UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ENGENHARIA

CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LARVAS PARA OS TECIDOS DE CAMUNDONGOS PELA IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENOS DE *Toxocara vitulorum* E O ESTUDO DA HISTOPATOLOGIA DAS LESÕES

1210001400

SILVIA HELENA SILVESTRE DE PAULA

ILHA SOLTEIRA/SP
2003

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LARVAS PARA OS TECIDOS DE CAMUNDONGOS PELA IMUNIZAÇÃO COM ANTÍGENOS DE *Toxocara vitulorum* E O ESTUDO DA HISTOPATOLOGIA DAS LESÕES

AUTORA: SÍLVIA HELENA SILVESTRE DE PAULA

ORIENTADORA: Profa. Dra. WILMA APARECIDA STARKE BUZETTI

Proc. 053/2003-NBD 135
UNESP - "CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA"
SERVIÇO TÉC. DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO
DATA DE CHEGADA: 01.09.03 | DATA DE TOMBO: 31.09.03
REGISTRADO POR: Aiza | TOMBO: Te. 1400
AQUISIÇÃO: Doação Autor R$10,00 | CLASSIFICAÇÃO: P324i

1210001400

Co
Sys 199628
Sys 55483
50405004

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP/ Campus de Ilha Solteira, para obtenção do titulo de Mestre em Zootecnia –Área de Concentração: Sistema de Produção Animal.

ILHA SOLTEIRA/SP
Março de 2003

BCpIS - FEIS - UNESP

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação/Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da FEIS/UNESP

Paula, Sílvia Helena Silvestre de

P324i Inibição da migração de larvas para os tecidos de camundongos pela imunização com antígenos de *Toxocara vitulorum* e o estudo da histopatologia das lesões / Sílvia Helena Silvestre de Paula – Ilha Solteira : [s.n.], 2003

xvii, 70 p. :il.

Disssertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de concentração : Sistemas de Produção Animal, 2003

Orientadora : Wilma Aparecida Starke Buzetti

Bibliografia: p. 57-64

1. Imunologia. 2. Parasitologia veterinaria. 3. Helmintos. 4. Búfalo.

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Ilha Solteira

Inibição da migração de larvas para os tecidos de camundongos pela imunização com antígenos de *Toxocara vitulorum* e o estudo da histopatologia das lesões.

Silvia Helena Silvestre de Paula

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNESP - CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ZOOTECNIA

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profª Drª Wilma Aparecida Starke Buzetti - (Orientadora)

Profª Drª Rosângela Zacarias Machado

Profª Drª Maria Conceição Zocoller Seno

Ilha Solteira – SP
abril de 2003

Cursos: Agronomia - C. Biológicas - Eng. Civil - Eng. Elétrica - Eng. Mecânica - Física - Matemática - Zootecnia
Av. Brasil Centro, 56 - Cx. Postal 31 - CEP 15385-000 - PABX (18) 3743-1000
Fax: (18) 3742-2735 - E-mail: scom@adm.feis.unesp.br
ILHA SOLTEIRA - SP - BRASIL

BCpIS - FEIS - UNESP

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

DEDICO

A minha mãe e meu pai, em presença espiritual, mostrando sempre o melhor caminho a ser seguido. Agradeço pelas oportunidades que sempre me concederam e retribuo a vocês hoje com mais essa conquista.

A minha irmã Cristiane, pelo incentivo e preocupação, ao meu lado sempre com muito amor ajudando na solução de tantos problemas.

A minha irmã Eliana, que se dedicou a mim com muito carinho, mas principalmente por ter me concedido a coisa mais importante que eu poderia receber na vida.

E a você, meu amado sobrinho "Frederico", que me mostrou a verdadeira razão de estar lutando e o motivo pelo qual vale a pena continuar...

Ao querido Marcos Lemos, que participou dessa jornada, com muito amor, estimulo e confiança que sempre depositou em mim.

Por fim, aos meus queridos cunhados, pelo carinho e compreensão.

BCpIS - FEIS - UNESP



AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Professora Doutora Wilma Aparecida Starke Buzetti, agradeço pela confiança e credibilidade depositada em mim no início deste curso, as quais foram revertidas em auto-estima e anseio para conclusão do experimento. Sobretudo, agradeço pela paciência, atenção e pelo incentivo durante o decorrer de todo curso. Ainda, fundamentalmente pelos preciosos ensinamentos, dando-me exemplos de dedicação e inspiração à pesquisa.

Aos funcionários da Fazenda de Ensino e Pesquisa - UNESP, pelo manejo e cuidados com os animais, bem como a dedicação diária na coleta do material necessário para realização deste experimento.

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia Aparecida Duarte Cardoso e João Augusto da Paixão, pelos valiosos auxílios na contagem do material de pesquisa e manejo com os camundongos, ajudando sempre com muito afinco e dedicação.

A Professora Doutora Maria Conceição Zocoller Seno pela atenção tão despendida ao nosso trabalho, bem como pelas suas dicas e valiosas sugestões em todo decorrer deste curso. Sempre com muita paciência e sabedoria esteve presente auxiliando em cada momento de dificuldade. Devo muito a você do pouco que sei.

BCpIS - FEIS - UNESP



Aos amigos e colegas:

Maria Francisca Neves pela atenção dispensada a mim desde o início deste curso. Sempre com muita dedicação no apoio da realização deste experimento. Com muito carinho esteve presente na difícil rotina no decorrer de todos anos. Obrigada pela sua presença, confiança e amizade verdadeira.

Fabiano Pan Ferreira pela organização laboratorial, persistência, carinho e dedicação. Agradeço pelo auxílio na manutenção dos camundongos, necrópsia, enfim por todo seu apoio atencioso.

Antônio Carlos Faconti de Noronha Jr., agradeço pelas vezes que realizou os transportes dos camundongos utilizados no experimento. Mas principalmente por estar sempre presente com a sua força de viver não deixando que os momentos tristes superassem as alegrias.

Priscila Alonso dos Santos e Marco Antônio Pereira da Silva que por estarem o tempo todo ao meu lado, proporcionaram otimismo, confiança e muita força para a conclusão desta pesquisa. Além de tudo, permaneceram ao meu lado em um dos momentos mais difíceis da minha vida. Serei sempre grata a "Deus" por tê-los colocado em meu caminho.

Enfim, a todos os companheiros do curso de pós-graduação, pelos bons momentos e convívio que jamais serão esquecidos.

Aos meus tios Emílio Cláudio Silvestre e Sueli Aparecida da Silva Silvestre pelo amparo e carinho dispensados a mim nestes anos de curso.

A secretária Meiri Sayuri Nishida Máximo da Cruz por sua atenção a nós, pós-graduandos, e a auxiliar acadêmica Zeneide Ribeiro Campos pelo auxílio na digitação da dissertação.



A Sra. Cleuza Nozela Beltrame, zeladora do Departamento de Biologia e Zootecnia, pela satisfação da convivência diária, oferecendo sempre seus serviços com muito carinho e alegria.

Aos Professores Doutores do curso de Pós-graduação do Departamento de Biologia e 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 Filho, Edson Guilherme Vieira, pela compreensão e apoio durante os anos de duração deste curso. E é com muito orgulho que encerro esta pesquisa com um pouco mais de experiência, resultante da somatória do esforço e profissionalismo de cada um de vocês.

Aos Professores Doutores do Departamento de Matemática da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira/ UNESP – Evaristo Bianchini Sobrinho, do Departamento de Ciências do Solo e Engenharia Rural da Faculdade de Ilha Solteira/ UNESP – Salatiér Buzetti e ao amigo doutorando Geovane Lima Guimarães pela colaboração na execução da análise estatística.

Ao Professor Doutor Gervásio Henrique Bechara e o Doutorando Guilherme Sellera Godoy do Departamento de Patologia da UNESP-Câmpus de Jaboticabal, pela atenção e auxílio na interpretação histopatológica deste experimento.

SUMÁRIO

Páginas

LISTA DE TABELA.....viii
LISTA DE FIGURAS x
RESUMO xiv
ABSTRACT xvi
INTRODUÇÃO 01
OBJETIVO 03
REVISÃO DE LITERATURA.....04
MATERIAL E MÉTODOS 12
1. Local 12
2. Animais 12
2.1.Camundongos.....12
2.2. Bezerros búfalos 12
3. Obtenção de ovos infectantes.....13
4. Obtenção de larvas infectantes.....14
5. Obtenção dos antígenos 14
5.1. Quantificação da proteína dos antígenos 16
6. Imunização dos camundongos 16
7. Infecção experimental dos camundongos 16
8. Necrópsia dos camundongos 17
9. Digestão das amostras de tecidos para observação de larvas.....18
10. Histologia 18
10.1. Coloração das amostras de tecidos 18

10.2. Contagem de células 19
11. Delineamento experimental 19
12. Análise Estatística 20
RESULTADOS 21
1. Exame de fezes 21
2. Larvas de *T. vitulorum* recuperadas nos tecidos de camundongos imunizados e não imunizados (controle) 25
3. Histopatologia 34
DISCUSSÃO 47
CONCLUSÕES 56
REFERÊNCIAS 57
ANEXOS 65

LISTA DE TABELAS

Páginas

TABELA 1 - Presença de larvas de *Toxocara* spp em diferentes tecidos observados por vários autores 07

TABELA 2 - Esquema de imunização de camundongos com os antígenos Pe, Ex e ES 16

TABELA 3 - Número de camundongos necropsiados às sete horas, aos quatro dias e aos 30 dias após a infecção experimental com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum* 20

TABELA 4 - Contagem total de larvas e ovos de *Toxocara vitulorum* nas fezes para cada grupo de cinco camundongos desafiados com ovos infectantes deste parasita (2500 ovos/animal) 22

TABELA 5 - Número médio, desvio padrão (DP) de larvas de *Toxocara vitulorum* nos tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Pe, Ex e ES) de *T. vitulorum* e não imunizados (controles) necropsiados nos diferentes períodos após o desafio com ovos infectantes deste parasita (Ilha Solteira, SP, 2002) 27

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

TABELA 6 - Número de células mastócitos e eosinófilos no intestino grosso de camundongos dos grupos controle e imunizados com os antígenos Pe e Ex. 35

TABELA 7 – Resumo das observações histopatológicas observadas no intestinos grosso, fígado e pulmão de camundongos não imunizados e imunizados com os antígenos Pe, Ex e ES de *T. vitulorum*. 37

LISTA DE FIGURAS

Páginas

FIGURA 1 - Número total de larvas e ovos eliminados nas fezes dos camundongos imunizados com o antígeno Pe e não imunizados (controle), após o desafio com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum* (n=5) 22

FIGURA 2 - Número total de larvas e ovos eliminados nas fezes dos camundongos imunizados com o antígeno Ex e não imunizados (controle), após o desafio com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum* (n=5) 23

FIGURA 3 - Número total de larvas e ovos eliminados nas fezes dos camundongos imunizados com antígeno ES e não imunizados (controle), após o desafio com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum* (n=5) 24

FIGURA 4 - Número médio de larvas de *Toxocara vitulorum* nos tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES e Pe) e os não imunizados (controle), no período de 7 horas após o desafio. * Significativo à 5% de probabilidade em relação ao controle 28

FIGURA 5 - Número médio de larvas de *Toxocara vitulorum* nos tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES e Pe) e os não imunizados (controle), no período de 4 dias após o desafio. * Significativo a 5% de probabilidade em relação ao controle 31

FIGURA 6 - Número médio de larvas de *Toxocara vitulorum* nos tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES e Pe) e os não imunizados (controle), no período de 30 dias após o desafio. * Significativo a 5% de probabilidade em relação ao controle 33

FIGURA 7 - Fotomicrografias do intestino grosso de camundongos sete horas após infecção experimental com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum* **A:** Camundongo não imunizado. Observe a integridade do tecido muscular, da submucosa, mucosa e epitélio, além da ausência de alterações vasculares. **B:** camundongo imunizado com o antígeno Pe. Note o espessamento da muscular e da submucosa com perda da integridade da mucosa, a presença da larva (seta) envolvida por reação inflamatória e ainda, hiperemia por todo tecido 38

FIGURA 8 - Fotomicrografias do intestino grosso de um camundongo imunizado com antígeno de *T. vitulorum* e necropsiado sete horas após o desafio. **A:** Camundongo imunizado com o antígeno Pe. Observe a larva (seta) de *T. vitulorum* na mucosa envolvida por reação. Note a presença de abundante eosinófilos e neutrófilos e a hiperemia por todo tecido. **B:** Camundongo imunizado com antígeno Ex. Note a evidência dos mastócitos corados em azul, eosinófilos, hiperemia e diapedese 39

FIGURA 9 - Fotomicrografias do fígado de camundongo não imunizado e necropsiado quatro dias após o desafio **A:** Note pequeno foco inflamatório (seta) (200x). **B:** Mesmo foco inflamatório da figura A, mas em maior aumento, mostrando a presença massiva de eosinófilos; alguns neutrófilos e degeneração vacuolar ( ) (600x) 40

FIGURA 10 - Fotomicrografias do fígado de um camundongo necropsiado quatro dias após o desafio. **A:** Mesmo foco inflamatório mostrado na figura 9B, mas em aumento maior (1000x) mostrando a presença de eosinófilos. **B:** Camundongo imunizado com antígeno Pe. Observe a presença de uma larva dentro de uma ruptura de tecido (seta) 41

FIGURA 11 - Fotomicrografias do fígado de um camundongo imunizado com o antígeno ES e necropsiado quatro dias após desafio. **A:** Manguito em um ramo da veia porta com presença de células inflamatórias (seta). **B:** Maior aumento da figura anterior (11A) (400x)..... 42

FIGURA 12 - **A:** Fotomicrografias do fígado de camundongo imunizado com antígeno ES e necropsiado quatro dias após o desafio. Maior aumento da figura 11B (600x). **B:** Fotomicrografia de pulmão de um camundongo não imunizado e necropsiado quatro dias após o desafio. Observe a reação inflamatória ao redor dos brônquios, alvéolos e vasos (200x)..... 43

FIGURA 13 - Fotomicrografias de pulmão de camundongo imunizados com antígeno ES e necropsiado quatro dias após o desafio. **A:** Observe a intensa reação inflamatória ao redor dos alvéolos e hemorragia com deposição de fibrina, eosinófilos e neutrófilos (200x). **B:** Maior aumento da figura anterior (13A) (600x). Maciça reação inflamatória ao redor dos alvéolos, hemorragia 44

FIGURA 14 - Fotomicrografias dos pulmões dos camundongos imunizados e necropsiados quatro dias após o desafio. **A:** Camundongo imunizado com antígeno ES. Observe a presença de secção de uma larva (seta) entre os alvéolos, envolvida por células inflamatórias e hemorragia. **B:** Camundongo imunizado com o antígeno Pe. Note secções de uma larva (seta) envolvida por reação inflamatória com presença de eosinófilos, linfócitos, macrófagos e hemorragia por todo tecido 45

FIGURA 15 - Fotomicrografias do pulmão de camundongo imunizado com o antígeno Pe e necropsiado quatro dias após o desafio. Observe uma larva rompendo a parede do vaso sangüíneo e note a reação inflamatória com a presença de eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. **A:** (400x) e B: (600x)..... 46

RESUMO

O *Toxocara vitulorum* é um nematódeo parasita do intestino delgado particularmente de bezerros búfalos muito jovens e pode ocasionar morte dos mesmos quando não tratados. Este trabalho objetivou a imunização de camundongos com diferentes antígenos deste parasita para verificar a capacidade do sistema imunológico de inibir a migração larval para diferentes tecidos, através da contagem de ovos eliminados nas fezes e da presença de larvas nos tecidos. A histopatologia das lesões teciduais provocada pela migração larval bem como a quantificação de mastócitos e eosinófilos do intestino grosso, também foram realizados. Para tanto, três grupos de camundongos foram imunizados com: antígenos do fluido perientérico (Pe) do parasita adulto, antígenos extrato solúvel bruto (Ex) e excretor/secretor (ES) de larvas infectantes de *T. vitulorum*. Estes três grupos foram comparados com o grupo controle, não imunizado. Todos os grupos foram desafiados com ovos infectantes deste parasita e necropsiados em três períodos diferentes após o desafio: sete horas, quatro dias e 30 dias pós-infecção. Realizou-se a contagem de ovos e de larvas nas fezes dos camundongos e o grupo imunizado com antígeno Pe foi o que eliminou a maior quantidade de larvas. Após a necrópsia, realizou-se a retirada de tecido do intestino delgado, intestino grosso, fígado, pulmão, coração, cérebro e músculos (diafragma, língua e quadríceps femural). Estes tecidos foram digeridos (por digestão péptica) e as larvas foram identificadas e contadas em cada tecido. O maior número de larvas foi encontrado no intestino grosso no período de sete horas após o desafio, em todos os grupos examinados, porém, este número foi significativamente inferior ($p<0,005$) nos grupos imunizados. Com quatro dias após o desafio, as larvas concentravam-se, preferencialmente, no fígado e pulmões, e os grupos imunizados apresentaram uma quantidade muito menor de larvas, significativo para o fígado e pulmão ($p<0,005$) em relação ao grupo controle. No período de 30 dias após o desafio, as larvas recuperadas

unesp

no cérebro e no músculo, mesmo que em pequena quantidade, demonstraram a capacidade das larvas de alcançar estes tecidos. A porcentagem da inibição larval para o fígado foi de 86% para o antígeno Ex; 79% para o antígeno Pe e 58% para o antígeno ES. O número de mastócitos no intestino grosso dos animais imunizados não foi relevante em relação ao controle, mas os eosinófilos aumentaram 15 vezes nos animais imunizados. As reações inflamatórias observadas nos tecidos dos animais imunizados com os três antígenos foram mais intensas que nos tecidos dos animais do grupo controle, deixando claro a capacidade dos antígenos de *T. vitulorum* de estimular imunologicamente o hospedeiro na tentativa de inibir a migração de larvas pelos tecidos. As células identificadas nos focos inflamatórios foram eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, mas com total predominância de eosinófilos em todos os tecidos observados.

Palavras-chave: búfalo, *Toxocara vitulorum*, imunização, camundongos.

ABSTRACT

Toxocara vitulorum is a nematode parasite of the small intestine, particularly, water buffalo calves and can cause high morbidity and mortality when the calves are not treated. The objective of this study was immunization of mice with different antigens from *T. vitulorum* adult and larvae in order to verify the capacity of the immune system to inhibit larval migration from gut to different tissues. The histopathology lesions caused by the larval migration was studied as well as the mast cell and eosinophil quantifications in the large intestines. Three groups of mice were immunized with: perienteric fluid (Pe) of adult and excretory/secretory (ES) and soluble extracts (Ex) of infective larvae of *T. vitulorum*. One group of no immunized animals was considered the control of the experiment. All groups were challenged with *T. vitulorum* infective eggs and necropsied in three different periods after challenging: 7 hours, 4 and 30 days. Eggs and larvae counts in the feces of the mice were accomplished and revealed that the immunized group of animals with Pe antigen eliminated the highest number of larvae. Tissues of small and large intestines, liver, lung, heart, brain and muscle (diaphragm, tongue e quadriceps femoris) were removed, by peptical digestion and the larvae present in these tissues were identified and counted. The greater larval number was found in the large intestine 7 hours after challenging in all examined groups; however, this number was significantly lower ($p<0,005$) in animals of immunized groups. On day 4 after challenging, a greater number of larvae were found in the liver and lungs in control group, but in immunized groups a very lower numbers were seen in liver and lungs ($p<0,005$). On day 30 after challenging larvae were recovered in the brain and muscle, but in very low numbers. The percentage of larval inhibition of migration to the liver was 86% for Ex, 79% for Pe, and 58% for ES antigens. The number of mast cells in the large intestine in both immunized and no immunized animals were seen in low counts,

unesp

but the eosinophil numbers increased 15 times in the immunized animals. The inflammatory reactions observed in immunized animal were more intense than the reactions in no immunized mice for all three antigens. The inflammatory cells found in the tissues were eosinophils, neutrophils e macrophagos, but with predominance of eosinophils.

Key words: water buffalo, *Toxocara vitulorum,* immunization, mice

BCpIS - FEIS - UNESP

INTRODUÇÃO

A incidência de enfermidades parasitárias é muito alta e por esta razão é mundialmente pesquisada, e em países subdesenvolvidos esta incidência é gravemente acentuada em todas espécies de animais.

O nematódeo *Toxocara vitulorum,* parasita intestinal pertencente à Família Ascarididae que acomete mundialmente e em grande escala bezerros búfalos, causa perdas econômicas aos produtores.

O *T. vitulorum* é transmitido para os bezerros, principalmente pelo leite e colostro das fêmeas contendo larvas infectantes, as quais evoluem para a forma adulta no intestino, podendo ocorrer danos no local e até levar o animal à morte. Quando infectados com ovos presentes no ambiente, estes eclodem, penetram no intestino e migram para os tecidos causando lesões traumáticas muitas vezes irreversíveis, antes mesmo de tornarem-se adultos.

Porém, 30-45 dias após o nascimento, os bezerros expulsam espontaneamente os parasitas adultos e permanecem protegidos da reinfecção. Dessa forma, este parasita estimula a resposta imunológica, tanto através de antígenos larvais como de antígenos de adultos.

Em pesquisas específicas, observou-se que o manejo, o estado nutricional e o uso de anti-helmínticos limitam o desenvolvimento do parasita adulto no animal, porém, os estádios larvais nos tecidos das fêmeas adultas são irremediáveis, principalmente porque as larvas permanecem em estado de "hipobiose" na musculatura e no cérebro, não sendo assim reconhecidas pelo sistema imunológico. As fêmeas, então, são consideradas fontes contaminantes diretas para seus bezerros e talvez ao homem.

Contudo, uma forma de controle seria a imunização das mães para inibir a migração larval para a glândula mamária e subseqüente impedimento da ingestão pelos seus

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

bezerros. Assim, em relação ao parasita *T. vitulorum,* três diferentes antígenos já foram obtidos: o líquido perientérico de adultos (Pe), o excretor/secretor (ES) e o extrato solúvel bruto (Ex) de larvas infectantes (AMERASINGHE et al., 1992; STARKE-BUZETTI et al., 2001; SOUZA, 2001; FERREIRA, 2002). Estes três antígenos detectaram níveis altos de anticorpos no soro e no colostro de búfalas adultas e no soro de bezerros búfalos naturalmente infectados com *T. vitulorum*. Estes resultados demonstraram que há uma resposta imune-humoral contra esta infecção parasitária. No entanto, resta conhecer se estes antígenos irão desencadear no hospedeiro uma resposta imunológica protetora, principalmente contra as larvas migratórias teciduais.

