima e décima quinzenas de vida quando comparados aos dos animais controles, embora os animais infectados apresentassem contagens relativamente maiores do que os grupos controles.

Analisando-se as variações de glóbulos vermelhos (eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos), hematócrito e volume corpuscular médio (VCM), notou-se que não houve diferença significativa entre os dados obtidos para os animais controles e infectados, em quaisquer dos tempos investigados.

Os dados das análises estatísticas encontram-se nas Tabelas 11, 12 e 13 (Anexo).

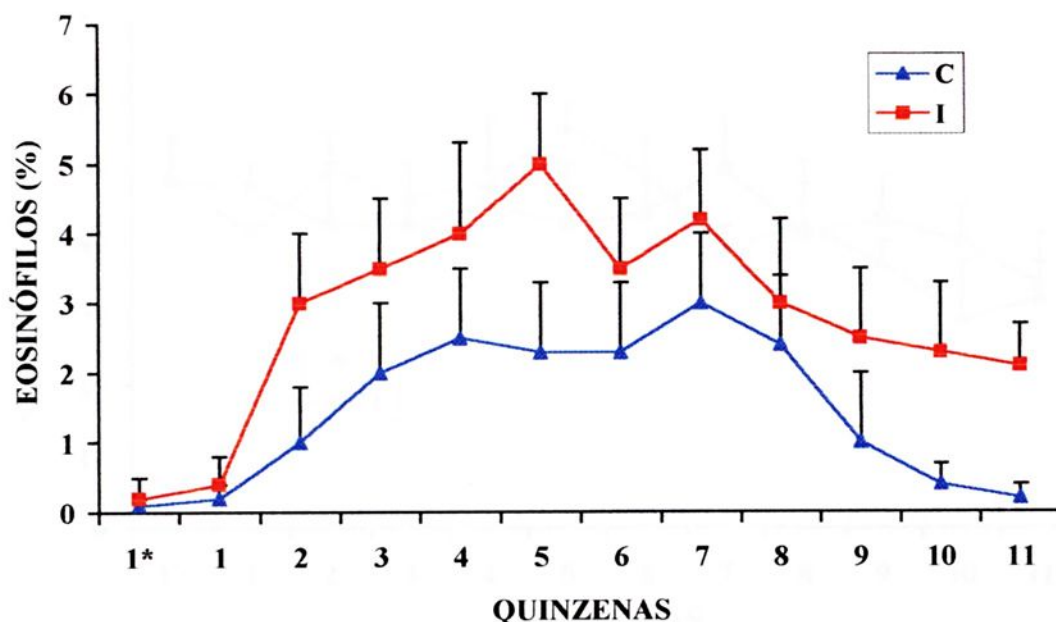


FIGURA 15. Valores médios das contagens relativas de eosinófilos do sangue dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e de controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão (1* = 1 dia de idade).

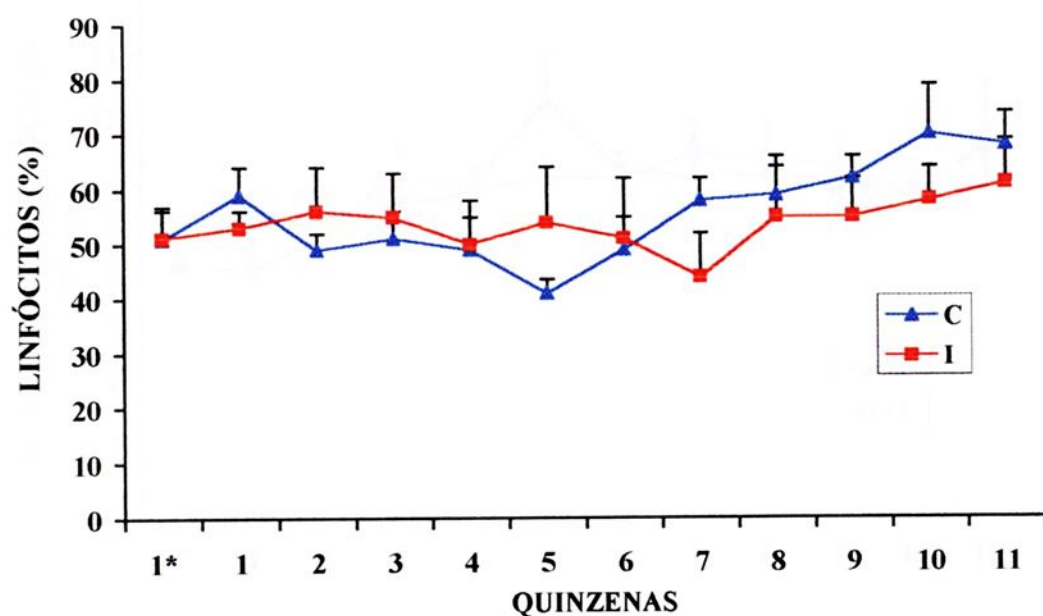


FIGURA 16. Valores médios das contagens relativas de linfócitos do sangue dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão (1* = 1 dia de idade).

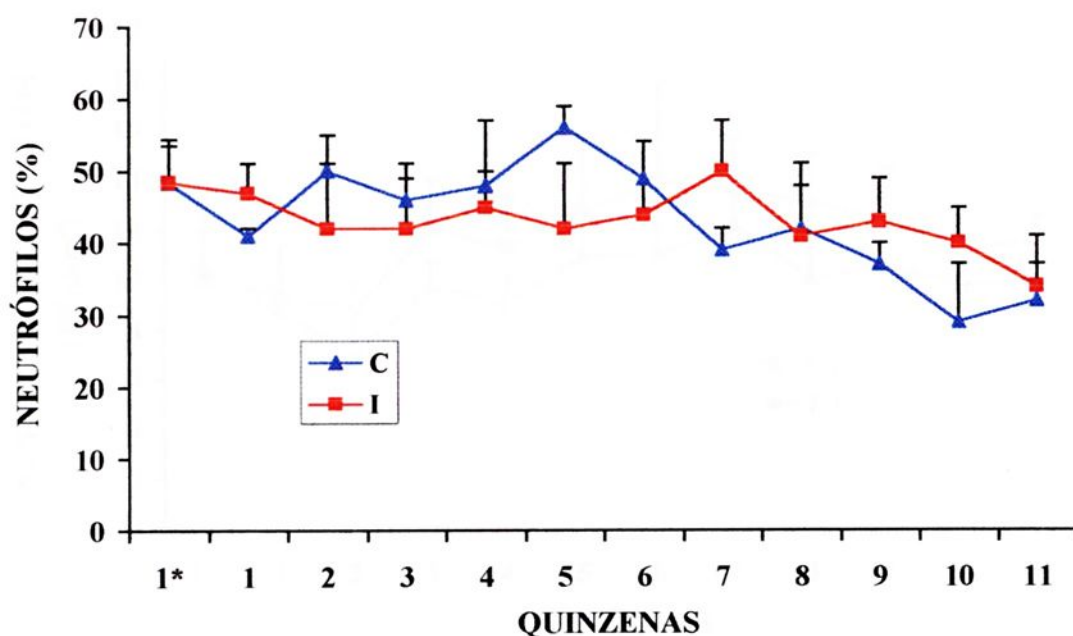


FIGURA 17. Valores médios das contagens relativas de neutrófilos do sangue dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão (1* = 1 dia de idade).

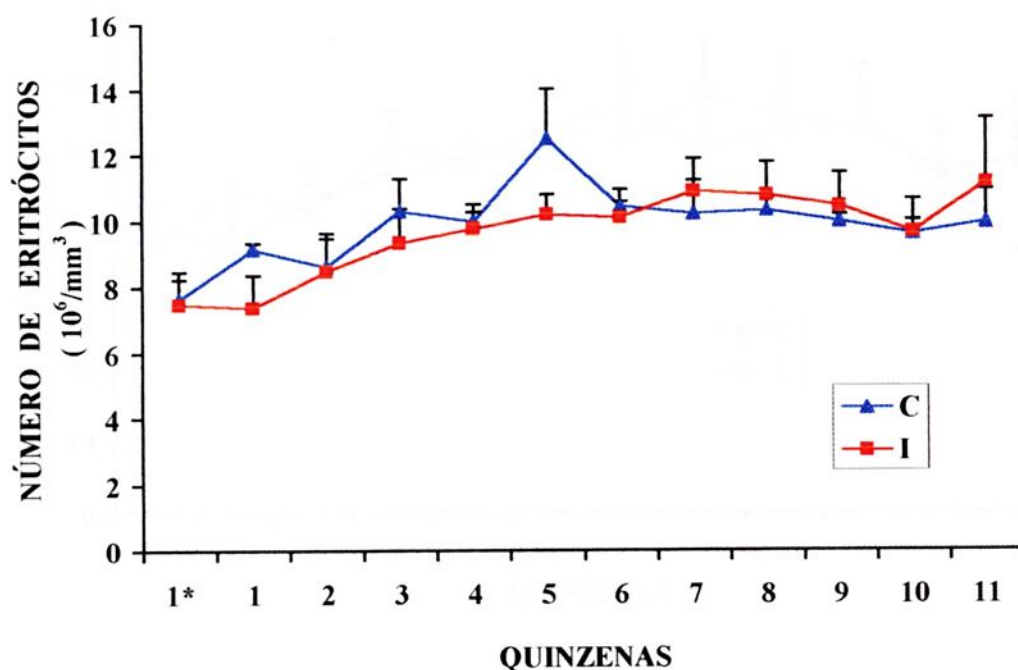


FIGURA 18. Valores médios das contagens de eritrócitos dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão (1* = 1 dia de idade).

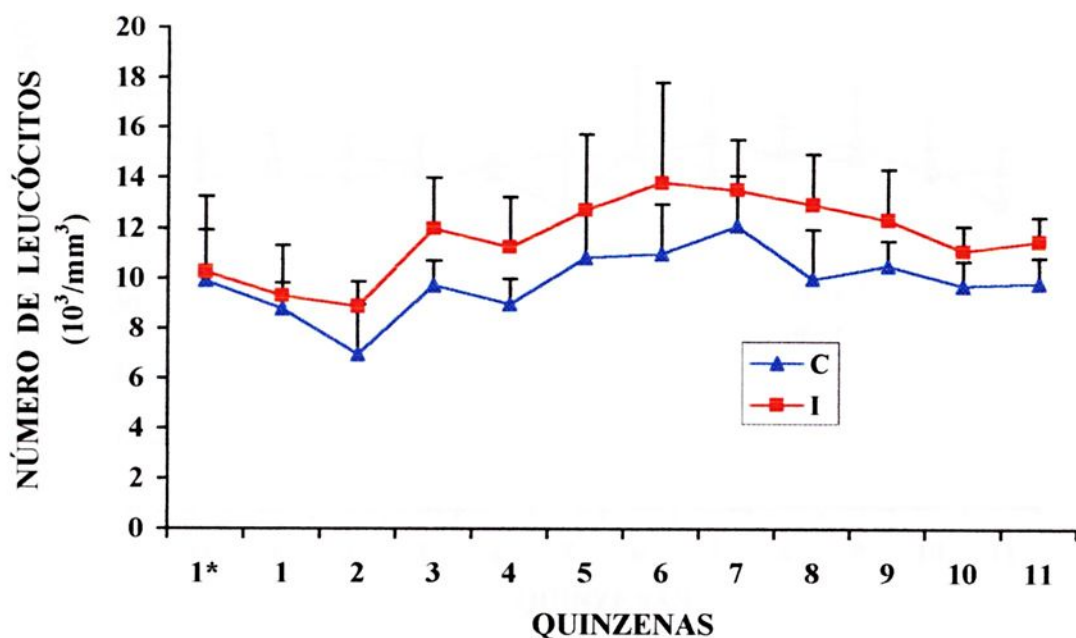


FIGURA 19. Valores médios das contagens de leucócitos dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão (1* = 1 dia de idade).