Como os camundongos podem servir de modelo para o estudo da migração larval, o presente trabalho objetivou a utilização de antígenos obtidos das larvas (Ex e ES) e do adulto (Pe) de *T. vitulorum* para imunizar estes animais e verificar se estes antígenos apresentam capacidade de proteção imunológica inibindo a migração larval através dos tecidos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

OBJETIVOS

Objetivo geral

Imunização de camundongos com os seguintes antígenos larvais (Ex e ES) e de adultos (Pe) de *T. vitulorum* para verificar se estes antígenos apresentam a capacidade de estimular o sistema imunológico para inibir a migração de larvas pelos tecidos.

Objetivos específicos

1. Quantificação de larvas presentes na mucosa, as quais foram expulsas nas fezes dos camundongos sete horas após o desafio com ovos infectantes de *T. vitulorum.*
2. Quantificação das larvas presentes na digestão péptica tecidual do intestino delgado e grosso, fígado, pulmão, coração, músculos e cérebro, sete horas, quatro e 30 dias após o desafio.
3. Verificar a percentagem da inibição da migração larval para o fígado, quatro dias após o desafio.
4. Quantificação do número de mastócitos e eosinófilos presentes na parede do intestino grosso sete horas após o desafio.
5. Verificar a intensidade das reações inflamatórias observadas nos tecidos em decorrência da migração larval no período de sete horas e quatro dias após o desafio.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

REVISÃO DE LITERATURA

Toxocara vitulorum (GOEZE, 1782) WARREN, 1970 é um nematódeo parasita, pertencente à superfamília Ascaridoidea (RAILLIET & HENRY, 1915) e família Ascarididae. Há décadas muitos pesquisadores vem observando que o presente parasita é o principal agente causador de morte entre os bubalinos de um a três meses de idade e que quando é altamente prevalecente e o animal não é medicado, a taxa de mortalidade pode variar de 30% a 50% (DAS & SINGH, 1955; PATNAIK & PANDE, 1963 e LÁU, 1999).

Um outro fator que deve ter importância relevante é a dimensão do *T. vitulorum* adulto localizado no intestino delgado do hospedeiro. ROBERTS (1993) citou, em sua revisão, que no pico da liberação dos ovos pelas fezes, as fêmeas mediam em torno de 15 a 31 cm e os machos de 10,5 a 20,4 cm. Reportou ainda, que os búfalos poderiam ser encontrados com até centenas de exemplares adultos. STARKE et al. (1993), também através de mensurações deste parasitas, observaram que o comprimento, diâmetro e massa eram, respectivamente, 15,0 a 27,5 cm; 2,5 a 4,0 cm e 1,2 a 2,4 g nos machos, e 17,0 a 40,0 cm; 3,0 a 7,0 cm e 2,5 a 8,0 g nas fêmeas. Desta forma estes nematódeos enovelados no intestino delgado causam obstruções que dificultam a passagem do bolo alimentar, dificultando a sua absorção.

De maneira geral, os búfalos encontram-se altamente infectados com *T. vitulorum*, aproximadamente dos 15 aos 120 dias de idade. O pico máximo de eliminação de ovos nas fezes dos animais ocorre em média aos 45 dias, mas em seguida, a contagem destes ovos declina e coincide com a expulsão natural dos parasitas adultos pelas fezes do hospedeiro. Neste período, a contagem de ovos (OPG) decresce rapidamente para alcançar o valor zero em torno de 120 dias de idade em decorrência da expulsão natural (STARKE et al., 1983; NEVES, 2001; SOUZA, 2001 e STARKE-BUZETTI, et al.,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

2001). Esta precocidade de infecção foi atribuída por alguns pesquisadores, como sendo pré-natal (HERLICHE & PORTER, 1953; REFUERZO & ALBIS-JIMENEZ, 1954; DAS & SINGH, 1955). Posteriormente, experimentos com *T. vitulorum*, indicaram a possibilidade dos bezerros búfalos adquirirem esta parasitose através do colostro (TONGSON, 1971; WARREN, 1971; CHAUHAN et al., 1974; MIA et al., 1975; GAUTAM et al., 1976; BARUAH et al., 1981; BANERJEE et al., 1983; ROBERTS, 1990a.b; STARKE et al., 1992). Assim sendo, a transmissão transmamária têm um papel muito importante na infecção precoce dos bezerros búfalos.

ROBERTS (1990a), através de larvas marcadas, de *T. vitulorum* em búfalos, demonstrou que as larvas presentes no fígado e nos pulmões, um a oito dias antes do parto, migravam para a glândula mamária. Nesse órgão, a larva continuava seu crescimento e 90% delas, eram eliminadas através do colostro/leite, pela maioria das búfalas estudadas, durante os primeiros seis dias após o parto. Concordantemente, STARKE et al. (1992) evidenciaram a presença de larvas deste helminto no colostro/leite de búfalas, do parto ao 26° dia pós-parto (70% dos animais analisados).

Demonstrando a patogenicidade deste parasita, ENYENIHI (1969) constatou que os bezerros búfalos infectados com *T. vitulorum* mostravam uma progressiva redução no ganho de peso com o aumento do número de parasitas adultos presentes no intestino. Além disso, verificou clinicamente que os animais perdiam peso durante o segundo mês de vida, mostrando sinais clínicos de inapetência, anemia, diarréia, cólicas intermitentes, timpanismo, pêlos arrepiados e opacos. ROBERTS (1993), em sua revisão, cita como sinais clínicos, além de anorexia e diarréia, ocorrência de constipação entérica, desidratação, esteatorréia, dor abdominal e um odor butírico no tubo digestivo. Pode ocorrer também, mas menos comumente, obstrução do trato alimentar do animal e intussuscepção. Além disso, estes helmintos adultos perfuram a parede intestinal e atingem outras vísceras, como o fígado (SRIVASTAVA, 1963).

A larva deste helminto realiza, portanto, migrações pelo corpo do animal. WARREN (1971), estudando em camundongos a sobrevivência e o comportamento migratório da larva de *T. vitulorum* após a infecção com ovos infectantes, constatou que as larvas eram encapsuladas através de reações inflamatórias imune-celulares no fígado e nos pulmões, onde muitas delas eram mortas, embora uma pequena proporção conseguia escapar continuando a migração para a musculatura esquelética do hospedeiro. Estudos clínicos da toxocarose nos bezerros búfalos revelaram que as migrações larvais ocasionavam sugestiva insuficiência hepática (GUPTA et al., 1976)

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

que podia ser ocasionada ou pela liberação de toxinas (DAS & SINGH, 1955) ou pelas lesões viscerais traumáticas (SRIVASTAVA, 1963). Além disso, RAI et al. (1971) citados por GUPTA et al. (1976), observaram níveis elevados de histamina no sangue de bezerros infectados, correlacionados com as lesões teciduais e a toxemia. As irritações pulmonares decorrentes da migração larval, normalmente, entre os dias 8 e 21, podiam provocar o desenvolvimento de uma reação inflamatória em torno da larva (REFUERZO et al., 1952; ENYENIHI, 1970) levando os animais a um processo de pneumonia secundária à migração larval.

OMAR & BARRIGA (1991) infectaram coelhos com ovos de *T. vitulorum* nos dias zero, 35 e 72. 10 e 4% dos parasitas administrados passaram nas fezes durante três dias em seguida à primeira e segunda infecção respectivamente, mas 32% depois da terceira. Muitas larvas foram eliminadas na terceira infecção, mas nenhuma na primeira e segunda. No fígado foram recuperadas 593 larvas, no pulmão 243 e zero nos músculos no dia 5 pós-infecção (pi); 282 no fígado, 138 no pulmão e 21 nos músculos no dia 15 pi; 151 no fígado, 21 no pulmão e 50 nos músculos no dia 30 pi; zero no fígado, 26 no pulmão e 15 nos músculos no dia 65 pi; zero no fígado, zero no pulmão e nove nos músculos no dia 101 pi. Nenhuma larva foi encontrada em outro tecido. O tamanho das larvas encontradas nos músculos aos 30, 65 e 101 dias indicou que o parasita não se desenvolveu, mas estava provavelmente em estado hipobiótico no organismo.

Na Tabela 1 estão sumarizados locais onde as larvas de *T. vitulorum* e *T. canis* foram observadas em diferentes tecidos em trabalhos realizados por diferentes pesquisadores.

MIA et al. (1975) apesar de concordar que as búfalas adultas eram consideradas hospedeiros intermediários desta infecção, não conseguiram explicar como os parasitas no animal adulto iriam tornar-se infectantes aos animais susceptíveis. Mas mesmo assim, sugeriram que o estresse provocado pela prenhez, pelo parto e pela lactação é que poderia contribuir para o desencadeamento desta parasitose, onde as búfalas, comportando-se como hospedeiros intermediários, seriam fontes de infecção aos seus bezerros ainda no período de lactação. A imunossupressão observada durante a prenhez e a lactação poderia ser provavelmente devido às alterações endocrinológicas que ocorrem no animal neste período. Portanto, a resposta imunológica deprimida no peri-parto tem importante papel na ecologia parasitária. O ciclo de vida do hospedeiro sincronizado com o do parasita pode trazer benefícios para a atividade parasitária e

unesp

TABELA 1 - Presença de larvas de *Toxocara* spp. em diferentes tecidos observados por vários autores.

	Intestino	Fígado	Pulmão	Rim	Coração Pâncreas Mesentério	Baço	Cavidade Abdominal	Traquéia Esôfago	Cérebro	Músculo
***Chauhan & Pande** (1972) Ratos Albinos	2 horas 8horas – todo intestino	6 horas 4 dias- pico 15 dias- declíneo	2-15 dias 5 dias- pico 15 dias- declíneo	2 dias	2 dias	2 dias	8 horas	9 dias	NO	NO
***Chauhan et al.** (1974) Ratos Albinos	10 horas- todo intestino	10 horas - 1 larva 1 dia - 5 larvas	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
***Amerasinghe et al.** (1992) Camundongos	NO	2 dias 2 dias- pico 7 dias- declíneo	2 dias 2 dias- pico 12-21 dias- declíneo	2 dias 4 dias- pico 7 dias- declíneo	NO	2 dias 7 dias- declíneo	NO	NO	2 dias 7 dias-pico 7 dias- declíneo	4 dias 12 dias-pico 21 dias- declíneo
***Barriga e Omar** (1992) Coelhos	NE	5 dias- pico 15 dias- declíneo	5 dias- pico 15 dias- declíneo	NE	NE	NE	NO	NO	NE	35 dias -pico 40 dias - declíneo
***Omar e Barriga** (1991) Coelhos	NE	5 dias- pico 15 dias- declíneo	5 dias- pico 15 dias- declíneo	NE	NE	NE	NO	NO	NE	35 dias – pico 40 dias- declíneo
****Nunes et al.** (1999) Camundongos	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	45-48 dias	NO

N.O= Tecidos não observados ; N.E= Larvas não encontradas ;* *Toxocara vitulorum* ; ** *Toxocara canis*

proporcionar uma fonte de infecção para as gerações totalmente susceptíveis da prole, pela prenhez.

Estudos das alterações patológicas e do papel das células inflamatórias no controle de helmintos foram realizados por vários autores. CHAUHAN et al. (1974) infectaram experimentalmente ratos albinos e frangos com *T. vitulorum* e observaram as seguintes alterações: 1) grande número de larvas migrando em diferentes profundidades da parede intestinal, principalmente na região cecal. A mucosa intestinal encontrava-se congesta e na região cecal, a mucosa apresentava-se com uma acentuada descamação com áreas hemorrágicas nos locais de penetração; 2) uma zona de reação inflamatória local composta por eosinófilos, neutrófilos e acúmulo de eritrócitos e 3) congestão dos vasos sangüíneos da mucosa e submucosa. Além da região intestinal, estes autores encontraram larvas que migraram também para o fígado dos ratos. Porém, nos frangos infectados, além do intestino e do fígado, as larvas foram encontradas também nos pulmões. No mesmo trabalho, constataram migrações pelos lóbulos hepáticos, bem como pela veia porta; o que resultou em extensas rupturas do parênquima hepático, como também atrações de células inflamatórias, principalmente de eosinófilos e neutrófilos. Também no tecido alveolar, as larvas estavam envolvidas por eosinófilos e eritrócitos. Em seguida, TAWFIK (1975) estudou a migração larval de *T. vitulorum* em ratos e observou inflamação com infiltração celular, descamação e necrose na mucosa da parede intestinal (íleo e ceco). No fígado, foi observado hemorragia, alterações necróticas e formação de granulomas focais e difusos. Os pulmões encontravam-se hemorrágicos e com broncopneumonia.

KAYES & OAKS (1978), infectando camundongos com ovos infectantes de *T. canis*, observaram a formação de granulomas ao redor da larva infectante na musculatura. O granuloma inicial consistia basicamente pela presença abundante de eosinófilos evoluindo para um infiltrado de células inflamatórias de processo agudo. Durante as 48 horas seguintes, muitos dos eosinófilos encontravam-se sem grânulos e desintegrados. Com a evolução deste processo, macrófagos eram acrescidos ao fragmento celular resultante do granuloma, onde as células mononucleares eram predominantes nas lesões no final de 28 dias de infecção. Após 11 semanas, a larva inicial encontrava-se encapsulada por este granuloma, o qual apresentava-se com um aspecto epitelióide e fibrótico. Além da musculatura e do intestino, o fígado também foi utilizado para demonstrar a resposta imune celular, como no experimento realizado por PARSONS & GRIEVE (1990) que após infectarem ratos com *T. canis*, verificaram que

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

os eosinófilos podem ter um papel importante no aprisionamento das larvas deste parasita. No entanto, nem todas as larvas aprisionadas foram mortas e algumas persistiam 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. Em seguida, ABO-SHEHADA et al. (1991) verificaram experimentalmente em camundongos infectados com *T. canis* que as larvas L3 pareciam retidas em uma reação inflamatória em torno de nove horas após a infecção, na parede intestinal e no fígado, quando os animais já haviam sido previamente imunizados. Entretanto, a maioria destas larvas não morria e conseguia escapar dos granulomas para continuar a migração subseqüente, apesar da redução do número destas larvas no cérebro e nos músculos. ALDAWEK et al. (2002) em ovinos infectados experimentalmente com *T. canis*, observaram alterações histológicas no intestino, fígado e pulmão. No intestino destes animais foram encontradas larvas com maciça infiltração eosinofílica. No fígado, as mesmas células foram notadas e a lesão evoluiu para granulomas eosinofílicos. O pulmão apresentou-se com vasos congestos ao redor dos alvéolos e brônquios e também com a presença de eosinóifilos.

Os mecanismos imunes de defesa do hospedeiro podem provocar uma lesão inflamatória levando a um processo de expulsão natural do parasita pelo intestino, conhecido como fenômeno da "auto-cura", ou "cura espontânea". Este termo foi inicialmente proposto por STOLL (1929) para designar o processo de defesa ocorrido em carneiros infectados com *Haemonchus contortus*. Posteriormente, TAFFS (1964) verificou que havia uma relação inversa entre o nível de anticorpos circulantes de suínos com a contagem fecal de ovos de *A. suum*, sugerindo também a participação da imunidade humoral neste processo.

A resposta imune celular foi também demonstrada por HUNTLEY et al. (1984) que concluíram que os mastócitos após prolongada ativação antigênica migravam para o epitélio da mucosa gástrica do abomaso de ovinos e sofriam alterações granulares, que foram conhecidos como leucócitos globulares. ASHRAF et al. (1998) sugeriram que mastócitos de mucosa em suínos infectados com A. *suum* reagiam com o antígeno do parasita e iniciavam eventos relacionados com a sua expulsão. Com relação aos eosinófilos, EVERSOLE et al. (1999) verificaram aumento dos mesmos na lâmina própria e no epitélio da mucosa intestinal na infecção por *N. brasiliensis* em camundongos, demonstrando a migração destas células da cripta para o vilo em direção à região intraepitelial, o que seria uma tentativa de ação citotóxica direta contra os

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

parasitas adultos no lúmen intestinal. Recentemente, NEVES (2001) reportou o aumento significativo do número de mastócitos e eosinófilos no duodeno e jejuno de bezerros búfalos naturalmente infectados com *T. vitulorum*, nas fases de ascensão e pico do parasitismo, mas declinando no período de expulsão do parasita pelo hospedeiro. Estes autores sugeriram a participação destas células no processo de expulsão do parasita.

Vários estudos sobre os aspectos imunológicos por infecções helmínticas vêem sendo desenvolvidos com fins de diagnóstico e de controle através da produção de vacinas. Dentre os trabalhos que versam sobre este assunto, maior ênfase vem sendo dada para *T. canis*, parasita de cães, devido a sua importância em saúde pública. No homem, os pacientes infectados com *T. canis* apresentam a síndrome da larva migrans visceral que é caracterizada por febre, eosinofilia periférica, hepatomegalia, pneumonia transitória, cegueira e transtornos cerebrais (BEAVER et al., 1952; OSHIMA, 1961; OLSON, 1961). Alguns autores já estudaram a possibilidade de se utilizar larvas infectantes irradiadas, como um meio de provocar a imunidade específica no hospedeiro e assim desenvolver métodos de vacinação (MILLER, 1971; BARRIGA & MYSER, 1987).

Já BARRIGA & CARRILO (1987) citado por BARRIGA (1991) produziram 76% de proteção contra a infecção em ratos pela vacinação com antígeno solúvel bruto de larvas de *T. canis*, indicando a possibilidade de controle pela vacinação. ABDO-SHEHADA et al. (1991) testaram o antígeno ES em camundongos experimentalmente infectados com *T. canis* para conhecer o grau de proteção contra estes parasitas. Verificaram que os camundongos vacinados apresentaram uma maior reação inflamatória na mucosa intestinal, dificultando a penetração da larva.

Com *T. vitulorum* AMERASINGHE et al. (1992) através de prévia imunização parenteral de camundongos com diferentes antígenos deste parasita (extrato larval, excretor/secretor, ou fluído perientérico e suas frações) de larvas infectantes ou de parasitas adultos obtiveram uma ótima proteção contra a reinfecção e a migração larval. Os antígenos mais efetivos na proteção imunogênica foram os do líquido perientérico (Pe) dos parasitas adultos (100% de proteção) e excretor/secretor (ES) de larvas infectantes de *T. vitulorum* (>92% de proteção).

A infecção por *T. vitulorum* também estimula uma resposta imune-humoral nos búfalos. Assim sendo, RAJAPAKSE et al. (1994b), verificaram altos níveis de anticorpos anti-ES de larvas infectantes e de adultos no soro de búfalas adultas e colostro dos seus respectivos bezerros naturalmente infectados. Quando o soro e

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

colostro destas búfalas foram injetados em camundongos e após desafiados com ovos infectantes, RAJAPAKSE et al. (1994a) verificaram uma redução na migração larval maior que 93,8%.

STARKE-BUZETTI et al. (2001) em pesquisa com bezerros búfalos, através do teste ELISA indireto, examinaram os níveis de anticorpos sorológicos anti-Ex das larvas de *T. vitulorum*. Os bezerros búfalos, no primeiro dia de vida antes de mamar o colostro, apresentavam níveis negativos de anticorpos, mas um dia após terem mamado, estes níveis encontravam-se muito elevados, indicando que a origem dos anticorpos foi do colostro. Do mesmo modo, SOUZA (2001) confirmou a resposta imune humoral sorológica em bezerros búfalos e búfalas no periparto, naturalmente infectados com *T. vitulorum*, contra os antígenos Pe de adulto, ES e Ex de larvas infectantes de *T. vitulorum*. FERREIRA (2002) fracionando estes mesmos antígenos pelo SDS-PAGE detectou e separou as bandas protéicas. As bandas protéicas foram em seguida reconhecidas por anticorpos anti-*T. vitulorum* dos soros e dos colostros das búfalas e dos soros dos bezerros búfalos infectados naturalmente com *T. vitulorum,* quando analisadas por Western blot.

Estes dados ressaltados na literatura, com relação à precocidade e prevalência desta infecção em búfalos, a patogenicidade do parasita e as dificuldades do controle por quimioterápicos atualmente presentes no mercado, além da constatação de que o sistema imunológico dos hospedeiros podem ser estimulados e capazes de armar uma resposta imune celular e humoral, estudos futuros para a detecção de moléculas alvos para quimioterapia ou/e o isolamento de antígenos antigênicos e imunogênicos, são necessários.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Local

A pesquisa foi executada na Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEP) da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - Universidade Estadual Paulista (UNESP- Ilha Solteira) situada à margem direita do Rio Paraná, no município de Selvíria, do Estado de Mato Grosso do Sul. A execução laboratorial foi realizada no Laboratório de Parasitologia/Imunologia do Departamento de Biologia e Zootecnia da UNESP-Ilha Solteira.

2. Animais

2.1. Camundongos

Foram utilizados 60 camundongos (*Mus musculus*) machos adultos da linhagem Rockefeller, adquiridos do Biotério Central do Câmpus de Botucatu-UNESP. Os camundongos foram alojados em gaiolas apropriadas e permaneceram em sala climatizada a 25° C, onde receberam água e ração à vontade.

2.2. Bezerros búfalos

Foram utilizados bezerros búfalos mestiços (Murrah x Mediterrâneo) com aproximadamente um a dois meses de idade, da Fazenda de Ensino e Pesquisa (FEP) da UNESP-Ilha Solteira, infectados naturalmente com *T. vitulorum*. O regime de criação foi extensivo e os animais mantidos em pastagem de capim braquiária (*Brachiaria decumbens*). Os bezerros foram utilizados como doadores de parasitas adultos para a obtenção dos ovos infectantes.



3. Obtenção dos ovos infectantes

Para a obtenção dos ovos infectantes, fêmeas adultas de *T. vitulorum* foram colhidas de bezerros búfalos, de um a dois meses de vida, naturalmente infectados. O parasitismo dos animais foi avaliado através de contagem de ovos por grama de fezes (OPG), usando-se câmaras de McMaster de acordo com a técnica de WHITLOCK (1948). Os animais positivos foram tratados com anti-helmíntico à base de Piperazina na dosagem de 100 a 150 mg/kg de peso vivo do animal. Em seguida ao tratamento anti-helmíntico, os parasitas adultos expelidos nas fezes dos animais, ou expelidos após a massagem retal foram colhidos, acondicionados em frascos contendo salina a 0,85% e levados ao laboratório.

Após a obtenção dos parasitas adultos, estes foram lavados várias vezes com detergente neutro e enxaguados com água destilada até que estivessem completamente livres de resíduos fecais. As fêmeas foram separadas e colocadas em placas de Petri, contendo solução salina fosfatada tamponada (PBS) efetuando-se a dissecação e a retirada dos úteros contendo os ovos.