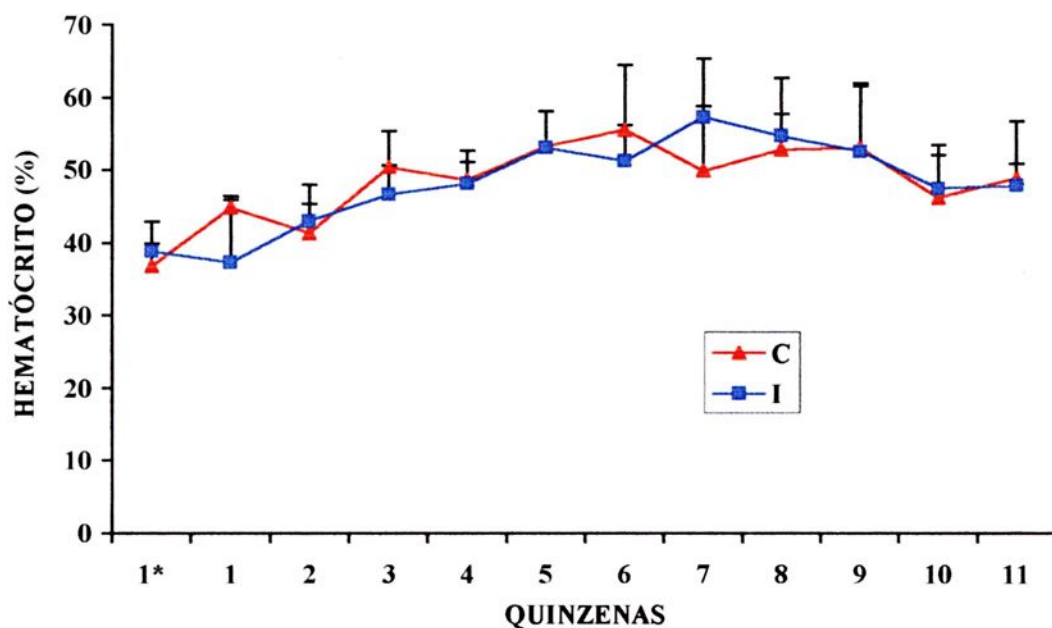


FIGURA 20. Hematócrito dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão (1* = 1 dia de idade).

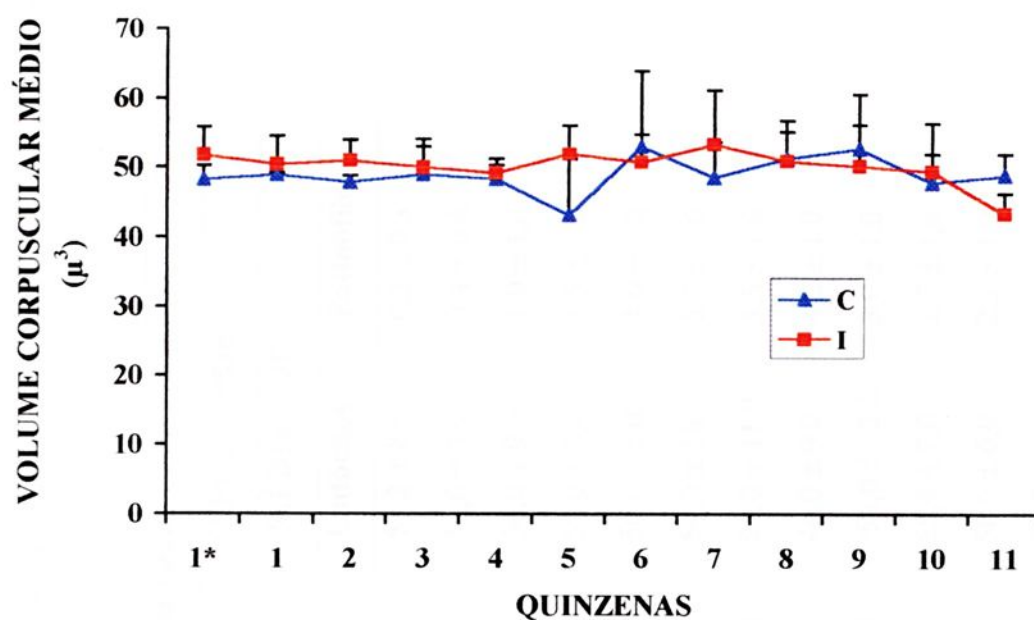


FIGURA 21. Volume corpuscular médio dos bezerros búfalos infectados (I, n = 4 a 18) e controles (C, n = 2 a 6), obtidos quinzenalmente a partir de 1 a 174 dias de idade. As colunas indicam o desvio padrão da média (1* = 1 dia de idade).

TABELA 6. Dados médios das contagens diferenciais relativas de leucócitos de bezerros búfalos controles e infectados por *Toxocara vitulorum* do nascimento aos 174 dias de idade.

Quinzenas	IDADE / Dias (s)	Contagens Relativas Diferenciais de Leucócitos					
		CONTROLES			INFECTADOS		
		MÉDIA ± DP			MÉDIA ± DP		
		Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos
1*	1	48,4 ± 6,9	50,9 ± 6,5	0,1 ± 0,3	48,4 ± 8,5	51,2 ± 8,5	0,2 ± 0,3
1	2 – 15	41,0 ± 1,4	59,0 ± 1,0	0,2 ± 0,2	47,0 ± 4,0	53,0 ± 3,0	0,4 ± 0,4
2	16 – 30	50,0 ± 5,0	49,0 ± 5,0	1,0 ± 0,8	42,0 ± 9,0	56,0 ± 9,0	3,0 ± 1,0
3	31 – 46	46,0 ± 5,0	52,0 ± 5,0	2,0 ± 1,0	42,0 ± 7,0	55,0 ± 8,0	3,5 ± 1,0
4	47 – 62	48,0 ± 9,0	49,0 ± 9,0	2,5 ± 0,9	45,0 ± 5,0	50,0 ± 5,0	4,0 ± 1,0
5	63 – 78	56,0 ± 3,0	41,0 ± 3,0	2,3 ± 0,9	42,0 ± 9,0	54,0 ± 10,0	5,0 ± 1,0
6	79 – 94	49,0 ± 5,0	49,0 ± 6,0	2,3 ± 0,9	44,0 ± 10,0	51,0 ± 11,0	3,5 ± 1,0
7	95 – 110	39,0 ± 3,0	58,0 ± 4,0	3,0 ± 1,0	50,0 ± 7,0	44,0 ± 9,0	4,2 ± 1,0
8	111 – 126	42,0 ± 6,0	59,0 ± 5,0	2,4 ± 0,9	41,0 ± 10,0	56,0 ± 12,0	3,0 ± 1,0
9	127 – 142	37,0 ± 3,0	62,0 ± 4,0	1,0 ± 0,7	43,0 ± 6,0	55,0 ± 7,0	2,5 ± 1,0
10	143 – 158	29,0 ± 8,0	70,0 ± 9,0	0,4 ± 0,3	40,0 ± 5,0	58,0 ± 6,0	2,3 ± 1,0
11	159 - 174	32,0 ± 5,0	68,0 ± 6,0	0,2 ± 0,2	34,0 ± 7,0	61,0 ± 8,0	2,1 ± 0,5

DP = Desvio Padrão / 1* = 1 dia de idade



TABELA 7. Dados médios do hemograma de bezerros búfalos controles e infectados por *Toxocara vitulorum* do o nascimento aos 174 dias de idade.

HEMOGRAMA									
Quinzenas	IDADE / dia (s)	CONTROLES (Médias $\pm$ DP)				INFECTADOS (Médias $\pm$ DP)			
		Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemat. (%)	Vol. Corp. Médio (μ^3)	Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemat. (%)	Vol. Corp. Médio (μ^3)	Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)
1*	1	8,0 $\pm$ 1,0	37,0 $\pm$ 3,2	48,2 $\pm$ 2,4	10,0 $\pm$ 2,0	7,5 $\pm$ 1,0	39,0 $\pm$ 4,0	52,0 $\pm$ 4,0	10,2 $\pm$ 2,5
1	2 – 15	9,0 $\pm$ 0,2	45,0 $\pm$ 1,3	49,0 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 1,0	7,4 $\pm$ 1,4	37,3 $\pm$ 10,0	50,0 $\pm$ 4,0	9,3 $\pm$ 2,1
2	16 – 30	9,0 $\pm$ 1,0	41,3 $\pm$ 4,0	48,0 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 2,0	8,5 $\pm$ 1,1	43,1 $\pm$ 5,4	51,0 $\pm$ 3,2	9,0 $\pm$ 1,3
3	31 – 46	10,0 $\pm$ 1,0	50,4 $\pm$ 5,5	51,4 $\pm$ 8,0	10,0 $\pm$ 1,2	9,4 $\pm$ 1,1	47,0 $\pm$ 4,0	50,3 $\pm$ 1,4	12,1 $\pm$ 2,3
4	47 – 62	10,0 $\pm$ 0,5	49,0 $\pm$ 3,6	47,2 $\pm$ 0,5	9,0 $\pm$ 1,0	10,0 $\pm$ 0,5	48,1 $\pm$ 3,1	50,0 $\pm$ 2,0	11,2 $\pm$ 2,0
5	63 – 78	12,5 $\pm$ 1,5	53,3 $\pm$ 5,0	43,2 $\pm$ 8,1	11,0 $\pm$ 2,0	10,2 $\pm$ 0,5	53,2 $\pm$ 5,2	50,4 $\pm$ 2,2	13,0 $\pm$ 3,0
6	79 – 94	10,4 $\pm$ 0,5	55,7 $\pm$ 9,0	53,0 $\pm$ 11,0	11,0 $\pm$ 2,0	10,1 $\pm$ 0,5	51,4 $\pm$ 5,1	47,1 $\pm$ 2,0	14,0 $\pm$ 4,0
7	95 – 110	10,2 $\pm$ 1,0	50,0 $\pm$ 9,0	47,0 $\pm$ 1,0	12,1 $\pm$ 2,0	11,0 $\pm$ 1,0	57,5 $\pm$ 8,0	46,4 $\pm$ 1,0	13,5 $\pm$ 2,1
8	111 – 126	10,3 $\pm$ 0,4	53,0 $\pm$ 5,0	51,3 $\pm$ 4,0	10,1 $\pm$ 2,0	11,0 $\pm$ 1,0	55,0 $\pm$ 8,0	46,0 $\pm$ 0,2	13,1 $\pm$ 2,1
9	127 – 142	10,0 $\pm$ 0,2	53,2 $\pm$ 9,1	53,0 $\pm$ 8,0	10,5 $\pm$ 1,0	10,5 $\pm$ 1,1	53,0 $\pm$ 9,1	46,0 $\pm$ 1,0	12,4 $\pm$ 2,2
10	143 – 158	10,0 $\pm$ 0,4	46,2 $\pm$ 6,0	46,0 $\pm$ 0,5	10,0 $\pm$ 1,4	10,0 $\pm$ 1,0	48,0 $\pm$ 6,2	49,0 $\pm$ 8,1	11,1 $\pm$ 1,4
11	159 - 174	10,0 $\pm$ 1,1	49,0 $\pm$ 9,0	49,0 $\pm$ 3,4	10,0 $\pm$ 1,2	11,1 $\pm$ 1,6	48,1 $\pm$ 3,5	46,0 $\pm$ 0,1	11,5 $\pm$ 1,3

DP = Desvio Padrão / 1* = 1 dia de idade.



6. DISCUSSÃO

A toxocaríose, apesar da sua distribuição mundial e inúmeras pesquisas realizadas, continua necessitando de maiores estudos. Não se compreende de forma clara os mecanismos de defesa do hospedeiro contra este parasita, as células envolvidas em sua resposta imune, a função destas células no processo de expulsão dos parasitas e os mediadores liberados por elas. A maioria dos estudos existentes nesta área foi baseado em animais de laboratório e ovinos, portanto, quase nada se sabe desta parasitose em búfalos.

Através dos exames de fezes pode-se observar que os animais tiveram um período de infecção patente a partir de 11 dias de idade, demonstrando uma precocidade de infecção por *T.vitulorum* já constatada também por outros autores em búfalos (Tongson, 1971; Warren, 1971; Chauhan et al., 1974; Starke et al., 1983 e Roberts, 1990a). Um dos motivos para justificar a precocidade desta infecção deve-se principalmente a aquisição deste parasita através de larvas infectantes pelo colostro materno (Warren et al., 1971; Starke et al., 1983 e Roberts, 1990 ab). Neste experimento, verificou-se que o pico máximo do parasitismo ocorreu ao redor de 45 dias após o nascimento quando os ovos começaram a desaparecer das fezes. A partir dessa idade, os animais adquirem resistência contra o *T. vitulorum* e verifica-se uma queda brusca na contagem de OPG. Esta queda ocorre em decorrência da expulsão natural dos helmintos pelos animais (Chauhan et al., 1974 na Índia; Costa et al., 1980 e Starke et al., 1983, no Brasil). No presente trabalho, verificou-se que esta auto-cura iniciou a partir dos 44 a 45 dias, quando os parasitas foram eliminados pelos animais espontaneamente através das fezes. Estes ovos não foram mais evidenciados nas fezes dos animais a partir de 85 dias, mesmo quando mantidos em locais contaminados pelos ovos infectantes, confirmando a não reinfecção intestinal. Esta cura espontânea já foi

confirmada por vários autores, porém em outras espécies de parasitas intestinais como *H. contortus*, *T. colubriformis*, *S. papillosus*, e *N. battus* em ovinos (Rothwell, 1989; McClure et al., 1992; Smith et al., 1994, Nawa et al., 1994 e Winter et al., 1997), *N. brasiliensis* em ratos e em camundongos (Miller et al., 1983; Moqbel et al., 1986; Nawa et al., 1994) e *T. spiralis* em ratos e camundongos (Castro, 1992). Com relação ao *T. vitulorum*, pouco se conhece a respeito deste fenômeno.

No presente experimento, o duodeno e o jejuno foram as porções do intestino delgado onde os exemplares adultos de *T. vitulorum* foram encontrados, já no íleo não se observou nenhum exemplar da espécie. Nas regiões do parasitismo, evidenciaram-se lesões macroscópicas como petéquias, aumento do muco intestinal e espessamento da parede intestinal. Nos fígados examinados às necrópsias, não foram observadas manchas devido a migração larval. Lesões causadas por larvas de *T. vitulorum* já foram descritas em animais jovens, como as manchas brancas (mancha do leite) que aparecem no fígado devido à migração larval (revisado por Roberts, 1993). Em infecção experimental no hospedeiro materno, de ruminantes, já foram verificados eosinofilia, linfocitose e anemia (Mozgovoi e Shikhov, 1971). Em alguns casos mais graves, aumento da temperatura do corpo (Mozgovoi e Shakhmatova, 1969), presença de pequenos focos inflamatórios no fígado e nos pulmões, presença de nódulos linfáticos, hepáticos e pulmonares edematosos e infiltração eosinofílica 10 dias após a infecção experimental, também foram observados (Casarosa, 1953). No hospedeiro definitivo (bezerros búfalos) foram observadas ulcerações na mucosa do intestino delgado, hipertrofia da camada muscular (revisado por Roberts, 1993) e infiltração por linfócitos e eosinófilos (Srivastava e Sharma, 1981). As lesões da mucosa foram atribuídas às toxinas dos antígenos excretor-secretor (ES) das larvas (Srivastava, 1963 e Gupta et al., 1976), pela morte do parasita (Das e Singh, 1955; Ranatunga, 1960) ou pelo grande número de parasitas adultos (Roberts, 1993). Este parasita também causa pneumonia, aumento de fluidos peritoniais e pericardites, enterites hemorrágicas com necroses, principalmente nos locais onde os parasitas adultos e jovens se encontram enovelados, deixando o intestino com aspecto de “salsicha” (Das e Singh, 1955). Além dos danos patogênicos ocasionados pelo elevado número de parasitas (centenas, algumas vezes) na luz intestinal (Roberts, 1993), o *T. vitulorum* pode perfurar a luz intestinal e atingir a cápsula do fígado com extensivos efeitos patogênicos (Srivastava, 1963). Como sequelas comuns pode-se observar obstrução (Sukhapesna, 1981), intussuscepção (Sprent, 1946) e perfuração intestinal (Srivastava, 1963). Em casos raros,

parasitas adultos podem ser observados nos ductos biliares (Das e Singh, 1955).

Pela contagem de ovos por grama de fezes (OPG) pode-se estimar o grau do parasitismo. Desta forma, neste trabalho, o número do OPG médio foi de 10 138 ovos (16 600 a 83 700 OPG) dos animais que se encontravam no pico do parasitismo. Akhtar et al. (1982) consideraram 5000 OPG como infecção leve, 5000 a 10000 OPG, infecção moderada e acima de 10 000 OPG, infecção severa. Portanto, os animais durante o pico encontraram-se severamente infectados por este parasita. No entanto, Baruah et al (1980) detectaram casos clínicos de diarreia e desidratação em parasitismo com 2 700 a 16 000 OPG e casos de toxemia com 31 000 a 66 000 OPG.

Apesar do *T. vitulorum* parasitar búfalos e bovinos, esta parasitose é mais relevante e prevalecente nos primeiros. Desta forma, Molintas (1938) observou que as infecções tornavam-se patentes três semanas mais cedo em bezerros búfalos do que em bezerros bovinos. Além disso, em bezerros búfalos, três dos 27 animais morreram por toxemia com idade média de 60 dias, o que não ocorreu com bezerros bovinos. Roberts (1991) observou em fazendas institucionais, dados inferiores a 50 % de bezerros bovinos infectados em uma região onde mais de 90 % dos bezerros búfalos estavam infectados. Por outro lado, Masud e Majid (1984) não acharam diferenças na proporção de bezerros búfalos e bovinos infectados.

A resistência imunológica contra helmintos pode ser dos tipos humoral e celular. Os mecanismos humorais estão relacionados com a produção de anticorpos IgM, IgG e IgA, em resposta aos antígenos de helmintos, embora existam evidências de que a principal imunoglobulina seja IgE. Como resultado, o desenvolvimento de um ataque parasitário provoca uma reação local aguda de hipersensibilidade imediata nas regiões parasitadas do intestino. Neste caso a combinação de antígenos de helmintos com mastócitos ligados à IgE leva a degranulação dessas células e a liberação de aminas vasoativas. Os eosinófilos podem ligar-se à cutícula das larvas de helmintos através da via mediada por IgE causando a destruição da larva através da liberação do conteúdo citotóxico de seus grânulos (Tizard, 1996). Além disso, os linfócitos citotóxicos podem ser capazes de destruir as larvas de helmintos, pois é comum observar-se grandes linfócitos aderidos firmemente as larvas migratórias de nematóides *in vitro* (Tizard, 1996). Desta forma, McClure et al. (1992) verificaram que associados à expulsão de *T. colubriformis* por ovinos; mastócitos, leucócitos globulares e linfócitos T locais estavam aumentados, além da presença de IgA, IgG1 e IgG2 no muco intestinal. No presente trabalho, a finalidade não foi pesquisar o papel destas imunoglobulinas no processo de

expulsão e auto-cura desta parasitose, mas sim quantificar mastócitos e eosinófilos na mucosa intestinal e correlacionar tais contagens com o estado parasitário dos bezerros búfalos por *T. vitulorum* durante as fases de início ou ascensão, pico, declínio ou expulsão e ausência ou pós-expulsão (recuperação) deste parasitismo intestinal. Além disso, parâmetros sangüíneos, principalmente eosinófilos no sangue periférico, foram avaliados. Deste estudo pioneiro realizado em bubalinos, verificou-se que tanto mastócitos como eosinófilos, são células residentes normais da parede intestinal. Igualmente em camundongos, eosinófilos são células que se acumulam no trato gastrointestinal já durante o desenvolvimento embrionário, atingindo quando o animal nasce, concentrações similares às dos adultos. Os eosinófilos são importantes componentes da imunidade inata (Mishra et al., 1999). Já mastócitos, embora evidenciados no período prenatal, somente atingem os níveis do camundongo adulto, quando estes alcançam um a dois meses de idade (Woodbiry e Neurath, 1978). Estas evidências indicam que tanto eosinófilos como mastócitos podem também desempenhar importantes funções na proteção inata dos animais.

No entanto, com a presença do *T. vitulorum* parasitando os bezerros búfalos deste experimento, pôde-se observar através de técnicas histoquímicas, um aumento na população de mastócitos principalmente na mucosa do duodeno (duas vezes) e do jejuno (quatro vezes), melhor evidenciado nos animais que se encontravam no pico do parasitismo. Este aumento coincidiu com as contagens máximas de ovos de *T. vitulorum* nas fezes dos bezerros búfalos, mostrando que o aumento do número desta célula estava inteiramente associado ao grau de parasitismo destes animais, como pôde ser comprovado pelo cálculo do coeficiente de correlação que demonstrou ser positivo e significativo para mastócitos na unidade vilo-crípta do duodeno ($r = 0,98$) e jejuno ($r = 0,92$). Isto também pode ser confirmado pela diminuição destas células logo após a fase de pico, quando ocorreu uma diminuição dos ovos nas fezes (fase de declínio do parasitismo). Porém não se poderia deixar de comentar sobre a presença de *S. papillosus* em alguns dos animais deste experimento, podendo a presença de mastócitos estar também ligada à presença deste parasita, apesar do baixo grau de parasitismo, fato que já foi estudado por Nawa et al. (1994) em roedores. No entanto, observou-se que após a expulsão de *T. vitulorum*, o número de mastócitos voltou a normalidade, mesmo os animais ainda manifestando o *S. papillosus*, sugerindo que esta mastocitose foi provocada principalmente pela presença de *T. vitulorum*. Este aumento de mastócitos também foi estudado em roedores por O'Sullivan e Donald (1973) nas helmintoses



gastrointestinais e por Miller (1984) nas infecções com *N. brasiliensis*. Através dos dados obtidos neste trabalho, pôde-se também sugerir que o acúmulo de mastócitos na mucosa pode ter um importante papel na expulsão dos parasitas, devido à mastocitose ser coincidente com o pico de eliminação de ovos nas fezes. Estes dados estão de acordo com os achados por Jarret e Miller (1982), Rothwell (1989) e Winter et al. (1997) que também evidenciaram que os mastócitos contribuíram no processo de expulsão de certos parasitas em roedores e em ovinos. Stevens e Austen (1989) relataram que o aumento destas células no local da inflamação tinha como principal função a atração de outras células, como eosinófilos. Além disso, em experimentos com ovinos, Huntley et al. (1987 e 1992) e Jones et al. (1994) verificaram que MMC também desempenhavam um importante papel para uma rápida resposta de expulsão do parasita pelo hospedeiro, e isto foi comprovado pela presença de uma enzima específica de mastócito, a protease (SMCP) que estava elevada no soro e no muco destes animais. Mediadores inflamatórios, assim como leucotrienos, SMCP, histamina e prostaglandinas secretados por mastócitos (Jones et al., 1992 e Metcalfe et al., 1997) poderiam também ter papel relevante neste processo.