Para a retirada do útero, foi feito um corte transversal na altura do esôfago do parasita. Com o auxílio de uma pinça, foi prensada a extremidade posterior e, com um estilete o corpo do parasita foi pressionado no sentido postero-anterior para ajudar na expulsão do seu conteúdo. Com o auxílio de uma pinça pequena, foi separado o intestino do útero. Após a retirada do útero, este foi transferido para outra placa de Petri de aproximadamente 8 cm de diâmetro, e perfurado para facilitar a liberação dos ovos.

Em seguida, a suspensão dos ovos permaneceu na placas de Petri contendo água destilada numa profundidade de 0,5 a 1,0 cm e foi deixada à temperatura ambiente (25°C), de acordo com a técnica de SMITH (1989) com algumas adaptações.

Diariamente as placas de Petri foram destampadas e agitadas por movimentos rotatórios para oxigenar a água. Após quatro dias, tempo em que os úteros já estavam deteriorados e, então, esse material foi passado em peneira com malha de náilon 0,2 mm de abertura. O material coado (ovos livres dos detritos) foi centrifugado cinco vezes a 1.000 rpm por um a dois minutos e em seguida foi deixado para incubar em temperatura ambiente, agitando-se todos os dias para manter a oxigenação. Foram acrescentadas a cada placa de Petri, 3 a 4 gotas de hipoclorito de sódio a 1%, para evitar a contaminação desse material por fungos. A segmentação dos ovos foi acompanhada por exames

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

diários ao microscópico óptico, até o desenvolvimento das larvas infectantes dentro dos ovos (25 a 30 dias).

4. Obtenção das larvas infectantes

Os ovos contendo a larva infectante de *T. vitulorum* foram colocados em tubos de centrífuga (15 ml) e ao sedimento foi acrescentado igual volume de solução de hipoclorito de sódio (5% de cloro) por 20 minutos. Em seguida, o material foi lavado oito vezes através da centrifugação em 2000 rpm por dois minutos. Com este processo o ovo perdeu a sua casca externa, permanecendo assim, a larva envolta pela membrana vitelina. A liberação dessas larvas da membrana vitelina foi realizada em banho-maria a 37°C e através de agitação manual ou oxigenação com auxílio de pipeta de Pasteur.

5. Obtenção dos antígenos

a) Antígeno do Líquido Perientérico de adultos (Pe)

O antígeno Pe foi obtido seguindo-se a técnica de AMERASINGHE et al. (1992) com algumas adaptações. A partir de fêmeas e machos adultos de *T. vitulorum*, através de punções com auxílio de agulhas hipodérmicas na extremidade posterior dos parasitas, foi coletado o líquido perientérico. Em seguida, o líquido foi centrifugado a 2.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante (Pe) foi filtrado em membranas de 0,2 µm (Gelman Sciences®) e adicionado inibidor de proteases (AEBSF, E-64, bestatina, leupeptina, aprotinina e EDTA de sódio) na proporção de 01 ml de inibidor para cada 10 ml do Pe. Aliquotizado em tubos de Eppendorf com 500 µl cada e estocados a -70°C.

b) Extrato solúvel bruto de larvas infectantes (Ex)

Este antígeno foi processado segundo o método de STARKE-BUZETTI et al. (2001). As larvas infectantes de *T. vitulorum* foram ultra-sonicadas, com auxílio do aparelho ultra-sônico (Vir Sonic 1001, Virtis®), em média de três ciclos (monitorado em microscópio óptico), com potência de 10 watts e pulsações contínuas. Entre cada ciclo, a ponteira do aparelho foi mantida em solução de PBS gelada e o recipiente contendo as



larvas em manipulação foi deixado imerso em água contendo gelo triturado. Neste material sonicado foi adicionado um inibidor de protease na proporção de 1 ml do inibidor/10 ml de solução de antígeno. Esta suspensão foi deixada a 4°C por uma noite e posteriormente centrifugado, por duas vezes seguidas: a primeira a 3000 rpm por 10 minutos e a segunda por 16000 rpm por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 10°C. O sobrenadante obtido foi filtrado em membranas de 0,2 μm (Gelman Sciences®) e aliquotizados (500 μl) em tubos de Eppendorf, onde as amostras foram concentradas com auxílio de um concentrador a vácuo (Vacufuge Concentrator 5301, Eppendorf®) e estocadas a -70°C.

c) Antígeno excretor-secretor (ES)

O antígeno ES foi obtido pela cultura das larvas infectantes (10.000/ml) em meio de cultura, como descrito por RAJAPAKSE et al. (1992), contendo: 10 ml de RPMI-1640 (Sigma R-4130); 1% de glicose; 0,85% de $NaHCO_3$; Solução antibiótico/antimicótico (Sigma, A-5955) contendo 5.000 UI de penicilina, 5 mg de estreptomicina e 10 μg anfotericina B.

O meio foi corrigido para pH neutro e filtrado com membranas de 0,2 μm de porosidade (Gelman Sciences®). O meio de cultura permaneceu a 37°C em estufa (CO_2 Incubator, Sanyo®) com injeção de 5% CO_2, por uma semana, segundo RAJAPAKSE et al. (1992). Semanalmente, foi recolhido o sobrenadante da suspensão larval em cultura, realizando centrifugação a 2.000 rpm por cinco minutos.

O sobrenadante obtido foi filtrado em membranas de 0,2 μm (Gelman Sciences®) e foi adicionado ao líquido o inibidor de protease, na proporção de 1 ml inibidor/10 ml de solução de antígeno.

Em seguida foi realizada uma diálise do líquido coletado com membrana apropriada (DispoDialyzers, MWco:25.000, Spectrum Labs). A diálise foi realizada por 24 horas a 4°C, em béquer contendo dois litros de PBS a 0,01 M e pH 7,4 sob agitação constante, com auxílio de um agitador magnético (Agitador Magnético TE-085, Tecnal®) a 10 rpm. Após 24 horas, as amostras foram aliquotizadas e concentradas em centrífuga a vácuo em tubos de Eppendorf (500 μl cada) e estocadas a -70°C.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

5.1. Quantificação da proteína dos antígenos

A concentração protéica dos antígenos foi determinada pelo método de HARTREE (1972). A leitura foi realizada em absorbância (650 nm) com espectrofotômetro (CE 2041 200-Series - Cecil®).

6. Imunização dos camundongos

A imunização dos camundongos foi realizada utilizando-se os antígenos Pe, Ex ou ES na quantidade de 20 µg de proteina. Estes antígenos foram homogeneizados em adjuvante de Freund completo e incompleto. Desta suspensão protéica, 200µl foram inoculados por três vezes, intra-peritonealmente em cada animal, segundo o esquema mostrado na Tabela 2.

TABELA 2 - Esquema de imunização de camundongos com os antígenos Pe, Ex e ES.

Grupo	Antígenos	Número de animais	Períodos		
			1° Semana	2° Semana	4° Semana
1	Pe	18	Adjuvante Completo de Freund	Adjuvante Incompleto de Freund	Adjuvante Incompleto de Freund
2	Ex	18	Adjuvante Completo de Freund	Adjuvante Incompleto de Freund	Adjuvante Incompleto de Freund
3	ES	18	Adjuvante Completo de Freund	Adjuvante Incompleto de Freund	Adjuvante Incompleto de Freund
4	Controle	18	-	-	-

7. Infecção experimental dos camundongos

Uma semana após a última imunização, todos os camundongos que permaneceram separados em gaiolas quando imunizados (3 gaiolas com 15 camundongos cada uma) e os não imunizados (uma gaiola com 15 animais) foram desafiados através da infecção experimental com ovos infectantes de *T. vitulorum*. A dose única de 2500 ovos/animal

suspendidos em 1000µl de PBS foi administrada oralmente, utilizando-se uma seringa de insulina graduada adaptada a uma cânula esofágica. Logo após a infecção experimental, as fezes dos camundongos foram colhidas de cada gaiola, as quais estavam livres da cama dentro de um período de oito horas, a cada duas horas e totalizando quatro colheitas. Para o grupo de camundongos necropsiados sete horas após o desafio, a colheita das fezes foi realizada apenas durante este período, dessa forma, com uma hora a menos de colheita. O exame coprológico foi realizado através da homogeneização de todas as fezes presentes nas gaiolas de cada grupo de animais com água de torneira e coadas em gaze com auxilio de uma peneira. Em seguida, as fezes foram centrifugadas (2000 rpm). Deste material centrifugado, descartou-se parte do sobrenadante, deixando-se apenas 5 ml de sedimento em cada tubo. Após a homogeneização tomou-se uma alíquota de 10% deste sedimento fecal de cada tubo, que foi observada entre lâmina e lamínula em microscópio óptico para a quantificação dos ovos e das larvas.

8. Necrópsia dos camundongos

Após o desafio com ovos infectantes, foi observada a ocorrência de migração larval através dos tecidos e dos órgãos dos camundongos infectados. Essa observação foi realizada através de exame pós-mortem, por meio de necrópsia desses animais. As necrópsias foram realizadas em três etapas: sete horas, quatro dias e 30 dias após o desafio.

Os camundongos foram anestesiados, sacrificados e os tecidos colhidos.

A incisão para retirada dos órgãos foi realizada na região ventral dos animais para abertura das cavidades abdominal e torácica. Os órgãos exteriorizados foram os intestinos delgado e grosso, fígado, pulmão, coração e músculos (diafragma, língua e quadríceps femoral). Após, foi realizada nova incisão na região cranial para remoção do cérebro.

Os órgãos foram imediatamente colocados, individualmente, em tubos de vidro contendo pepsina ácida em banho-maria onde foram digeridos.

Para cada grupo de camundongos necropsiados no período de sete horas, quatro ou 30 dias após a infecção experimental, cinco animais foram destinados à digestão péptica e um destinado ao estudo histológico, não sofrendo digestão péptica, onde os órgãos foram fixados em fixador Bouin.

unesp

9. Digestão das amostras de tecido para observação de larvas

As amostras de tecidos foram mantidas em uma solução de pepsina ácida para a digestão péptica, em 0,7% de pepsina e 0,7% de HCl, em banho-maria por seis horas à 37°C e com agitação constante. O digerido total de cada órgão foi passado totalmente por uma peneira e centrifugado três vezes a 2000 rpm por cinco minutos, quando obteve-se o sobrenadante límpido. 10% do total do sedimento de cada tecido foi examinado em microscópio óptico. A quantificação das larvas presentes nesta alíquota foi realizada e o total foi multiplicado por 10.

A porcentagem de inibição larval foi calculada em relação à quantidade de larvas recuperadas do fígado dos camundongos necropsiados quatro dias pós-infecção, utilizando-se a seguinte formula segundo AMERASINGHE et al. (1992).

$$\frac{\text{N°de larvas nos animais controle - N° de larvas nos animais imunizados}}{\text{N° de larvas nos animais controle}} \times 100$$

10. Histologia

Para o estudo histológico, as amostras de tecido foram mantidas no fixador Bouin por 12 horas, e em seguida, transferidas para frascos contendo álcool etílico a 70% após prévio enxágüe 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.

Os órgãos emblocados em parafina foram seccionados em micrótomo (5 μm) e montados em lâmina de vidro através da técnica histológica padrão.

10.1. Coloração das amostras de tecidos

As secções teciduais foram montadas em lâminas de vidro, hidratadas através de passagens sucessivas por xilol e etanol 100%, 95%, 90%, 75%, 70% e, em seguida coradas por hematoxilina e eosina (HE). Foi utilizada também, a técnica de DUFFY et al. (1993) para corar mastócitos e eosinófilos com os corantes Azul de Astra e "New

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Red" respectivamente.

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

As lâminas contendo os tecidos foram fotografadas em um Microscópio ótico Olympus Bx 60 pertencente ao Departamento de Veterinária da FCAV-UNESP de Jaboticabal.

10.2. Contagem de células

A quantificação de mastócitos e eosinófilos foi realizada na mucosa para cada unidade de vilo-cripta (UVC), na submucosa e muscular do intestino grosso do grupo não imunizado e dos grupos imunizados com os antígenos Pe e Ex. Foram observadas um total de 40 UVCs (4 lâminas) para cada segmento intestinal. Estas contagens foram realizadas em campos microscópicos escolhidos ao acaso.

11. Delineamento experimental

Este experimento foi conduzido com quatro grupos de cinco animais/grupo, conforme representado na Tabela 3:

- **Tratamento 1:** representado por camundongos imunizados com o antígeno Pe e desafiados com ovos infectantes de *T. vitulorum.*
- **Tratamento 2:** representado por camundongos imunizados com o antígeno Ex de larvas infectantes e desafiados com ovos infectantes de *T. vitulorum.*
- **Tratamento 3:** representado por camundongos imunizados com o antígeno ES de larvas infectantes e desafiados com ovos infectantes de *T. vitulorum.*
- **Tratamento 4:** representado por camundongos não imunizados mas desafiados com ovos infectantes de *T. vitulorum.*

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

TABELA 3 - Número de camundongos necropsiados às sete horas, aos quatro dias e aos 30 dias após a infecção experimental com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum*.

Número de camundongos necropsiados				
Grupos		**Período pós-infecção**		
		7 h	4 d	30 d
1	Imunizados com Pe e infectados	6	6	6
2	Imunizados com Ex e infectados	6	6	6
3	Imunizados com ES e infectados	6	6	6
4	* Controle	6	6	6
Total		24	24	24

* Grupo controle - camundongos que não foram imunizados, porém infectados.

12. Análise Estatística

Esse experimento foi analisado segundo o esquema fatorial 4x3, em um delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições.

A comparação de médias de larvas contadas no material digerido (tecidos de camundongos), foi realizada pelo teste de Tukey.

RESULTADOS

1. Exames de fezes

1.1. Grupo de animais imunizados com o antígeno Pe comparado com o grupo de animais não imunizados (controle).

Após a imunização dos camundongos com antígeno Pe de *T. vitulorum* adulto, estes animais foram desafiados com ovos infectantes deste parasita. Após o desafio todas as fezes foram colhidas em um período de oito horas, a cada duas horas, totalizando quatro colheitas e todos os ovos e larvas foram então quantificados neste material. Desta forma, nas primeiras duas horas após o desafio, estes dois grupos de animais apresentaram-se com ausência de larvas e ovos nas fezes. No entanto, no período subseqüente, ou seja, quatro horas após o desafio uma grande quantidade (90 larvas e 50 ovos) pode ser observada nas fezes dos animais imunizados, mas apenas 10 larvas e nenhum ovo nos não imunizados. Após seis horas, os animais desafiados e imunizados apresentavam nas fezes 80 larvas e nenhum ovo e os não imunizados 60 larvas e 10 ovos. O pico máximo de expulsão foi registrado com oito horas após o desafio do grupo de animais imunizados (120 larvas e nenhum ovo) indicando uma quantidade crescente de parasitas sendo expulsos pelas fezes, mas o grupo controle continuou eliminando apenas 70 parasitas. Em síntese, o grupo de animais imunizados com antígeno Pe demonstrou uma capacidade levemente superior de expulsão de larvas e ovos pelas fezes refletindo em uma maior dificuldade de penetração das larvas na mucosa do intestino. Estes dados podem ser observados na Tabela 4 e Figura 1.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

TABELA 4 - Contagem total de larvas e ovos de *Toxocara vitulorum* nas fezes para cada grupo de cinco camundongos desafiados com ovos infectantes deste parasita (2500 ovos/animal).

Número total de ovos e larvas de *Toxocara vitulorum* eliminados nas fezes								
Horas após o desafio	**Controle**		**Antígeno Pe**		**Antígeno Ex**		**Antígeno ES**	
	Larvas + Ovos		Larvas + Ovos		Larvas + Ovos		Larvas + Ovos	
0-2 horas	0	0	0	0	0	10	0	10
2-4 horas	10	0	40	50	50	30	10	20
4-6 horas	60	10	80	0	10	0	30	0
6-7 horas	60	10	120	0	0	0	0	10
Total	130	20	240	50	60	40	40	40
Total (larvas e ovos)	150		290		100		80	
Média *	30		58		20		16	
% **	1,2%		2,32%		0,8%		0,64%	

Número de animais = 5
*** Média de parasitas por animal (ovos +larvas)**
**** Porcentagem de eliminação de larvas+ovos por animal**

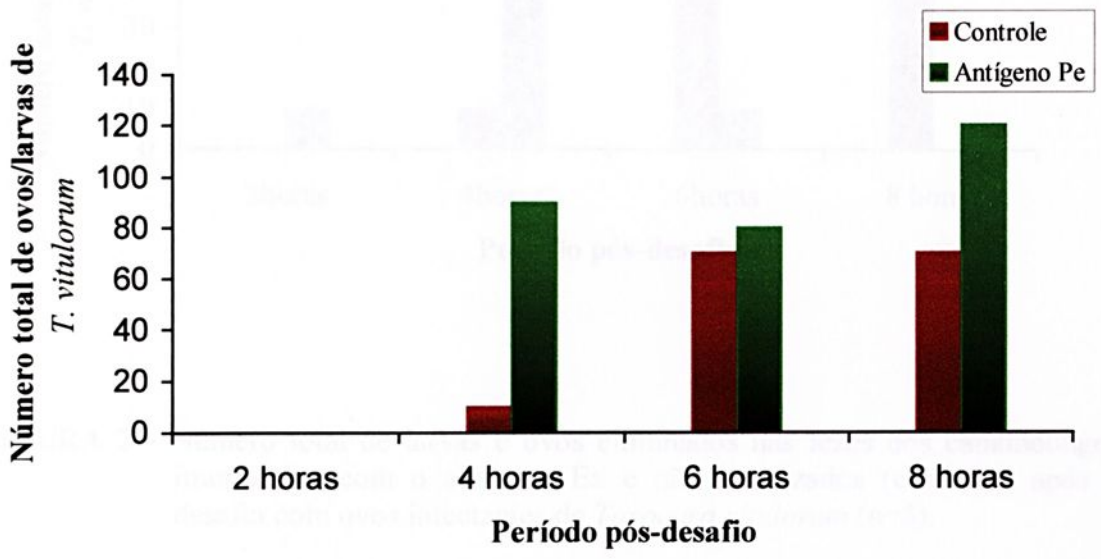


FIGURA 1 - Número total de larvas e ovos eliminados nas fezes dos camundongos imunizados com o antígeno Pe e não imunizados (controle), após o desafio com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum* (n=5).

1.2. Grupo de animais imunizados com o antígeno Ex comparado com o grupo de animais não imunizados (controle).

Neste grupo de animais, duas horas após o desafio, mesmo que em pequena quantidade, detectou-se 10 ovos e nenhuma larva nas fezes dos animais imunizados. No período de quatro horas após o desafio, ocorreu o pico máximo de expulsão no grupo imunizado, com o total de 50 larvas e 30 ovos. Já o grupo controle permaneceu ao nível de 10 parasitas. No entanto, seis horas após, este número decresceu rapidamente no grupo de animais imunizados, e apenas 10 larvas foram contadas. Porém, nos animais do grupo controle a eliminação permaneceu constante (10 ovos e 60 larvas) até o final da colheita das fezes, sugerindo que poderia haver mais larvas a serem eliminadas em horas subseqüentes. Estes dados podem ser observados na Tabela 4 e Figura 2.

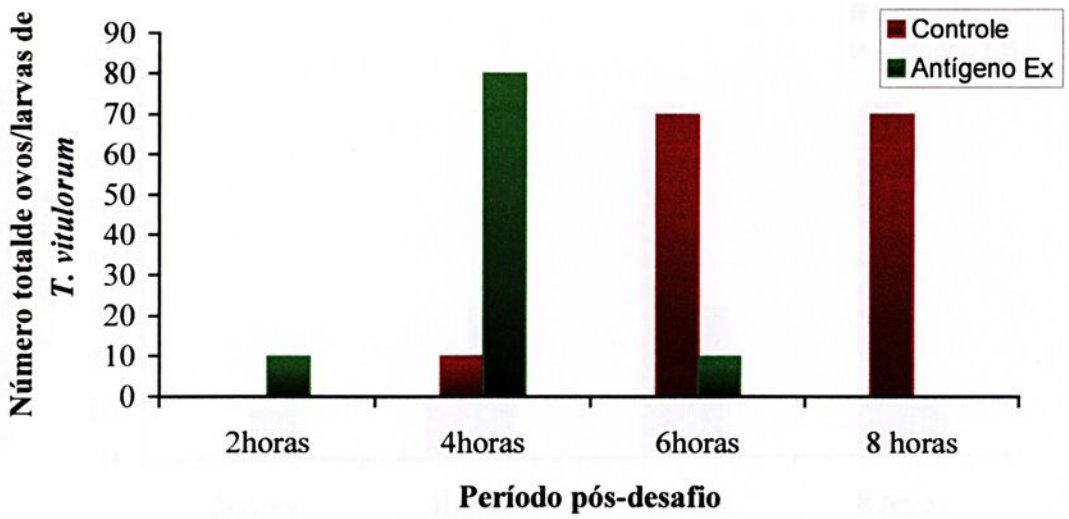


FIGURA 2 - Número total de larvas e ovos eliminados nas fezes dos camundongos imunizados com o antígeno Ex e não imunizados (controle), após o desafio com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum* (n=5).

BCpIS - FEIS - UNESP

1.3. Grupo de animais imunizados com o antígeno ES comparado com o grupo de animais não imunizados (controle).

Durante as primeiras duas horas após o desafio, o grupo dos animais imunizados apresentaram-se 10 ovos e nenhuma larva nas fezes, enquanto no grupo controle nenhuma larva ou ovo foi registrado. Entre quatro e seis horas houve, um aumento progressivo de 10 para 70 parasitas respectivamente, no grupo dos animais controle, enquanto no grupo imunizado o número de larvas e ovos permaneceu constante, ou seja, somente 30 larvas e nenhum ovo. No último período, oito horas após o desafio, a eliminação de larvas e de ovos no grupo controle permaneceu o mesmo (70), mas no grupo imunizado observou-se declínio acentuado na expulsão de larvas e de ovos. Estes dados podem ser observados na Tabela 4 e Figura 3.