Da mesma maneira que para mastócitos, eosinófilos também foram atraídos para o local parasitado, mas ao contrário de mastócitos, eosinófilos foram mais abundantes nas fases de ascensão, pico e declínio, enquanto mastócitos somente no pico. Winter et al. (1997) demonstraram também a mastocitose e a elevação do número de eosinófilos coincidentes com a rejeição de *N. battus* após a infecção primária por ovinos. Mas esta dinâmica na alteração populacional destas duas células não foi similar com a do presente trabalho, ou seja, o aumento de eosinófilos, observado no trabalho de Winter et al. (1997), ocorreu somente durante o período da rejeição do parasita pelo hospedeiro, enquanto mastócitos manteve-se ainda em número aumentado por um período ligeiramente maior. Interessante notar que, apesar da população de eosinófilos declinar menos rapidamente do que a de mastócitos, ambos os tipos celulares atingiram novamente os níveis do controle quando os parasitas já haviam sido expelidos pelos animais, demonstrando mais uma vez que estas células migraram ou proliferaram em resposta à presença de *T. vitulorum* no lúmen intestinal dos animais. Outros autores já constatarem este declínio populacional destas células após a fase de recuperação em outras infecções parasitárias, como em ovinos por *N. battus* (Winter et al., 1997), em camundongos por *T. spirallis* (Friend et al., 2000) ou após tratamento anti-helmíntico, como no caso de ratos parasitados por *H. diminuta* (Starke e Oaks, 1999). Qual o

destino destas células após a fase de recuperação da parasitose ? Algumas células morrem após sofrerem processo de apoptose. Mastócitos já foram observados em apoptose, mas apenas cerca de 3 a 5 % (Starke e Oaks, 1999 e Friend et al., 2000). Da mesma maneira, o número de eosinófilos sofrendo apoptose era muito baixo no local do parasitismo (Friend et al., 2000). A maioria dos eosinófilos desloca-se para os linfonodos mesentéricos e mastócitos para o baço, onde ambas as células são destruídas por macrófagos após sofrerem um processo de envelhecimento e morte por apoptose (Friend et al., 2000). O aumento de eosinófilos no sangue e tecido também foi evidenciado por Parsons et al. (1993) em camundongos infectados por *T. canis*. Sugane et al. (1996) sugeriram que eosinófilos não apresentavam um papel significativo no processo de expulsão e morte de larvas de *T. canis* em camundongos, e que outras células como mastócitos e linfócitos poderiam participar deste processo. No entanto, sabe-se que eosinófilos apresentam uma proteína em seus grânulos denominada de proteína básica principal (MBP) associada com a morte de parasitas (Wasson e Gleich, 1979). Além disso, mediadores liberados por estas células podem causar destruição do tecido, hipertrofia da musculatura lisa e mudanças na permeabilidade vascular (Hirai et al., 1997).

Embora o papel das citocinas não tenha sido estudado neste trabalho, cabe aqui resaltar que o sucesso no processo de rejeição aos parasitas, é também atribuído a citocinas liberadas por mastócitos e eosinófilos. Entre as várias funções destas substâncias, pode-se citar o controle da degranulação, a maturação destas células e a quimiotaxia. Um exemplo destes fenômenos é a diminuição de eosinófilos em ratos infectados por larvas de *T. canis*, previamente tratados com o anticorpo anti-IL-5 (Parsons et al., 1993). A IL-5 regula a eosinopoiese na medula óssea e atua na diferenciação de eosinófilos (Sanderson et al., 1988) e a ausência da eosinofilia pós-infecção parasitária em hospedeiros atímicos foi interpretada como sendo um processo imune-dependente de células T (revisado por Parsons et al., 1993). Além disso, observações histopatológicas revelam que granulomas foram formados no fígado e os eosinófilos eram substituídos por células mononucleares, especialmente linfócitos e macrófagos, em camundongos infectados por *T. canis* e tratados com anti-IL-5 (Parsons et al., 1993). Há vários trabalhos demonstrando um sinergismo das atividades de mastócitos e eosinófilos, controlado por IL-5, GM-CSF e TNF α , levando ao recrutamento, ativação e sobrevivência de eosinófilos através da liberação de IL-5 de mastócitos, quando este é ativado por IgE (Bradding et al., 1993; Okayama et al., 1995



e Okayama et al., 1997). O ECF-A, seletivamente quimiotático para eosinófilos, também demonstra a cooperação existente entre mastócitos e eosinófilos nos processos de hipersensibilidade. Este fator é liberado pelos mastócitos e tem a função de atrair eosinófilos para o local da inflamação (Goetzel et al., 1975). As anafilatoxinas, como C5a e C3a, também são potentes fatores de quimiotaxia para eosinófilos que podem ser geradas pela via clássica ou alternativa da ativação do complemento, ou através da clivagem direta da protease lisossomal de neutrófilos (Goetzel et al., 1975). A atuação destas células no local da inflamação tem sido relatada por diversos autores. Miller e Jarret (1971) verificaram que, na infecção de ratos por *N. brasiliensis*, a degranulação destas células no local foi seguida pela sua proliferação máxima 14 dias após a infecção, quando os parasitas foram expelidos do intestino pelo mecanismo de auto-cura. Urban et al. (2000) mostraram a importância de IL-4 e IL-13 na imunidade protetora contra nematódeos parasitas. Enfim, a presença de mastócitos e eosinófilos nas infecções parasitárias parece desempenhar papel importante na rejeição dos parasitas.

Enquanto se sucedem trabalhos nacionais sobre a exploração econômica de búfalos que, inegavelmente, são de grande interesse, pouca atenção tem sido dispensada a estudos sobre a hematologia dessa espécie animal, igualmente importante, sob o aspecto fisiológico. Acredita-se que um dos fatores que tem contribuído para a escassez de observações hematológicas no Brasil, seja a forma de criação extensiva dos búfalos, muitas vezes em estado de quase abandono, tornando os animais de difícil manejo para a coleta do material (Filho et al., 1972). O hemograma dos bezerros búfalos foi realizado no presente trabalho desde o nascimento até 174 dias de idade e o sangue foi colhido a cada 15 dias. Nestas análises não se observaram entre os grupos controles e infectados diferenças significativas no que diz respeito aos eritrócitos, leucócitos, hematócrito e volume corpuscular médio. Estes dados estão em consonância com os dados de Filho et al. (1972) e Takarkhede et al. (1973), no que diz respeito a eritrócitos e volume corpuscular médio. No entanto, os valores obtidos por estes autores foram superiores para leucócitos e inferiores para hematócrito, quando relacionados com o presente trabalho. Ademais, Andersen et al. (1960), infectando bezerros com larvas de parasitos gastroentéricos, verificaram a diminuição do volume globular, hemoglobina e eritrócitos. Já Mahrt et al. (1964), infectando bezerros com parasitos gastroentéricos observaram pequenas variações no volume globular, leucócitos e alguns animais apresentaram eosinofilia. No entanto, Viana e Campos (1974), estudando o hemograma



de bezerros com verminose gastrointestinal adquirida, observaram que o número de leucócitos foi significativamente menor nos animais parasitados.

Através da contagem diferencial de leucócitos dos bezerros búfalos controles e infectados, pode-se observar que os linfócitos não apresentaram diferenças significativas, assim como os neutrófilos. Estes dados estão em concordância com Neto et al. (1971) que, em trabalhos sobre as alterações hematológicas provocadas por verminose, também não observaram alterações significativas no hemograma de bezerros normais em relação aos animais infectados. Porém, Viana e Campos (1974) verificaram o aumento nos neutrófilos segmentados e a diminuição dos linfócitos nos animais doentes, porém não sendo estatisticamente significante. Isto também foi observado por Delaune (1939), que cita ainda o aumento de eosinófilos em alguns bezerros parasitados. Estes dados estão em concordância com o presente trabalho, onde os eosinófilos nos animais infectados mantiveram-se superiores a partir da segunda quinzena (30 dias de idade) até a quinta quinzena (78 dias de idade), fase que coincidiu desde a aquisição da parasitose até o início da eliminação dos parasitas, mostrando a direta ligação desta eosinofilia com o quadro parasitológico dos animais. Hipereosinofilia, com níveis de eosinófilos circulantes, muitas vezes com excesso de 50 %, foi observada no homem infectado com larvas de *T. canis* (Beaver et al., 1956). Além disso, Gould (1970) verificou que a infecção com *T. spiralis* induziu uma profunda eosinofilia em humanos e em animais de laboratório. Da mesma maneira, Basten et al. (1970) mostraram que a administração oral de larvas de *T. spiralis* provocava uma prolongada eosinofilia e, através de injeções intravenosas com estas larvas, a eosinofilia foi ainda mais intensa. O aumento no número de eosinófilos também foi um consistente achado no sangue e nos tecidos de animais infectados com larvas de *T. canis* (Sugane e Oshima, 1982 e Parsons et al., 1989). Já em ovinos, Winter et al (1997) verificaram que durante a infecção primária por *N. battus*, os eosinófilos no sangue periférico encontravam-se em contagens relativamente baixas durante o período da infecção, aumentavam durante a rejeição e apresentavam o pico somente após os parasitas terem sido expelidos. Porém, nos casos de toxocariose, não existem evidências diretas da morte larval por eosinófilos. No entanto, *in vitro*, quando as larvas de *T. canis* foram incubadas com soro-imune e rico em eosinófilos foi constatado ataque às larvas e degranulação dos eosinófilos, porém a viabilidade larval não foi diminuída (Lombardi et al., 1990). Mas, *in vivo* em casos de toxocariose visceral, camundongos atímicos e desprovidos de linfócitos T funcionais apresentaram um aumento no número de



eosinófilos no sangue e no tecido, após a infecção com larvas de *T. canis* (Kayes e Oaks, 1980). Além disso, os mecanismos responsáveis por esta resposta eosinofílica em toxocarose tecidual sugerem serem dirigidos contra os produtos excretórios-secretórios (ES) larvais. Este antígeno ES além de estar associado com a aderência de anticorpos, complemento e eosinófilos à epicutícula das larvas, também tem a função de driblar o sistema imunológico do hospedeiro, pois logo que eosinófilos ou anticorpos se fixam na epicutícula esta se desprende da larva impedindo sua destruição (Badley et al., 1987). No entanto, recentemente demonstrou-se que eosinófilos, no controle das helmintoses, participavam de respostas de hipersensibilidade imediata mediada por mastócitos, e de hipersensibilidade tardia mediada por linfócitos Th2 e Th3 (Meeusen, 1999). Deste modo, é comum duas ondas de aumento populacional de eosinófilos em infecções parasitárias; uma de linfócitos T-independentes e outra de T-dependentes (Kusama et al., 1995). Enquanto, na hipersensibilidade imediata, eosinófilos e mastócitos agem em conjunto liberando mediadores químicos e/ou produzindo respostas imunofisiológicas semelhantes na tentativa de eliminar o invasor, na hipersensibilidade tardia mediada por Th2 e Th3, a resposta eosinofílica pode ser uma consequência da persistência do parasita no hospedeiro (revisado por Meeusen, 1999).

Mediante o que foi citado na literatura e também pelos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se inferir que os parasitas gastrointestinais tem a capacidade de ativar o sistema imunológico do hospedeiro no sentido de elaborar mecanismos imunes efetores com o objetivo de defesa, mas nem sempre com respostas efetivas e algumas vezes podem até causar danos aos hospedeiros. Estes danos podem ser ocasionados como consequência da resposta imune gerada para eliminar o parasita que usam ou criam estratégias de evasão, resultando em uma inapropriada estimulação crônica ou em uma hiperreatividade (Meeusen, 1999). Além disso, para os helmintos que apresentam grande porte, como no caso do *T. vitulorum*, são necessários potentes mecanismos tóxicos para destruí-los.

Apesar da existência de inúmeras publicações de respostas imunes contra nematódeos gastrointestinais, particularmente em roedores e ovinos, com animais de grande porte, em especial os búfalos, pouco progresso foi realizado nos últimos anos. Alguns dados obtidos destes modelos experimentais tem sido úteis e podem ser extrapolados para os grandes ruminantes, mas nem sempre funcionam adequadamente, e neste sentido, mais investigações necessitam ser realizadas. Desta forma, os resultados da presente pesquisa refletem-se de grande importância como incentivo para estudos

mais aprofundados referentes aos mecanismos imune celulares protetores contra parasitas de bubalinos.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos do presente experimento, pôde-se concluir que:

- Os bezerros búfalos encontravam-se parasitados com *T. vitulorum* dos 11 aos 104 dias de idade.
- Ocorreu infiltrado de mastócitos e eosinófilos na lâmina própria da mucosa intestinal (UVC) dos animais infectados por *T. vitulorum*. Estes infiltrados de mastócitos e eosinófilos foram máximos durante o pico do parasitismo, declinando quando *T. vitulorum* estava sendo expulso pelo hospedeiro, indicando que estas células podem participar no processo de resistência contra estes parasitas em bezerros búfalos.
- No íleo observou-se aumento, porém não significativo, de mastócitos e eosinófilos. Isto pode dever-se ao fato dos parasitas não terem sido encontrados nesta porção do intestino.
- Ocorreu eosinofilia nos animais infectados a partir da segunda quinzena (30 dias), atingindo o pico na quinta quinzena (78 dias), e declinando logo em seguida. Esta eosinofilia ocorreu durante todo o parasitismo patente.
- Na infecção por *T. vitulorum*, os parâmetros analisados através do hemograma completo (eritrócitos, leucócitos, hematócrito e volume corpuscular médio), não apresentaram variações significativas quando comparados com os parâmetros dos grupos controles, indicando que esta parasitose, não provoca uma alteração no quadro sangüíneo dos bezerros búfalos, à exceção de eosinófilos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ABEYDEERA, L.R., ROBERTS, J.A. Histopathological study of the buffalo liver in experimental infection with *Toxocara vitulorum* infective larvae. **Buffalo Journal**, v. 7, p.165-70, 1991.
- AKHTAR, M.S., CHATTHA, M.I., CHAUDHRY, A. H. Comparative efficacy of santonin and piperazine against *Neoascaris vitulorum* in buffalo calves. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 5, p. 71-6, 1982.
- ALDENBORG, F., ENERBÄCK, L. Thymus dependence of connective tissue mast cells: a quantitative cytofluorometric study of the growth of peritoneal mast cells in normal and athymic rats. **International Archive Allergy Immunology**, v. 78, p. 277-82, 1985.
- AMERASINGHE, P.H., RAJAPAKSE, R.P.V.J., FERNANDO, S.T. Antigen-induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. **Parasitology Research**, v.78, p. 643-7, 1992.
- ANDERSEN, F.L. et al. Changes in blood of calves experimentally infected with *Ostertagia ostertagi* e *Haemonchus placei*. **Journal of Parasitology**, v. 46, p. 38-9, 1960.
- ARAÚJO, P. Observações pertinentes as primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *A. suum* e *Toxocara canis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 14, p. 83-90, 1972.
- ARCHER, G.T., HIRSCH J.G. Motion picture studies on degranulation of horse eosinophils during phagocytosis. **Journal Experimental Medical**, v. 118, 287-94, 1963.



- BADLEY, et al. Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: The role of excretory-secretory antigens. **Parasite Immunology** v. 9, p. 133-43, 1987.
- BANERJEE, D.P., BARMAN ROY, A. K., SANYAL, P.K. Public health significance of *Neoascaris vitulorum* larvae in buffalo milk samples. **Journal of Parasitology**, v.69, p.1124, 1983.
- BARRIGA, O.O., MYSER, W.C. Effect of irradiation on the biology of the infective larvae of *Toxocara canis* in the mouse. **Journal Parasitology**, v. 73, p. 89-94, 1987.
- BARUAH, P.K., SINGH, R.P., BALI, M.K. Treatment trials and correction of electrolyte imbalance caused by *Neoascaris vitulorum* in buffalo calves. **Indian Veterinary Medical Journal**, v.4, p. 76-8, 1980.
- BARUAH, P.K., SINGH, R.P., BALI, M.K. Relationship between presence of 3rd stage larvae of *Neoascaris vitulorum* and *Strongyloides papillosus* in colostrum/milk of buffalo and appearance of eggs in the faecal samples of their calves. **Indian Journal of Dairy Science**, v.34, p.76-8, 1981.
- BASTEN, A., BOYER, M.H., BEESON, P.B. Mechanism of eosinophilia. In: Factors affecting the eosinophil response of rats to *Trichinella spirallis*. **Journal Experimental Medical.**, v. 131, p. 1288-305, 1970.
- BEAVER, P.C. Larva migrans. **Experimental Parasitology**, v.5, p.587-621, 1956.
- BEFUS, D.A., BIENENSTOCK, J. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. **Journal Immunology**, v.128, p. 2475-80, 1982.
- BEFUS, D.A. et al. Mast cell heterogeneity in man. I. Histologic studies of intestine. **International Archive Allergy Applied Immunology**, v. 76, p. 232-6, 1985.
- BEHNKE, J.M. et al. Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematospiroides dubius*): downregulation of specific cytokine secretion (IL-9 and IL-10) correlates with poor mastocytosis and chronic survival of adult worms. **Parasite Immunology**, v. 7, p. 415-21, 1993.
- BENDIXSEN T. et al. The sensibilization of mucosal mast cells during infections with *Trichostrongylus colubriformis* or *Haemonchus contortus* in sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 25, p. 741-8, 1995.
- BISCHOFF, S.C. et al. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. **Histopathology**, v. 28, p. 1-13, 1996.



- BRADDING, P. et al. Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5 and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. **Journal Immunology**, v. 151, p. 3853, 1993.
- BROWN, M.A. et al. B cell stimulatory factor-1 / interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cell lines. **Cell**, v. 50, p. 809, 1987.
- BROWN, M. A ., HURAL, J. Functions of IL-4 control of its expression. **Critical Reviews in Immunology**, v. 17, p. 1-32, 1997.
- BUTTERWOTH, A.E. The eosinophil and its role in immunity to helminth infection. **Current Topics Microbiology and Immunology**, v. 77, p. 127-69, 1977.
- CAPRON, A . et al. Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistossomules. **Nature**, v. 253, p. 474-6, 1975.
- CAPRON, M. et al. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. **Journal Immunology**, v. 126, p. 2087, 1981.
- CASAROSA, L. La microascaridiosi sperimentale del vitello ed i suoi rapporti con le "macchie verdi" del vitello e vitellone della patologia spontanea. **Atti Della Societa Delle Scienze Veterinarie**, v.7, p.671-8, 1953.
- CASTRO, G.A. Intestinal physiology in the parasitized host: Integration, desintegration, and reconstruction of system. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 664, p. 369-79, 1992.
- CHAUHAN, P.P.S., PANDE, B.P. Migratory behaviour & histopathology of *Neoascaris vitulorum* larvae in albino mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 10, p. 193-200, 1972.
- CHAUHAN, P.P.S., AGRAWAL, R.D., AHLUWALIA, S.S. A note on the presence of *Strongyloides papillosus* and *Neoascaris vitulorum* larvae in the milk of buffaloes. **Current Science**, v.43, p.486-7, 1974.
- CLAEREBOU, E., VERCRUYSSSE, J. The immune response and the evaluation of acquired immunity against gastrointestinal nematodes in cattle: a review. **Parasitology**, v. 120, p. 25-42, 2000.
- CLINE, M.J. et al. Phagocytosis by human eosinophils. **Blood**, v. 32, p. 922-34, 1968.



- COLLEY, D.G., KATZ, S.P., WIKEL, S.K. Schistosomiasis: an experimental model for the study of immunopathologic mechanisms wich involve eosinophils. **Advance Biosciences**, v. 12, p. 653-66, 1973.
- COLLEY, D.G., JAMES, S.L. Participation of eosinophils in immunological systems. In: Cellular, Molecular, and Clinical Aspects of Allergic Disorders. **Plenum**, p. 55-86, 1979.
- COSTA, A.J. et al. Desenvolvimento das helmintoses gastrointestinais em búfalos (*Bubalus bubalis*) nascidos em Sertãozinho (SP). **Boletim da Indústria Animal**, v. 37, n. 2, p. 195-205, 1980.
- DAS, K.M., SINGH, G.B. Calf ascariasis in India. A nine years survey with special reference to "Hetrazan". **British Veterinary Journal**, v. 111, p. 342-7, 1955.
- DELAUNE, E. Observation on the bovine blood picture in health and under parasitism. **Proceeding of the Society Experimental Biology Medical**, v. 41, p. 482-3, 1939.
- DESREUMAUX, P.A. et al. Interleukin-5 mRNA expression by eosinophils in the intetinal mucosa of patients with coeliac disease. **Journal Experimental Medical**, v. 175, p. 293-6, 1992.
- DESREUMAUX, P. et al. Interleukin 3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin 5 in Eosinophilic Gastoenteritis. **American Gastroenterological Association**, v. 110, p. 768-74, 1996.
- DOUCH, P.G., MORUM, P.E., RABEL, B. Secretion of anti-parasite substances and leukotrienes from ovine gastrointestinal tissues and isolated mucosal mast cells. **Intenational Journal for Parasitology**, v. 26, p. 205-11, 1996.
- DUFFY, J.P. et al. Combined staining method for demonstration of tissue eosinophils and mast cells. **Journal Histotech**, v. 16, p. 143-4, 1993.
- DVORACK, J.E. et al. Induction of nasal late-phase reactions by insufflation of ragweed-pollen extracts. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 73, p. 363-8, 1984.
- DWINELL, M.B., BASS, P., OAKS, J.A. Praziquantel treatment normalizes intestinal myoelectric alterations associated with *Hymenolepis diminuta*-infected rats. **Journal Parasitology**, v. 81, p. 979-84, 1995.
- EVERSOLE, R. et al. Changes in the morphology and the distribution of rat intestinal eosinophils during infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. **Laboratory Investigation**, v. 79, p. 785-97, 1999.