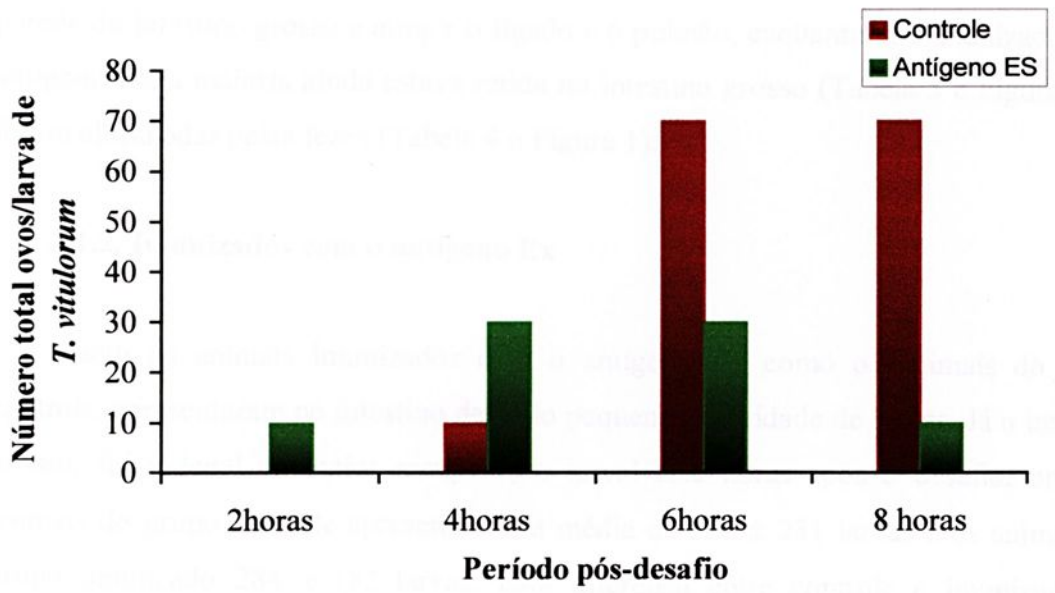


FIGURA 3 - Número total de larvas e ovos eliminados nas fezes dos camundongos imunizados com antígeno ES e não imunizados (controle), após o desafio com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum* (n=5).

2. Larvas de *T.vitulorum* recuperadas nos tecidos de camundongos imunizados e não imunizados (controle)

2.1. Sete horas após o desafio:

2.1.1. Imunizados com o antígeno Pe

Sete horas após o desafio, a maior concentração de larvas de *T. vitulorum* foi observada no intestino grosso dos animais não imunizados, com 526 ± 231 (média±desvio padrão). Neste órgão, este número foi significativamente inferior no grupo imunizado (246 ± 46,7) em relação ao grupo não imunizado. No intestino delgado por outro lado, apenas um pequeno número de larvas foi recuperado, tanto no grupo de animais imunizados (16 ± 35,8) como, nos não imunizados (10 ± 10). Nos demais órgãos como o fígado e o pulmão, as larvas foram recuperadas somente nos animais do grupo controle. Este resultado demonstrou que nos animais do grupo controle as larvas conseguiram mais rapidamente, em um período de apenas sete horas, atravessar a parede do intestino grosso e atingir o fígado e o pulmão, enquanto nos imunizados com antígeno Pe, a maioria ainda estava retida no intestino grosso (Tabela 5 e Figura 4) ou foram eliminadas pelas fezes (Tabela 4 e Figura 1).

2.1.2. Imunizados com o antígeno Ex

Tanto os animais imunizados com o antígeno Ex como os animais do grupo controle, apresentaram no intestino delgado pequena quantidade de larvas. Já o intestino grosso, foi o local de maior recuperação larval sete horas após o desafio, onde os animais do grupo controle apresentaram a média de 526 ± 231 larvas e os animais do grupo imunizado 284 ± 182 larvas. Esta diferença entre controle e imunizado foi significativa. Por outro lado, no fígado dos animais controle observou-se uma média de 4 ± 5,5 larvas e nos imunizados nenhuma larva. Já no pulmão dos animais não imunizados, encontrou-se em média, apenas 6 ± 13,4 larvas e nos imunizados, 8 ± 13 larvas. Nos demais tecidos nenhuma larva foi localizada (Tabela 5 e Figura 4).



2.1.3. Imunizados com o antígeno ES

Mais uma vez, nota-se que o intestino grosso dos animais controle, foi o local onde o maior número de larvas foi recuperado, sendo condizente com resultados anteriores obtidos para o antígeno Ex e Pe. No entanto, neste grupo, os animais imunizados com o antígeno ES apresentaram número inferior de larvas (44 ± 30,5) no intestino grosso do que nos animais não imunizados (526 ± 231). O número de larvas do grupo imunizado foi significantemente 11 vezes inferior ao número de larvas do grupo controle. Em seguida, o intestino delgado também foi o local onde detectou-se larvas, porém em número bem inferior ao do intestino grosso. Nos demais tecidos nenhuma larva foi observada (Tabela 5 e Figura 4).

unesp

TABELA 5 – Número médio e desvio padrão (DP) de larvas de *Toxocara vitulorum* nos tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES, Pe) e os não imunizados (controle) nos diferentes períodos após o desafio com ovos infectantes deste parasita. (Ilha Solteira, SP, 2002).

Período Pós-desafio	Tratamento	Número de larvas de *Toxocara vitulorum* nos tecidos						
		Número Médio e Desvio Padrão						
		ID	IG	FÍGADO	CORAÇÃO	PULMÃO	CÉREBRO	MÚSCULO
7 HORAS	CONTROLE	10±10	526±231	4± 5,5	0	6±13,4	0	0
	EX	16±16,7	284±182	0	0	8±13	0	0
	ES	4±8,9	44±30,5	0	0	0	0	0
	PE	16±35,8	246±46,7	0	0	0	0	0
4 DIAS	CONTROLE	0	4±8,9	134±77	0	20±7,1	2±4,5	6±8,94
	EX	2±4,5	0	18±34,9	0	8±13	0	0
	ES	0	0	56±59,4	0	20±7,1	0	0
	PE	0	0	28±22,8	0	6±8,94	2±4,5	0
30 DIAS	CONTROLE	0	0	0	0	0	2±4,5	4±5,84
	EX	0	0	0	0	0	0	0
	ES	0	0	0	0	0	0	2±4,5
	PE	0	0	0	0	2±4,5	0	2±4,5

ID = intestino delgado ; IG = intestino grosso

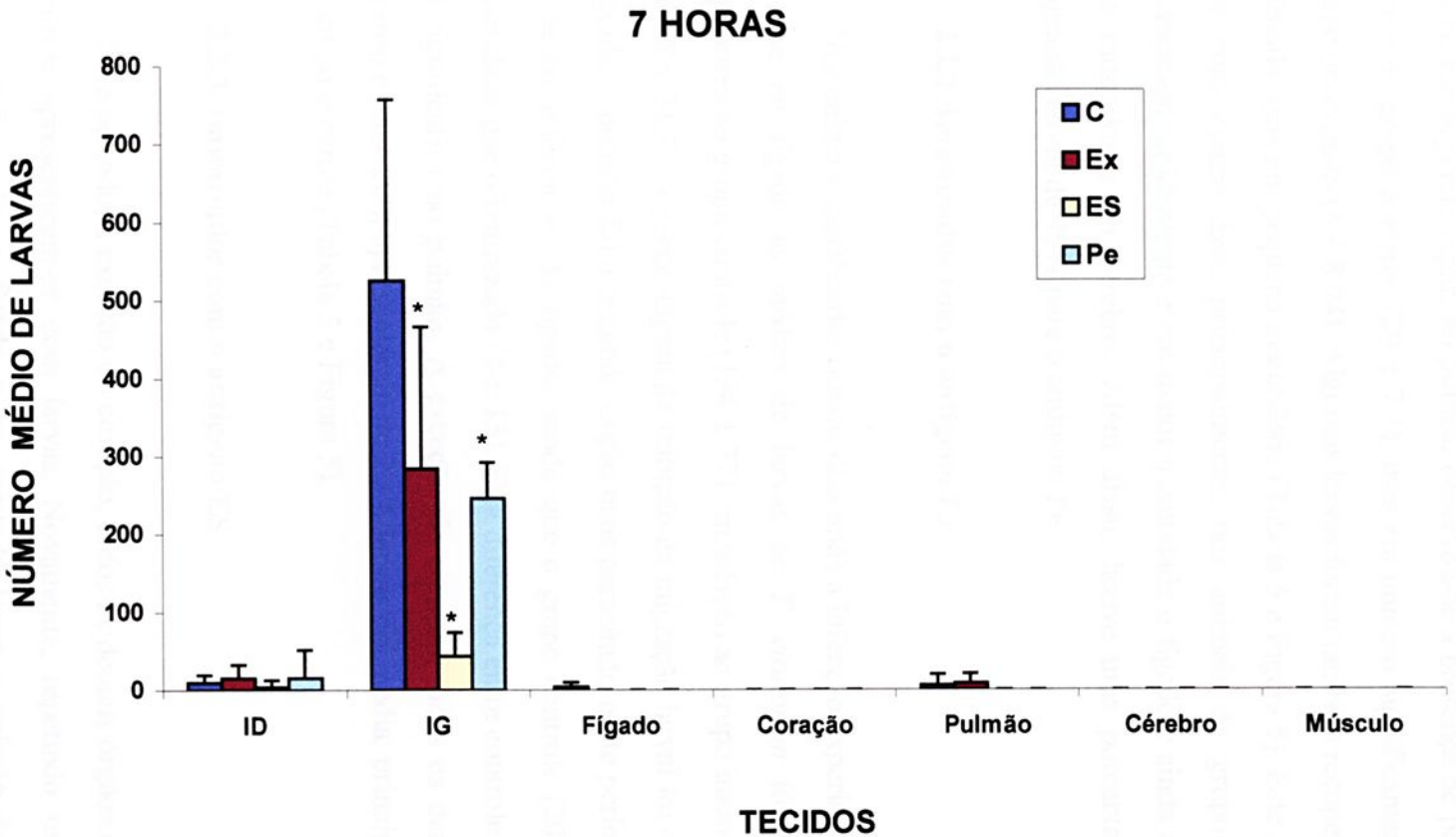


FIGURA 4 - Número médias de larvas *de Toxocara vitulorum* nos tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES, Pe) e os não imunizados (controle), no período do 7 horas após o desafio.
* Significativo a 5% de probabilidade em relação ao controle.

2.2. Quatro dias após o desafio:

2.2.1. Imunizados com o antígeno Pe

No quarto dia após o desafio, houve uma diminuição no número de larvas no intestino grosso, mas por outro lado, houve um aumento no fígado, mas significativamente inferior no grupo imunizado (28 ± 22,8) em relação ao controle (134 ± 77). Em segundo lugar, no pulmão observou-se a presença de pequena quantidade de larvas no grupo controle (20 ± 7,1), mas em número significantemente superior ao do grupo imunizado (6 ± 8,94). Algumas larvas foram também recuperadas no cérebro e no músculo, mas em pequena quantidade (Tabela 5 e Figura 5). Este resultado demonstrou que com quatro dias, principalmente, nos animais do grupo controle, as larvas alcançaram rapidamente e em maior quantidade o fígado e ainda conseguiram penetrar nos músculos e no cérebro. Além disso, houve uma porcentagem de inibição da migração larval de 79% para o antígeno Pe.

2.2.2. Imunizados com o antígeno Ex

Nos animais sacrificados quatro dias após a infecção experimental (desafio), notou-se que no fígado as médias de larvas de *T. vitulorum* foram significativamente superiores no grupo controle (134 ± 77) em relação ao grupo imunizado com o antígeno Ex (18 ± 34,9). A porcentagem de inibição da migração larval foi em torno de 86%. Em seguida, o pulmão foi o segundo órgão mais parasitado neste período, mas com número de larvas inferior ao do fígado, sendo que o grupo controle (20 ± 7,1) reteve maior quantidade que o imunizado (8 ± 13). Esta diferença entre controle e imunizado também foi significativa no pulmão. À exceção do coração, todos os demais órgãos (ID, IG, cérebro e músculo), apresentaram de 2 a 6 larvas em média, principalmente nos animais do grupo controle (Tabela 5 e Figura 5).

2.2.3. Imunizados com o antígeno ES

Neste período, à exceção do coração, todos os demais órgãos dos animais do grupo controle apresentaram-se com larvas. Novamente, repetindo os resultados com os antígenos Ex e Pe, o fígado e em segundo lugar o pulmão dos animais do grupo

unesp

controle, encontravam-se com o maior número de larvas. A porcentagem de inibição da migração larval no fígado foi de 58% com este antígeno. Já no cérebro e no músculo as larvas foram evidenciadas somente nos animais controle, mas não nos imunizados (Tabela 5 e Figura 5).

Porém, os números de larvas nos animais imunizados com o antígeno ES (56 ± 59,4 e 20 ± 7,1, respectivamente, para o fígado e o pulmão) foram bem superiores aos dos grupos Ex e Pe.

Em relação ao fígado, não houve diferença significativa na contagem de larvas entre os três antígenos, embora somente o grupo ES não diferiu estatisticamente do controle. Já no pulmão não houve diferença significativa entre os antígenos Ex e ES e entre Ex e Pe, porém houve diferença significativa entre as contagens de larvas oriundas da imunização pelos antígenos ES e Pe e entre o antígeno Pe e o controle.

unesp

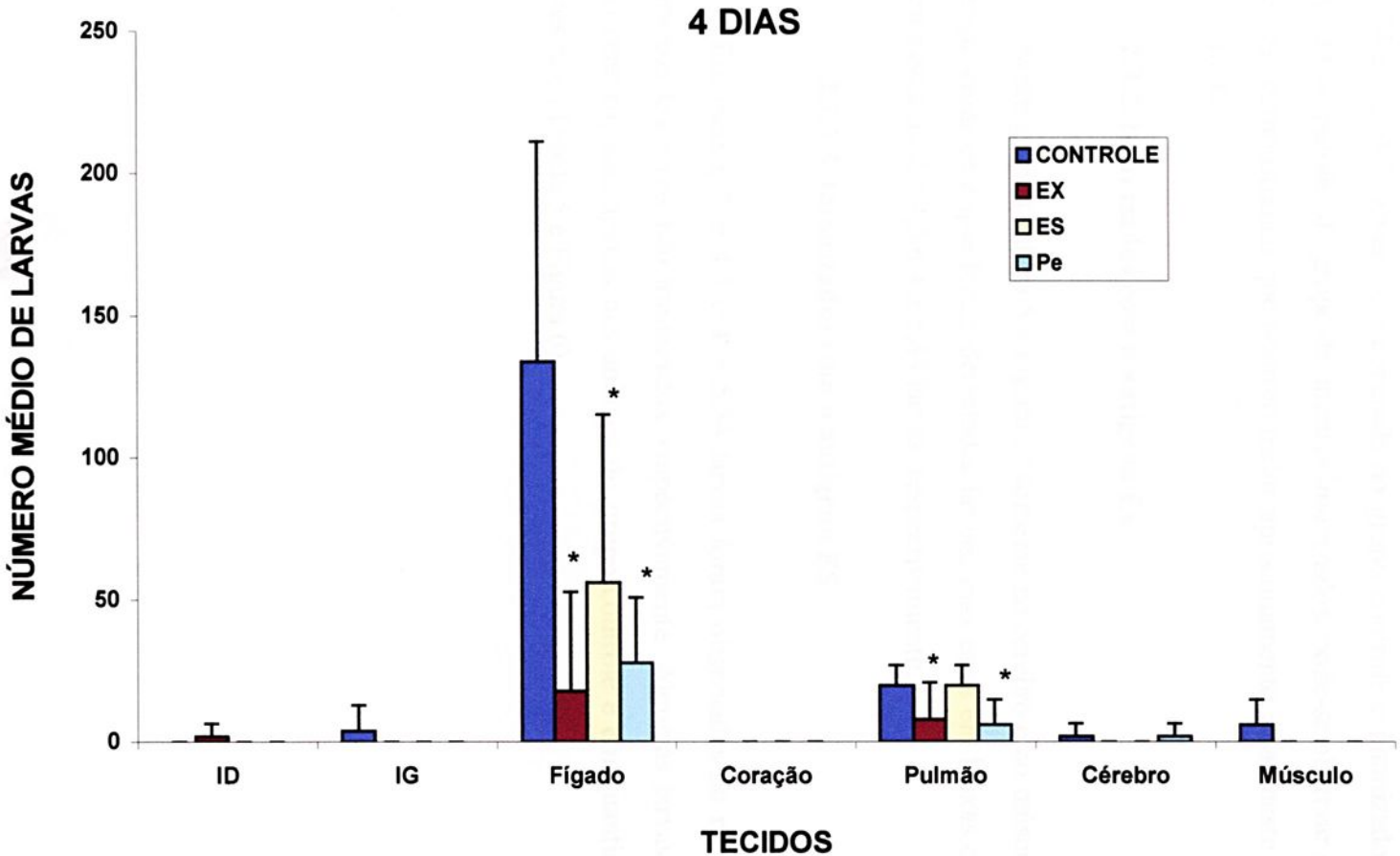


FIGURA 5 - Número médias de larvas *de Toxocara vitulorum* nos tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES, Pe) e os não imunizados (controle) no período do 4 dias após o desafio.
* Significativo a 5% de probabilidade em relação ao controle.

2.3. Trinta dias após o desafio:

2.3.1. Imunizados com o antígeno Pe

Neste período somente um número muito baixo de larvas foi recuperado no cérebro (2 ± 4,5) dos animais não imunizados. No músculo por outro lado, uma média de 4 ± 5,84 e 2 ± 4,5 larvas foi recuperada no grupo controle e imunizado, respectivamente. Ainda no pulmão do grupo de animais imunizados, pode-se observar a média de 2 ± 4,5 larvas, demonstrando que ocorreu maior aprisionamento delas neste órgão (Tabela 5 e Figura 4).

2.3.2. Imunizados com o antígeno Ex

Neste grupo (Tabela 5 e Figura 5) somente no cérebro e no músculo dos animais do grupo controle é que foram detectadas larvas, mas estas em baixas contagens, ou seja, em média de 2 ± 4,5 e 4 ± 5,84 larvas, respectivamente.

2.1.3.3. Imunizados com o antígeno ES

Em média, 2 ± 4,5 e 4 ± 5,84 larvas foram observadas no músculo dos animais imunizados e nos não imunizados, respectivamente. Algumas larvas foram detectadas no cérebro, mas apenas nos animais do grupo controle e em quantidade inferior à do músculo (Tabela 5 e Figura 6).

BCpIS - FEIS - UNESP



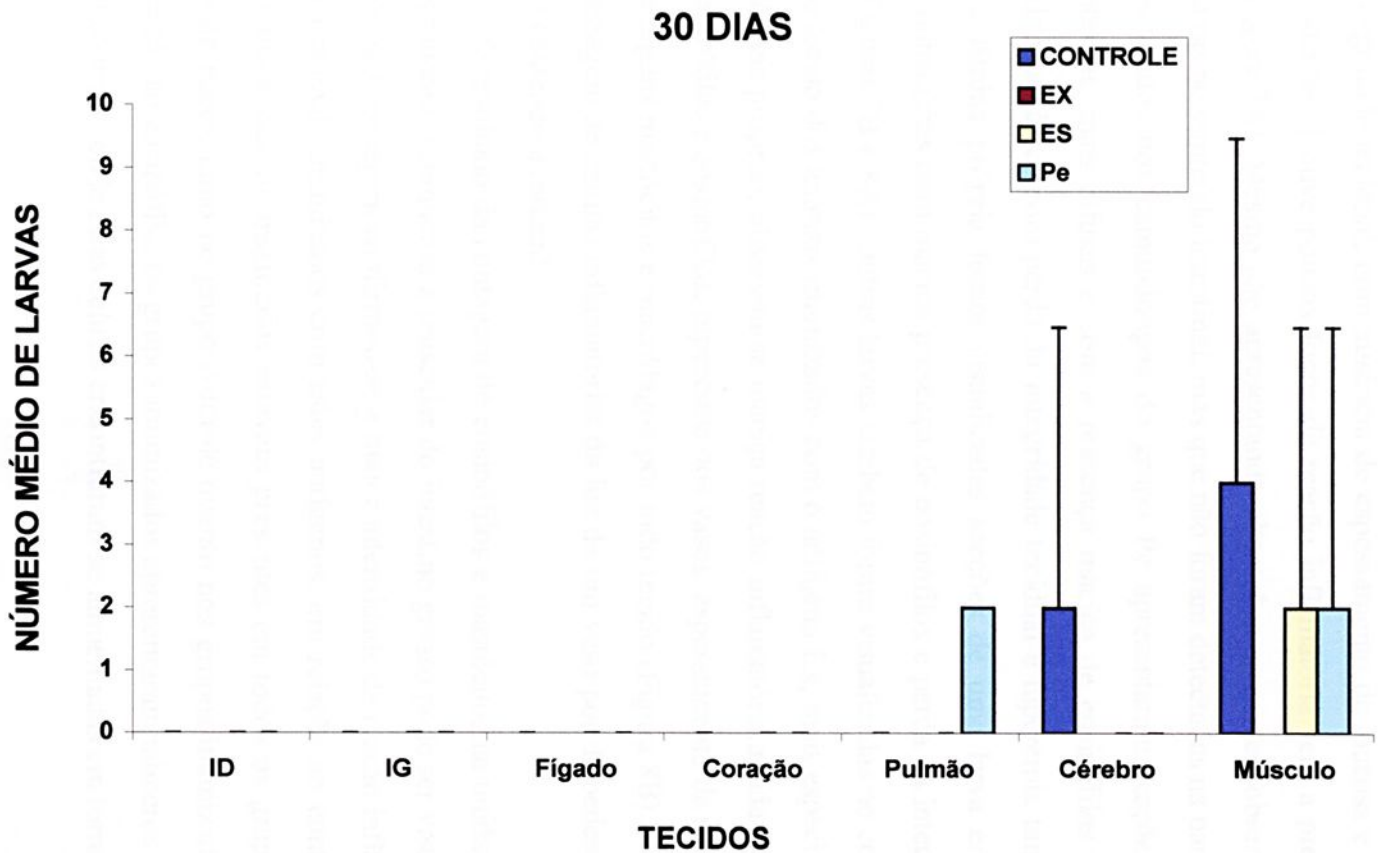


FIGURA 6 - Número médias de larvas *de Toxocara vitulorum* nos tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES, Pe) e os não imunizados (controle) no período do 30 dias após o desafio.

3. Histopatologia

3.3. Intestino grosso dos camundongos imunizados e não imunizados (controle) necropsiados sete horas após o desafio

O intestino grosso do grupo de camundongos não imunizados apresentou integridade tecidual, com ausência de espessamento de mucosa e alterações vasculares evidentes. Houve poucos focos de reação inflamatória sem a presença de eosinófilos (Figura 7A). Mesmo não apresentando alterações aparentes, observou-se a presença de larvas no conteúdo intestinal, mas que não foram detectadas na parede intestinal. Porém os tecidos dos camundongos do grupo Pe apresentaram reações inflamatórias mais intensas, mais difusas e com a presença maciça de eosinófilos e alguns mastócitos. Algumas áreas com perda da integridade tecidual e hiperemia também foram notadas. Na lâmina própria foram visualizadas secções de uma larva envolvida por reações inflamatórias com maciça presença de eosinófilos e perda da integridade tecidual local (Figuras 7B e 8A). Outras larvas também foram visualizadas no conteúdo intestinal. Já, no tecido dos animais imunizados com o antígeno Ex, mais especificamente na mucosa (lâmina própria), observou-se maciça reação inflamatória aguda com predominância de neutrófilos e eosinófilos, hiperemia dos vasos, espessamento da submucosa e a presença de alguns mastócitos e macrófagos por todo tecido (Figura 8B). Foi observado ainda, a passagem de células inflamatórias da luz de um vaso por diapedese e secções de larvas no conteúdo intestinal.

O resultado da contagem de eosinófilos e mastócitos na unidade cripta-vilo (UCV) da mucosa, submucosa e muscular do intestino grosso pode ser visualizado na Tabela 6. Por esta contagem confirmou-se a maior intensidade da reação inflamatória no intestino dos animais imunizados com estes antígenos, em relação ao controle não imunizado. Notou-se que os mastócitos estavam presentes em todos os grupos, mas em número muito baixo, tanto no grupo controle quanto nos grupos imunizados. No entanto, com relação ao eosinófilo, os grupos imunizados apresentaram números muito superiores aos do controle, onde estas células encontraram-se aumentadas em torno de 15 vezes.



TABELA 6 - Número de células mastócitos e eosinófilos no intestino grosso de camundongos dos grupos controle e imunizados com os antígenos Pe e Ex.

Grupo Intestino Grosso	Total	Média	DP
Controle			
Mastócitos	16	4,0	8,4
Eosinófilos	10	2,5	5,3
Pe			
Mastócitos	13	3,2	6,8
Eosinófilos	152	38,0	80,6
Ex			
Mastócitos	14	3,5	7,4
Eosinófilos	159	39,7	84,3

DP= desvio padrão

3.1. Fígado dos camundongos imunizados e não imunizados (controle) necropsiados quatro dias após o desafio.

O grupo de camundongos não imunizados apresentou intensa vacuolização dos hepatócitos, decorrente da anóxia tecidual devido possivelmente à insuficiência respiratória ou circulatória ou ainda devido às toxinas liberadas pelas larvas no tecido hepático. Observou-se também manguitos (células inflamatória ao redor de vasos) e alguns focos inflamatórios com pequena quantidade de células polimorfonucleares e mononucleares. Houve ausência de mastócitos, mas houve intensa ruptura do tecido hepático (Figuras 9A e B; 10A).

Nos grupos de animais imunizados com os antígenos Pe e ES, por outro lado, observou-se alterações teciduais com a presença de focos inflamatórios maiores e mais difusos do que o grupo controle. Ocorreu também intensa quantidade de manguitos, os quais apresentaram células monocleares (células de kupffer e linfócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos) com predominância de eosinófilos (Figuras 11A e B; 12A). Houve também vacuolização dos hepatócitos e rupturas do tecido, mas em menor intensidade que o grupo controle. Já no grupo imunizado com antígeno Ex observou-se a presença menos intensa de manguitos, dos focos inflamatórios e da vacuolização (degeneração vacuolar), que a dos demais grupos

unesp

imunizados, porém a ruptura tecidual foi tão intensa quanto à do grupo controle. Secções de uma larva foi localizada dentro de uma ruptura hepática no grupo Pe (Figura 10B). Provavelmente, as demais lesões e as reações inflamatórias ocorridas no tecido foram devido à passagem das larvas por estes tecidos.

3.2. Pulmão dos camundongos imunizados e não imunizados (controle) necropsiados quatro dias após o desafio.

Os animais do grupo controle apresentaram leve reação inflamatória ao redor dos brônquios, alvéolos e alguns vasos. Esta reação inflamatória estava associada com neutrófilos e linfócitos, mas predominantemente eosinófilos. Observou-se também a deposição de fibrina e alguns mastócitos, envolvendo os brônquios (Figuras 12B).

No grupo dos animais imunizados com ES, observou-se uma reação inflamatória mais intensa que a do grupo controle com maciça presença de células polimorfonucleares, principalmente eosinófilos e hemorragia com presença de fibrina (Figura 13 A e B). Secções de larvas foram observadas entre os alvéolos (Figuras 14 A), envolvidas por grande quantidade de células polimorfonucleadas, principalmente eosinófilos, mas também mononucleadas com macrófagos presentes. Além disso, o edema alveolar estava presente em todo o tecido. No grupo imunizado com Ex as alterações foram semelhantes às lesões do grupo ES, mas o grupo Pe apresentou reações inflamatórias um pouco mais intensa, com predomínio de células polimorfonucleadas e também mononucleadas em menor escala, além de hemorragia e congestão dos vasos (Figuras 15A e B).

Na tabela 7 está demonstrado o resumo das observações histopatológicas dos tecidos anteriormente citados.

3.3. Cérebro e músculos dos camundongos imunizados e não imunizados (controle) necropsiados 30 dias após o desafio.

Nenhuma alteração histológica foi observada nestes tecidos no período de 30 dias, tanto nos grupos dos camundongos imunizados como no grupo controle, certamente devido ao pequeno número de larvas encontradas.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

TABELA 7 – Resumo das observações histopatológicas observadas no intestino grosso, fígado e pulmão de camundongos não imunizados e imunizados com os antígenos Pe, Ex e ES de *T. vitulorum.*

Tecidos	Camundongos não imunizados	Camundongos Imunizados
Intestino Grosso 7 horas após o desafio	▪ Poucos focos de reações inflamatórias, ausência de eosinófilos e mastócitos. ▪ Mucosa e submucosa com integridade tecidual, sem alterações vasculares evidentes.	▪ Reações inflamatórias mais intensas e difusas. ▪ Secções de larvas na lâmina próprias envolvidas em reações com presença maciça de eosinófilos, neutrófilos e mastócitos. ▪ Perda da integridade tecidual, hiperemia e alterações vasculares evidentes.
Fígado 4 dias após o desafio	▪ Reações inflamatórias não intensas com pequena presença de células mono e polinucleares. ▪ Grande degeneração vacuolar dos hepatócitos. ▪ Rupturas no tecido.	▪ Reações inflamatórias mais intensas e difusas com grande quantidade de células de Kupffer, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. ▪ Menor degeneração vacuolar. ▪ Rupturas no tecido.
Pulmão 4 dias após o desafio	▪ Leves reações inflamatória com presença de neutrófilos, linfócitos e muito eosinófilos ao redor dos brônquios alvéolos e vasos. ▪ Deposição de fibrina envolvendo os brônquios, presença de alguns mastócitos.	▪ Intensas reações inflamatórias com maciça presença de neutrófilos, linfócitos e principalmente eosinófilos. ▪ Hemorragia com deposição de fibrina, edema alveolar e congestão de vasos. ▪ Secções de larvas entre os alvéolos.



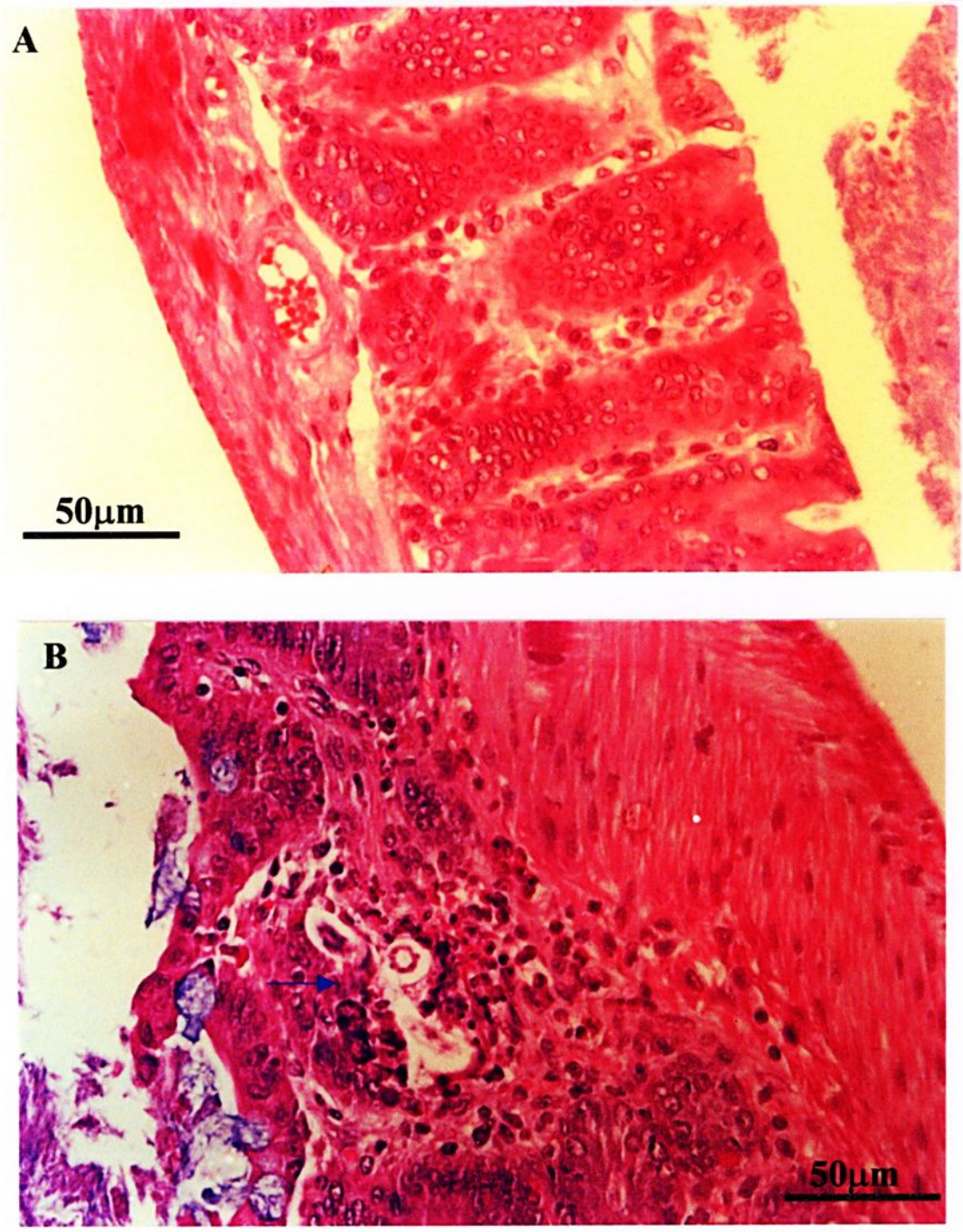


FIGURA 7 - Fotomicrografias do intestino grosso de camundongos sete horas após infecção experimental com ovos infectantes de *Toxocara vitulorum* **A:** Camundongo não imunizado. Observe a integridade do tecido muscular, da submucosa, mucosa e epitélio, além da ausência de alterações vasculares. **B:** camundongo imunizado com o antígeno Pe. Note o espessamento da muscular e da submucosa com perda da integridade da mucosa, a presença da larva (seta) envolvida por reação inflamatória e ainda, hiperemia por todo tecido (400x).

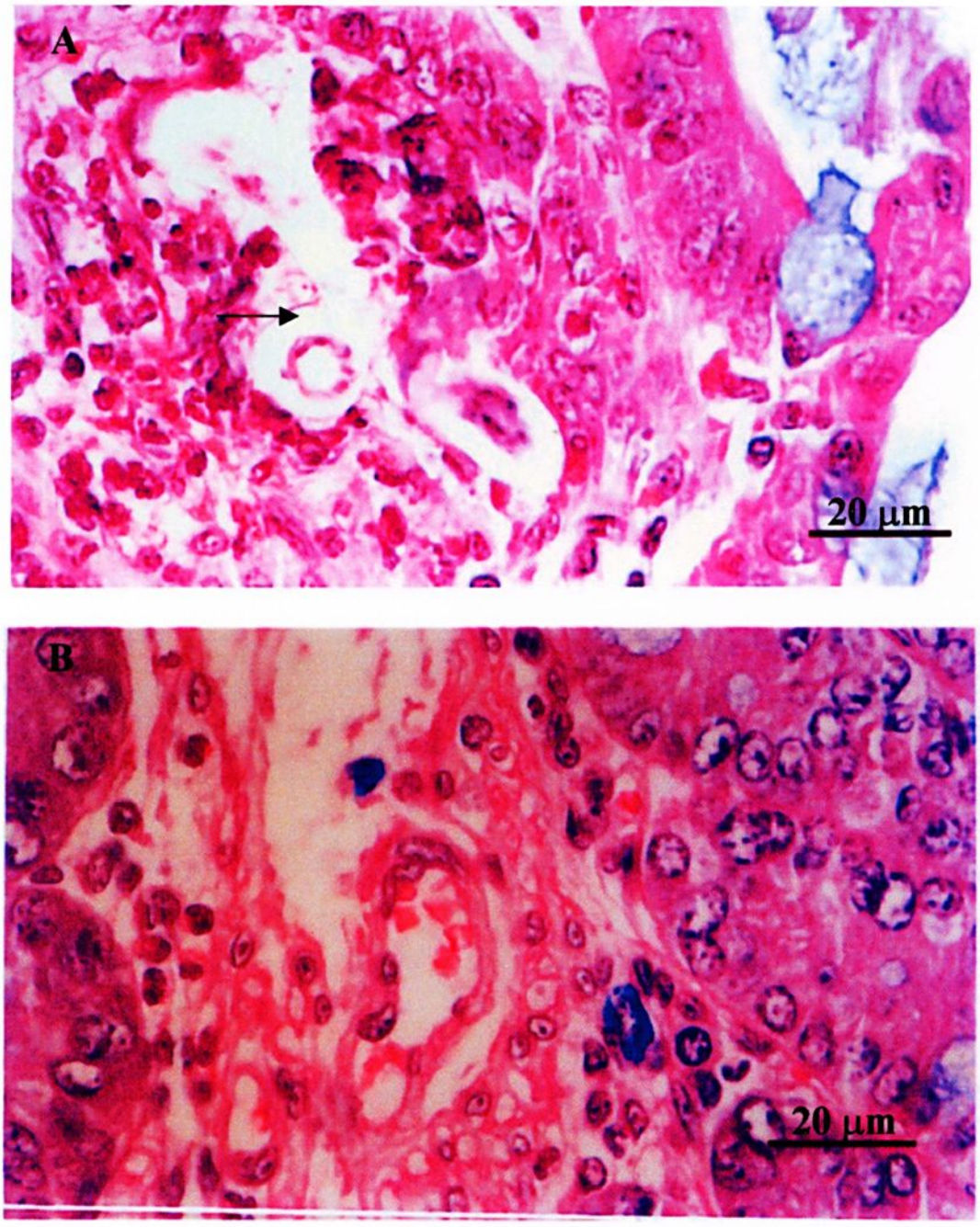


FIGURA 8 - Fotomicrografias do intestino grosso de um camundongo imunizado com antígeno de *T. vitulorum* e necropsiado sete horas após o desafio. **A:** Camundongo imunizado com o antígeno Pe. Observe a larva (seta) de *T. vitulorum* na mucosa envolvida por reação. Note a presença de abundante eosinófilos e neutrófilos e a hiperemia por todo tecido. **B:** Camundongo imunizado com antígeno Ex. Note a evidência dos mastócitos corados em azul, eosinófilos, hiperemia e diapedese.

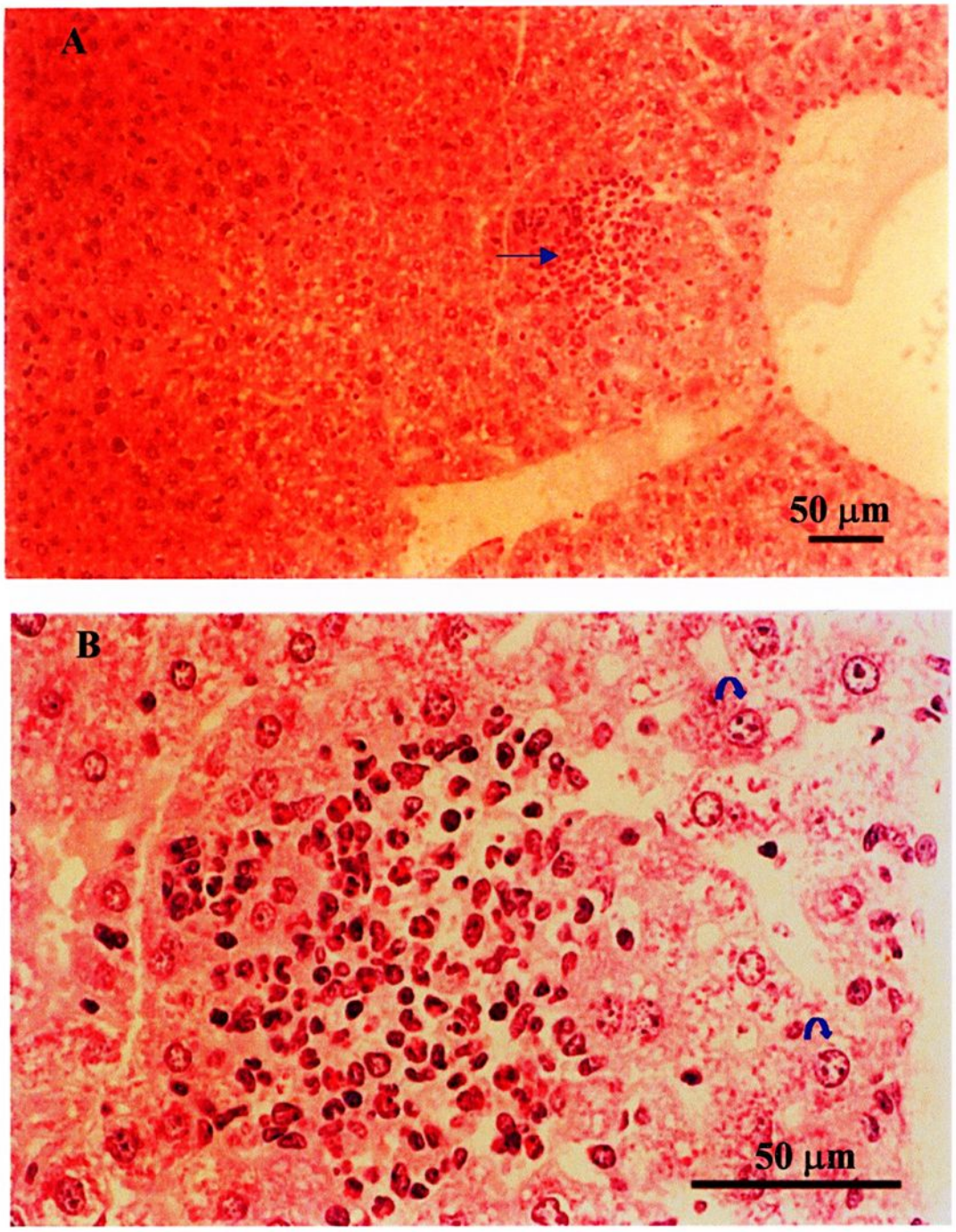


FIGURA 9 - Fotomicrografias do fígado de camundongo não imunizado e necropsiado quatro dias após o desafio **A:** Note pequeno foco inflamatório (seta) (200x). **B:** Mesmo foco inflamatório da figura A, mas em maior aumento, mostrando a presença massiva de eosinófilos; alguns neutrófilos e degeneração vacuolar (∩) (600x).

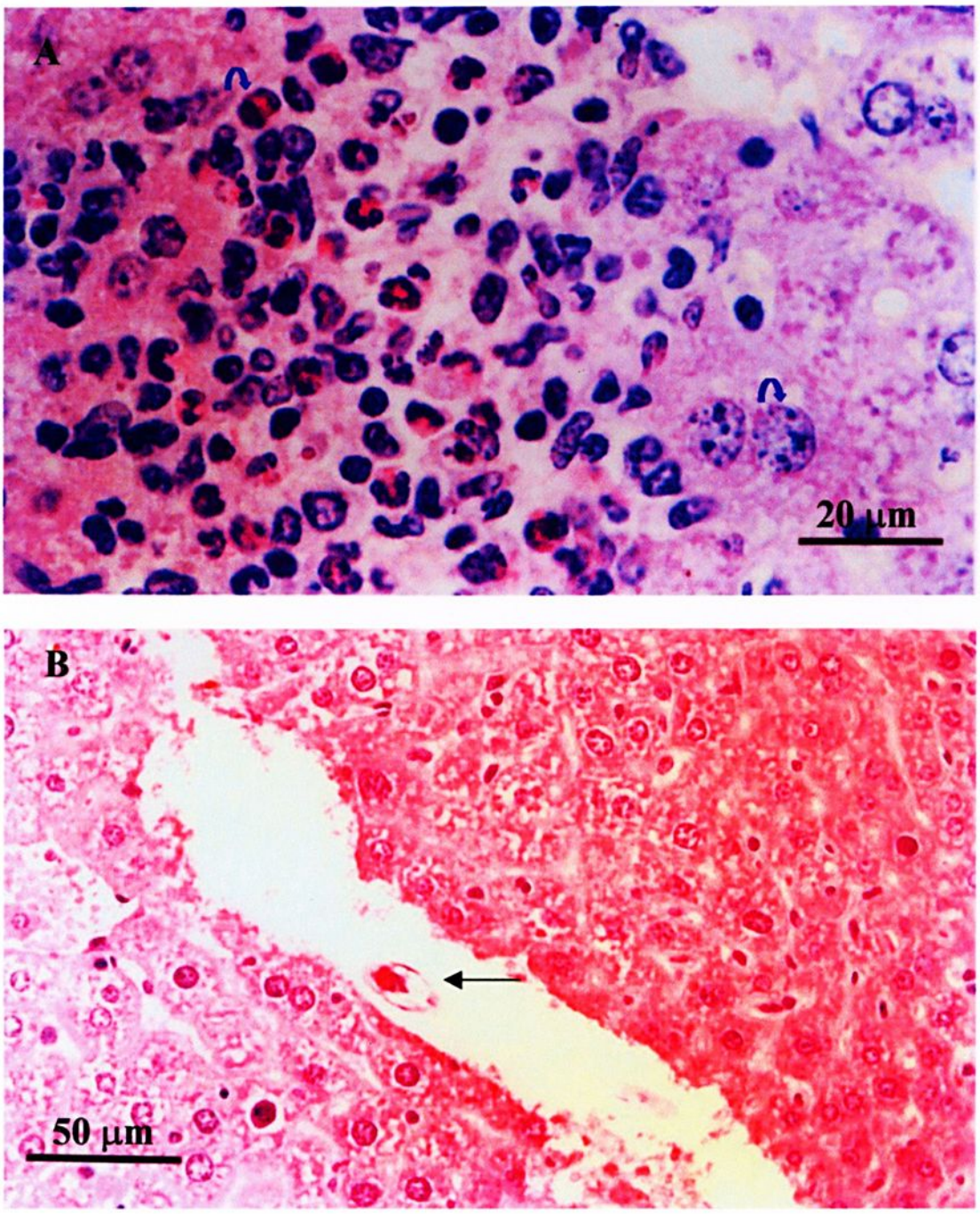


FIGURA 10 - Fotomicrografias do fígado de camundongos necropsiados quatro dias após o desafio. **A:** Mesmo foco inflamatório mostrado na figura 9B, mas em aumento maior (1000x) mostrando a presença de eosinófilos. **B:** Camundongo imunizado com antígeno Pe. Observe a presença de uma larva dentro de uma ruptura de tecido (seta).