- ENERBÄCK, L., NORBY, K. The mast cells. **Current Topic Pathology**, v. 79, p. 169-204, 1990.
- FAGERHOLM, H.P. et al. Differentiation of cuticular structures during the growth of the third-stage larva of *Ascaris suum* (Nematoda, Ascaridoidea) after emerging from the egg. **Journal Parasitology**, v. 3, p. 421-7, 2000.
- FERNANDO, S.T. et al. Precipitin reactions in monkeys (*Macaca sinica*) experimentally infected with *Toxocara canis* and in children with visceral larva migrans syndrome. **Journal of Comparative Pathology**, v.80, p.407-14, 1970.
- FILHO, R.A.A. et al. Quadro hemático de búfalos (*Bubalus bubalis*). **Biológico**, v. 38, p. 131-5, 1972.
- FINKELMAN, F.D. et al. Regulation of murine in vivo IgG and IgE responses by a monoclonal anti-IL-4 receptor antibody. **International Immunology**, v. 6, p. 599-607, 1991.
- FINKELMAN, F.D. et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from studies with rodent models. **Annual Review Immunology**, v. 15, p. 505-33, 1997.
- FINE, D.P., BUCHANAN, R.D., COLLEY D.G. *Schistosoma mansoni* infection in mice depleted of thymus-dependent lymphocytes. In: Eosinophilia and immunologic responses to a schistosomal egg preparation. **American Journal Pathology**, v. 71, p. 287-300, 1973.
- FRIEND, D.S. et al. Senescent jejunal mast cells and eosinophils in the mouse preferentially translocate to the spleen and draining lymph node, respectively, during the recovery phase of helminth infection. **The Journal of Immunology**, p. 344-52, 2000.
- GAUTAM, O.P., MALIK, P.D., SINGH, D.K.. *Neoascaris vitulorum* larvae in the colostrum/milk of buffaloes. **Indian Journal of Public Health**, v.20, p.183-4, 1976.
- GOETZL, E.J. et al. Eosinophil polymorfonuclear leukocyte function in immediate hypersensitivity. **Archive Pathology**, v. 99, p. 1-5, 1975.
- GOETZL, E.J., AUSTEN, K.F. Purification and syntesis of eosinophilotactic tetrapeptides of human lung tissue: Identification as eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis. **Immunology**, v. 10, p. 4123-7, 1975.



- GORDON, H.M., WHITLOCK, A.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal Count. Science Ind. Reserch Austrian.**, v. 12, p. 50-2, 1939.
- GORDON, J. R. et al. Mast cells a source of multifunctional cytokines. **Immunology Today**, v. 11, p. 458, 1991.
- GOULD, S.E. Clinical Pathology: Diagnostic Laboratory Procedures. In: Trichinosis in man and animals. **Bold**, S. E. Springfield, p. 9, 1970.
- GUPTA, G.C., JOSHI, B.P., RAI, P. Some aspects of biochemical studies in calf diseases and scour. **Indian Veterinary Journal**, v. 53, p. 438-41, 1976.
- HIRAI, K. et, al. Regulation of function of eosinophils and basophils. **Critical Reviews in Immunology**, v. 17, p. 325-52, 1997.
- HUNTLEY, J.F. et al. Quantitative recovery of isolated mucosal mast cells and globule leucocytes from parasitized sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 33, p. 58-63, 1982.
- HUNTLEY, J.F. et al. The isolation and characterization of globule leucocytes: Their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. **Parasite Immunology**, v. 6, p. 371-90, 1984.
- HUNTLEY, J.F. et al. The isolation and purification of a proteinase with chymotrypsin-like properties from ovine mucosal mast cells. **International Journal of Biochemistry**, v. 18, p. 673, 1986.
- HUNTLEY, J.F. et al. Systemic release of a mast cell proteinase following infections in sheep. **Parasite Immunology**, v. 9, p. 603-14, 1987.
- HUNTLEY, J.F. et al. The influence of challenge dose, duration of immunity, or steroid treatment on mucosal mast cells and on the distribution of sheep mast cell proteinase in *Haemonchus*-infected sheep. **Parasite Immunology**, v. 14, p. 429-40, 1992.
- JARRET, E.E., MILLER, H.R. Production and activities of IgE in helminth infection. **Proceeding Allergy**, v. 31, p. 178-233, 1982.
- JONES, W.O., EMERY, D.L. Demonstration of a range of inflammatory mediators released in Trichostrongylosis of sheep. **International Journal for Parasitology**, v. 21, p. 361-3, 1991.
- JONES, W.O., HUNTLEY, J.F., EMERY, D.L. Isolation and degranulation of mucosal mast cells from the small intestine of parasitized sheep. **International Journal of Parasitology**, v. 22, p. 519-21, 1992.



- JONES, W.O. et al. Changes in inflammatory mediators and larval inhibitory activity in intestinal contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. **International Journal of Parasitology**, v. 24, p. 519-25, 1994.
- KAY, A.B., SHIN, H.S., AUSTEN, K.F. Selective attraction of eosinophils and synergism between eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A) and a fragment cleaved from the fifth component of complement (5a). **Immunology**, v.24, p. 969-76, 1973.
- KAYES, S.G., OAKS, J.A. *Toxocara canis*: T lymphocyte function in murine larval migrants and eosinophils onset. **Experimental Parasitology**, v. 49, p. 47-55, 1980.
- KEEGAN, A.D. et al. Interleukin 4 receptor: signaling mechanisms. **Immunology Today**, v. 15, p. 423, 1994.
- KOVACS, E.J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immunology Today**, v. 12, p. 17-23, 1991.
- KUSAMA, Y. et al. Mechanisms of eosinophilia in Balb/c-nu/+ and congenitally athymic Balb/c-nu/n mice infected with *Toxocara canis*. **Immunology**, v. 84, p. 461-8, 1995.
- LEVY, A.M., FRONDOZA, C. Immunity to intestinal parasites: role of mast cells and goblet cells. **Federation Proceedings**, v. 42, p. 1750-5, 1983.
- LEVY, A.M., KITA, K. The eosinophil in gut inflammation: Effector or Director? **Gastroenterology**, v. 110, p. 952-4, 1996.
- LEWIS, D.M. et al. Localization of the guinea pig eosinophil major basic protein to the core of the granule. **Journal Cell Biology**, v. 77, p. 702, 1978.
- LOMBARDI, S. et al. The *in vitro* adherence of murine eosinophils, neutrophils and non-induced macrophages to infective larvae of *Toxocara canis* (Nematoda, Ascarididae). **International Journal for Parasitology**, v. 20, p. 603-13, 1990.
- LOPEZ, A.F. et al. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. **Journal Experimental Medicinal**, v. 167, p. 219-224, 1988.
- LOWENTHAL, J.W. et al. Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hematopoietic and nonhematopoietic cells. **Journal Immunology**, v. 140, p. 456, 1988.



- MCDONALD, T.T. et al. *Nippostrongylus brasiliensis*: Mast cell kinetics at small intestinal sites in infected rats. **Experimental Parasitology**, v. 49, p. 9-14, 1980.
- MADDEN, K.B. et al. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 1387-91, 1991.
- MAHRT, J.L., HAMMOND, D.M., MINER, M.L. Changes in serum proteins and other blood values associated with experimental *Ostertagia ostertagi* infections in calves. **Cornell Veterinary**, v. 54, p. 453-74, 1964.
- MARSHALL, J.S., BIENESTOCK, J. Mast cells. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 12, p. 191-202, 1990.
- MASUD, F.S., MAJID, A. Five years survey on ascaris in buffalo and cow-calves in Multan Division. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 4, p. 63-5, 1984.
- MAYRHOFER, G., FISHER, R. Mast cells in severely T cell depleted rats and the response to infection with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunology**, v. 37, p. 145-55, 1979.
- McCLURE, S.J. et al. A serial study of rejection of *Trichostrongylus colubriformis* by immune sheep. **International Journal Parasitology**, v. 22, p. 227-34, 1992.
- McKENZIE, G.L. et al. A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. **Current Biology**, v. 8, p. 339, 1998.
- MEEUSEN, N.T. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. **Veterinary Parasitology**, v. 84, p. 259-73, 1999.
- METCALFE, D.D. et al. Mast cells. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 1033-79, 1997.
- MIA, S. et al. The route of infection of buffalo calves by *Toxocara (Neoascaris) vitulorum*. **Tropical Animal Health and Production**, v.7, p.153-6, 1975.
- MILLER, H.R.P., JARRET, W.H.F. Immune reactions in mucous membranes. In: Intestinal mast cell response during helminth expulsion in the rat. **Immunology**, v. 20, p. 277-88, 1971.
- MILLER, A.M., COLLEY, D.G., McGARRY, M.P. Spleen cells from *Schistosoma mansoni* infected mice produce diffusible stimulator of eosinophilopoiesis *in vivo*. **Nature**, v. 262, p. 586-7, 1976.
- MILLER, H.R.P. et al. Systemic release of mucosal mast-cell protease in primed rats challenged with *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunology**, v. 49, p. 471, 1983.
- MILLER, H.R.P. The protective mucosal response against gastrointestinal nematodes in ruminants and laboratory animals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.6, p. 167 – 259, 1984.



- MILLER, H.R.P. et al. Intestinal mucosal mast cells in normal and parasitized rats. In: *Mast cell Heterogeneity and Derivation* Raven Press, p. 209-55, 1985.
- MISHRA, A. et al. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 103, p. 1719-27, 1999.
- MOHAN, R.N. Diseases and parasites of buffaloes. III. Parasitic and miscellaneous diseases. **Veterinary Bulletin**, v. 38, p. 735-56, 1968.
- MOLINTAS, D.M. A study of four systems of managing calves to control internal parasite. **Phillippine Agriculturists**, v. 27, p. 445-67, 1938.
- MONCADA, S., VANE, J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A² and prostacyclin. **Pharmacological Reviews**, v. 30, p. 293-331, 1979.
- MOQBEL, R. et al. Enteral and systemic release of leukotrienes during anaphylaxis of *Nippostrongylus brasiliensis*-primed rats. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 296-301, 1986.
- MOQBEL, R., LEVI SCHAFFER, F., KAY, A.B. Cytokine generation by eosinophils. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 94, p. 1183, 1994.
- MOZGOVOI, A.A., SHAKHMATOVA, V.I. Study of the cycle of *Neoascaris vitulorum* (Ascaridata: Anisakidae) of ruminants. **Trudy Gel'mintologicheskoi Laboratorii**, v. 20, p. 97-101, 1969.
- MOZGOVOI, A.A., SHIKHOV, R.M. Neoascariasis of ruminants. **Veterinariya (Moscow)**, v. 48, p. 59-61, 1971.
- MURREL, K.D. *Ascaris suum*: A revision of its early migratory path and implications for human ascariasis. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 321-4, 1997.
- NAWA, Y. et al. Eosinophil response in mast cell-deficient W/W^v mice. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 83, p. 6-11, 1987.
- NAWA, Y. et al. Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths. **Parasite Immunology**, v. 16, p. 333-8, 1994.
- NETO, F.J.M., VIANA, E.S. Hemograma de bezerros naturalmente infectados por parasitos gastrointestinais. **Arquivo da Escola de Veterinária UFMG**, v. 23, p. 51-4, 1971.