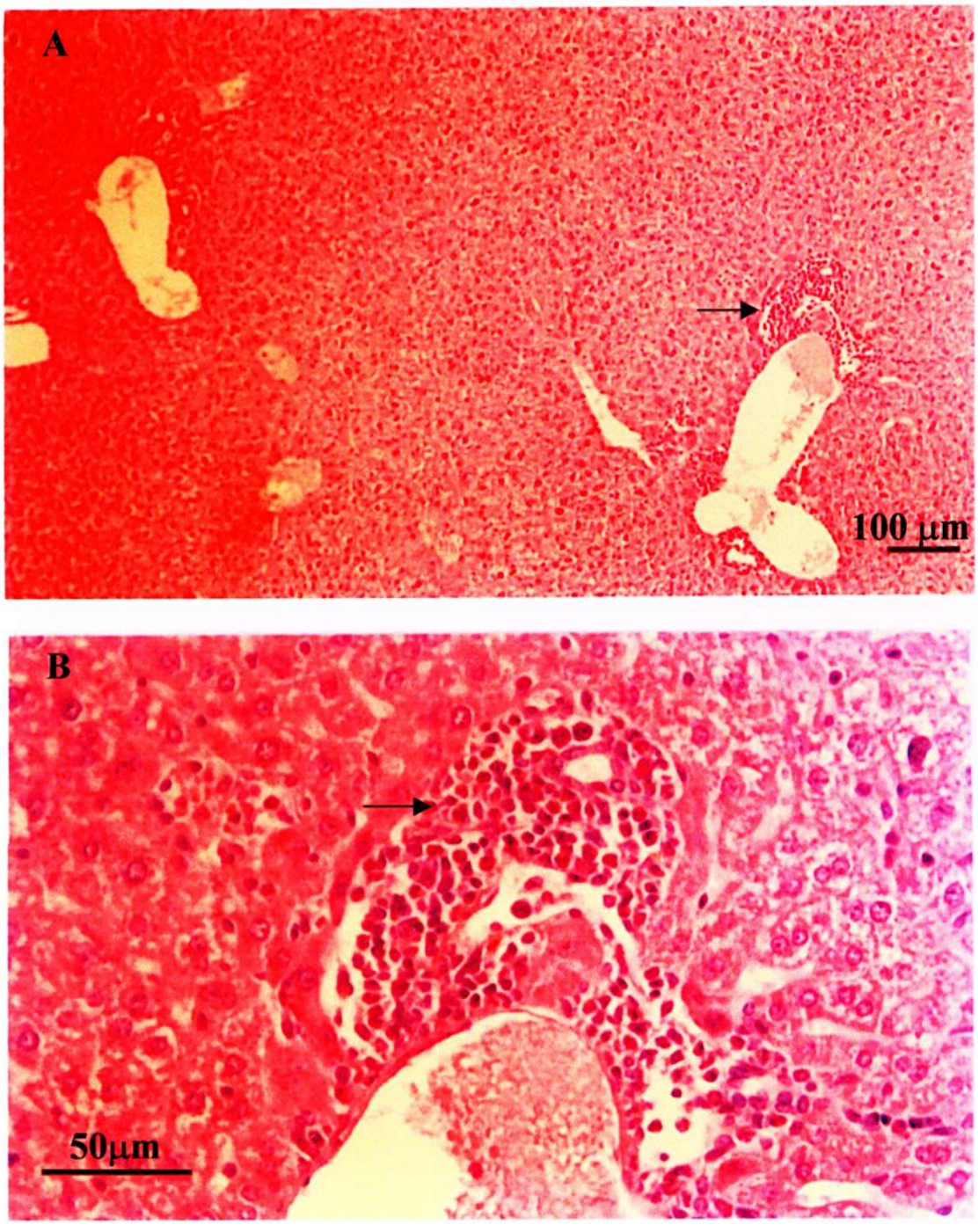


FIGURA 11 - Fotomicrografias do fígado de camundongo imunizado com o antígeno ES e necropsiado quatro dias após desafio. **A:** Manguito em um ramo da veia porta com presença de células inflamatórias (seta). **B:** Maior aumento da figura anterior (11A) (400x).

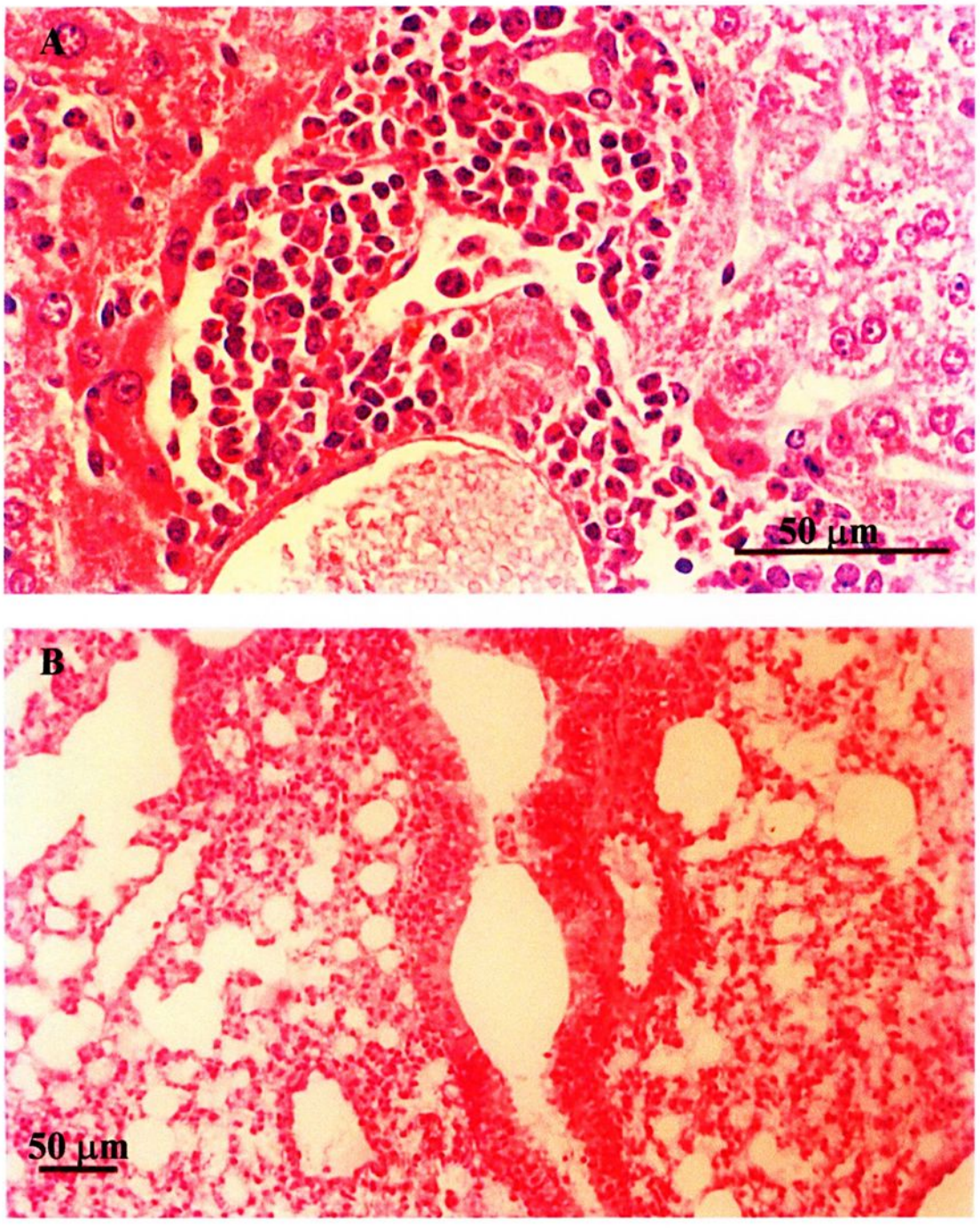


Figura 12: A: Fotomicrografia de fígado de camundongo imunizado com antígeno ES e necropsiado quatro dias após o desafio. Maior aumento da figura 11B (600x). **B:** Fotomicrografia de pulmão de um camundongo não imunizado e necropsiado quatro dias após o desafio. Observe a reação inflamatória ao redor dos brônquios, alvéolos e vasos (200x).

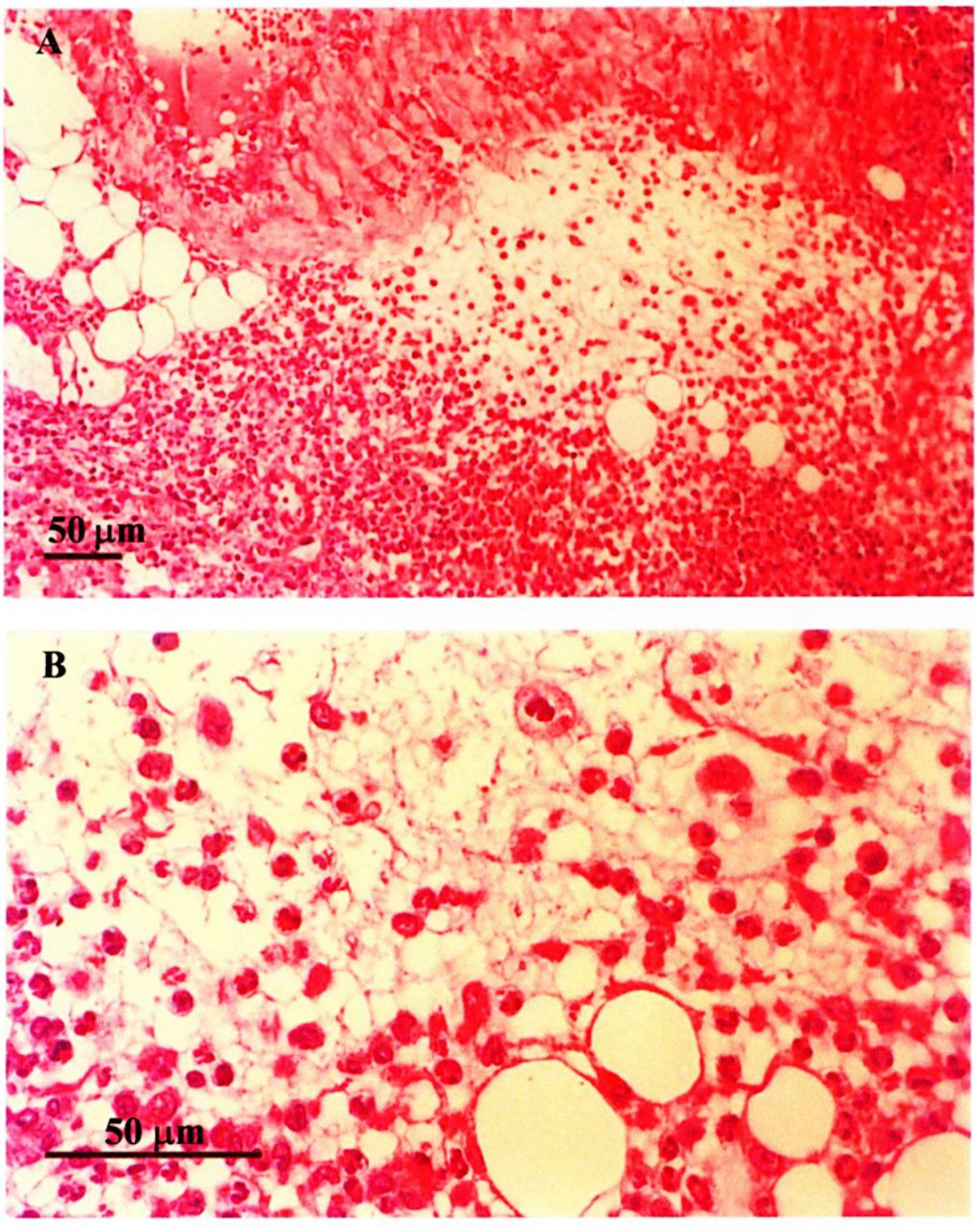


FIGURA 13 - Fotomicrografias do pulmão de camundongo imunizado com antígeno ES e necropsiado quatro dias após o desafio. **A:** Observe a intensa reação inflamatória ao redor dos alvéolos e hemorragia com deposição de fibrina, eosinófilos e neutrófilos (200x). **B:** Maior aumento da figura anterior (13A) (600x). Maciça reação inflamatória ao redor dos alvéolos, hemorragia.

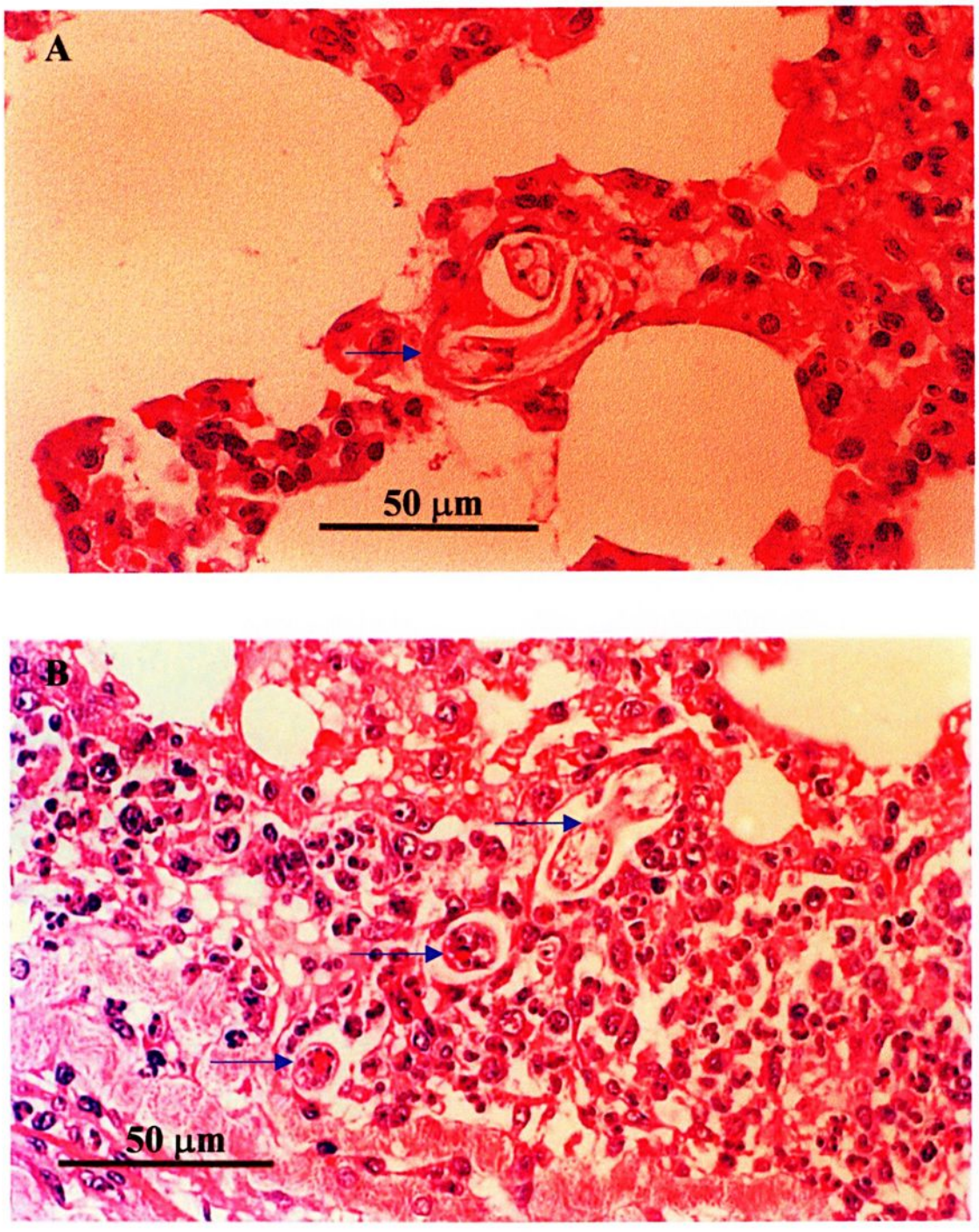


FIGURA 14 - Fotomicrografias dos pulmões de camundongos imunizados e necropsiados quatro dias após o desafio. **A:** Camundongo imunizado com antígeno ES. Observe a presença de secção de uma larva (seta) entre os alvéolos, envolvida por células inflamatórias e hemorragia. **B:** Camundongo imunizado com o antígeno Pe. Note secções de uma larva (seta) envolvida por reação inflamatória com presença de eosinófilos, linfócitos, macrófagos e hemorragia por todo tecido (600x).

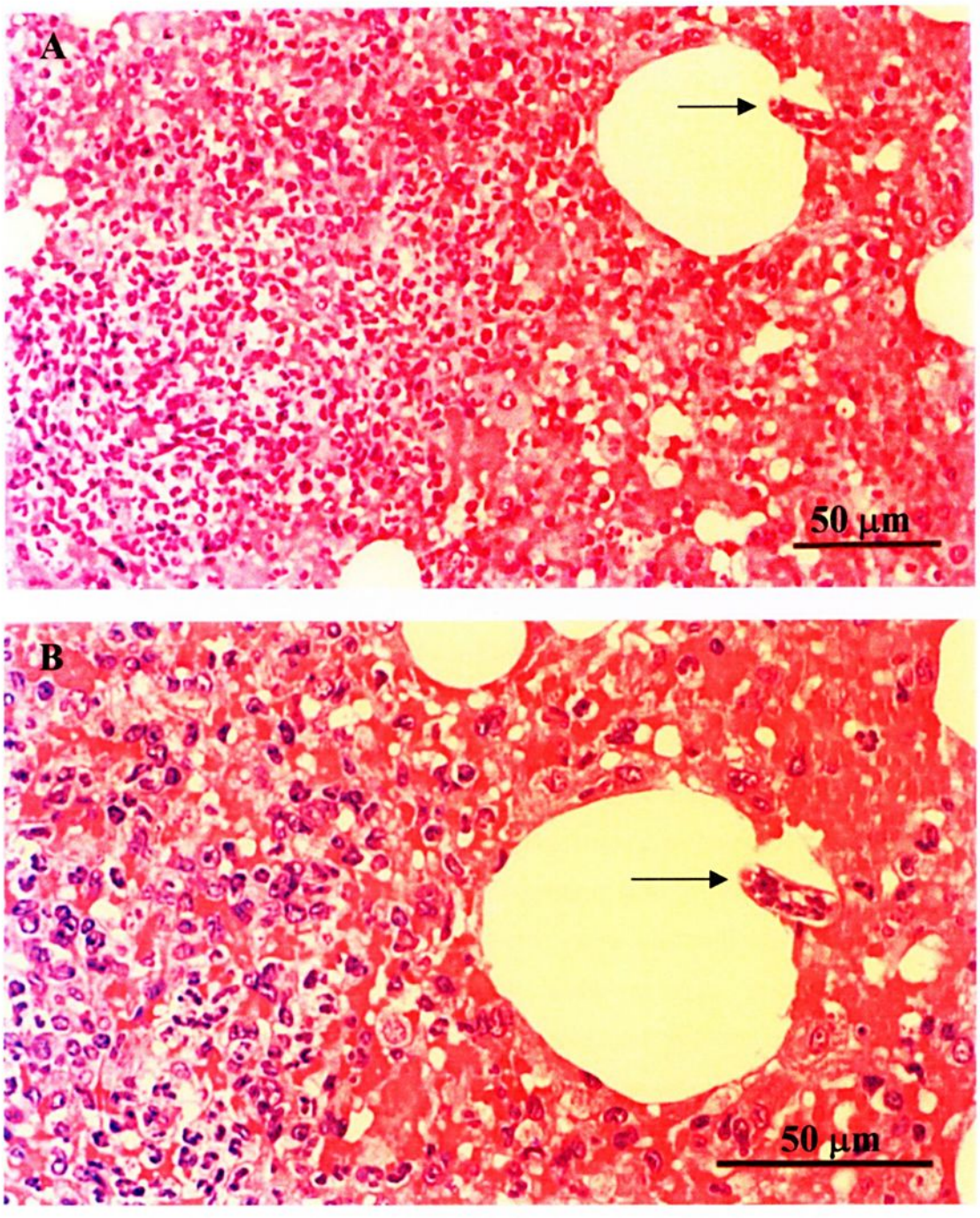


FIGURA 15 - Fotomicrografias de pulmão de camundongo imunizado com o antígeno Pe e necropsiado quatro dias após o desafio. Observe uma larva rompendo a parede do vaso sangüíneo e note a reação inflamatória com a presença de eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos. **A:** (400x) **e B:** (600x).

DISCUSSÃO

No presente experimento o número de ovos e larvas eliminados nas fezes dos camundongos foi muito baixa em todos os grupos examinados, ou seja, de 1,2%; 2,32%; 0,8% e 0,64%, respectivamente para o grupo controle e imunizados com Pe, Ex, e ES. Esperava-se que os animais dos grupos imunizados apresentassem uma maior capacidade de eliminação de parasitas em relação ao controle, no entanto, isto ocorreu somente com o grupo Pe, que rejeitou uma quantidade superior ao controle (o dobro). Como o antígeno Pe foi obtido de parasitas adultos do trato intestinal, justifica-se sua maior eficiência na estimulação do sistema imune inflamatório para dificultar a penetração larval pela mucosa intestinal. Por outro lado, o pequeno número eliminado em todos os grupos, pode ser justificado, em função das colheitas de fezes terem sido realizadas somente nas primeiras oito horas após a infecção experimental. Possivelmente, se estas colheitas fossem prolongadas por um período superior, este resultado poderia ser diferente e o número de parasitas detectados nas fezes poderia ser superior, pois verificou-se uma quantidade crescente de larvas no período de quatro a oito horas pós-desafio nas fezes dos animais do grupo Pe. Verificou-se também que a quantidade de larvas nas fezes foi superior à de ovos, indicando que este período foi suficiente para que ocorresse a eclosão dos mesmos. As porcentagens de larvas e de ovos foram respectivamente, 86,7% e 13,3% para o grupo controle, 82,7% e 17,3% para o grupo Pe, 60% e 40% para o grupo Ex e 50% para o grupo ES.

O único trabalho referenciado, no qual foi realizada a contagem de ovos e larvas eliminados nas fezes após o período pós-infecção, foi o de OMAR & BARRIGA (1991). Estes autores conseguiram após três infecções experimentais consecutivas de coelhos com ovos infectantes de *T. vitulorum,* detectar na primeira e segunda infecção uma eliminação de parasitas de 10% e 4% respectivamente, e na terceira 32%,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

sugerindo que a reinfecção causou uma estimulação do sistema imune, a qual dificultou a penetração larval pela mucosa intestinal.

Os antígenos Ex, ES e Pe foram utilizados para imunizar camundongos e verificar se a imunidade produzida iria prevenir a migração larval de *T. vitulorum* para os tecidos, como a mucosa intestinal, o fígado, o pulmão, o coração, o músculo e o cérebro. Estes animais, após a imunização, foram infectados experimentalmente com ovos infectantes de *T. vitulorum* (desafio) e em seguida necropsiados às oito horas, quatro dias e trinta dias pós-desafio. Os órgãos foram colhidos e as larvas contadas após a digestão péptica dos mesmos.

Sete horas após o desafio, observou-se que a grande maioria das larvas encontrava-se ainda presente no intestino grosso, que segundo CHAUHAN & PANDE (1971), CHAUHAN et al. (1974) e ROBERTS (1990a) é o local de penetração das larvas de *T. vitulorum* pela mucosa antes de atingirem a circulação sanguínea ou linfática. As larvas encontravam-se em maior quantidade neste órgão, em todos os grupos examinados (controle e grupos imunizados). No entanto, o grupo controle (não imunizado), foi o que apresentou o maior número de larvas, ou seja, quase o dobro em relação aos imunizados. Este resultado demonstrou que estas larvas encontram-se em processo de migração através do intestino grosso. Os grupos imunizados com os antígenos Ex e Pe apresentaram praticamente o mesmo número de larvas, mas com o antígeno ES, esta quantidade foi quase cinco vezes inferior em relação ao grupo Ex e Pe. Segundo ABO-SHEHADA (1991), uma reação inflamatória ocorre ao redor da larva no local da sua penetração na mucosa do intestino de camundongos vacinados, na tentativa de impedir a entrada de larvas de *T.canis* pela mucosa intestinal do hospedeiro. Assim, é possível que uma reação inflamatória mais intensa nos grupos imunizados poderia dificultar a penetração das larvas antes de atingir a circulação e órgãos. Além disso, sabe-se que as superfícies de mucosa, e neste caso a mucosa intestinal, são portas de entrada para patógenos, como os parasitas. Para evitar que isto aconteça o sistema imunológico deve estar preparado para manter uma barreira contra a entrada destes para a corrente sanguínea. As células epiteliais especializadas (como as células M), os linfócitos em placas de Peyer ou difusos, assim como os eosinófilos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos poderiam estar sendo sensibilizados e coordenar uma resposta conjunta para tentar aprisionar as larvas, no momento de sua entrada para o organismo animal (SIMECKA, 1998). Os antígenos de *T. vitulorum* estão, desta forma, atuando para que ocorresse neste local, sensibilização dos mecanismos efetores celulares listados acima.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Com relação ao intestino delgado, algumas larvas ainda estavam presentes sete horas pós-desafio, possivelmente ainda no conteúdo luminal. No entanto, a quantidade larval neste órgão foi muito baixa em todos os grupos avaliados (4 a 16 larvas). Já no fígado e pulmão, foram detectadas, ainda em número muito baixo, larvas no grupo controle, embora também no pulmão do grupo Ex. A presença destas larvas nestes dois últimos órgãos, em um período de apenas sete horas pós-desafio, significa uma rápida migração larval principalmente no grupo controle, que não recebeu qualquer larva no intestino entre 12 e 48 horas após a infecção de camundongos com ovos de *T. vitulorum*. CHAUHAN et al. (1974), infectando ratos albinos com ovos de *T. vitulorum*, relataram a presença de larvas no intestino delgado, fígado e pulmão já entre 10 e 24 horas após a infecção. Porém, ROBERTS (1990a) trabalhando com o hospedeiro natural, injetou diretamente no íleo de bezerros búfalos, larvas infectantes de *T. vitulorum* marcadas radioativamente. Estas larvas foram em seguida, recuperadas na parede intestinal, no período de duas horas após infecção e 24 horas no pulmão e no fígado.

Os animais do grupo Pe além de terem retido maior número de larvas no intestino grosso, do que os demais grupos imunizados, também foram os que apresentaram a maior rejeição de larvas e ovos através do trato intestinal, pelas fezes. Outro fator que deve ser ressaltado é que o intestino grosso foi separado para a digestão péptica juntamente com o conteúdo luminal. Desta forma, muitas larvas presentes no material digerido poderiam ainda estar no lúmem junto do seu conteúdo e assim não tiveram a oportunidade de penetrar na mucosa e migrar. OMAR & BARRIGA (1991), através da imunização com repetidas doses de ovos infectantes de *T. vitulorum*, verificaram também eliminação mais lenta de ovos e larvas nos animais não sensibilizados pela infecção experimental. Além disso, na primeira e na segunda infecção, praticamente nenhuma larva foi eliminada, somente ovos, mas na terceira, a eclosão dos ovos foi superior e grande quantidade de larvas foi eliminada com as fezes. Já, no presente trabalho, como descrito anteriormente, prevaleceu maior número de larvas em relação aos ovos em todos os grupos analisados.

Decorridos quatro dias pós-desafio com ovos infectantes, grande quantidade de larvas já foi recuperada principalmente no fígado dos quatro grupos de camundongos, confirmando a rota de migração desse nematódeo do intestino grosso para este órgão. Resultados semelhantes foram obtidos por CHAUHAN & PANDE (1972), BARRIGA & OMAR (1992) e AMERASINGHE et al. (1992). Após a imunização de

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

camundongos com diferentes tipos de antígenos (das larvas e do adulto) *de T. vitulorum*, AMERASINGHE et al. (1992) desafiaram camundongos com ovos infectantes deste parasita e verificaram que o pico máximo de larvas encontradas no fígado ocorreu dois dias após a infecção. Em seguida houve uma redução gradativa dessas larvas até o dia 21 após a infecção. No pulmão, a quantidade de larvas permaneceu estável entre o quarto e o sétimo dia. Da mesma forma, FAGEHOLM et al. (2000), infectaram suínos com ovos de *Ascaris suum* e observaram a migração de larvas tanto no fígado como no pulmão, em períodos similares ao nosso experimento.

O resultado da recuperação de larvas no fígado e no pulmão dos animais imunizados com os três antígenos apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) em relação ao grupo controle, ou seja, o controle foi 4,7 vezes superior ao Pe, 7,4 vezes ao grupo Ex e 2,4 vezes ao ES. Em relação ao número larval, estes resultados demonstraram que o antígeno Pe, apesar do grande número de larvas retidas no intestino grosso (n=246), somente um oitavo destas larvas foi capaz de migrar para o fígado (n=28), deduzindo-se que a maioria ficou presa na mucosa deste órgão, ou durante a migração até o fígado. Já no controle, a migração de larvas do intestino grosso (n=526) até o fígado (n=134) foi de dois terços. O antígeno Ex apresentou comportamento semelhante ao antígeno Pe. Já o grupo ES, além de apresentar menor quantidade de ovos e larvas nas fezes e de larvas na parede do intestino grosso (sete horas), apresentou número bem mais elevado de larvas no fígado, no quarto dia pós-infecção, demonstrado menor eficiência do antígeno ES na inibição da migração larval. Quatro dias pós-desafio, algumas larvas ainda estavam presentes na mucosa do intestino delgado e grosso, mas apenas em número muitíssimo baixo (2 a 4 larvas em média) e, somente no grupo Ex e no controle. O terceiro órgão mais parasitado por larvas, mesmo em número bem inferior ao do fígado, foi o pulmão. Neste órgão, no entanto, somente o grupo ES não diferiu estatisticamente do grupo controle, reforçando mais uma vez a ineficiência deste antígeno, no controle da migração larval. Ainda, com quatro dias após o desafio, algumas larvas também foram visualizadas no conteúdo digerido do cérebro e do músculo, mas somente no controle, embora uma larva também foi detectada no pulmão e no músculo dos animais imunizados pelo Pe.

Com base na dose de ovos infectantes administrados para cada camundongo e a quantidade de larvas presentes no fígado (quatro dias pós-desafio) dos animais imunizados, calculou-se a porcentagem de inibição larval em relação ao controle: assim o antígeno Pe inibiu 79%, o Ex 86% e o ES 58%. Já AMERASINGHE et al (1992),

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

verificaram que os antígenos mais efetivos foram o Pe com 100% de proteção, o ES larval com 92% e o Ex larval com 82% de inibição larval tecidual em camundongos imunizados e desafiados com ovos de *T. vitulorum*.

No entanto, 30 dias após o desafio, somente no pulmão (antígeno Pe), cérebro (controle) e músculo (controle e antígeno ES e Pe) encontrou-se larvas. Mas, o número foi baixo e não significativo em relação ao controle. Desta forma, nota-se que as larvas são capazes de migrar para o cérebro e para o músculo, as quais podem permanecer em estado de hipobiose. Também é importante ressaltar o que foi discutido por WARREN (1971), observando uma pequena proporção de larvas de *T. vitulorum* migrando para a musculatura esquelética de camundongos, apesar da existência de um gradual desaparecimento destas nos tecidos. O autor deduziu que muitas larvas poderiam ter morrido ou tomado outra rota dentro do hospedeiro, como a bexiga ou serem destruídas por reação tecidual. Além disso, muitas larvas migratórias teciduais são eliminadas pelos pulmões. O que este último autor relatou, foi observado também no presente experimento, onde a quantidade de larvas inicialmente administrada aos animais foi maior que a quantidade encontrada nas fezes e nos tecidos. Segundo KAYES & OAKS (1978), larvas de *T. canis* ainda podem permanecer vivas na musculatura de camundongos, apesar das reações granulomatosas ocorridas em função da reação imune celular. Além disso, ABO-SHEHADA et al. (1991) observaram granulomas formados em torno das larvas de *T. canis,* no fígado e no músculo de camundongos. Como algumas larvas foram detectadas no cérebro 35 a 45 dias pós-infecção, os autores concluíram que esta reação não era suficiente para destruí-las na totalidade e estas larvas poderiam ter escapado dos granulomas hepáticos e migrado para este órgão. Estas mesmas larvas vivas de *T. canis* também foram visualizadas no cérebro de camundongos no experimento desenvolvido por NUNES et al. (1999), no período de 42 a 48 dia pós-infecção. Além disso, AMERASINGHE et al. (1992), apesar de pequena quantidade, também recuperaram larvas no músculo de camundongos controle, entre 4 e 12 dias após a infecção, mas nenhuma no cérebro. Já, BARRIGA E OMAR (1992), entretanto, recuperaram larvas de *T. vitulorum* em músculo de coelhos não imunizados no período de 35 a 45 dias após o desafio.

Através da histopatologia, observou-se que no intestino grosso dos camundongos dos grupos imunizados, as reações inflamatórias foram mais intensas do que nos não imunizados. Notou-se a presença de células inflamatórias predominando de modo geral, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos levando à perda da integridade tecidual,

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

principalmente, onde secções de larvas foram detectadas. CHAUHAN et al. (1974) observaram que as larvas de *T. vitulorum* na mucosa intestinal de ratos albinos estavam cercadas por eosinófilos, neutrófilos, além da congestão de vasos sanguíneos na mucosa. Além disso, KAREN & CAROLYN (1997) reportaram que os eosinófilos e seus grânulos citoplasmáticos contém muitas toxinas moleculares que podem ser liberadas extracelularmente em resposta à estimulação antigênica, possivelmente com ação contra os helmintos. Também, EVERSOLE et al. (1999) detectaram aumentado número de eosinófilos na mucosa intestinal de camundongos infectados por *N. brasiliensis*. Porém, NEVES (2001) além de eosinófilos, observou também aumento significativo de mastócitos no intestino de bezerros búfalos naturalmente infectados, participando possivelmente no processo de expulsão do parasita. Em um recente trabalho, ALDAWEK et al. (2002) relataram congestão da mucosa intestinal com inflamação eosinofílica e presença de larvas na mucosa intestinal de cordeiros infectados com *T. canis*. Portanto, os eosinófilos estão sempre presentes e associados às infecções helmínticas, como os mastócitos, mas neste caso, mastócitos não elevaram significantemente. Embora, muitos estudos mostraram uma associação de eosinófilos com a morte de parasitas em secções histológicas, nem sempre ficou claro se o parasita era morto pelos eosinófilos ou por conseqüência do processo inflamatório. No entanto, *in vitro*, eosinófilos aderem a uma variedade de helmintos opsonisados com imunoglobulinas e complemento. Eles liberam o conteúdo de seus grânulos e secretam fatores solúveis os quais matam a larva (BUTTERWORTH et al., 1984). Recentemente, MEEUSEN et al. (2002) propuseram dois mecanismos para explicar a morte do parasita helmíntico por eosinófilos. O primeiro seria uma resposta imune inata no hospedeiro não natural. Neste hospedeiro, os antígenos de superfície ou os excretores e secretores poderiam induzir uma forte resposta imune inata, incluindo a ativação de complemento (via alternativa) e assim estimular mastócitos para liberação de moléculas vasoativas. Desta forma, eosinófilos residentes e do sangue seriam recrutados para o local da infecção. Este primeiro mecanismo, explicaria porque nos animais do grupo controle do presente experimento houve, mesmo que bem mais branda, uma reação inflamatória na mucosa com eliminação ou expulsão de larvas pelas fezes dos hospedeiros. O segundo mecanismo seria a resposta imune adaptativa a qual, neste caso, seria aquela ocorrida após repetidas infecções no hospedeiro não natural, ou especificamente como no presente experimento, nos camundongos imunizados. Neste segundo mecanismo, menor estímulo seria necessário para que uma forte resposta imune inata cooperasse

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

eficientemente com a imunidade adquirida para favorecer as ligações dos eosinófilos às larvas via complemento e receptor Fc das imunoglobulinas. Além disso, a forte imunidade inata atuando como adjuvante poderia acelerar a resposta imune adaptativa efetiva para estimular mastócitos, células exterminadoras naturais e linfócitos intraepiteliais. Estas células poderiam secretar IL-5 e induzir a proliferação e a migração de eosinófilos da medula óssea para o local da infecção. O aumento da expressão de receptores de complemento sobre eosinófilos juntamente com abundante deposição de complemento sobre a superfície da larva no hospedeiro não natural poderia resultar em um ataque eosinofílico mais intenso, com liberação do conteúdo dos grânulos e morte do parasita.

No fígado dos camundongos não imunizados aos quatro dias da infecção experimental, observou-se novamente, reações inflamatórias menos intensas que as dos animais imunizados, porém, maior extensão de áreas com hepatócitos vacuolizados e ruptura do tecido hepático, sugerindo um provável mecanismo de defesa mais atuante nos animais imunizados. Após o intestino, o fígado foi o segundo órgão que mais aprisionou larvas de *T. vitulorum*, e devido às lesões causadas por estas larvas, este órgão foi considerado importante na relação hospedeiro parasita, confirmando o que foi relatado por ALDAWEK et al (2002) em cordeiros infectados experimentalmente com *T. canis*. Além disso, estes mesmos autores observam congestão de vasos com agregado de linfócitos, eosinófilos e neutrófilos, como descrito no presente trabalho. Com o progresso desta infecção, segundo ALDAWEK et al. (2002), as lesões evoluíram para granuloma eosinofílico com lesões no parênquima hepático após 14, 20 e 28 dias de infecção. Estes granulomas foram também relatados por KAYS et al. (1978) 11 semanas após a infecção de camundongos com *T. canis* e já se apresentavam na forma crônica. Porém, estes autores observaram que os granulomas eram inicialmente constituídos abundantemente por eosinófilos, mas aos 14 dias observaram desintegração destas células e substituição das mesmas por macrófagos. Esta reação inflamatória, como resposta a uma ativação da defesa imune celular, também foi observada no fígado de ratos após infecção com *T. canis* em um experimento realizado por PARSONS & GRIEVE (1990), onde foram observadas larvas aprisionadas em granulomas fortemente infiltrados por eosinófilos. No atual experimento, não foi possível observar larvas em granulomas devido ao fato de que os animais foram necropsiados antes do tempo da formação dos mesmos. Pode-se, contudo, inferir que no fígado e no pulmão dos camundongos do atual experimento, possíveis granulomas iriam formar-se caso o

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

procedimento histológico destes tecidos fosse realizado nestes mesmos períodos. ABO-SHEHADA et al. (1991) também observaram a presença de granuloma no fígado como mecanismo de defesa e aprisionamento de larvas.

Assim como nos dois órgãos citados anteriormente, a reação inflamatória quatro dias após a infecção experimental verificada no pulmão dos animais do grupo controle, apresentou-se menos intensa que as dos animais imunizados, mas além de células polimorfonucleadas e mononucleadas ocorreu também deposição de fibrina, demonstrando que houve hemorragia nos locais prováveis percorridos pelas larvas. O pulmão dos animais imunizados, além das lesões apresentarem-se mais intensas, houve também a presença de larvas entre os alvéolos, envolvidas principalmente por células inflamatórias e hemorragia como no experimento de CHAUHAN et al. (1974). Além disso, ALDAWEK et al. (2002) relataram também lesões muito semelhantes ao do presente experimento, destacando uma severa congestão dos vasos sanguíneos perialveolares e peribronquiolares associada à infiltração de eosinófilos, linfócitos e macrófagos com intensa exudação nos alvéolos. Deve-se levar em consideração que o pulmão do hospedeiro não natural (errático) é um órgão de expulsão do parasita, onde as larvas podem ser expectoradas ou deglutidas e eliminadas, pois a forma adulta não se desenvolve.

Todos os grupos de camundongos imunizados apresentaram alterações histológicas (reações inflamatórias) mais acentuadas que o grupo não imunizado. Porém, entre os antígenos as reações inflamatórias dos animais imunizados foram semelhantes para cada órgão analisado.

Nos hospedeiros naturais, sabe-se que a infecção por *T. vitulorum* estimula o sistema imune-humoral como foi observado por RAJAPAKSE et al. (1994a), STARKE-BUZETTI et al. (2001) e SOUZA (2001). As búfalas adultas apresentaram altos níveis de anticorpos no período peri-parto e estes anticorpos foram transferidos possivelmente pelo colostro aos seus respectivos bezerros. Posteriormente, os bezerros búfalos, em virtude da constante estimulação pelas larvas, também começaram a produzir ativamente anticorpos contra os antígenos Ex, ES e Pe de *T. vitulorum* (SOUZA, 2001). Posteriormente FERREIRA (2002) obteve resultados semelhantes quando fracionou os antígenos Pe, Ex e ES de *T. vitulorum* através da eletroforese para serem testados novamente com os soros de búfalas adultas, através de Western Blot. Todos os antígenos acima citados reagiram com os soros de bezerros búfalos em diferentes fases do parasitismo (ascensão, pico e declínio) e soros e colostros de búfalas adultas.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

Enquanto todas as frações dos antígenos ES deixaram de ser detectadas nos soros dos bezerros búfalos a partir de 150 dias (fase de ausência de ovos nas fezes) o antígeno Pe continuou reagindo entre 150 e 365 dias. As frações que reagiram mais freqüentemente (em todas as fases do parasitismo) pelo Western Blot, segundo FERREIRA (2002) foram para o antígeno ES (190, 150 e 110 KDa), Ex (96, 82 e 68 KDa) e Pe (165, 112 e 88 KDa). As frações 165, 112 e 88 KDa do Pe e 96, 82 e 68 KDa de Ex foram as que continuaram reagindo nos bezerros búfalos mais velhos. Além disso, quando FERREIRA (2002) testou o soro imune de camundongos anti-Ex, anti-ES e anti-Pe de *T. vitulorum* contra estes antígenos pelo Western Blot (reação heteróloga e homóloga), o autor constatou a presença de reação cruzada entre esses antígenos. Estes resultados demonstraram que os antígenos utilizados na imunização dos camundongos da presente pesquisa podem servir potencialmente como moléculas a serem utilizadas no controle imunológico de búfalos contra a infecção por *T. vitulorum.* Uma possível estratégia de controle do *T. vitulorum* seria através da vacinação das búfalas adultas para evitar a transferência de larvas através do colostro.

Em função dos resultados obtidos no presente estudo, e com os descritos na literatura, sugere-se a continuação da presente pesquisa, testando-se a viabilidade da utilização destes antígenos, ou suas frações no controle destas parasitoses no rebanho bubalino.

unesp

CONCLUSÕES

Os antígenos de *T. vitulorum* mostraram-se imunogênicos pois foram capazes de desencadear uma resposta imunológica nos camundongos imunizados, controlando a migração larval para os tecidos. Assim a porcentagem de inibição da migração larval para o fígado foi de 58%, 79% e 86%, respectivamente, para os antígenos ES, Pe e Ex.

Pela contagem larval, às sete horas pós-desafio, as larvas ainda encontravam-se em sua maioria na mucosa do intestino grosso, mas, quatro dias após, as mesmas já tinham alcançado o fígado e os pulmões. Em todos os tecidos analisados houve predominância de larvas nos tecidos dos animais não imunizados. Com 30 dias, as larvas principalmente nos animais do grupo controle, já se encontravam no músculo e no cérebro, embora, em número muito reduzido.