- NETO, F.J.M., VIANA, E.S., MAGALHÃES, L.M. Patologia clínica veterinária. Belo Horizonte: Rabelo, p. 279, 1981.
- NUTMAN, T.B. Mast cells and their role in parasitic helminth infection. **In: The mast cell in health and disease**, p. 669-86, 1993.
- O'DONNELL M.C. et al. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. **Journal Experimental Medicine**, v. 157, p. 1981-91, 1991.
- OKAYAMA, Y. et al. IgE-dependent expression of mRNA for IL-4 and IL-5 in human lung mast cells. **Journal Immunology**, v. 155, p. 1796-808, 1995.
- OKAYAMA, Y. et al. Activation of eosinophils with cytokines produced by lung mast cells. **International Archive of Allergy Immunology**, v. 114, p. 75-7, 1997.
- OLIVEIRA, S.H. et al. Participation of interleukin-5 and interleukin-8 in the eosinophil migration induced by a large volume of saline. **International Archive Allergy Immunology**, v. 111, p. 245-52, 1996.
- OMAR, H.M., BARRIGA, O.O. Biology and pathophysiology of *Toxocara vitulorum* infections in a rabbit model. **Veterinary Parasitology**, v. 40, p. 257-66, 1991.
- ORANGE, R.P., MURPHY, R.C., AUSTEN, K.F. Inactivation of reacting substance of anaphylaxis (SRS-A) by arylsulfatases. **Journal Immunology**, v. 113, p. 316-22, 1974.
- PATNAIK, M.M., PANDE, B.P. Notes on helminthic infestations encountered in one month old buffalo calves. **Indian Veterinary Journal**, v. 40, p. 128-33, 1963.
- PARSONS, J.C., BOWMANN, D.D., GRIEVE, R.B. Tissue localization of excretory-secretory antigens of larval *Toxocara canis* in acute and chronic murine toxocariasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, p.974-81, 1986.
- PARSONS, J.C., BOWMANN, D.D., GRIEVE, R.B. Pathological and haematological responses of cats experimentally infected with *Toxocara canis* larvae. **International Journal for Parasitology** v. 19, p. 479-88, 1989.
- PARSONS, J.C., GRIEVE, R.B. Effect of egg dose and host genotype on liver trapping in murine larval toxocariasis. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 53-8, 1990a.



- PARSONS, J.C., GRIEVE, R.B. Kinetics of liver trapping of infective larvae in murine toxocariasis. **Journal of Parasitology**, v. 76, p. 529-36, 1990b.
- PARSONS, J.C., COFFMAN, R.L., GRIEVE, R.B. Antibody to interleukin 5 prevents blood and tissue eosinophilia but not liver trapping in murine larval toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 501-8, 1993.
- RAJAPAKSE, R.P.V.J., LLOYD, S., FERNANDO, S.T. *Toxocara vitulorum*: maternal transfer of antibodies from buffalo cows (*Bubalis bubalis*) to calves and levels of infection with *T. vitulorum* in the calves. **Research in Veterinary Science**, v. 57, p. 81-7, 1994a.
- RAJAPAKSE, R.P.V.J., LLOYD, S., FERNANDO, S.T. The effect of serum and colostrum immunoglobulins from buffaloes infected with *Toxocara vitulorum* or *T. vitulorum* larvae *in vitro* and *in vivo* in mice. **Research Parasitology**, v. 80, p. 426-30, 1994b.
- RANATUNGA, P. 1. Investigation of the efficacy of sulphadimidine in preventing coccidiosis of buffalo calves. 2. Further confirmatory evidence for prenatal *Ascaris* infection in buffalo calves. **Ceylon Veterinary Journal**, v. 8, p. 20-5, 1960.
- ROBERTS, J.A. The extraparasitic life cycle of *Toxocara vitulorum* in the village environment of Sri Lanka. **Veterinary Research Communications**, v.13, p.377-88, 1989.
- ROBERTS, J.A. The egg production of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, v. 37, p. 113-20, 1990a.
- ROBERTS, J.A. The life cycle of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal for Parasitology**, v. 20, p.833-40, 1990b.
- ROBERTS, J.A. Field trials of a single treatment for *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Journal**, v. 6, p. 113-23, 1991.
- ROBERTS, J.A. *Toxocara vitulorum* in ruminants. **Helminthological Abstracts**, v.62, n.4, p.151-74, 1993.
- ROTHMAN, P. et al. Cytokines and growth factors signal through tyrosine phosphorylation of a family of related transcription factors. **Immunity**, v. 1, p. 457, 1994.
- ROTHWELL, T.L.W. Immune expulsion of parasitic nematodes from the alimentary tract. **International Journal for Parasitology**, v.19, p. 139-68, 1989.



- ROTHWELL, T.L.W. Relationship between eosinophilia and responsiveness to infection with *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. **International Journal Parasitology**, v. 23, p. 203-11, 1993.
- SANDERSON, C.J., CAMPBELL, H.D., YONG, I.G. Molecular and cellular biology of eosinophil differentiation factor (interleukin 5) and effects on human and mouse and mouse B cells. **Immunology Reviews**, v. 102, p. 29-50, 1988.
- SCHWARTZ, L.B. Mast cells: function and contents. **Current Opinion in Immunology**, v. 6, p. 91-7, 1994.
- SINGH, S.P., MALIK, J.K. A note on haematological changes in buffalo calves during fasting. **Indian Journal Animal**, v. 49, p. 63-5, 1977.
- SISSON, S., GROSSMAN, J.D. Ruminante – Sistema digestivo. In_. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. p. 807-58.
- SMITH, J.D. Phasmid nematoda: rhabditida ascaridida and oxyurida. In_. **Introduction to animal parasitology**. 3.ed. New York: Cambridge, 1994. p.397-409.
- SPRENT, E.F.A. Some observations on the evidence of bovine helminths in Plateau Province, Northern Nigeria. **Veterinary Journal**, v. 102, p. 36-40, 1946.
- SOULSBY, E.J.L. Toxocariasis. **British Veterinary Journal**, v.139, p.471-5, 1983.
- SRIVASTAVA, A.K. *Neoascaris vitulorum* (Goeze, 1782 e Travassos, 1907) in intestinal perforation with its localization in liver of buffalo calves. **Indian Veterinary Journal**, v. 40, p. 758-62, 1963.
- SRIVASTAVA, A.K., SHARMA, D.N. Studies on the occurrence, clinical features and pathomorphological aspects of ascariasis in buffalo calves. **Veterinary Research Journal**, v. 4, p. 160-2, 1981.
- STARKE, W.A. et al. Curso natural das helmintoses gastrintestinais em búfalos no município de Andradina (SP). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.35, p.651-64, 1983.
- STARKE, W.A., ZOCOLLER, M.C., MACHADO, R.Z. Transmissão transmamária de larvas de nematódeos gastrintestinais a bezerros búfalos. II. Larvas de *Toxocara vitulorum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, p. 97-103, 1992.
- STARKE, W.A., OAKS, J.A. *Hymenolepis diminuta*: Praziquantel removal of adult tapeworm is followed by apoptotic down-regulation of mucosal mastocytosis. **Experimental Parasitology**, v. 92, p. 171-81, 1999.



- STEVENS, R.L., AUSTEN, K.F. Recent advances in the cellular and molecular biology of mast cells. **Immunology Today**, v. 10, p. 381-3, 1989.
- SUGANE, K., OSHIMA, T. Recovery of large numbers of eosinophils from mice infected with *Toxocara canis*. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 29, p. 799-802, 1980.
- SUGANE, K., OSHIMA, T. Eosinophilia, granuloma formation and migratory behaviour of larvae in the congenitally athymic mouse infected with *Toxocara canis*. **Parasite Immunology**, v. 4, p.307-18, 1982.
- SUGANE, K., OSHIMA, T. Induction of peripheral blood eosinophilia in mice by excretory and secretory antigen of *Toxocara canis* larvae. **Journal of Helminthology**, v. 58, p. 143-7, 1984.
- SUGANE, K. et al. Eosinophilia, IL-5 level and recovery of larvae in IL-5 transgenic mice infected with *Toxocara canis*. **Journal of Helminthology**, v. 70, p. 153-8, 1996.
- SUKHAPESNA, V. Ascariasis in buffalo calves. **Journal of the Thai Veterinary Medical Association**, v. 32, p. 263-8, 1981.
- TAKAMOTO, M., SUGANE, K. Mechanisms of eosinophilia in *Toxocara canis* infected mice: *in vitro* production of interleukin 5 by lung cells of both normal and congenitally athymic nude mice. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 493-500, 1993.
- TAKARKHEDE, M.L., PATEL, M.R., PANDEY, S.K. Physiological and biochemical parameters of blood in male buffalo calves. **The Indian Veterinary Journal**, v. 17, p. 948-9, 1973.
- TALIAFERRO, W.H., SARLES, M.P. The cellular reactions in the skin, lungs and intestine of normal and immune rats after infection with *Nippostrongylus muris*. **Journal Infective Disease**, v. 64, p. 151-92, 1939.
- THEODOROU, V. et al. Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: Involvement of mast cells and prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 106, p. 1493-500, 1994.
- TIZARD, I. Introdução à Imunologia Veterinária. In_. **Imunidade contra Protozoários e Helminthos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1996. p. 211-24.
- TONGSON, M.S. *Neoascaris vitulorum* larvae in milk of Murrah buffalo. **Philippine Journal of Veterinary Medicine**, v.10, p.60-4, 1971.



- URBAN, J.F.J. et al. IL-3, IL-4R α , and Stat 6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. **Immunity**, v. 8, p. 255, 1998.
- URBAN, J.F.J. et al. Stat6 signaling promotes protective immunity against *Trichinella spiralis* through a mast cell-and T cell-dependent mechanism. **The Journal of Immunology**, p. 2046-52, 2000.
- VIANA, E.S., CAMPOS, J.M. Estudos do hemograma em bezerros com controle parasitológico e bezerros com verminose gastrointestinal naturalmente adquirida. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**, v. 26, p. 121-6, 1974.
- WARREN, E.G. Observations on the migration and development of *Toxocara vitulorum* in natural and experimental hosts. **International Journal for Parasitology**, v.1, p.85-99, 1971.
- WASSERMAN, S.I., GOETZL, E.J., AUSTEN, K.F. Preformed eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A). **Journal Immunology**, v. 112, p. 351-8, 1974.
- WASSON, D.L., GLEICH, G.J. Damage to *Trichinella spiralis* newborn larvae by eosinophil major basic protein. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, p. 860-3, 1979.
- WELSH, R.A. The genesis of the Charcot-Leyden crystal in the eosinophilic of man. **American Journal Pathology**, v. 35, p. 1091-103, 1959.
- WHITLOCK, A.V. Some modifications of the McMaster helminth eggs; counting technique and apparatus. **Journal Helminthology**, v. 29, p. 177-80, 1948.
- WINTER, M.D., WRIGHT, C., LEE, D.L. The mast cell and eosinophil response of young lambs to a primary infection with *Nematodirus battus*. **Parasitology**, v. 114, p. 189-93, 1997.
- WOODBURY, R.G., NEURATH, H. Purification of an atypical mast cell protease and its levels in developing rats. **Biochemistry**, v. 17, p. 4298, 1978.
- WOODBURY, R.G., MILLER, H.R.P. Quantitative analysis of mucosal mast cell protease in the intestines of *Nippostrongylus* infected rats. **Immunology**, v. 46, p. 487-95, 1982.
- YAMAGUCHI, Y et al. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 43-56, 1988a.