Pelo exame histopatológico, quatro dias pós-desafio, as reações inflamatórias foram mais intensas nos tecidos dos animais imunizados do que nos tecidos dos animais não imunizados. Eosinófilo foi o tipo celular predominante nestas reações inflamatórias tanto no fígado como nos pulmões. Na parede do intestino grosso, houve aumento significativo de eosinófilo (15 vezes), mas aumento reduzido de mastócitos.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

REFERÊNCIAS

ABO-SHEHADA, M.N.; Al-ZUBAIDY, B.A.; HERBERT, I. V. Acquired immunity to *Toxocara canis* infection in mice. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.38, n.4, p.289-298, 1991.

ALDAWEK, A.M.; LEVKUT, M.; REVAJOVÁ, V.; KOLODZIEYSKI, L.; SEVEIKOVÁ, Z.; DUBINSKY, P. Larval toxocarosis in sheep: the immnunohistochemical characterization of lesions in some affected organs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.105, p.207-214, 2002.

AMERASINGHE, P.H.; RAJAPAKSE, R.P.; LLOYD, S.; FERNANDO, S.T. Antigen-induced protection against infection with *Toxocara vitulorum* larvae in mice. **Parasitology Research**, Belfast, v.78, n.8, p. 643-647, 1992.

ARAUJO, P. Observações pertinentes às primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides, Ascaris suum* e *Toxocara canis.* **Revista Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.14, p.83-90. 1972.

ASHRAF, M.; URBAN, J. F. JR.; LEE, T. D. G.; LEE, C. M. Characterization of isolatedporcine intestinal mucosal mast cell following infection with *Ascaris suum.* **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 29, p.143-158, 1988.

BANERJEE, D.P.; BARMAN ROY, A.K.; SANYAL, P.K. Public health significance of *Neoascaris vitulorum* larvae in buffalo milk samples. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v.69, n.6, p.1124, 1983.

unesp

BARRIGA, O.O.; MYSER, W.C. Effects of irradiation on the biology of the infective larvae of *Toxocara canis* in the mouse. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v.73, p.89-94, 1987.

BARRIGA, O.O. Rotational control of canine toxocariasis by the veterinary practitioner, **JAVMA**, v.198, p.216-221, 1991.

BARRIGA, O.O.; OMAR, H.M. Immunity to *Toxocara vitulorum* repeated infections in a rabbit model **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.33, p.249-260, 1992

BARUAH, P.K.; SINGH, R.P.; BALI, M.K. Relationship between presence of 3th 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**, New Delhi, v.34, p.76-78, 1981.

BUTTERWORTH, A. E. Cell-mediated damage to helminthes. **Adv. Parasitology.** V.23, p. 143-235, 1984.

BEAVER, P.C.; SNYDER, C.H.; CARRERA, G.M.; et al. Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans. Report of three cases. **Pediatrics**, São Paulo, v.9 p.7, 1952.

CHAUHAN. P.P.S.; PANDE, B.P. Migratory behaviour and histopathology of *Neoascaris vitulorum* larvae in albino mice. **Indian Journal of Experimental Biology,** New Delhi, v.10, p.193-200, 1972.

CHAUHAN, P.P.S.; BHATIA, B.B.; ARORA, G.S.; et al. A note on migratory behaviour of *Neoascaris vitulorum* larvae in albino rat and chicken: a histology study. **The Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v.44, p.801-804, 1974.

DAS, K.M.; SINGH, G.B. Calf ascariasis in India. A nine years survey with special reference to "Hetrazan". **The British Veterinary Journal**, London, v.111, p.347, 1955.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

DUFFY, J. P.; SMITH, P. J., CROCHER, J.; MATTHEWS, H. R. Combined staining method for demonstration of tissue eosinophils and mast cells. **Jornal Histotech**, v.16, p.143-144.

ENYENIHI, U.K. Pathogenicity of *Neoascaris vitulorum* infections on calves. **Bulletin Of Epizootic Diseases of Africa**, London, v.17, p.171-178, 1969.

ENYENIHI, U.K. Migration of *Neoascaris vitulorum* larvae in guinea pigs and calves. **Nigerian Journal of Science,** Ibadan, v.4, p.59-65, 1970.

EVERSOLE, R. MACKENZIE, C.; CONDER, G.; JONSON, S.; BEUVING, L. Changes in the morphology and the distribution of rat intestinal eosinophils during infection with nematode *Nippostrongylus brasiliensis.* **Laboratory Intestigation**, v.79, p. 785-797, 1999.

FAGERHOLM, H.P.; NANSER, P.; ROEPSTORFF, A.; et al. Differentiation of cuticular structures during the growth of the third-stage larva of *Ascaris suum* Nematoda, Ascaridoidea) after emerging from the egg. **The Journal of Parasitology**, Lancaster, v.86, p.421-427, 2000.

FERREIRA, F.P. **Obtenção e caracterização de antígenos de *Toxocara vitulorum* por SDS-Page e "Western blot"**. Ilha Solteira, 2002. 53p. Dissertação (Mestrado – Sistema de Produção Animal) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

GAUTAM, O.P.; MALIK, P.D.; SINGH, D. K. *Neoascaris vitulorum* larvae in the colostrum/milk of buffaloes. **Current Science**, Bangalore, v.45, p.350, 1976.

GUPTA, G.C.; JOSUL, B.P.; RAI, P. Some aspects of biochemical studies in calf diseases ascaridiasis and scour. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v.53, p.438-441, 1976.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, New York, v.48, n.2, p.422-427, 1972.

HERLICH, H.; PORTER, D.A. Prenatal infection of a calf with the Nematode, *Neoascaris vitulorum.* **The Journal of Parasitology**, Lancaster, v.39, p.33-34, 1953.

HUNTLEY, J.F. NEWLANDS, G.; MILLER, H. R. P. The isolation and characterization of globule leucocytes: their derivation from mucosal mast cells in parasitized sheep. **Parasite Immunology**, Oxford, v.6, p. 371-390, 1984.

KAYES, S.G.; OAKS, J.A. Development of the granulomatous response in murine toxocariasis. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.93. p.277-294, 1978.

LÁU, H.D. Doenças dos bezerros. In:___. **Doenças em búfalos no Brasil**: diagnósticos, epidemiologia e controle. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1999. p. 23-56.

LLOYD, S. Effect of pregnancy and lactation upon infection. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v. 4, p.153-276, 1983.

MAIZELS, R.M. et al. Protease inhibitors. In:___. **Parasite antigens, parasite genes**: A laboratory manual for molecular parasitology. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 103-104.

MEEUSEN, E.N.T.; BALIC, A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites. **Parasitology Today**, Amsterdam, v.16, p.95-101, 2000.

MIA, S.; DEWAN, M.L.; UDDIN, M. et al. The route of infection of buffalo calves by *Toxocara* (*Neoascaris*) *vitulorum*. **Tropical Animal Health Production**, Edinburgh, v.7, p.153-156, 1975.

MILLER, T.A. Vaccination against the canina hookhorm disease. **Advances in Parasitology**, London, v.9, p.153-183, 1971.

NEVES, M.F. **Infecção por *Toxocara vitulorum* em bezerros búfalo (*Bubalis bubalis*) com ênfase ao papel de mastócitos e eosinófilos.** 2001. 80p. Dissertação (Mestrado-Sistema de Produção Animal) - Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.



NOBLE, E.R.; NOBLE, G.A. **Parasitology:** the biology of animal parasites. Philadelphia: Ed. Lea & Febiger (USA), 1989. 574 p.

NUNES, C.M.; TUNDISI, R.N.; HEINEMANN, M.B.; et al. Toxocariasis: Serological diagnosis by indirect antibody competition ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, p.95-100, 1999.

OLSON, L.J. Organ distribution of *Toxocara canis* larvae in normal mice and in mice previously infects with *Toxocara, Ascaris* or *Trichinella*. **Texas Reports on Biology and Medicine**, Galveston, v.20, p.651, 1961.

OMAR, H.M.; BARRIGA, O.O., Biology and pathophysiology of *Toxocara vitulorum* infections in a rabbit model. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.40, p.257-266, 1991.

OSHIMA, T. Standardization of techniques for infecting mice with *Toxocara* canis and observations on the normal migrations routes of the larvae. **Journal of Parasitology,** Lancaster, v.47, p.652, 1961.

OVINGTON, K. S.; BEHM, C. The enigmatic eosinophil: investigation of the biological role of eosinophils in parasitic helmint infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v.92, Supl., p. 93-104, 1997.

PAGE, A.P.; RICHARDS, D. T.; LEWIS, J. W.; OMAR, H. M.; MAIZELS, R. M. Comparison of isolates and species of *Toxacara* and *Toxocaries* by biosynthetic labeling of somatic and ES proteins from infective larvae. **Parasitology**, Cambridge, v. 103, p.451-464, 1991.

PARSONS, J.C. & GRIEVE, R.B. Kinetics of trapping of infective larvae in murine toxocariasis. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v.76, p.529-536, 1990.

PATNAIK, M.M.; PANDE B.P. Notes on the helminthic infestations encountered in one month old buffalo calves. **The Indian Veterinary Journal**, Madras, v.40, p.128-133, 1963.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

RAJAPAKSE, R.P.V.J.; VASANTHATHILAKE, V.W.; LLOYD, S.; FERNANDO, S.T. Collection of eggs and hatching and culturing second-stage larvae of *Toxocara vitulorum* in vitro. **The Journal of Parasitology**, Lancaster, v.78, p.1090-1092, 1992.

RAJAPAKSE, R.P.V.J.; LLOYD, S.; FERNANDO, S.T. The effect of serum and colostrums immunoglobulins from buffaloes infected with *Toxocara vitulorum* on *T. vitulorum* larvae in vitro and in vivo in mice. **Parasitology Research**, Belfast v.80, p.426-430, 1994a.

RAJAPAKSE, R.P.V.J.; LLOYD, S.; FERNANDO, S.T. *Toxocara vitulorum*: maternal transfer of antibodies from buffalo cows (*Bubalus bubalis*) to calves and levels of infection with *Toxocara vitulorum* in the calves. **Research in Veterinary Science**, London, v.57, p.81-87, 1994b.

REFUERZO, P.G.; ALBIS-JIMENEZ, F.S.; DE LA CERNA, G. Studies on *Neoascaris vitulorum* (Goeze, 1782), I. Observations on the morphology of the ova and of their development to the infective stage, with notes on feeding experiments. **The Philippine Journal of Animal Industry**, Manila, v. 13, p.15-22, 1952.

REFUERZO, P. G.; ALBIS-JIMENEZ, F. S. Studies on *Neoascaris vitulorum*. III. Further observations on inoculation of calves with notes on prenatal infection. **American Journal Veterinary Research**, Chicago, v.15, p.532-534, 1954.

ROBERTS, J.A. The life cycle of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal for Parasitology**, Elmsford, v.20, p.833-840. 1990a.

ROBERTS, J.A. The egg production of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.37, p.113-120, 1990b.

ROBERTS, J.A. *Toxocara vitulorum* in ruminants. **Helminthological Abstract**, Farnham Royal, v.62, p.151-174, 1993.

SIMECKA, J.W. Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. **Advanced Drug Delivery Reviews,** Amsterdam, v.34, p.235-259, 1998.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 11 12 13 14 15 16 17 18

SMITH, H.V. A rapid method for hatching infective eggs of *Toxocara canis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.83, p.215, 1989.

SOUZA, E.M. **Respostas imunológicas de búfalos (*Bubalus bubalis*) infectados naturalmente por *Toxocara vitulorum*.** Ilha Solteira, 2001. 92p. Dissertação (Mestrado- Sistema de Produção animal) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

SRIVASTAVA, S.C. *Neoascaris vitulorum* (Goeze, 1782) Travassos, 1907 in intestinal perforation with its localization in liver of buffalo calves. **The Indian Veterinary Journal**, Madras, v.40, p.758-762, 1963.

STARKE, W.A.; MACHADO, R.Z.; ZOCOLLER, M.C. Curso natural das helmintoses gastrintestinais em búfalos no Município de Andradina -SP. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.35, p.651-664, 1983.

STARKE, W.A; MACHADO, R.Z.; ZOCOLLER, M.C. Transmissão transmamária de larvas de nematóides gastrintestinais a bezerros búfalos. II. Larvas de *Toxocara vitulorum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.44, p.97-103, 1992.

STARKE, W.A.; EVANGELISTA, F.M.M.; ZOCOLLER, M.C. *Toxocara vitulorum* (Nematoda, Ascarididae): Estudos Morfológicos e Biológicos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 8, 1993, Londrina. **Anais...** Londrina: Sociedade Rural do Paraná, 1993. p. H6.

STARKE, W. A.; MACHADO, R. Z.; BECHARA, G. H.; et al. Skin hypersensitivity tests in buffaloes parasitized with Toxocara vitulorum. **Veterinary Parasitology,** Amsterdam, v.63, p.283-290, 1996.

STARKE-BUZETTI, W. A.; MACHADO, R. Z.; ZOCCOLER-SENO, M. C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Toxocara vitulorum* in water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.97, p.55-64, 2001.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

STOLL, N.R. The occurrence of self-cure and protection in typical nematode parasitism. **Journal of Parasitology**, Lancaster, v.15, p.147-148, 1929.

TAFFS, L.F. Immunological studies on experimental infection of pigs with *Ascaris suum* (Goeze, 1782). III. The antibody response and acquired immunity. **Journal of Helminthology**, London, v.38, p. 129-150, 1964.

TAWFIK, M.A.A. Pathological changes induced by the migration of *Neoascaris vitulorum* in white rats. **Egyptiam Journal Veterinary Science**, Cairo, v.12, p.85-88, 1975.

TONGSON, M.S. *Neoascaris vitulorum* larvae in milk of Murrah buffalo. **Philipine Journal Veterinary Medicine**, Quezon, v.10, p.60-64, 1971.

VIDOTTO, O. **Considerações sobre o estádio evolutivo da larva infestante de *Neoascaris vitulorum* (Goeze 1782) Travassos, 1927, nematódeo parasita de ruminantes.** São Paulo, 1980. 20p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Parasitologia) - Universidade de São Paulo.

WARREN, E.G. Studies on the morphology and taxonomy of the genera *Toxocara* Stiles, 1905 and *Neoascaris* Travassos, 1927. **Zoologischer Anzeiger**, Jena, v.185, p.393-442, 1970.

WARREN, E.G. Observations on the migration and development of *Toxocara vitulorum* in natural and experimental hosts. **International Journal for Parasitology**, Elmsford, v.1, p.85-99, 1971.

WHITLOCK, H.V. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. **Journal Science Research Australian,** v.21, p.177-180, 1948.

cm 1 2 3 4 5 6 7 unesp 1 12 13 14 15 16 17 18

ANEXOS

TABELA 01 - Análise de variância referente ao número de larvas de *Toxocara vitulorum* encontradas nos tecidos de camundongos imunizados com antígenos (Ex, ES e Pe) e não imunizados (controle), nos períodos de 7 horas, 4 dias e 30 dias.

CAUSAS DA VARIAÇÃO	QUADRADOS MÉDIOS						
	ID	IG	FÍGADO	CORAÇÃO	PULMÃO	CÉREBRO	MÚSCULO
Período	20,8124*	1314,8484*	186,6599*	0,0000	29,2837*	0,2683ns	1,1001ns
Tratamento	1,4572ns	82,5138*	25,7626*	0,0000	2,3440ns	0,3280ns	1,4259ns
Período tratamento	0,9231ns	73,6965*	18,3089*	0,0000	4,3722*	0,1491ns	0,5148ns
Resíduo	1,7900	5,6800	4,2175	0,0000	1,4760	0,2683	0,5472
Média geral	1,64	5,77	2,88	0,00	2,03	1,16	1,25
CV (%)	81,29	41,30	71,34	00,00	59,84	64,42	59,05

* - Significativo a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey
ns – Não significativo pelo teste F
Obs: Dados transformados em $(x + 1)^{1/2}$

TABELA 02 - Teste de Tukey referente às médias das contagens de larvas *de Toxocara vitulorum* em diferentes tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES, Pe) e os não imunizados (controle).

TRATAMENTO	MÉDIAS DAS CONTAGENS						
	ID	IG	FÍGADO	CORAÇÃO	PULMÃO	CÉREBRO	MÚSCULO
CONTROLE	3,33 a	176,67 a	46 a	0 a	8,87 a	1,33 a	3,33 a
EX	6 a	95,33 b	6 b	0 a	5,33 a	0 a	0 a
ES	1,33 a	14,67 c	18,67 ab	0 a	6,67 a	0 a	0,67 a
PE	5,33 a	8,2 b	9,33 b	0 a	2,67 a	0,67 a	0,67 a

Obs: Letras diferentes na vertical indicam diferença significativa ($p<0,005$)
ID = intestino delgado
IG = intestino grosso

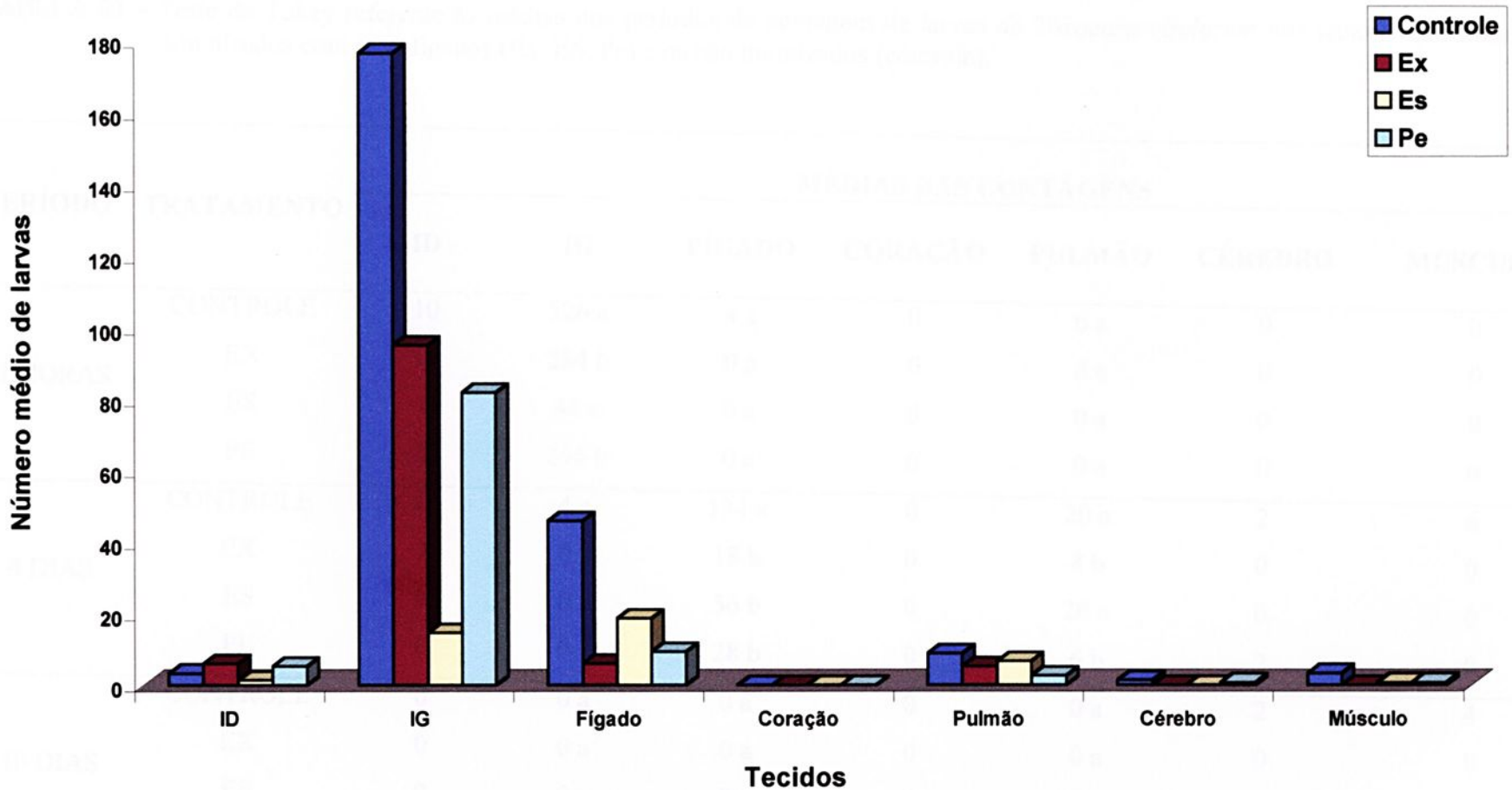


FIGURA 1 - Teste de Tukey referente às médias das contagens de larvas de *Toxocara vitulorum* em diferentes tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES e Pe) e não imunizados (controle).

TABELA 03 - Teste de Tukey referente às médias dos períodos de contagem de larvas *de Toxocara vitulorum* nos tecidos de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES, Pe) e os não imunizados (controle).

PERÍODO	TRATAMENTO	MÉDIAS DAS CONTAGENS						
		ID	IG	FÍGADO	CORAÇÃO	PULMÃO	CÉREBRO	MÚSCULO
7 HORAS	CONTROLE	10	526 a	4 a	0	6 a	0	0
	EX	16	284 b	0 a	0	8 a	0	0
	ES	4	44 c	0 a	0	0 a	0	0
	PE	16	246 b	0 a	0	0 a	0	0
4 DIAS	CONTROLE	0	4 a	134 a	0	20 a	2	6
	EX	2	0 a	18 b	0	8 b	0	0
	ES	0	0 a	56 b	0	20 a	0	0
	PE	0	0 a	28 b	0	6 b	2	0
30 DIAS	CONTROLE	0	0 a	0 a	0	0 a	2	4
	EX	0	0 a	0 a	0	0 a	0	0
	ES	0	0 a	0 a	0	0 a	0	2
	PE	0	0 a	0 a	0	2 a	0	2

Obs: Letras diferentes na vertical indicam diferença significativa ($p<0,005$)
ID = intestino delgado ; IG = intestino grosso ; O que não apresentar letras, não foi realizado o desdobramento pelo teste de Tukey, tendo em vista que não houve interação significativa na análise de variância.

TABELA 04 - Teste de Tukey referente às médias das contagens de larvas *de Toxocara vitulorum* no fígado e pulmão de camundongos imunizados com os antígenos (Ex, ES, Pe) e os não imunizados (controle).

TRATAMENTO	MÉDIAS DAS CONTAGENS*	
	FÍGADO	PULMÃO
CONTROLE	11,21 a	4,47 a
ES	7,23 ab	4,47 a
Pe	5,29 b	2,73 ab
Ex	3,48 b	2,23 b

* Médias transformadas segundo a raiz (x-0,5)