YAMAGUCHI, Y et al. Highly purified murine interleukin-5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, p. 1737-42, 1988b.



9. ANEXOS

TABELA 8. Quadrados das médias (QM) da análise de variância referentes às contagens de mastócitos e eosinófilos nos seis grupos (G) em estudo, três porções (P) do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e nas regiões unidade vilo-crípta (UVC), submucosa (SM), muscular (M) e placas de Peyer (PP).

	QM				
	MAST/UVC	MAST/SM	MAST/M	MAST/PP	EOSIN/UVC
GRUPO	3,5596 **	0,2255 ^{NS}	0,7891 **	1,8664 ^{NS}	36,6855 **
PORÇÃO	5,2443 **	8,2982 **	1,7310 **	-	13,4869 **
G * P	0,5986 *	0,1360 ^{NS}	1,1471 **	-	1,9135 ^{NS}
CV %	19,68	22,58	18,43	14,62	19,34

** - Significativo ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste F.

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

NS – não significativo.

CV – coeficiente de variação.

TABELA 9. Desdobramento das médias e teste de Tukey referentes as contagens de eosinófilos nos animais controles (C30 e C50) e infectados por *T. vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo, na unidade vilocripta (UVC) das três porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo).

G / P	EOSINÓFILOS		
	DUODENO / UVC	JEJUNO / UVC	ÍLEO / UVC
C30	30,13 b	60,42 bc	64,03 ab
C50	20,92 b	43,04 c	40,84 b
ASC	78,52 ab	104,24 abc	80,82 ab
PICO	112,81 a	125,68 a	89,16 ab
DECL	87,84 ab	114,29 ab	110,62 a
AUS	38,86 b	67,97 abc	68,25 ab

G = grupos

P = porções

Letras minúsculas iguais nas médias não diferem significativamente (colunas).

Letras maiúsculas iguais nas médias não diferem significativamente (linhas).

Linhas sem letras maiúsculas são iguais e não diferem significativamente.



TABELA 10. Desdobramento das médias e teste de Tukey referentes as contagens de mastócitos nas três porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) nas três regiões unidade vilo-crípta (UVC), submucosa (SM) e muscular (M), em relação aos grupos controles com 30 (C30) e 50 (C50) dias de idade, infectados por *T. vitulorum* nas fases de ascensão (ASC), pico (PICO), declínio (DECL) e ausência (AUS) do parasitismo.

G / P	MAST / UVC			MAST / SM			MAST / M		
	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo	Duodeno	Jejuno	Íleo
C30	6,24 bA	3,24 bA	3,35 aA	3,34 abA	1,83 aAB	0,24 aB	10,24 aA	8,33 aA	0,00 bB
C50	7,05 bA	4,45 bA	3,85 aA	1,40 bA	2,09 aA	0,00 aA	6,59 aA	5,95 aA	6,84 aA
ASC	9,67 bA	9,50 bA	5,70 aA	2,23 bA	2,40 aA	0,00 aB	6,75 aA	6,74 aA	6,96 aA
PICO	17,08 aA	19,89 aA	5,62 aB	4,42 aA	3,58 aA	0,00 aB	9,81 aA	9,05 aA	7,52 aA
DECL	8,75 bA	8,97 bA	5,77 aA	2,87 abA	2,47 aA	0,00 aB	6,72 aA	6,87 aA	6,22 aA
AUS	7,50 bAB	9,50 bA	3,35 aB	3,65 abA	1,69 aAB	0,00 aB	6,75 aA	5,60 aA	5,50 abA

G = grupos

P = porções

Letras minúsculas iguais nas médias não diferem significativamente (colunas).

Letras maiúsculas iguais nas médias não diferem significativamente (linhas).

Linhas sem letras maiúsculas são iguais e não diferem significativamente.

TABELA 11. Quadrado médio (QM) da análise de variância referente às contagens diferenciais de leucócitos e do hemograma de bezerras búfalos, realizados a cada 15 dias, do nascimento até 174 dias de idade.

F. V.	G. L.	QM						
		Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Eritrócitos 10 ⁶ / mm ³	Leucócitos 10 ³ / mm ³	Vol. Corp. Médio μ ³	Hematócrito %
Tratamentos	1	112,3772 ^{ns}	404,8282 [*]	62,30 ^{**}	1,5566 ^{ns}	123,4763 ^{**}	47,5382 ^{ns}	1,3619 ^{ns}
Épocas	11	364,0791 ^{**}	375,6491 ^{**}	16,20 ^{**}	14,7595 ^{**}	26,6212 ^{**}	30,8227 ^{ns}	402,9550 ^{**}
I/ T* E	11	277,1633 ^{**}	284,7997 ^{**}	1,74 ^{ns}	2,4051 [*]	1,9551 ^{ns}	40,3691 ^{ns}	48,6362 ^{ns}
CV %		16,65	15,35	41,14	9,55	20,61	10,07	12,82
M	Inf.	44,67	52,15	3,48 a	9,68	11,87 a	50,69	49,28
	Contr	43,06	55,35	1,59 b	9,80	9,81 b	49,28	48,63

** - Significativo ao nível de 1 % de probabilidade pelo teste F.

* - Significativo ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste F.

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

CV = coeficiente de variação.

M = média.

TABELA 12. Médias e teste de Tukey referentes as contagens diferenciais de leucócitos e do hemograma de bezerros búfalos, realizados a cada 15 dias, desde o nascimento até 174 dias de idade.

Quinzenas	Idades (dias)	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Eritrócitos	Leucócitos	Vol. Corp.	Hematócrito
					$10^6 / \text{mm}^3$	$10^3 / \text{mm}^3$	Médio μ^3	%
1*	1	56,06	43,81	0,21 f	7,44	10,06 b	50,50	38,12 e
1	2-15	45,30	54,20	0,36 ef	7,51	9,10 c	50,02	38,09 de
2	16-30	44,16	54,16	2,20 bcd	8,55	8,28 d	50,05	42,50 de
3	31-46	43,65	53,90	3,0 bc	9,60	11,20 abc	49,70	47,70 c
4	47-62	46,44	50,31	3,42 ab	9,87	10,56 abcd	49,00	48,25 bc
5	63-78	44,55	52,00	4,51 a	10,61	12,33 ab	50,55	53,16 abc
6	79-94	45,46	50,10	3,17 bc	10,00	13,00 a	51,29	52,46 abc
7	95-110	47,09	48,10	3,87 ab	10,68	13,00 a	52,09	55,45 a
8	111-126	40,80	56,05	2,77 bcd	10,52	12,38 ab	51,05	54,48 b
9	127-142	41,55	56,50	2,04 cd	10,28	11,89 abc	50,72	52,89 abc
10	143-158	36,81	60,87	1,76 de	9,62	10,69 abcd	49,00	47,12 cd
11	159-174	33,00	64,43	1,28 def	10,86	10,71 abcd	45,86	48,57 abcd

1* = 1 dia de idade.

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Colunas que não contém letras significa que são iguais, não diferindo estatisticamente..

Letras com letras manuscritas são iguais e não diferem significativamente.

TABELA 12. Médias e teste de Tukey referentes as contagens diferenciais de leucócitos e do hemograma de bezerros búfalos, realizados a cada 15 dias, desde o nascimento até 174 dias de idade.

Quinzenas	Idades (dias)	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Eritrócitos 10 ⁶ / mm ³	Leucócitos 10 ³ / mm ³	Vol. Corp. Médio μ ³	Hematócrito %
1*	1	56,06	43,81	0,21 f	7,44	10,06 b	50,50	38,12 e
1	2-15	45,30	54,20	0,36 ef	7,51	9,10 c	50,02	38,09 de
2	16-30	44,16	54,16	2,20 bcd	8,55	8,28 d	50,05	42,50 de
3	31-46	43,65	53,90	3,0 bc	9,60	11,20 abc	49,70	47,70 c
4	47-62	46,44	50,31	3,42 ab	9,87	10,56 abcd	49,00	48,25 bc
5	63-78	44,55	52,00	4,51 a	10,61	12,33 ab	50,55	53,16 abc
6	79-94	45,46	50,10	3,17 bc	10,00	13,00 a	51,29	52,46 abc
7	95-110	47,09	48,10	3,87 ab	10,68	13,00 a	52,09	55,45 a
8	111-126	40,80	56,05	2,77 bcd	10,52	12,38 ab	51,05	54,48 b
9	127-142	41,55	56,50	2,04 cd	10,28	11,89 abc	50,72	52,89 abc
10	143-158	36,81	60,87	1,76 de	9,62	10,69 abcd	49,00	47,12 cd
11	159-174	33,00	64,43	1,28 def	10,86	10,71 abcd	45,86	48,57 abcd

1* = 1 dia de idade.

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de Tukey.

Colunas que não contém letras significa que são iguais, não diferindo estatisticamente..

TABELA 13. Desdobramento das média e teste de Tukey referentes as contagens diferenciais de leucócitos e a interação entre os animais controles e infectados por *T. vitulorum*.

Quinzenas	Neutrófilos		Linfócitos		Eosinófilos	
	I	C	I	C	I	C
1*	48,4 a	48,0 abcd	51,2 c	50,9 abc	0,21 e	0,20 c
1	46,4 bc	41,0 abcd	53,0 ab	59,0 abc	0,41 e	0,16 abc
2	41,8 bc	50,2 ab	56,1 a	49,0 c	2,79 cd A	0,66 bc B
3	42,7bc	45,8 abc	54,9 a	51,5 bc	3,51 bcd A	1,89 abc B
4	45,5 bc	48,4 abc	51,0 ab	48,8 c	3,89 abc A	2,47 ab B
5	42,3 bcB	56,0 abcdA	54,1 abA	41,7 cB	4,94 a A	2,33 abc B
6	44,2 bc	49,3 ab	50,6 ab	48,5 c	3,55 bcd A	2,22 abc B
7	49,9 bA	39,5 abcdB	44,4 bcB	58,0 abcA	4,19 ab	2,99 a
8	40,9 c	40,4abcd	55,5 a	57,6 abc	2,86 bcd	2,41 abc
9	42,8 bc	37,0 bcd	54,8 a	62,0 abc	2,50 cd A	0,66 abc B
10	39,6 cA	28,5 dB	57,6 aB	70,5 Aa	2,29 cd A	0,41 bc B
11	34,0 c	31,7 cd	61,5 a	68,3 ab	2,08 cde	0,22 bc

1* = 1 dia de idade.

Letras minúsculas iguais nas médias não diferem significativamente (colunas).

Letras maiúsculas iguais nas médias não diferem significativamente (linhas).

Linhas sem letras maiúsculas são iguais e não diferem significativamente.

